

Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles / Université libre de Bruxelles Institutional Repository Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

Bunel, V. (2014). Recherche de nouvelles substances naturelles d'intérêt dans la prévention de la fibrose rénale d'origine médicamenteuse (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté de Pharmacie, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/209222/4/d63d7981-d201-478d-809b-14e9f586d81e.txt

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à

prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que : - Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;

- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;

- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

------ English Version ------

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is

invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;

- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES, UNIVERSITÉ D'EUROPE



Faculté de Pharmacie

Ecole doctorale en Sciences Pharmaceutiques

Recherche de nouvelles substances naturelles d'intérêt dans la prévention de la fibrose rénale d'origine médicamenteuse

Valérian BUNEL

Promoteur Prof. Caroline STÉVIGNY (Laboratoire de Pharmacognosie, de Bromatologie et de Nutrition Humaine)

Co-promoteurs Prof. Marie-Hélène ANTOINE (Laboratoire de Néphrologie Expérimentale, ULB) Prof. Pierre DUEZ (Laboratoire de Chimie Thérapeutique et de Pharmacognosie, UMons)

Composition du jury

Dr. Anne-Émilie DECLÈVES, Faculté de Médecine, ULB Prof. Jean-Michel KAUFFMANN, Faculté de Pharmacie, ULB (Président) Prof. Véronique MATHIEU, Faculté de Pharmacie, ULB Prof. Joëlle NORTIER, Faculté de Médecine, ULB Prof. Stéphanie POCHET, Faculté de Pharmacie, ULB (Secrétaire) Prof. Joëlle QUETIN-LECLERCQ, Faculté de Pharmacie et des Sciences Biomédicales, UCL



cadémique 2014-2015

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Professeur Caroline Stévigny d'avoir accepté d'encadrer cette thèse de doctorat, ainsi que le Professeur Pierre Duez, de m'avoir accueilli au Laboratoire de Pharmacognosie, de Bromatologie et de Nutrition Humaine. Grâce à eux, mes travaux de thèse ont pu débuter dans un environnement scientifiquement dynamique et stimulant. Ils m'ont en outre vite donné l'opportunité de participer à un meeting au cours duquel j'ai pu rencontrer le Professeur Joëlle Nortier, qui m'ouvrit rapidement les portes de son Laboratoire de Néphrologie Expérimentale (Faculté de Médecine, ULB). Je remercie également le Professeur Marie-Hélène Antoine pour m'avoir initié et guidé dans les techniques de culture cellulaire, ainsi que pour m'avoir conseillé et orienté jour après jour sur cette *terra incognita* qu'était la Néphrologie.

Pour l'élaboration de cette collaboration qui me permit d'obtenir un financement FNRS-FRIA, ainsi que pour m'avoir accompagné tout au long de mes travaux, je leur exprime ma plus profonde reconnaissance. C'est grâce à leurs incroyables expertises et esprits scientifiques ainsi qu'à leur extraordinaire sens humain que j'ai pu évoluer dans un environnement propice à la recherche. Sans eux, cette thèse n'aurait pas pu voir le jour.

Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude envers les personnes qui ont contribué – ne serait-ce qu'indirectement – à la réalisation de cette thèse de doctorat.

Merci à tout l'équipe Plantnut, et notamment à ses pierre-angulaires, Marie Faes et Olivier Vaillant, qui contribuent chaque jour à permettre à de nombreux chercheurs internationaux (doctorants, stagiaires, visiteurs,...) de progresser dans leurs travaux. Merci également à mes collègues (Carole, Catherine, Jacob, Jérémie, Laurent, Luc, Léocadie, Philippe) pour la bonne ambiance qu'ils ont pu apporter au laboratoire.

Je suis également très reconnaissant envers l'équipe du Laboratoire de Néphrologie Expérimentale, qui m'a permis d'évoluer tout au long de ces 4 années de doctorat. Je ne remercierai jamais assez Thomas Baudoux, Cécile Husson et Eric Deprez pour leur aide précieuse et leur soutien de tous les jours. Qu'ils trouvent en ces quelques lignes les remerciements amplement mérités pour leurs conseils en cytométrie de flux, PCR, décontamination microbienne,... A tous, je vous adresse les plus chaleureux remerciements pour nos débats concernant l'utilisation des méthodes statistiques, pour nos échanges de points de vue sur la culture cellulaire, pour nos concertations relatives aux pannes d'appareillages,...

Ma gratitude va aussi au Professeur Stéphanie Pochet, présidente de mon Comité d'Accompagnement, qui a su veiller chaque année au bon déroulement de mes travaux.

Je remercie également les personnes ayant accepté de se porter membre du jury et d'évaluer justement cette thèse, en dépit d'un emploi du temps souvent très chargé.

Finalement, je formule une dernière pensée à mes parents, mon frère, mes amis,... et plus particulièrement à ma compagne, Sylvie, qui a souffert des sacrifices qu'exige la réalisation d'une thèse de doctorat. Merci à tous pour votre aide, vos encouragements et votre présence.

Résumé

Les reins sont les organes cibles de nombreuses molécules toxiques. Les cellules épithéliales du tubule proximal rénal sont particulièrement vulnérables vis-à-vis de xénobiotiques utilisés comme médicaments ou non. Ces agressions peuvent être corrélées à une augmentation du stress oxydatif et induire la mort cellulaire. Elles peuvent également mener à la perte des caractéristiques phénotypiques des cellules épithéliales, initiant leur dédifférenciation en cellules mésenchymateuses et éventuellement en fibroblastes, principaux responsables de la fibrose rénale.

Les stratégies de protection – notamment implémentées en clinique lors de l'administration de médicaments néphrotoxiques – reposant sur une approche pharmacologique restent rares.

A partir de données de médecines traditionnelles, nous avons sélectionné une série de plantes considérées utiles pour le traitement ou la prévention de troubles associés aux maladies rénales : Angelicae sinensis radix, Eleutherococci radix, Ginseng radix, Schisandrae chinensis fructus et Silybi mariani fructus.

A l'aide d'un modèle *in vitro* reposant sur l'emploi de la lignée cellulaire HK-2, nous avons examiné si ces produits pouvaient apporter une protection efficace vis-à-vis de 3 xénobiotiques néphrotoxiques : les acides aristolochiques, le cisplatine et la ciclosporine. Cinq phénomènes impliqués dans la néphrotoxicité et couramment retrouvés lors du développement de la fibrose rénale ont été investigués : *(i)* la mortalité cellulaire et l'apoptose ; *(ii)* la génération de stress oxydatif ; *(iii)* la modulation des capacités de régénération ; *(iv)* la production de matrice extracellulaire ; et *(v)* l'activation de la voie de signalisation de la β -caténine.

Parmi les 5 plantes étudiées sur ce modèle, celle présentant l'activité la plus intéressante vis-à-vis de l'un des 3 toxiques a été investiguée plus en détails afin d'identifier le(s) composé(s) responsable(s) de sa bioactivité. Les résultats ont indiqué que l'extrait méthanolique d'*Angelica sinensis* était le plus efficace pour réduire la néphrotoxicité induite par le cisplatine. Ces principes actifs – l'acide férulique, le Z-ligustilide et le E-ligustilide – ont été testés selon la même méthodologie.

L'acide férulique a été le plus efficace pour améliorer la survie cellulaire et diminuer l'apoptose induite par le cisplatine. Il a également permis de réduire la production de matrice extracellulaire, de stimuler les capacités de régénération de cellules saines et d'inhiber partiellement la voie de signalisation de la β-caténine. Il n'a toutefois pas été capable de limiter la génération de stress oxydatif induite par le traitement au cisplatine.

L'acide férulique semble être un candidat prometteur pour protéger les tubules rénaux vis-à-vis du cisplatine et pourrait contribuer à limiter l'initiation et le développement de la fibrose rénale.

Abstract

The kidneys are targets of numerous toxic compounds. Proximal tubular epithelia cells are particularly vulnerable to xenobiotics used as drugs or not. These injuries can be associated with an increased oxidative stress and can trigger cell death. They can also lead to the loss of phenotypic characteristics of epithelial cells and initiate their dedifferentiation in mesenchymal cells, eventually evolving in fibroblasts, major actors responsible for renal fibrosis.

Protective strategies – including those implemented in clinical practice during the administration of nephrotoxic drugs – relying on a pharmacological approach remain seldom.

By means of data issuing from traditional medicines, we selected a series of herbs potentially useful for the treatment or prevention of troubles associated with kidney diseases: Angelicae sinensis radix, Eleutherococci radix, Ginseng radix, Schisandrae chinensis fructus and Silybi mariani fructus.

Using an *in vitro* model based on HK-2 cell line, we examined if these herbal products could bring an effective protection towards 3 nephrotoxic drugs: aristolochic acids, cisplatin and ciclosporin. Five phenomena involved in nephrotoxicity and regularly occurring during the progression of renal fibrosis were investigated: (*i*) cell death and apoptosis; (*ii*) oxidative stress generation; (*iii*) modulation of regeneration capacities; (*iv*) extracellular matrix production; and (*v*) β -catenin pathway activation.

Among the 5 herbs that were studied, the one presenting the most interesting effects towards one of the 3 toxicants has been investigated in details in order to identify the compound(s) responsible for its bioactivity. Results indicated that the crude methanolic extract of *Angelica sinensis* was the most potent for reducing cisplatin-induced nephrotoxicity. Its active principles – ferulic acid, Z-ligustilide and E-ligustilide – were tested according to the same methods.

Ferulic acid was the most potent compound for improving cell survival and for alleviating cisplatineinduced apoptosis. It also allowed to restrain the extracellular matrix production, enhanced the regeneration capacities of healthy cells and partially inhibited the activation of the β -catenin pathway. It was however ineffective in preventing the generation of oxidative stress induced during cisplatin treatment.

Ferulic acid appears as a promising candidate for protecting renal tubules against cisplatin's nephrotoxicity and could contribute to limit the onset and progression of renal fibrosis.

Abréviations

A : absorbance AA : acides aristolochiques AAN : aristolochic acid nephropathy = néphropathies aux acides aristolochiques ADH : antidiuretic hormone = hormone anti-diurétique ou vasopressine ADN : acide désoxyribonucléique AINS : anti-inflammatoire non-stéroïdien ARA : atteinte rénale aiguë (N.B.: ce terme remplace celui d'IRA (insuffisance rénale aiguë), soit AKI (acute kidney injury) ou ARF (acute renal failure) en anglais). ARN : acide ribonucléique AS : extrait d'Angelica sinensis α-SMA : α-smooth muscle actin BCA : acide bicinchoninique CAT : catalase CHN : chinese herb nephropathy = néphropathie aux plantes chinoises CisPt : cisplatine CsA : ciclosporine A cTGF : connective tissue growth factor Ctr1 : copper transporter 1 = transporteur de cuivre 1 DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole DFG : débit de filtration glomérulaire DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium DMSO : diméthylsulfoxyde DPA : dialyse péritonéale automatisée DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire EGF : epidermal growth factor = facteur de croissance épidermique eGFR : estimated alomerular filtration rate = débit de filtration glomérulaire estimé E-lig = E-ligustilide EMT : epithelial-to-mesenchymal transition = transition épithélio-mésenchymateuse EndoMt : endothelial-to-mesenchymal transition = transition endothélio-mésenchymateuse EPO : érythropoïétine ES : extrait d'Eleutherococcus senticosus ET : écart type FA : ferulic acid = acide férulique FBS : fetal bovine serum = sérum bovin fœtal FITC : isothiocyanate de fluorescéine GSH-Px : glutathion peroxydase H2DCF-DA : diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine HPLC : high-performance liquid chromatography = chromatographie liquide haute performance IC : inhibitory concentration = concentration inhibitrice IRT : insuffisance rénale terminale

MEC : matrice extracellulaire

MMP : matrix metalloproteinase = métalloprotéinase matricielle

MRC : maladie rénale chronique (N.B.: ce terme remplace celui d'IRC (insuffisance rénale chronique),

soit CKD (chronic kidney disease) ou CRF (chronic renal failure) en anglais).

MS : mass spectrometry = spectrométrie de masse

MTC : médecine traditionnelle chinoise

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit

NO : nitric oxide = oxyde nitrique

NOS : nitric oxide synthase = oxyde nitrique synthase

NTA : nécrose tubulaire aiguë

OAT : organic anion transporter = transporteur d'anions organiques

OCT : organic cation transporter = transporteur de cations organiques

PAAS : principes actifs d'Angelica sinensis

PBS : phosphate buffered saline = tampon phosphate salin

PCR : polymerase chain reaction = réaction en chaîne par polymérase

PG : extrait de Panax ginseng

P-gp: P-glycoprotéine

PI : iodure de propidium

PNF : pression nette de filtration

PSR : picrosirius red = rouge picrosirius

QFIA : quantitative fluorescence image analysis = analyse quantitative d'image en fluorescence

RNS : reactive nitrogen species = espèces réactives de l'azote

ROS : reactive oxygen species = espèces réactives de l'oxygène

RPTECs : renal proxima' tubular epithelial cells = cellules épithéliales du tubule proximal

RT-qPCR : real-time quantitative polymerase chain reaction

SF : serum-free = milieu de culture dépourvu de sérum

SM : extrait de Silybum marianum

Smad 2/3 : small mothers against decapentaplegic 2/3

SOD : superoxyde dismutase

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

TCD : tubule contourné distal

Tcf/Lef : T cell factor/lymphoid enhancer factor

TCP : tubule contourné proximal

TEAC : Trolox® equivalent antioxidant capacity = capacité antioxydante en équivalent Trolox®

TGF-β : transforming growth factor-β

TNF- α : tumor necrosis factor- α = facteur de nécrose tumorale- α

TRR : thérapie de remplacement rénal

UUO : unilateral ureteral obstruction = obstruction unilatérale urétérale

VG : violet de gentiane

Z-lig = Z-ligustilide

<u>Remarque</u> : compte tenu de leur utilisation consensuelle dans la littérature scientifique, c'est la forme anglaise de certaines abréviations qui sera adoptée dans le présent document.

Table des matières

Remerciement	s I
Résumé	
Abstract	iv
Abréviations	v
Table des mati	èresvii
1. Introductio	n1
1.1. Le rein	et ses pathologies 2
1.1.1. Des	scription générale du rein2
1.1.1.1.	Rappels anatomiques 2
1.1.1.2.	Physiologie rénale7
1.1.2. Les	pathologies rénales
1.1.2.1.	L'atteinte rénale aiguë
1.1.2.2.	La maladie rénale chronique14
1.1.2.3.	Etiologies des insuffisances rénales18
1.1.3. Pris	se en charge de l'insuffisance rénale22
1.1.3.1.	Biopsie rénale
1.1.3.2.	Mesures conservatrices
1.1.3.3.	Dialyse
1.1.3.4.	Transplantation rénale
1.1.3.5.	Prise en charge pharmacologique
1.2. Physiop	athologie des atteintes rénales
1.2.1. Né	crose tubulaire aiguë
1.2.1.1.	Atteintes cytotoxiques engendrées par le stress oxydatif 25
1.2.1.2.	Mort cellulaire
1.2.1.3.	Perte de l'adhérence cellulaire
1.2.2. Ré	génération tubulaire
1.2.3. Tra	nsition épithélio-mésenchymateuse et fibrose 29
1.2.4. Inf	iltrat inflammatoire
1.2.5. Fac	teurs vasculaires
1.3. Xénobi	otiques néphrotoxiques
1.3.1. Les	acides aristolochiques
1.3.1.1.	Rappels historiques sur la néphropathie aux acides aristolochiques
1.3.1.2.	Stratégie de néphroprotection
1.3.1.3.	De la néphropathie aux plantes chinoises aux carcinomes urothéliaux
1.3.1.4.	Autres cas de néphropathies aux acides aristolochiques dans le monde
1.3.1.5.	Néphropathie dite endémique des Balkans 40

1.3.1.6.	Néphrotoxicité des acides aristolochiques	40
1.3.2. Le	cisplatine	42
1.3.2.1.	Rappels historiques	42
1.3.2.2.	Mécanisme d'action	42
1.3.2.3.	Données pharmacothérapeutiques	44
1.3.2.4.	Dérivés du platine	45
1.3.2.5.	Néphrotoxicité du cisplatine	46
1.3.2.6.	Stratégies de néphroprotection	47
1.3.3. La	ciclosporine A	48
1.3.3.1.	Rappels historiques	48
1.3.3.2.	Mécanisme d'action	49
1.3.3.3.	Données pharmacothérapeutiques	49
1.3.3.4.	Néphrotoxicité de la ciclosporine	50
1.3.3.5.	Stratégies de néphroprotection	51
1.3.4. Au	itres agents néphrotoxiques	52
1.4. Plantes	s médicinales considérées comme néphroprotectrices abordées dans ce travail	53
1.4.1. Ar	ngelica sinensis (Oliv.) Diels	53
1.4.1.1.	Description botanique	53
1.4.1.2.	Description phytochimique	54
1.4.1.3.	Usages médico-traditionnels	55
1.4.1.4.	Données pharmacothérapeutiques	55
1.4.1.5.	Potentiel néphroprotecteur	56
1.4.2. El	eutherococcus senticosus (Rupr. & Maxim.) Maxim	58
1.4.2.1.	Description botanique	58
1.4.2.2.	Description phytochimique	58
1.4.2.3.	Usages médico-traditionnels	59
1.4.2.4.	Données pharmacothérapeutiques	60
1.4.2.5.	Potentiel néphroprotecteur	61
1.4.3. Pc	anax ginseng C.A. Meyer	62
1.4.3.1.	Description botanique et pharmaceutique	62
1.4.3.2.	Description phytochimique	63
1.4.3.3.	Usages médico-traditionnels	65
1.4.3.4.	Données pharmacothérapeutiques	65
1.4.3.5.	Potentiel néphroprotecteur	67
1.4.4. Sc	hisandra chinensis (Turcz.) Baill	69
1.4.4.1.	Description botanique	69
1.4.4.2.	Description phytochimique	70
1.4.4.3.	Usages médico-traditionnels	71
1.4.4.4.	Données pharmacothérapeutiques	71
1.4.4.5.	Potentiel néphroprotecteur	72

1.4.5. Silybum marianum (L.) Gaertn	73
1.4.5.1. Description botanique	73
1.4.5.2. Description phytochimique	74
1.4.5.3. Usages médico-traditionnels	75
1.4.5.4. Données pharmacothérapeutiques	75
1.4.5.5. Potentiel néphroprotecteur	76
2. Objectifs du travail	79
3. Matériel et méthodes	81
3.1. Matériel végétal et préparation des extraits	82
3.2. Réactifs	83
3.3. Analyses phytochimiques	83
3.3.1. Analyse de l'extrait d'A. sinensis	83
3.3.1.1. Dosage de l'acide férulique	83
3.3.1.2. Dosage du Z-ligustilide	84
3.3.2. Analyse de l'extrait d'E. senticosus	84
3.3.3. Analyse de l'extrait de P. ginseng	84
3.3.4. Analyse de l'extrait de 5. chinensis	85
3.3.5. Analyse de l'extrait de S. marianum	85
3.3.6. Recherche d'activité antioxydante	85
3.4. Cultures cellulaires	86
3.5. Protocole expérimental	
3.6. Détermination des doses de travail	88
3.6.1. Test au MTT	88
3.6.2. Test à la résazurine	89
3.6.3. Test au violet de gentiane	90
3.6.4. Dosage des protéines	
3.6.5. Mise en équation des courbes de survie	
3.7. Etude de la mortalité cellulaire	
3.7.1. Evaluation de la survie	
3.7.2. Mesures d'apoptose	
3.8. Mesure du statut oxydatif	
3.9. Production de matrice extracellulaire – dosage du collagène	
3.10.Relocalisation de la β-caténine	
3.10.1. Perte de β-caténine membranaire	
3.10.2. Acquisition de β-caténine intracytoplasmique/nucléaire	
3.11.Caractérisation phénotypique par RT-qPCR	
3.12.Recherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire	100
3.12.1. Evaluation de la prolifération cellulaire par l'index Ki-67	100
3.12.2. Analyse des phases du cycle cellulaire	101
3.12.3. Test de cicatrisation	103

3.13.Analyses statistiques	
4. Résultats et discussion	
4.1. Analyse phytochimique des extraits de plantes	
4.1.1. Analyse de l'extrait d'A. sinensis	
4.1.2. Analyse de l'extrait de E. senticosus	
4.1.3. Analyse de l'extrait de P. ginseng	
4.1.4. Analyse de l'extrait de S. chinensis	
4.1.5. Analyse de l'extrait de S. marianum	112
4.2. Détermination des doses de travail	113
4.2.1. Détermination des doses de travail pour les 3 substances néphro	otoxiques 113
4.2.2. Détermination des doses de travail pour les extraits de plantes	115
4.3. Recherche d'effets néphroprotecteurs des extraits bruts	
4.3.1. Mesures de survie cellulaire	
4.3.2. Protection vis-à-vis du stress oxydatif	120
4.3.3. Quantification du collagène	
4.3.4. Mesures de β-caténine aux niveaux membranaire ou nucléaire	
4.3.5. Recherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire	123
4.3.6. Sélection de l'extrait le plus intéressant	
4.4. Recherche d'effets néphroprotecteurs de l'extrait d'Angelica sinensis	vis-à-vis du cisplatine 125
4.4.1. Mesures de survie cellulaire	
4.4.1.1. Estimation de la survie cellulaire globale	
4.4.1.2. Evaluation des taux d'apoptose	
4.4.2. Evaluation du statut oxydatif	
4.4.3. Mesure de la production de collagène	
4.4.4. Relocalisation de la β-caténine	
4.4.4.1. Analyse de la forme membranaire de β-caténine	
4.4.4.2. Analyse de la forme cytoplasmique/nucléaire de β-caténine.	
4.4.5. Caractérisation phénotypique par RT-qPCR	
4.4.6. Recherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire	
4.4.6.1. Evaluation de la prolifération cellulaire par l'index Ki-67	
4.4.6.2. Analyse des phases du cycle cellulaire	140
4.4.6.3. Test de cicatrisation	
4.5. Recherche d'effets néphroprotecteurs des composés bioactifs major	itaires d'A. sinensis 144
4.5.1. Mesures de survie cellulaire	145
4.5.1.1. Estimation de la survie cellulaire globale	145
4.5.1.2. Evaluation des taux d'apoptose	
4.5.2. Evaluation du statut oxydatif	149
4.5.3. Mesure des quantités de collagène produites	151
4.5.4. Relocalisation de la β-caténine	152
4.5.4.1. Analyse de la forme membranaire de β-caténine	152

	4.5.4.2.	Analyse de la forme cytoplasmique/nucléaire de β-caténine
	4.5.5. Re	cherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire
	4.5.5.1.	Evaluation de la prolifération cellulaire par l'index Ki-67 154
	4.5.5.2.	Analyse des phases du cycle cellulaire 155
	4.5.5.3.	Test de cicatrisation
5.	Conclusion	générale et perspectives 157
6.	Bibliograph	ie
Ar	nnexes	xii
PL	blications	xxxix

xii

1. Introduction

1.1. Le rein et ses pathologies

Le rein assure un rôle central dans l'organisme. Il filtre près de 200 litres de plasma par jour et excrète dans l'urine les déchets du métabolisme ainsi que les xénobiotiques détoxifiés par le foie. Parallèlement, il intervient dans la régulation de la pression osmotique et des volumes liquidiens en contrôlant l'excrétion d'eau et de sodium, régule la concentration plasmatique de nombreux ions, participe au maintien de l'équilibre acido-basique, régule la pression artérielle et intervient dans la synthèse d'hormones telles que l'érythropoïétine et dans l'hydroxylation de la 25-hydroxyvitamine D.

1.1.1. Description générale du rein

1.1.1.1. Rappels anatomiques

1.1.1.1.1. Anatomie générale du rein

En forme de gros haricots, les reins pèsent environ 150 g et mesurent environ 12 cm de longueur sur 6 de largeur et 3 d'épaisseur. Ils occupent une position rétropéritonéale s'étendant entre les vertèbres thoracique Th₁₂ et lombaire L₃. Les artères et veines rénales, assurant leur circulation sanguine, ainsi que les uretères qui les débarrassent de l'urine formée, s'insèrent au niveau du hile rénal [1, 2].

Chaque rein est entouré par 3 couches de tissus, de la plus interne à la plus externe: (*i*) une capsule fibreuse qui prévient des infections provenant des régions voisines ; (*ii*) une capsule adipeuse qui fixe le rein à la paroi postérieure du tronc et le protège contre les coups ; et (*iii*) un fascia de tissu conjonctif qui lie le rein à la glande surrénale et aux structures voisines [1].

En coupe frontale, le rein laisse apparaitre 2 zones distinctes (Figure 1) : le cortex, de couleur pâle et situé en superficie ; et la médullaire, de couleur plus rouge et située en profondeur [1]. Cette dernière est constituée par 4 à 18 (en moyenne 8) pyramides rénales (ou pyramides de Malpighi), dont le sommet, orienté vers le centre du rein, est appelé papille rénale. Les prolongements du cortex, situés entre les pyramides, sont appelés colonnes rénales. Le cortex rénal et les pyramides rénales sont les deux principales régions du parenchyme rénal, qui constituent la partie fonctionnelle du rein. L'urine produite par les néphrons s'écoule vers le tube collecteur qui aboutit à un calice rénal mineur, puis à un calice majeur. L'urine se jette dans une cavité nommée pelvis (ou bassinet), et parcourt l'uretère jusqu'à la vessie où elle sera momentanément stockée [2, 3].



Figure 1 : anatomie interne du rein.

1.1.1.1.2. Le néphron

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein (Figure 2). On en compte environ un million dans chaque rein, quoique des études récentes aient démontré que leur nombre puisse varier entre 200.000 et 1.800.000. Leur nombre est inversement corrélé au poids de naissance [2]. Mis bout à bout, ils s'étendraient sur près de 70 km [1]. Ils se localisent dans le parenchyme rénal et assurent l'épuration du sang selon 3 mécanismes : la filtration glomérulaire, la sécrétion et la réabsorption tubulaires.



Figure 2 : schéma d'un néphron.

Le corpuscule rénal

Il s'agit d'une sphère de 150 à 250 µm constituée d'un lacis de capillaires situés entre une artériole afférente et une artériole efférente appelés glomérule (Figure 3). Cet amas est entouré par la capsule de Bowman, un bulbe creux en continuité avec le tubule proximal qui reçoit le plasma filtré par la paroi interne du glomérule. En effet, l'endothélium des capillaires est criblé de pores de 75 nm de diamètre, ce qui les rend très poreux à l'eau et à de nombreux solutés sanguins [1]. Les capillaires sont gainés par la membrane basale glomérulaire, composée majoritairement de protéoglycanes et de collagène IV, et sur laquelle s'arriment les podocytes à l'intérieur de la capsule de Bowman. Les podocytes comprennent des pédicelles dont l'écart entre chacun détermine des fentes de filtration. En raison de sa composition polyanionique, la membrane basale glomérulaire joue également un rôle de filtre qui bloque le passage des protéines [2, 4].



Figure 3 : schéma d'un corpuscule rénal [1].

Le tubule

Il mesure environ 3 cm de long et est impliqué dans la réabsorption et la sécrétion de molécules. Il se compose successivement du tube contourné proximal (TCP), de l'anse de Henle (partie descendante puis ascendante) et du tube contourné distal (TCD).

Si TCP et TCD se localisent essentiellement dans le cortex rénal, l'anse de Henle descend quant à elle vers la médullaire. La majorité des néphrons (85 %) se localise au niveau cortical (néphrons corticaux), de sorte qu'une petite partie de leur anse atteint la médullaire (Figure 4). Les autres (néphrons juxta-médullaires) ont une anse qui plonge plus profondément dans la médullaire, un critère d'importance dans la capacité du rein à produire de l'urine concentrée [3].

Sur toute sa longueur, le tubule est tapissé d'une monocouche de cellules épithéliales polaires reposant sur une lame basale. Leur pôle apical est dirigé vers la lumière du tubule, tandis que leur pôle basal s'oriente vers l'interstitium rénal [1].

Les cellules épithéliales du TCP (RPTECs), mesurant 15 à 20 µm, sont de forme cuboïde et pourvues de nombreuses mitochondries et microvillosités. Ces dernières forment au niveau du pôle apical la bordure en brosse, une caractéristique qui permet d'accroître très fortement la surface d'échange avec la lumière tubulaire, de favoriser la réabsorption d'eau et de nombreux solutés présents dans le filtrat, ou d'y sécréter des molécules à éliminer de l'organisme. La membrane basolatérale de ces cellules est également pourvue d'interdigitations qui favorisent les échanges. Les faces latérales présentent des expansions cytoplasmiques qui s'entremêlent avec les cellules voisines [2].



Figure 4 : schéma de néphrons cortical et juxta-médullaire [1].

Le TCP, segment le plus long du néphron, est subdivisé en segments S1, S2 et S3 dont la structure présente de légères variations. Le segment S1 correspond à la première partie du tubule dès la jonction avec le glomérule ; après quelques millimètres il se transforme en segment S2. Si les segments S1 et S2 sont dénommés *pars convoluta*, le segment S3 est appelé *pars recta* et correspond à la dernière portion du TCP plongeant vers la médullaire juste avant l'anse de Henle [2].

L'anse de Henle comprend une partie descendante et une partie ascendante. La première portion de la partie descendante possède des cellules similaires à celles du TCP [1].

Le tube collecteur

Il est le dernier segment du néphron qui collecte l'urine formée le long de plusieurs tubules. Il traverse les pyramides rénales pour déboucher sur les papilles. A l'approche du bassinet, plusieurs tubes fusionnent et forment un conduit plus large [1]. Les cellules épithéliales jouent un rôle dans le maintien de l'équilibre acido-basique du sang et complètent les effets des TCP et de l'anse en régulant la concentration de Na⁺ et d'eau [3].

1.1.1.1.3. L'interstitium

Il est composé par la membrane basale, les capsules de Bowman, l'épithélium des cavités pyélocalicielles, l'adventice des vaisseaux sanguins et la membrane basale des capillaires péri-tubulaires. Son volume est estimé à 5 à 10 % du cortex, alors qu'il atteint 40 % de la médullaire profonde [2]. Cet espace assure le contact et permet donc les échanges entre tubules et capillaires.

En plus d'une matrice extracellulaire (MEC), l'interstitium abrite de nombreuses cellules, notamment des fibroblastes capables de synthétiser l'érythropoïétine (EPO) en réponse à l'activation du facteur induit par l'hypoxie (HIF = hypoxia inducible factor) suivant une hypoxie [5]. D'autres acteurs importants dans la sécrétion d'EPO incluent les cellules endothéliales des capillaires péritubulaires, les cellules de l'épithélium tubulaire ainsi que certains hépatocytes, dont la production fourni 10 % de l'EPO circulante [6].

D'autres fibroblastes de l'interstitium rénal, appelés fibroblastes résidents, sont chargés de maintenir la structure du parenchyme.

Des cellules dendritiques assurent la défense contre des agents pathogènes en déclenchant éventuellement une réponse immunitaire qui implique la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Des macrophages sont également présents, ou peuvent être recrutés par voie sanguine, et sont capables d'initier une réponse inflammatoire.

D'autres composants de l'interstitium sont des terminaisons nerveuses et des vaisseaux lymphatiques [2].

1.1.1.1.4. Les capillaires péritubulaires

Il s'agit d'un réseau de capillaires enchâssés autour du tubule qui ont pour fonction la sécrétion de déchets ainsi que la recapture de l'eau et des solutés réabsorbés par les cellules tubulaires. Les capillaires des néphrons juxta-médullaires, au contraire de ceux des néphrons corticaux, s'enfoncent profondément dans la médulla en accompagnant les anses (= *vasa recta*). Ils jouent ainsi un rôle important dans la formation d'une urine concentrée [3].

1.1.1.1.5. L'appareil juxtaglomérulaire

Il s'agit de structures situées entre le TCD et les artérioles afférentes et efférentes du glomérule. Il est formé par les cellules juxtaglomérulaires comprenant les cellules de la terminaison de l'artériole afférente, de la partie initiale de l'artériole efférente, de cellules mésangiales extraglomérulaires et de la *macula densa* [2, 7]. Les cellules musculaires lisses (myocytes) artériolaires contiennent des vésicules de rénine ; lorsque la pression artérielle chute, ces mécanorécepteurs libèrent cette enzyme du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA).

Les cellules de la *macula densa*, accolées à la paroi du TCD, agissent comme chimiorécepteurs sensibles à la composition électrolytique du filtrat (et notamment à la concentration de sodium). Elles régulent la pression glomérulaire en dilatant ou contractant les artérioles et permettent ainsi de maintenir un débit de filtration glomérulaire (DFG) constant [3].

1.1.1.2. Physiologie rénale

Le néphron permet de maintenir la composition sanguine à un état d'équilibre selon les 3 mécanismes que sont la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire depuis les capillaires péritubulaires vers la lumière tubulaire et la réabsorption tubulaire depuis la lumière tubulaire vers les capillaires péritubulaires. Ces phénomènes permettent d'épurer le plasma sanguin des déchets métaboliques de l'organisme, tout en garantissant la recapture des éléments utiles tels que les nutriments, l'eau et certains ions [3].

Cette fonction est très gourmande en énergie : les reins, dont la masse atteint moins de 1 % de la masse corporelle, consomment 20 à 25 % de l'oxygène de l'organisme pour produire l'ATP nécessaire à leur métabolisme [1].

1.1.1.2.1. La filtration glomérulaire

Chaque minute, les 25 % du débit cardiaque parvenant aux reins apportent environ 1,2 l de sang. De ce volume, une proportion équivalente à 16-20 % s'échappe des artérioles pour constituer le filtrat glomérulaire ; il s'agit de la fraction filtrée qui atteint chaque jour environ 150 l chez la femme et 180 l chez l'homme [8]. Ainsi, les reins assurent la filtration du volume plasmatique entier d'un individu quasiment 60 fois par jour [1].

Le filtrat glomérulaire est majoritairement composé d'eau, constituant le plus abondant du corps humain, que l'on retrouve dans les compartiments intracellulaires (55 à 75 %) et extracellulaires (25 à 45 %). Les électrolytes les plus abondants du compartiment extracellulaire, et donc du filtrat glomérulaire, sont le sodium, le chlore et le bicarbonate. Le sodium est pompé hors des cellules par des Na⁺-K⁺-ATPases, de sorte que 85 à 90 % de ces ions sont présents dans le milieu extracellulaire ; sa concentration plasmatique atteint 140 mM. Le potassium est, quant à lui, principalement intracellulaire, et sa concentration plasmatique est de 4 mM [1].

La barrière glomérulo-capillaire (composée des cellules endothéliales, de la membrane basale et des

podocytes) constitue une membrane de filtration criblée de pores qui ne laissent pas passer les grosses molécules telles que les protéines d'une taille supérieure à 7-8 nm de diamètre (c'est la sélectivité de taille). Ainsi, les protéines de masse inférieure à 15.000 Da sont filtrées librement et celles supérieures à 70.000 Da ne sont pas filtrées du tout [2].

De plus, la membrane basale est composée de protéoglycanes, dont les charges négatives (au pH physiologique) agissent comme une barrière électrostatique. Ainsi, l'albumine, dont le diamètre de 6 nm (66.000 Da) pourrait permettre la filtration, ne passe pas la barrière glomérulaire en raison d'une charge électrique négative provoquant sa répulsion vers les capillaires sanguins ; on parle de sélectivité de charge. Le maintien de l'albumine dans les capillaires confère une pression oncotique suffisante pour empêcher la filtration de tout le plasma vers la chambre glomérulaire.

La filtration du plasma, du glomérule vers la chambre glomérulaire, est conditionnée par la pression nette de filtration (PNF) et est calculée selon la loi de Starling :

PNF = PHg - PHc - PO

Où : PHg est la pression hydrostatique glomérulaire (favorisant la filtration) ; PHc, la pression hydrostatique capsulaire (s'opposant à la filtration) ; et PO, la pression oncotique (due à la présence de protéines dans le sang des capillaires glomérulaires, s'opposant à la filtration) [1].

La PNF est estimée en donnant aux pressions les valeurs suivantes :

PNF = 55 - 15 - 30 = 10 mm Hg

La valeur positive de la PNF est notamment issue du fait que le diamètre de l'artériole glomérulaire efférente est plus faible que celui de l'artériole afférente (ce qui contribue à maintenir une pression hydrostatique élevée). Toutefois, la PNF – et donc le volume de filtrat glomérulaire – peut être influencée par les nerfs du plexus rénal, par des prostaglandines, par l'angiotensine II ou par le NO qui contrôlent le débit rénal au niveau des artérioles afférentes [7, 9].

Finalement, la quantité totale de filtrat glomérulaire produit chaque minute par les 2 reins est appelée débit de filtration glomérulaire (DFG). Chez un homme sain, les quelques 2 millions de glomérules des 2 reins assurent un DFG relativement constant de 120 ml/min ; ce dernier varie relativement peu malgré les conditions pouvant influencer la PNF. En fait, un DFG accru ne permet pas une réabsorption appropriée des substances utiles à l'organisme, alors qu'un DFG affaibli permet la réabsorption de quasiment tout le filtrat, avec les déchets du métabolisme. Ces deux cas de figures conduisent à des situations pathologiques [1].

1.1.1.2.2. La réabsorption tubulaire

La majorité du volume de filtrat glomérulaire est activement réabsorbée par les cellules épithéliales

tubulaires des néphrons et, dans une moindre mesure, par les tubes collecteurs. En effet, 99 % des 150/180 l du filtrat glomérulaire (urine dite primitive) sont réabsorbés quotidiennement, de sorte que 1 à 2 l seulement sont excrétés sous forme d'urine dite définitive [1, 8].

Le mécanisme de réabsorption implique une captation des solutés dans la lumière (pôle apical des cellules tubulaires) et un retour dans les capillaires péritubulaires (pôle basal des cellules tubulaires).

La réabsorption de solutés comme le glucose, les acides aminés, les vitamines, l'urée et les ions tels que Na⁺, K⁺, Ca^{2+,} Cl⁻, HCO₃⁻ (bicarbonate) et HPO₄²⁻(monohydrogénophosphate) se fait selon des mécanismes actifs ou passifs. Certaines substances ne sont au contraire pas ou peu réabsorbées. C'est le cas des molécules azotées produites par le métabolisme de l'organisme telles que l'urée, l'acide urique ou la créatinine (Figure 5). L'urée est suffisamment petite pour être réabsorbée par les pores membranaires (50 à 60 % repassent vers la circulation sanguine ; elle est également sécrétée au niveau de l'anse, de sorte que seulement 10 % de la fraction filtrée retournent vers la circulation), alors que la créatinine, un peu plus grosse et chargée positivement, est principalement filtrée (la quanitité sécrétée reste minoritaire) et s'avère utile pour évaluer le DFG [3].





Acide urique

Figure 5 : structures de la créatinine, de l'acide urique et de l'urée, 3 déchets du métabolisme.

Au niveau du TCP

Sitôt après la filtration glomérulaire, le liquide intraluminal est isotonique et de composition similaire au plasma sanguin (à l'exclusion des grandes protéines). Les cellules épithéliales du tubule proximal (RPTECs) sont les plus actives dans les phénomènes de réabsorption [3].

Quasiment tout le glucose filtré est réabsorbé. Une trop grande concentration de glucose dans le filtrat glomérulaire, comme dans les cas de diabète, est susceptible de saturer les récepteurs et les mécanismes de réabsorption, donnant lieu à une perte de glucose urinaire (= glycosurie).

Le Na⁺ est également rapidement réabsorbé à ce niveau (65 %). L'eau suit le mouvement de Na⁺ par osmose (mécanisme passif) par diffusion transcellulaire et paracellulaire, ainsi que par diffusion facilitée via les aquaporines [8]. La quantité d'aquaporines ne varie pas dans le TCP, alors que leur synthèse peut être activée par l'hormone antidiurétique (ADH) dans les TCD et les tubes collecteurs. Deux grands types de transporteurs sont impliqués dans la réabsorption du Na⁺ : les symporteurs Na⁺ et les antiporteurs Na⁺-H⁺. Les symporteurs Na⁺ permettent une réabsorption par couplage à divers solutés (par exemple le glucose, les acides aminés, l'acide lactique et les vitamines hydrosolubles). Les antiporteurs Na⁺-H⁺, quant à eux, assurent la réabsorption de Na⁺ couplée à la sécrétion de H⁺. Etant donné que l'ion Na⁺ est le plus abondant du filtrat, sa recapture nécessite jusqu'à 80 % de l'énergie (sous forme d'ATP) consommée dans l'ensemble des processus de réabsorption [1].

La plupart des petites protéines et des peptides ayant réussi à traverser la barrière glomérulaire sont en général réabsorbés par endocytose. Ce phénomène est permis par la présence de mégaline (= glycoprotéine 330) et de cubiline (= glycoprotéine 280) sur la membrane apicale des RPTECs [10, 11]. Ces protéines sont des récepteurs multiligands situés entre les microvillosités de la bordure en brosse. La mégaline fixe des protéines de transport (albumine, hémoglobine, lactoferrine, transthyrétine, transcobalamine, protéine de liaison du rétinol ou de la vitamine D), des apoplipoprotéines, des hormones (parathormone (PTH), insuline, EGF, prolactine, thyroglobuline), le plasminogène, la α 1-microglobuline, la β -amylase, les chaines légères des immunoglobulines, le cytochrome C,... La cubiline quant à elle fixe la vitamine B12 et quelques protéines ciblées par la mégaline. Les ligands liés aux complexes mégaline-cubiline sont internalisés par invagination de la membrane grâce à des puits de clathrine. Les RPTECs digèrent ensuite cet endosome afin d'en récupérer les composants utiles à l'organisme [11].

Au niveau de l'anse de Henle

Si la partie descendante réabsorbe environ 15 % de l'eau filtrée, la partie ascendante, dans sa portion large, possède des symporteurs Na⁺-K⁺-2Cl⁻ qui permettent la réabsorption concomitante d'un Na⁺, d'un K⁺ et de 2 Cl⁻ de la lumière du tubule. La partie ascendante n'intervient que très peu dans la réabsorption d'eau, les cellules y étant pratiquement imperméables ; ce qui permet de réguler la concentration de l'urine [8]. Ceci est assuré par un mécanisme à contre-courant qui implique des interactions entre l'urine primitive dans la lumière de l'anse de Henle et le sang dans la *vasa recta*. Chacun des liquides s'écoule dans un sens opposé à l'autre, ce qui permet de créer un gradient osmotique s'étendant du cortex jusqu'aux profondeurs de la médullaire [1].

Au niveau du TCD

Seulement 10 % du NaCl filtré et 25 % de l'eau parviennent au TCD. Situé sur la membrane apicale des cellules, le symporteur Na⁺-Cl⁻ assure la réabsorption des ions sodiques et chlorures. Les cellules du TCD étant normalement imperméables à l'eau, l'ADH peut stimuler la transcription des gènes

codant pour les sous-unités des aquaporines, permettant ainsi une réabsorption complémentaire d'eau [8]. La réabsorption de calcium est sous le contrôle de la parathormone.

Au niveau du tube collecteur

De la même manière que dans le TCD, l'ADH contrôle la quantité d'eau à réabsorber. L'aldostérone, une hormone minéralocorticoïde sécrétée par la glande corticosurrénale, contrôle quant à elle la réabsorption de sodium et la sécrétion de potassium. L'hyperkaliémie, résultant par exemple d'apports alimentaires excédentaires, stimule directement la libération d'aldostérone, alors que l'hypotension et l'hyponatrémie activent le SRAA qui provoquera à son tour la libération d'aldostérone par les surrénales. Cette hormone induit la synthèse de canaux sodiques au niveau des cellules principales, permettant la recapture des ions Na⁺; l'eau suit par osmose, et le K⁺ est rejeté vers la lumière tubulaire. En effet, au pôle basolatéral des cellules principales, la pompe Na⁺-K⁺ échange un ion sodique du cytoplasme contre un ion potassique de la circulation sanguine. La nonréabsorption de K⁺ a pour effet d'abaisser la kaliémie [3].

Le facteur natriurétique auriculaire (ANF) est lui aussi capable de réguler la natrémie ; en réponse à une tension anormalement élevée, les barorécepteurs des oreillettes libèrent le facteur natriurétique auriculaire qui agit en inhibant la réabsorption de Na⁺ au niveau des tubes collecteurs, en s'opposant à la libération d'aldostérone par les surrénales via le SRAA, ou en augmentant le DFG (par modulation de la pression artériolaire) [1].

1.1.1.2.3. La sécrétion tubulaire

En plus de la filtration glomérulaire et de la non-réabsorption de certaines molécules, le rein est doté d'un mécanisme actif permettant d'extraire des molécules des capillaires péritubulaires et de les excréter dans la lumière tubulaire [1].

Afin de maintenir un équilibre acido-basique, les protons (H^+) sont sécrétés par les cellules du TCP par l'intermédiaire de l'antiporteur Na⁺-H⁺, ainsi que par les cellules intercalaires du tubule collecteur. La sécrétion des ions NH₄⁺ se fait au niveau du TCP et du tube collecteur.

Une petite quantité de créatinine (5 à 10 % du plasma) est également sécrétée.

Au niveau des cellules du TCP, les RPTECs sont pourvues de transporteurs capables de réabsorber ou de sécréter diverses molécules ; les transporteurs de cations organiques (OCTs = organic cation transporters), les transporteurs d'anions organiques (OATs = organic anion transporters) ou la Pglycoprotéine (P-gp) sont impliqués dans l'élimination de nombreux médicaments (e.g. la digoxine, la quinidine, la cimétidine, les anthracyclines, la procaïnamide,...) [12]. Les OATs sont localisés au niveau des membranes basolatérale (OAT-1) ou apicale (OAT-4). On distingue également les polypeptides transporteurs d'anions organiques (OATPs), minoritaires au niveau rénal. Les substrats de ces transporteurs sont soit des composés endogènes, tels que l'AMP, le GMP ou les folates, soit des xénobiotiques. L'OAT-1 peut jouer un rôle important dans la sécrétion rénale des antibiotiques β-lactames et des diurétiques. Une inhibition compétitive pour ce transporteur peut apparaître lors de l'administration de plusieurs médicaments. Cette propriété a longtemps été mise à profit dans les traitements par β-lactamines ; l'administration concomitante de probénécide permettant de limiter l'excrétion de l'antibiotique, des doses moindres ont pu être administrées sans pour autant réduire l'efficacité du traitement [12].

Les OCTs sont localisés au niveau basolatéral des RPTECs. Ils assurent l'extraction de cations organiques du sang, notamment des composés endogènes tels que la choline, la dopamine, l'adrénaline, la sérotonine, et la noradrénaline ; mais aussi des xénobiotiques [12].

Les P-gp et les *multidrug resistance-associated proteins* (MRPs) assurent le transport des déchets et des xénobiotiques de la membrane apicale des RPTECs vers la lumière tubulaire [12].

1.1.2. Les pathologies rénales

Lorsque les reins ne parviennent plus à assumer leur fonction d'épuration de l'organisme, notamment liée à la perte de néphrons et de glomérules fonctionnels, il en résulte un état pathologique nommé "insuffisance rénale", laquelle se traduit par une augmentation des taux sanguins d'urée et de créatinine ainsi que par une baisse du pH (acidose métabolique).

L'échelle temporelle caractérisant cette pathologie permet de définir l'insuffisance rénale aiguë (IRA), d'installation brutale et de réversibilité totale ou partielle, de l'insuffisance rénale chronique (IRC), à évolution plus silencieuse et insidieuse mettant plusieurs années à se manifester cliniquement.

Terminologie

Le terme "insuffisance rénale aigüe" (ARF en anglais pour *acute renal failure*) tend à être remplacé par "atteinte rénale aiguë" (ARA ; ou AKI en anglais pour *acute kidney injury*) qui ne fait plus seulement référence à un déficit fonctionnel, mais englobe également une possible altération structurelle du rein.

De la même manière, on parlera plus volontiers de "maladie rénale chronique" (MRC ; ou CKD en anglais pour *chronic kidney disease*) plutôt que "d'insuffisance rénale chronique" (CRF en anglais pour *chronic renal failure*) ; ceci est motivé par le fait qu'une détérioration progressive de la fonction rénale peut rester silencieuse pendant longtemps.

1.1.2.1. L'atteinte rénale aiguë

L'ARA est définie comme une chute brutale ou progresive (en quelques jours) de la filtration glomérulaire, conduisant à l'accumulation dans le sang de toxines urémiques. Malgré son caractère généralement réversible, il s'agit d'une urgence clinique. En effet, cette situation peut nécessiter la mise en place d'une épuration extrarénale par dialyse [13].

Etiologie

Les causes d'ARA sont nombreuses. Elle peut avoir une origine :

Pré-rénale (cause fonctionnelle) si elle est caractérisée par une hypoperfusion des reins, dont les causes comprennent (*i*) une hypovolémie et une hypotension faisant suite à une hémorragie sévère, à une déshydratation liée à des diarrhées ou des vomissements prolongés ou à une cirrhose ; (*ii*) une sténose de l'artère rénale, un choc septique ou anaphylactique, ou une insuffisance cardiaque ; et (*iii*) la prise de médicaments, à savoir les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) [13].

L'origine pré-rénale explique 55 % des cas d'ARA ; et si cette dernière n'induit pas d'altérations structurelles au tissu rénal, elle est généralement contrôlée par de simples mesures thérapeutiques s'attaquant à la cause.

Rénale (cause organique aussi appelée parenchymateuse ou intrinsèque) si elle est causée par des altérations anatomiques du parenchyme rénal résultant (*i*) d'une nécrose tubulaire aiguë, cause la plus fréquente, qu'elle soit d'origine ischémique (hypoperfusion rénale prolongée) ou toxique ; (*ii*) d'une glomérulonéphrite ; ou (*iii*) d'une néphropathie vasculaire. L'ARA d'origine organique peut être due à une intoxication (médicamenteuse ou par contaminant environnemental), à une réaction allergique, à un processus infectieux ou immunologique,... [13]

Elle est à l'origine de 40 % des cas d'ARA.

Post-rénale (cause obstructive) si elle est consécutive à un obstacle entravant l'écoulement des urines, notamment dû à la présence de lithiases rénales ou de tumeurs sur les voies excrétrices inférieures. Le risque d'ARA d'origine post-rénale augmente également chez les hommes souffrant d'hypertrophie bénigne ou de cancer de la prostate [13].

Plus rares, les causes post-rénales ne sont responsables que de 5 % des ARA.

Signes et symptômes

Bien que la maladie sous-jacente dicte le tableau clinique, le signe le plus révélateur reste l'oligurie (débit urinaire < 400 ml/j), mais celle-ci n'est pas systématique. Elle peut évoluer en anurie si le débit urinaire descend en dessous de 100 ml/j. Cependant, dans certains cas la diurèse reste normale

(= ARA à diurèse conservée). Le déficit fonctionnel peut également engendrer une hyperkaliémie (associée à des troubles du rythme cardiaque), un œdème pulmonaire ou une acidose [14].

Diagnostic

Il repose sur la mise en évidence d'une chute du DFG et d'une augmentation de la créatininémie. Les origines obstructives peuvent être objectivées par urographie intraveineuse et par échographie [13].

Traitement

Il dépend de l'origine de l'ARA. La cause pré-rénale nécessite le traitement de la pathologie d'origine (réhydratation, transfusion sanguine,...) ; la fonction urinaire se normalise généralement avec la disparition de la cause. Cependant, si la maladie n'est pas traitée suffisamment tôt, l'ARA fonctionnelle peut se transformer en ARA organique, plus sévère et pouvant occasionner des altérations structurelles [13].

L'ARA organique demande l'identification et le traitement de l'affection en cause. Des séances d'hémodialyse peuvent être nécessaires pendant quelques jours.

Le traitement de l'ARA obstructive vise à lever l'obstacle (chirurgie, ultrasons,...).

Evolution

L'ARA est généralement réversible : la régénération tubulaire permet une restauration plus ou moins rapide des fonctions et structures rénales. Toutefois, le recouvrement peut ne pas être complet, et des épisodes récurrents d'ARA peuvent conduire à une pathologie chronique [15].

1.1.2.2. La maladie rénale chronique

La MRC, caractérisée par l'accumulation de tissu fibrotique, est l'aboutissement de toute pathologie non normalisée touchant le rein, quelle qu'en soit la cause. Ce terme, non spécifique à une étiologie bien déterminée, permet toutefois de définir une altération graduelle, lente et progressive de la fonction rénale se manifestant soit par la présence de lésions rénales (fonctionnelles et/ou structurelles), soit par un DFG inférieur à 60 ml/min/1,73 m² pendant au moins 3 mois [16]. Elle se caractérise par une perte de 60 à 70 % des néphrons.

Etiologie

Les causes sont multiples : pratiquement toutes les maladies impliquant directement ou indirectement le rein peuvent évoluer vers une MRC. On retrouve en outre les étiologies responsables des ARA, et plus particulièrement les maladies touchant directement le tissu rénal (comme le diabète) ou des voies excrétrices (calices, bassinets, uretère, vessie) ; elles peuvent également avoir une origine congénitale ou acquise, notamment via des infections chroniques ou une toxicité cellulaire exercée par certains médicaments ou certains contaminants environnementaux [15, 16].

Symptômes et signes

Dans les stades débutants, la MRC n'entraîne que peu de troubles permettant de la mettre en évidence. Elle est souvent diagnostiquée de manière fortuite (par exemple dans le cadre d'un bilan pour hypertension artérielle à laquelle elle est fréquemment liée), par objectivation d'une protéinurie ou d'une hématurie [16].

Dans les stades plus avancés, la MRC se traduit souvent par une hypertension et par des troubles urinaires tels qu'une polyurie ou au contraire une oligurie. Elle est souvent associée à une anémie attribuable à la diminution de la sécrétion d'érythropoïétine. Un œdème pulmonaire peut être la conséquence d'une insuffisance cardiaque gauche liée à une hypernatrémie. L'hyperkaliémie engendre quant à elle des troubles du rythme cardiaque. Les troubles associés à une moins bonne régulation des taux plasmatiques de calcium et de phosphore comprennent des déminéralisations osseuses – connues sous le nom d'ostéodystrophies rénales – ainsi que des troubles nerveux [16]. Lorsque la fonction rénale résiduelle est très altérée, une élévation de l'urée plasmatique (couramment appelée urémie) peut engendrer de nombreux troubles cliniques et biologiques allant jusqu'à la mort du patient.

Mécanismes de compensation

L'absence de manifestations cliniques dans les stades débutants de la MRC peut être expliquée par la réserve fonctionnelle du rein. En effet, lorsque les atteintes restent modérées, une adaptation fonctionnelle oblige les néphrons résiduels à maintenir l'homéostasie. Par exemple, la perte de 50 % des néphrons, comme lors de l'ablation d'un rein, n'induit pas de manifestations cliniques importantes. Lorsque la masse néphronique résiduelle n'atteint plus que 25 % de la valeur normale, des troubles cliniques apparaissent ; à 10 %, la survie est encore possible étant donné la capacité à mettre en place des mécanismes de compensation permettant d'excréter l'eau et le sel. Ces caractéristiques expliquent le diagnostic souvent tardif de la MRC.

Diagnostic

A l'échographie, la taille des reins est souvent diminuée. Toutefois, le critère diagnostique de choix repose sur la mise en évidence d'un DFG diminué ainsi qu'une élévation de la concentration sérique

de créatinine, bien que cette dernière ne soit pas une valeur prédictive très satisfaisante car insuffisamment corrélée à la baisse de la fonction rénale et du DFG. En effet, sa sécrétion, bien que modérée en conditions physiologiques, peut s'élever lorsque sa concentration sanguine augmente, contribuant à fausser la mesure de sa clairance et à surévaluer le DFG [2].

En tout, il a été estimé qu'aux Etats-Unis, la prévalence de la MRC dans la population générale adulte s'élevait à 11 %, dont seulement 3 % présentaient une forme asymptomatique de la maladie [17].

Classifications

En 2002, le National Kidney Foundation - Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI) a défini 5 stades de MRC dépendant de la fonction rénale résiduelle et permettant de décider du type de prise en charge à instaurer (Tableau 1) [16, 18].

Dans celui-ci, les stades 1 et 2 ne sont mis en évidence que par le biais d'une albuminurie, d'une hématurie ou d'anomalies visibles à l'échographie. L'évaluation du DFG est requise uniquement pour distinguer le stade 1 du 2. Si ces étapes sont généralement asymptomatiques, le risque d'évoluer vers des formes plus sévères de MRC est réel. Les étapes 3, 4 et 5 sont uniquement objectivées par mesure du DFG. Au stade 5, la fonction rénale n'atteint plus que 10 à 15 % de la normale. On parle alors d'insuffisance rénale terminale (IRT ; ou ESRD en anglais = *end-stage renal disease*) et la survie à long terme ne peut être assurée que par une thérapie de remplacement rénal (TRR) incluant la dialyse ou la greffe. Il est estimé que la prévalence des MRC de stade 5 croît de 5 à 8 % annuellement, ce qui provient essentiellement du vieillissement de la population, de l'émergence de meilleurs outils diagnostics, et d'une recrudescence de comorbidités associées à la MRC (comme le diabète ou l'hypertension) [17].

Stade	Description	DFG (ml/min/1,73m ²) (norm. 120)	Actions à entreprendre
1	Atteintes rénales ; DFG normal ou relativement élevé	≥ 90	Diagnostiquer ; traiter les comorbidités et limiter le risque cardiovasculaire
2	Atteintes rénales ; faible diminution du DFG	60-89	Surveiller la progression
3	Diminution modérée du DFG	30–59	Evaluer et traiter les complications
4	Diminution sévère du DFG	15-29	Préparation pour une TRR
5	IRT	< 15	Mise en place de la TRR (en cas d'urémie avérée)

Tableau 1 : les 5 stades de MRC et les actions à entreprendre pour chacune [16].

Conséquences

La MRC est par définition irréversible. La perte de la fonction rénale entraîne des conséquences sur l'ensemble de l'organisme.

Parmi les plus évidentes, celles-ci atteignent :

L'équilibre hydro-électrolytique comprenant une rétention hydro-sodée (génératrice d'œdèmes, d'hypertension artérielle,...), une acidose métabolique (par excrétion insuffisante de H⁺ et par défaut de génération de tampons), une hyperkaliémie (pouvant induire des arythmies cardiaques) et une hypocalcémie couplée à une hyperphosphatémie (liée à la diminution de son élimination) [2].

Le système cardiovasculaire est affecté par la rétention hydro-sodée (œdèmes systémiques ou pulmonaires, hypertension artérielle, insuffisance cardiaque) ainsi que par une accélération de l'athérosclérose.

Le système nerveux avec des manifestations telles que des neuropathies périphériques, de la fatigue ou des insomnies. Une urémie très élevée peut également donner lieu à des convulsions, des myoclonies ainsi qu'à des crises d'épilepsie [16].

Le système digestif en se manifestant par de l'anorexie, des nausées et des incidences accrues d'ulcère peptique et d'hépatite chronique.

Le système endocrinien perturbé notamment par une hyperparathyroïdie en réponse à l'hypocalcémie et à l'hyperphosphatémie. Des dyslipidémies et une altération du métabolisme glucidique sont également rencontrées.

Le système musculosquelettique notamment influencé par la perte de calcium, dont l'absorption digestive est réduite par l'absence de vitamine D3, ainsi que par l'hyperparathyroïdie (secondaire à l'hypocalcémie et à l'hyperphosphatémie) qui provoque la libération par les ostéoclastes de calcium stocké dans les os [19]. La fonte musculaire trouve son origine dans la perte d'albumine urinaire qui est en partie compensée par un catabolisme musculaire accru. L'acidose métabolique et le diabète peuvent stimuler la dégradation protéolytique des muscles. Finalement, l'état catabolique et l'anorexie engendrés par l'urémie entraînent une malnutrition protéique.

Le système hématopoïétique affecté notamment par une production insuffisante d'EPO qui se traduit par une anémie [6]. Celle-ci peut être renforcée par la présence de toxines affectant le fonctionnement de la moelle osseuse. La formation et les fonctions leucocytaires peuvent également être altérées, donnant lieu à une susceptibilité accrue aux infections. Enfin, l'hémostase peut être déficiente en raison de l'hypocalcémie et de la perte urinaire de facteurs de coagulation.

Le système dermatologique notamment par développement d'un teint jaune consécutif à un défaut d'excrétion de la bilirubine conjuguée. On constate également du prurit et des excoriations.

Traitement

Etant donné le caractère irréversible de la fibrose qui s'installe progressivement avec l'évolution de la MRC, une restauration intégrale de la fonction rénale est impossible. Il reste toutefois souhaitable de ralentir la progression de la MRC. Ceci peut être assuré par contrôle rigoureux des facteurs de risque cardio-vasculaires tels que le l'hypertension artérielle, le surpoids, le diabète, les dyslipidémies, le tabagisme. Le contrôle de la pression artérielle permet également une réduction de la protéinurie par réduction de la filtration glomérulaire [20].

1.1.2.3. Etiologies des insuffisances rénales

De nombreuses maladies, spécifiques ou non, peuvent toucher le rein. Si celles-ci ne déclenchent pas une ARA, elles peuvent être plus insidieuses et évoluer silencieusement vers une MRC. Les plus importantes sont décrites dans cette section.

1.1.2.3.1. La néphropathie diabétique

Il s'agit sans doute de la cause majoritaire de néphropathie responsable de MRC dans le monde. Elle serait à l'origine de 33 % des MRC [1] et toucherait 35 à 40 % des patients diabétiques [21].

Elle se manifeste de 15 à 20 ans après le début du diabète. Pourtant, un contrôle rigoureux de la glycémie permet de réduire le risque de complications rénales. La néphropathie diabétique est la première cause de protéinurie dans le monde.

Elle s'attaque aux capillaires glomérulaires et autres petits vaisseaux du rein. En plus de glycosyler les protéines et de causer leur altération structurelle, le sucre présent dans le filtrat glomérulaire attire de l'eau par osmose et provoque l'élimination de grands volumes liquidiens. Ceci a pour effet de diluer le Na⁺ présent dans la lumière tubulaire. En conséquence, la *macula densa* du TCD augmente la sécrétion de rénine, provoquant une vasoconstriction artériolaire dans le but de limiter le DFG. Il en résulte une ischémie chronique. L'angiotensine II produite à la suite du relargage de rénine a également pour effet d'activer la sécrétion de TGF- β (cf. section *1.2.5. Facteurs vasculaires*).

1.1.2.3.2. L'hypertension

Elle serait responsable de 30 % des cas de néphropathies [1]. Elle affecte la fonction rénale en diminuant la perfusion du parenchyme et en provoquant une ischémie chronique. Elle agit également en affaiblissant les vaisseaux sanguins. Comme pour la néphropathie diabétique, un contrôle strict de la tension artérielle permet de limiter les atteintes rénales. Lorsqu'une MRC est diagnostiquée à un stade précoce, la tension artérielle à ne pas dépasser est 130/80 mm Hg ; elle descend à 125/75 mm Hg pour les stades plus avancés [1].

1.1.2.3.3. Les glomérulopathies

Cet ensemble de maladies immunitaires, aussi appelée glomérulonéphrites, cible le glomérule. Si la majorité est d'étiologie inconnue, toutes provoquent une inflammation et des altérations histologiques du glomérule ; certaines sont caractérisées par des dépôts d'immunoglobulines au niveau de la membrane basale. Elles peuvent être primaires (souvent par réaction auto-immune) ou secondaires (associées à une maladie auto-immune, infectieuse, tumorale ou métabolique).

Les manifestations s'accompagnent généralement d'une ARA évoluant fréquemment vers une MRC et impliquent une dégradation de la fonction rénale, un syndrome néphritique (inflammation) avec hématurie, un syndrome néphrotique avec albuminurie, lipidurie, œdèmes...

Le diagnostic peut nécessiter une biopsie rénale.

Le traitement n'est pas spécifique, mais requiert la prise en charge de la maladie sous-jacente (par exemple par administration d'immunosuppresseurs dans le cas du lupus érythémateux) [22].

1.1.2.3.4. Les néphropathies tubulo-interstitielles

Il s'agit de maladies aiguës ou chroniques de l'interstitium rénal touchant les tubules. Elles peuvent être associées à une glomérulopathie ou à une maladie vasculaire rénale et peuvent conduire à une insuffisance rénale.

Les causes sont très nombreuses et peuvent être d'origine héréditaire ou acquise. Parmi celles-ci, on retrouve des causes toxiques exogènes (les AINS, la ciclosporine, les aminoglycosides,...) ou endogènes (hyperuricémie ou hypercalcémie), des maladies auto-immunes ou infectieuses (pyélonéphrites). En outres, les xénobiotiques sont capables d'induire des réponses allergiques conduisant à une réponse inflammatoire responsable de la néphrite [9]. D'autres origines incluent les néoplasies (lymphome ou myélome multiple), des troubles vasculaires (néphrosclérose artériolaire, nécrose tubulaire aiguë ou embolie), des pathologies héréditaires (polykystose rénale) ou associées à des obstructions chroniques des voies urinaires, à des néphropathies de reflux,...

Une fois de plus, le traitement n'est pas spécifique et nécessite une prise en charge de la maladie sous-jacente.

1.1.2.3.5. La nécrose tubulaire aiguë

La nécrose tubulaire aiguë (NTA) est provoquée par la mort massive d'un grand nombre de cellules de l'épithélium tubulaire à la suite d'une atteinte toxique ou ischémique. Si certains définissent la NTA comme synonyme de l'ARA, d'autres y voient une relation de cause à conséquence [23].

Elle se caractérise par une nécrose des RPTECs, surtout dans le cas des NTA toxiques. Les cellules nécrotiques tombent dans la lumière tubulaire, l'obstruent et contribuent ainsi à renforcer l'ARA. Toutefois, des cellules atteintes, mais n'ayant pas nécessairement entamé un processus nécrotique, peuvent également perdre leur adhérence et se détacher vers la lumière tubulaire.

Etant donné que les RPTECs se renouvellent sans cesse, la levée de l'agent inducteur de NTA se poursuit généralement par une reconstruction des tubules et une réversibilité de l'ARA. Ceci est notamment permis par le fait que la membrane basale n'est pas touchée par la perte de cellules.

Dans les NTA toxiques, les glomérules ne sont généralement pas affectés, au contraire des NTA ischémiques [23].

Les NTA toxiques sont associées à l'administration de substances néphrotoxiques ; ceci inclut bon nombre de médicaments, mais également des contaminants environnementaux (ochratoxines, métaux lourds,...), des drogues récréatives, des venins injectés après morsure de serpent,... La néphropathie aux produits de contraste (tels que les dérivés du gadolinium et les produits iodés) est responsable de NTA chez 7 % des patients subissant un examen radiologique [23].

1.1.2.3.6. La néphropathie aux AINS

Elle survient après un usage abusif d'AINS correspondant généralement à 1 à 2 g par jour pendant plusieurs années (soit 2-3 kg au total). Son évolution est asymptomatique jusqu'à ce que la quantité de néphrons chute sous 80 % de leur nombre initial. Les AINS seraient responsables de 1 à 3 % des MRC aux Etats-Unis ; au contraire des néphropathies hypertensives et diabétiques, la maladie tend à régresser en raison d'un usage mieux contrôlé des médicaments [24].

En inhibant les cyclooxygénases 1 et 2, les AINS empêchent la formation des prostaglandines. Ceci devient problématique lorsque la tension artérielle chute et que le débit de perfusion rénal doit être augmenté par dilatation des artérioles, notamment par la prostaglandine I₂. Il en résulte un état ischémique, généralement chronique, mais qui peut déboucher sur une NTA avec une chute drastique du DFG, un syndrome néphrotique avec néphrite interstitielle, une néphrite interstitielle ou une nécrose papillaire. Ces phénomènes, s'ils perdurent, peuvent mener à une MRC [15, 23].

Le paracétamol (qui n'est pas un AINS à proprement parler), est connu pour sa toxicité hépatique et est également capable d'induire des NTA : dans les cellules rénales, le cytochrome P450 métabolise le paracétamol en N-acétyl-p-benzoquinone imine, un dérivé toxique normalement rapidement éliminé par conjugaison avec le GSH puis éliminé dans les urines [15]. Lors de surdosages, la déplétion en GSH autorise la molécule à se lier aux protéines cytosoliques et contribue à une élévation du stress oxydatif.

Un autre exemple d'AINS néphrotoxique est celui de la phénacétine, médicament aujourd'hui retiré du marché, et qui exerce sa toxicité par l'accumulation de métabolites dans les RPTECs, source de lésions chroniques. Ce médicament a également été à la base d'un grand nombre de cas de carcinomes urothéliaux [21].

1.1.2.3.7. Les uropathies obstructives

Cette cause post-rénale doit être recherchée chez les patients se présentant avec une ARA sans étiologie évidente à l'anamnèse. Elle peut être supposée dès qu'une oligurie/anurie est constatée [13]. La cause la plus fréquente est la néphrolithiase, qui affecte 2 à 3 % de la population (l'homme étant 2 à 4 fois plus touché que la femme). Les calculs urinaires sont formés de substances présentes dans le filtrat à des concentrations proches de leur solubilité. Ces dernières précipitent à la suite d'un changement mineur de la composition de l'urine et peuvent occasionner une obstruction des voies urinaires [21]. D'autres causes incluent les tumeurs, notamment au niveau des calices.

1.1.2.3.8. La polykystose rénale

Il s'agit de la maladie héréditaire la plus fréquente touchant le rein. Elle se caractérise par l'apparition progressive de kystes millimétriques ou centimétriques élargissant les reins. Les kystes sont des cavités tapissées de cellules épithéliales et remplies d'un liquide séreux. Elle affecte un nouveau-né sur 750 à 1000, apparait généralement entre 25 et 30 ans, et est retrouvée chez 10 % des patients atteints d'IRT. La mutation responsable de la maladie concerne la polycystine-2, un canal calcique dont la fonction est encore imparfaitement comprise [21].

Il n'existe pas de traitement spécifique ; l'augmentation progressive de la taille des kystes détruit irréversiblement le parenchyme rénal. A terme, le recours à la dialyse ou à la greffe est nécessaire.

1.1.2.3.9. Les infections microbiennes

Elles peuvent engendrer des néphrites interstitielles qui, à répétition, peuvent évoluer vers une MRC.

La plus fréquente est la pyélonéphrite, une infection qui touche les voies urinaires hautes (les calices (pyélo) et le parenchyme (néphrite)). Elle est le plus fréquemment associée à une infection par *Escherichia coli* des voies urinaires basses (cystite). Le traitement repose sur une antibiothérapie. Les infections virales sont principalement attribuables au Puumalavirus, un sérotype du Hantavirus responsable de 100 à 200 cas d'ARA chaque année en Belgique. Le virus se transmet par morsure de rongeurs, principalement les campagnols et les mulots, constituant un réservoir animal vecteur de la maladie. La transmission peut également se faire par le biais d'inhalation de particules souillées par de l'urine d'animaux infectés. La maladie est associée à une légère fièvre hémorragique [25].

1.1.3. Prise en charge de l'insuffisance rénale

En 2005, l'Europe comptait 360.000 patients suivant une TRR, dont 66 % inscrits dans un programme de dialyse et 34 % ayant bénéficié d'une transplantation avec succès. Selon les estimations, le nombre en patients en IRT s'accroit de 5 à 8 % chaque année [17].

En Belgique, l'incidence de l'IRT a commencé à marquer un léger infléchissement entre 2009 et 2012, alors qu'il était resté stable durant les années antérieures. En revanche, la prévalence de l'IRT progresse d'environ 3 % chaque année et atteignait 13.664 patients en 2012 [26]. Le coût de la MRC est donc un réel fardeau dans le budget des soins de santé.

Les symptômes de l'insuffisance rénale sont relativement rares avant l'atteinte d'un stade avancé de la maladie ; ils se traduisent entre autres par une hypertension, une polyurie ou, au contraire, une anurie, une anémie, une acidose ou une hyperkaliémie. De plus, une diminution drastique du DFG peut conduire à une réabsorption trop importante de certains déchets du métabolisme.

1.1.3.1. Biopsie rénale

La biopsie est un acte visant à prélever un fragment tissulaire à des fins d'analyse histologique, permettant d'orienter le diagnostic et la caractérisation d'une maladie rénale. Elle permet également de guider le traitement, et d'évaluer le pronostic à court et long termes. La technique est sûre ; le risque de complications concerne principalement les hémorragies post-biopsie. L'hématurie est la complication la plus fréquente. Elle est de résolution généralement spontanée, mais peut dans certains cas mener à la formation de caillots dans les voies excrétrices inférieures. Ceux-ci sont prévenus par maintien d'une diurèse suffisante [2].
1.1.3.2. Mesures conservatrices

Le contrôle de facteurs prédisposant à la MRC – qu'ils en soient la cause ou non – tels que le diabète ou l'hypertension constitue bien évidemment un traitement de première ligne [27].

En cas de MRC, les patients doivent éviter la consommation trop importante de protéines et de sodium. L'eau et les aliments riches en potassium ou en magnésium (fruits, chocolat,...) sont également à proscrire. Il est conseillé aux patients atteints d'insuffisance rénale de limiter la consommation de protéines, de phosphore et de sodium qui alourdissent la charge de travail du rein [20, 28].

1.1.3.3. Dialyse

Il n'y a pas de consensus quant au meilleur moment pour débuter un programme de dialyse chronique. Selon les différentes comorbidités individuelles, la dialyse devient indispensable lorsque le DFG chute sous les 15 ml/min. Elle devrait aussi être installée dès que des troubles cliniques sévères sont objectivés (hyperkaliémie, œdème pulmonaire, acidose, urémie) [23].

En 2005, les pays européens allouaient 2 % de leur budget de soins de santé à la dialyse [17].

Notons également que la dialyse peut être employée afin d'épurer l'organisme d'un toxique (par exemple, les barbituriques, l'amanitine, le paraquat,...) consécutif à un empoisonnement [15]. L'élimination de métaux peut également se faire après administration d'un agent chélateur.

1.1.3.3.1. L'hémodialyse

Ce traitement consiste à faire passer le sang du patient dans un tube composé d'une membrane perméable à certaines substances et plongé dans une solution dont la composition est essentiellement similaire à celle du plasma d'une personne saine. Les solutés en excès dans le sang du patient dialysé, tels que les déchets azotés et le potassium, vont migrer selon leur gradient de concentration vers la solution de dialyse qui en est exempte. Au contraire, des molécules exerçant une activité tampon passent de la solution vers le sang et permettent de neutraliser les ions H⁺ en excès. Les membranes de dialyse sont conçues de manière à limiter le passage des molécules de poids moléculaire élevé, telles les protéines et peptides. L'opération est à répéter au minimum 3 fois par semaines pendant 4 à 6 heures [21]. Pour cette raison, l'hémodialyse est également appelée "rein artificiel".

Le péritoine du malade est ici utilisé comme membrane de filtration. Le liquide de dialyse est injecté dans la cavité péritonéale du patient à l'aide d'un cathéter implanté chirurgicalement dans la cavité abdominale, plusieurs semaines ou mois avant son utilisation. Après plusieurs heures de contact, le dialysat est récupéré [21, 29].

Plusieurs techniques de dialyse péritonéale sont proposées : la dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA) qui nécessite trois à quatre changements manuels quotidiens de poches de dialysat, ou la dialyse péritonéale automatisée (DPA) qui requiert un appareillage (cycleur). Dans les 2 cas, la dialyse se fait au domicile du patient, lui octroyant une qualité de vie considérablement meilleure. La dialyse s'effectue ici en continu et non par intermittence comme dans le cas de l'hémodialyse [29].

Outre les infections bactériennes généralement efficacement combattues à l'aide d'un antibiotique, la complication majeure de la dialyse péritonéale est l'altération du péritoine qui perd peu à peu sa perméabilité, nécessitant *in fine* le recours à l'hémodialyse [29].

1.1.3.4. Transplantation rénale

Le dernier recours permettant, en cas de succès, d'améliorer la qualité de vie de patient sur le long terme est la greffe. Elle est proposée surtout aux sujets jeunes chez lesquels le risque de récidive de la maladie est faible ou inexistant [30]. Toutefois, les transplantations sont limitées par manque de donneurs et contraignent les transplantés à prendre des immunosuppresseurs quotidiennement de manière à éviter le rejet de l'organe greffé. En Belgique, environ 40 % des patients atteints d'IRT bénéficient d'une transplantation [26].

1.1.3.5. Prise en charge pharmacologique

Le traitement médicamenteux de la MRC vise d'abord à lutter contre son étiologie ; le traitement de ses conséquences devra éventuellement être envisagé. Ceci inclut généralement l'administration d'EPO recombinante qui a pour but de stimuler l'érythropoïèse ou de vitamine D afin de compenser la perte de son hydroxylation endogène. Des antihypertenseurs, tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ont une place de choix dans le traitement de l'hypertension. Des médicaments destinés à abaisser la phosphatémie (acétate de calcium, lanthane et sévélamer) et la kaliémie (polystyrènes sulfonates calcique ou sodique) sont également fréquemment prescrits.

1.2. Physiopathologie des atteintes rénales

La présente section s'intéresse aux évènements contribuant à l'installation de l'insuffisance rénale. Une fois de plus, de nombreux processus peuvent être considérés, et seuls ceux qui semblent les plus pertinents seront présentés ici.

1.2.1. Nécrose tubulaire aiguë

Lors d'une atteinte ischémique, l'intégrité du cytosquelette des cellules tubulaires est rapidement altérée. Ceci s'accompagne d'une perte de la bordure en brosse, d'une délocalisation des protéines d'adhésion et d'autres protéines membranaires (telles que la Na⁺-K⁺-ATPase) et de mort cellulaire par apoptose ou par nécrose (Figure 6) [23].



Figure 6 : représentation schématique des évènements intervenant dans la NTA.

1.2.1.1. Atteintes cytotoxiques engendrées par le stress oxydatif

L'un des processus clé intervenant dans les atteintes rénales est le stress oxydatif. Au cours du métabolisme cellulaire, l'utilisation d'oxygène implique la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS = *reactive oxygen species*) [31]. Ces dernières peuvent réagir avec des molécules azotées, produisant ainsi des espèces réactives de l'azote (RNS = *reactive nitrogen species*). Les principaux ROS/RNS sont les radicaux hydroxyle (HO*), peroxyle (RO₂*) et superoxyde (O₂*), le monoxyde d'azote (NO*), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'acide hypochloreux (HCIO) et le

peroxynitrite (ONOO⁻). La mitochondrie est le site le plus générateur de ROS/RNS (jusqu'à 4 % de l'oxygène n'est pas converti en eau, mais en anion superoxyde). Certaines enzymes en sont également productrices (comme la NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase, la NO synthase (NOS), la myéloperoxydase,...) [32].

La production excessive de ces dérivés réactifs peut néanmoins s'inscrire dans un processus pathologique provoquant des dégâts à l'ADN, des oxydations d'acides gras insaturés (peroxydation lipidique) et de protéines ainsi que l'inactivation d'enzymes ou de leurs co-facteurs [32].

Pour se protéger des radicaux libres, la cellule peut compter sur plusieurs lignes de défenses :

- La présence d'antioxydants tels que les vitamines C et E, et le glutathion réduit (GSH) [33] ;
- L'inactivation par des métalloenzymes telles que :
 - la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la formation de H₂O₂ à partir de O₂^{**};
 - la catalase (CAT) qui transforme H₂O₂ en H₂O et O₂;
 - la glutathion peroxydase (GSH-Px) qui transforme H₂O₂ en H₂O par oxydation de 2 GSH ;
 - la glutathion-S-transférase (GST) qui catalyse la conjugaison de GSH réduit à de nombreuses substances toxiques, et notamment des molécules peroxydées (ROOH) en leurs hydroxyles (ROH).

Dans une large majorité de maladies rénales au cours desquelles la neutralisation du stress oxydatif n'est pas suffisante et pour lesquelles la balance redox est clairement en faveur de l'oxydation, les atteintes cellulaires cytotoxiques peuvent éventuellement mener à la mort ou à la dédifférenciation des RPTECs [34] (cf. *1.2.1.2. Mort cellulaire* et *1.2.3. Transition épithélio-mésenchymateuse et fibrose*). En effet, la MRC est associée à des dysfonctions mitochondriales engendrant une production excessive de ROS/RNS qui surpasse les capacités de défense antioxydante [35, 36].

Les conséquences d'un renforcement du stress oxydatif se traduisent par des dégâts à l'ADN notamment capables d'induire la mort cellulaire par apoptose (cf. *1.2.1.2. Mort cellulaire*). D'autres atteintes intéressent les structures protéiques telles que le cytosquelette, dont la désorganisation secondaire à la modification structurelle des microtubules provoque une relocalisation de la Na⁺-K^{*}-ATPase de la membrane basolatérale vers le niveau apical [23]. Finalement, la peroxydation lipidique est susceptible d'altérer l'intégrité de la membrane plasmique et de permettre le relargage d'enzymes de la bordure en brosse qui pourront être mises en évidence dans les urines.

Dans la NTA d'origine ischémique, la production de NO par induction de la NOS est une tentative de dilatation des artérioles rénales faisant réponse à l'hypoxie [23]. Toutefois, ce vasodilatateur radicalaire est neutralisé en peroxynitrite, un RNS responsable de dégâts oxydatifs qui renforce d'autant plus les atteintes liées à l'ischémie. Sans surprise, une stratégie thérapeutique émergente visant à ralentir la progression de la MRC consiste à limiter la génération de radicaux libres [2]. Si les études s'intéressant à l'amélioration de la fonction rénale à l'aide d'antioxydants (tels que la vitamine E et ses dérivés, la N-acétyl-cystéine,...) sont encore limitées, elles pointent toutefois vers une tendance à diminuer la vitesse de progression de la MRC et à retarder l'apparition de symptômes cliniques [34].

1.2.1.2. Mort cellulaire

Nécrose

Les RPTECs, surtout celles des segments S1 et S2, nécessitent de grandes quantités d'énergie pour accomplir leurs fonctions physiologiques. Elles sont dès lors sensibles aux déplétions d'ATP qui peuvent survenir en cas d'ischémie. Ainsi, dans la NTA ischémique, la raréfaction en oxygène conduit à la mort cellulaire selon un phénomène de nécrose. Des substances toxiques capables de causer des déplétions en ATP sont aussi capables d'induire une mort cellulaire par nécrose [15]. En effet, la perte d'ATP signe l'arrêt des pompes membranaires ; le potentiel de membrane est perdu, et les flux ioniques sont perturbés [15].

Ainsi, la nécrose cellulaire se caractérise-t-elle par un gonflement des organelles et de la cellule provoquant la rupture de la membrane plasmique et la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu interstitiel. Celui-ci est à la base d'une réponse inflammatoire [15].

Apoptose

L'apoptose est un type de mort cellulaire programmée qui permet l'élimination de cellules endommagées. Au contraire de la nécrose, il s'agit d'un processus requérant de l'énergie (de l'ATP). Elle peut par exemple être induite après une élévation de la génération d'espèces réactives de l'oxygène, susceptibles d'engendrer suffisamment de dégâts aux protéines ou à l'ADN cellulaire, par l'activation de récepteurs membranaires de mort cellulaire, par carence en facteurs trophiques,... [37].

Typiquement, les cellules entrant en apoptose présentent un rétrécissement drastique de leur volume cytoplasmique et de leur noyau. Ceci est associé à une fragmentation de leur ADN en sousunités d'environ 200 paires de bases (ou multiples de cette longueur), à la formation de corps apoptotiques et à la désintégration de leurs mitochondries [23, 37, 38].

Deux voies majoritaires sont susceptibles d'induire l'apoptose :

 La voie extrinsèque, ou voie du TNF (tumor necrosis factor), est activée lorsque des protéines appartenant à la super-famille du TNF se lient à leurs récepteurs (TNFR et notamment le récepteur Fas) à la surface de la membrane cellulaire, causant l'activation de caspases (cysteinyl-aspartate-cleaving proteases), notamment de la caspase 8 [15].

 La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, est activée lors de la disparition des protéines anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-XL,...) qui empêchent le relargage du cytochrome C dans le cytoplasme [37]. Ce dernier recrute alors d'autres facteurs tels que APAF-1 ou la caspase 9 pour former un complexe appelé apoptosome qui active la caspase 3, dernier effecteur de la cascade des caspases et initiateur de la mort cellulaire programmée [15].

Ces deux voies sont distinctes, mais convergent vers l'activation de caspases dont les activités catalytiques vont permettre d'activer une endonucléase capable de cliver l'ADN, engendrant des fragments de 200 paires de bases.

L'externalisation des phosphatidylsérines, de la face interne de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire (mécanisme *flip-flop*) constitue un signal de mort cellulaire à destination des cellules immunitaires. Les fragments cellulaires ou corps apoptotiques sont rapidement digérés par les macrophages environnants sans qu'une réponse inflammatoire soit initiée [15].

1.2.1.3. Perte de l'adhérence cellulaire

Dans les NTA ischémiques et toxiques, la perte des facteurs d'adhésion est notamment expliquée par la relocalisation des intégrines au niveau apical, ainsi que par la perte des médiateurs des jonctions serrées (β-caténine et E-cadhérine) [23, 39]. Ceci va occasionner le détachement de cellules tubulaires, qu'elles soient vivantes ou non ; des portions de tubules pour lesquelles la membrane basale constitue la seule barrière entre le filtrat glomérulaire et le milieu interstitiel apparaissent alors (Figure 6). Les intégrines présentes sur le pôle apical sont toujours capables d'adhérer et contribuent à former des amas pouvant obstruer la lumière et stopper le DFG.

De plus, les caspases induites durant l'apoptose sont dotées d'activités catalytiques envers la Ecadhérine, contribuant à renforcer le détachement cellulaire [40].

1.2.2. Régénération tubulaire

Faisant suite aux dommages tubulaires, les RPTECs peuvent entrer dans une phase de réparation tissulaire par le remplacement des cellules mortes ou altérées. Ce processus vise à assurer la récupération des fonctions des reins et consiste notamment en une prolifération accélérée [23]. La première étape de cette réparation consiste en la mort et le détachement des cellules trop atteintes, et le recrutement *in situ* de monocytes. De nombreuses cellules alors en phase de quiescence (phase G₀) entrent dans les phases prolifératives du cycle cellulaire (Figure 7).

Toutefois, les cellules très endommagées ne se diviseront pas sans avoir tenté au préalable de réparer les dégâts à l'ADN dont elles sont victimes. En cas d'échec, un processus apoptotique pourra débuter.



Figure 7 : schéma des phases du cycle cellulaire. La phase G₀ est la phase de quiescence durant laquelle les cellules accomplissent leurs fonctions physiologiques, mais ne se répliquent pas. Le début du cycle cellulaire est marqué par l'entrée en phase G₁ au long de laquelle la cellule voit son volume augmenter et synthétise les protéines et enzymes nécessaires aux phases suivantes, notamment les ADN polymérases. La phase S consiste en une réplication du matériel génétique. En phase G₂, la cellule acquiert de nouvelles protéines qui seront nécessaires à sa division. La phase M (mitose) correspond à la division cellulaire à proprement parler.

Dans un second temps, une population de cellules peu différenciées apparaît, constituée de cellules mésenchymateuses (cf. 1.2.3. Transition épithélio-mésenchymateuse et fibrose) [23].

Dans une dernière phase, la réparation tubulaire s'achève par une réacquisition du phénotype épithélial normal. La présence de facteurs de croissance plus ou moins spécifiques semble largement contribuer au bon déroulement de cette étape. Les RPTECs non endommagées ou n'ayant subi que très peu de lésions se mettent à proliférer et à migrer vers les zones vacantes, achevant la recolonisation de la membrane basale des tubules [41].

Des déficits dans cette étape de réparation peuvent conduire à une cicatrisation fibreuse. La perte de cellules endommagées conduit les cellules résiduelles à une hypertrophie associée à une plus forte consommation d'oxygène et une augmentation de la production de radicaux libres. Ceci conduit à une exacerbation des lésions cellulaires et à une action pro-fibrosante.

1.2.3. Transition épithélio-mésenchymateuse et fibrose

Les RPTECs semblent contribuer à la formation de lésions tubulo-interstitielles suivant un mécanisme appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, *epithelial-to-mesenchymal transition*) ; durant ce processus elles perdent leur phénotype épithélial initial pour se différencier en cellules mésenchymateuses. Les cellules mésenchymateuses constituent un pivot de la maladie rénale : en effet, à ce stade – et si les conditions environnantes le permettent – le processus inverse peut avoir lieu (MET = mesenchymal-to-epithelial transition). Sinon, les cellules mésenchymateuses sont capables de poursuivre leur différenciation en fibroblastes, considérés comme les cellules effectrices principales de la fibrogénèse [42].

L'EMT

On distingue 3 types d'EMT intervenant dans des conditions biologiques différentes et faisant intervenir des voies biochimiques plus ou moins distinctes, même si la majorité des traits caractérisant l'EMT sont communs (Figure 8).



Figure 8 : les 3 types d'EMT. Dans l'EMT de type I, les cellules épithéliales primitives se différencient en cellules mésenchymateuse qui évolueront en cellules épithéliales secondaires, ou entreront en apoptose. Dans l'EMT de type II, les cellules épithéliales (ou endothéliales) s'immiscent dans l'interstitium rénal et évoluent vers un profil fibroblastique si l'inflammation persiste. Le type III est associé à l'acquisition de propriétés métastatiques de cellules tumorales primaires.

L'EMT de type I Elle est impliquée dans le développement embryonnaire. En permettant la transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses mobiles, elle intervient dans les processus de gastrulation, de formation de la crête neurale ou des sclérotomes à partir des somites. Elle assure la constitution d'une matrice de tissu conjonctif. Certaines cellules mésenchymateuses peuvent conduire à la formation d'un épithélium secondaire en suivant le processus de MET [39].

L'EMT de type II II s'agit du phénomène impliqué dans la fibrose tissulaire (notamment rénale),

souvent associé à un contexte inflammatoire. Ici, les cellules épithéliales évoluent vers le phénotype mésenchymateux avant d'acquérir un profil de fibroblaste. Les cellules endothéliales peuvent également être touchées ; on parle alors d'EndoMT. Ce processus intervient dans la perte fonctionnelle de l'organe touché [39].

L'EMT de type III Elle est observée dans les cancers et implique la transformation de cellules épithéliales en cellules métastatiques. Elle touche essentiellement les cellules ayant subi des remodelages génétiques et épigénétiques. Il n'y a pas d'évolution vers un profil fibroblastique [39].

Dans les maladies rénales, l'EMT de type II se caractérise par un changement phénotypique au cours duquel des cellules épithéliales perdent des caractéristiques telles que leurs jonctions intercellulaires, leur polarisation ou leur insertion sur une membrane basale. Elles acquièrent une morphologie allongée et tendent progressivement vers l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux / fibroblastique. L'EMT doit être considérée comme un processus favorisant la régénération, mais qui peut évoluer vers la fibrogénèse si les conditions sont défavorables [39].

Les RPTECs sont en fait jointes entre elles par l'intermédiaire de jonctions serrées, de jonctions adhérentes et de desmosomes. Ces liens intercellulaires latéraux assurent la formation de couches parmi lesquelles les cellules disposent d'un certain degré de liberté leur permettant de migrer au sein de la couche à laquelle elles appartiennent. La β -caténine est une protéine permettant les jonctions intercellulaires : elle se lie à la E-cadhérine et à la α -caténine (elle-même liée au cytosquelette d'actine). Dans l'EMT de type II, la β -caténine n'est plus utilisée dans l'adhésion cellulaire, mais s'associe au complexe Tcf/Lef (*T cell factor/lymphoid enhancer factor*), un facteur de transcription qui intervient dans l'expression de gènes associés à la fibrose (tels que Snail, Twist, LEF1, ou Jaggad1). Sa perte au niveau des jonctions cellulaire entraîne une perte d'adhérence ; la β -caténine peut alors être relocalisée dans le noyau après association avec le complexe Tcf/Lef, ce qui induit l'expression du gène Snail. Snail est un facteur de transcription en doigt de zinc qui a un rôle crucial dans l'EMT car il supprime la transcription de la E-cadhérine et de ZO-1 (elles aussi impliquées dans les jonctions serrées) [39].

Les cellules mésenchymateuses ne forment pas de couche organisée et n'ont pas de polarisation apico-basale ; elles ne reposent pas sur une lame basale, n'ont que très peu de contacts avec les autres cellules et sont capables de migrer au sein du tissu interstitiel. Les propriétés de migration sont notamment conférées par les propriétés contractiles de la α -SMA (α -smooth muscle actin) [39].

Le médiateur clé de l'EMT est le TGF-β, une cytokine pro-fibrosante de par sa capacité à activer les fibroblastes et à induire à elle seule la totalité des étapes nécessaires à la dédifférenciation [43]. Trois

formes (TGF-β1 à 3) ont été décrites [44], le TGF-β1 étant le médiateur le plus important de la détérioration rénale [45].

Le TGF- β se lie aux 2 sous-unités du récepteur qui recrute la protéine "*activin-like kinase 5*" (ALK5) et permet la phosphorylation des Smad2/3 (*small mothers against decapentaplegic 2/3*) qui s'associent à la Smad 4. Le complexe migre alors vers le noyau et induit l'expression de gènes codant par exemple pour la α -SMA, le collagène ou le cTGF (*connective tissue growth factor*). Les gènes liés au phénotype épithélial, tels que la E-cadhérine, sont quant à eux réprimés [46, 47].

D'autres cibles des Smads incluent les "*mitogen-activated protein kinases*" telles que les "*extracellular signal-regulated kinases*", la p38 ou la Jun kinase impliquées dans la division, la croissance et la prolifération cellulaires [43].

Il est à noter que, si le TGF- β est en grande majorité produit par les cellules inflammatoires (notamment les macrophages), il est également produit par les RPTECs lésées et possède une activité pro-apoptotique contribuant au remodelage tissulaire durant le développement de la fibrose [43, 47]. L'implication du TGF- β dans la progression des MRC a orienté certaines études à tenter d'inhiber sa voie de signalisation par administration d'anticorps anti-TGF- β chez l'animal. En conséquence, la perte de la fonction rénale a été atténuée [43].

Les protéines impliquées dans ces phénomènes peuvent être utilisées comme marqueurs phénotypiques (Tableau 2).

	Marqueurs acquis	Marqueurs perdus
Protéines de surface		E-cadhérine N-cadhérine ZO-1
Protéines du cytosquelette	α-SMA Vimentine	Cytokératine β-caténine*
Protéines de la MEC	Fibronectine Collagènes I et III Laminine 5 MMP-2/9	Collagène IV Laminine I
Facteurs de transcription	β-caténine** Snail Slug LEF-1 FOXC2 Twist	

Tableau 2 : principales protéines surexprimées ou réprimées dans le cadre de l'EMT de type II et pouvant être utilisées afin d'objectiver un phénotype épithélial ou mésenchymateux / fibroblastique (* : forme membranaire intervenant dans les jonctions intercellulaires ; ** : forme relocalisante, retrouvée aux niveaux cytoplasmique et nucléaire). Pour finir, il est à noter qu'un processus similaire a été décrit pour les cellules endothéliales des capillaires rénaux (EndoMT = *endothelial-to-mesenchymal transition*) et contribuerait également à fournir des fibroblastes responsables du développement de la fibrose [48].

La matrice extracellulaire

L'accumulation de matrice extracellulaire (MEC) consiste sans aucun doute le processus clé de la fibrose. En conditions physiologiques, les cellules du parenchyme rénal maintiennent le volume de l'interstitium constant par sécrétion d'enzymes protéolytiques, les MMP-2 et MMP-9 (= *matrix metalloproteinase 2-9*). Ces dernières assurent la digestion du collagène IV, de la fibronectine, de la laminine et des protéoglycanes produits en excès [2, 49].

Dans des conditions pathologiques, l'accumulation de MEC menant à la fibrose rénale résulte d'un remodelage matriciel défaillant, caractérisé par une augmentation de sa synthèse et par une diminution de sa protéolyse. Les cellules mésenchymateuses ainsi que les fibroblastes de l'interstitium produisent de la fibronectine et du collagène l et III sous la stimulation par le TGF- β . Au niveau du glomérule, les cellules mésangiales expriment constitutivement l'inhibiteur tissulaire de la MMP-2 (TIMP-2 = *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2*) ; celui-ci est surexprimé en réponse à de nombreuses agressions, et notamment en présence de TGF- β [49].

La fibrose

La fibrose rénale est définie comme une accumulation de MEC (composée de collagène, d'acide hyaluronique, de fibronectine et de protéoglycanes) non fonctionnelle, remplaçant les tubules, et issue d'un processus cicatriciel défaillant. Il s'agit d'un processus irréversible qui est l'aboutissement de toutes les maladies rénales [2]. De nombreux facteurs peuvent influencer la progression de la fibrose rénale, ou au contraire sa régression dans les stades débutants (Figure 9).

Facteurs pro-fibrosants

- Inflammation + cytokines pro-fibrosantes
- Cytokines pro-fibrosantes (TGF-β)
- ROS/RNS

Progression

- Angiotensine II, endothéline, aldostérone
- MEC



Facteurs anti-fibrosants

- Avérés
 - Inhibiteurs du SRAA
 - Antagonistes de l'endothéline
 - Activation des NOS
 - Antagonistes du TGF-β
 - Défenses antioxydantes
- Théorique
 - Agents dégradant la MEC (MMPs)

Figure 9 : facteurs influençant la progression ou la régression de la fibrose rénale.

La production de MEC est dictée par la présence de TGF- β . A lui seul, ce facteur de croissance est capable d'initier et d'entretenir tout le processus d'EMT et d'activation des fibroblastes menant à la fibrose [43].

Les modifications structurelles de l'interstitium – menant à la destruction irréversible de l'architecture du parenchyme rénal – entravent le bon déroulement des échanges entre les capillaires et les tubules, ce qui contribue à accélérer la détérioration de la fonction rénale.

Les phénomènes d'accumulation et d'activation de fibroblastes sont considérés comme des facteurs clés pour l'évolution de la fibrose rénale. Une récente étude [50] a permis de déterminer l'origine et la proportion des populations cellulaires fournissant les fibroblastes dans le rein en fibrose :

- 5 % seraient originaires de la voie de l'EMT ;
- 10 % seraient fournis par la voie de l'EndoMT ;
- 35 % seraient issus du recrutement de fibroblastes circulants issus de la moelle osseuse ;
- 50 % proviendraient de l'activation de fibroblastes résidents de l'interstitium.

Les auteurs ont ici utilisé un modèle de néphropathie obstructive UUO (*unilateral ureteral obstruction*) dont la significativité, en termes de pathologie humaine, reste limitée. La possibilité d'extrapolation des résultats à d'autres maladies rénales est encore très contestée et ne devrait pas être directe [51]. D'autres études basées sur des modèles différents devraient confirmer ou infirmer l'hypothèse selon laquelle l'EMT constitue un moteur dans la progression de la fibrose. Plus particulièrement, le passage de cellules mésenchymateuses à travers la membrane basale (c'est-à-dire de la lumière tubulaire vers l'interstitium) n'a à ce jour pas pu être observé et ne permet pas de statuer sur la place de l'EMT dans la constitution d'un réservoir de cellules fibroblastiques interstitielles [42].

De nombreuses études se sont focalisées sur la restriction de la voie du TGF- β afin d'empêcher le développement de la fibrose rénale. Celles-ci ont notamment permis de faire émerger une activité anti-fibrosante du facteur de croissance des hépatocytes (= *hepatocyte growth factor*), un facteur endogène antagonisant les effets du TGF- β , notamment en réduisant l'EMT et en limitant les dépôts de MEC [2, 43, 52]. Un autre facteur supposé antagoniste du TGF- β est le *bone morphogenic protein* 7; son activité protectrice vis-à-vis de la fibrose rénale ne fait cependant pas encore consensus [2].

1.2.4. Infiltrat inflammatoire

Il est à noter que le recrutement de cellules inflammatoires (monocytes et lymphocytes T) fait généralement suite à une atteinte des cellules résidentes du rein. Etant donné que l'apoptose n'induit pas de relargage du contenu cytoplasmique, elle n'entraîne pas l'activation d'un processus inflammatoire au contraire de la nécrose [53]. Les cellules tubulaires endommagées sont par contre capables de libérer des cytokines qui initieront un processus inflammatoire [2]. L'endothéline, sécrétée par l'endothélium vasculaire, stimule les fibroblastes interstitiels et les cellules inflammatoires. D'autres médiateurs tels que l'interleukine-6 (IL-6) ou la "monocyte chemoattractant protein-1" conduisent à un afflux de cellules mononucléaires dans l'interstitium [54].

Ces cellules inflammatoires sont capables de sécréter des médiateurs autocrines ou paracrines, amplifiant et entretenant (inflammation chronique) ou au contraire réprimant la réaction inflammatoire [2]. Dans ce dernier cas, elle peut laisser place à un mécanisme de réparation ou à une cicatrisation fibreuse [55].

Des cellules immunitaires, telles que les macrophages, jouent un rôle dans l'élimination des cellules altérées et des débris et sécrètent des ROS/RNS pouvant endommager directement les cellules rénales saines [2, 34]. Les cellules inflammatoires vont alors produire des cytokines telles que le TGF- β , capable d'induire le processus d'EMT et la prolifération des fibroblastes (cf. *1.2.3. Transition épithélio-mésenchymateuse et fibrose*), ou le TNF- α engendrant l'apoptose selon la voie extrinsèque (cf. *1.2.1.2. Mort cellulaire*) [2].

1.2.5. Facteurs vasculaires

L'angiotensine II, issue du SRAA, agit sur le tonus vasculaire de la circulation sanguine systémique et intra-rénale. Elle possède également une activité pro-inflammatoire et pro-fibrosante pouvant modifier le fonctionnement rénal [2, 49]. Il a été démontré sur l'animal que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les antagonistes des récepteurs de type 1 à l'angiotensine pouvaient réduire la protéinurie, l'infiltrat inflammatoire et la fibrose dans des modèles expérimentaux tels que l'uropathie obstructive, la néphrectomie subtotale, la néphropathie d'origine autoimmune, la néphropathie diabétique ou la néphropathie hypertensive. Ceci a également été confirmé lors d'études cliniques [56].

Le rein est pourvu de tous les éléments nécessaire au SRAA ; il est ainsi capable de fonctionner de manière autocrine ou paracrine [56]. En plus de provoquer une vasoconstriction de l'artériole efférente (et une vasodilatation de l'artériole afférente) l'activation des récepteurs à l'angiotensine II

est impliquée dans l'induction génomique du TGF-β1 [2, 49, 57]. Rappelons que la sécrétion intrarénale de TGF-β peut conduire à la dédifférenciation phénotypique des RPTECs (par EMT) ainsi qu'à la prolifération des fibroblastes résidents.

Finalement, l'hypertension artérielle, qu'elle soit la cause ou la conséquence de l'insuffisance rénale, accélère par elle-même le déclin de la fonction rénale par l'ischémie qu'elle engendre [2, 58].

1.3. Xénobiotiques néphrotoxiques

Le rein est susceptible d'être endommagé par bon nombre de facteurs physiques ou chimiques. La vulnérabilité des reins vis-à-vis des atteintes toxiques peut être expliquée par :

- L'importante perfusion sanguine ; en effet, les reins reçoivent 25 % du débit cardiaque ;
- La grande surface de contact (conférée par la bordure en brosse du TCP) avec le filtrat ;
- La présence de nombreux mécanismes de transport, visant à assurer la réabsorption de molécules utiles à l'organisme, mais également de substances pouvant être toxiques;
- L'activité métabolique élevée qui peut conduire à la formation de dérivés toxiques ;
- Les mécanismes visant à accroitre la concentration urinaire ou interstitielle des déchets.

De nombreuses molécules environnementales, médicamenteuses ou issues du métabolisme sont susceptibles d'être toxiques pour le rein. Chez les patients hospitalisés, la proportion des ARA induites par les médicaments s'élève à 18 à 33 % en dépit de néphrotoxicités connues et donc potentiellement évitables [15].

Dans cette section, l'accent sera mis sur les xénobiotiques néphrotoxiques employés dans ce travail.

1.3.1. Les acides aristolochiques

Retrouvées dans les plantes du genre Aristolochia et Asarum, ces molécules sont des dérivés phénanthréniques nitrés dont l'activité néphrotoxique chez l'humain a été attestée dans les années 1960 lors d'essais cliniques visant à évaluer leur potentiel antitumoral (Figure 10). Il est également reconnu que les acides aristolochiques sont de puissants cancérigènes du fait de leurs mutagénicité et génotoxicité [59-61].



Figure 10 : structures des acides aristolochiques I (AAI) et II (AAII).

1.3.1.1. Rappels historiques sur la néphropathie aux acides aristolochiques

En Europe, pendant longtemps, les espèces *A. clematitis* L. ou *A. serpentaria* L. ont été utilisées comme plantes médicinales diurétiques, emménagogues ou ocytociques [59]. En médecine traditionnelle chinoise (MTC), *A. fangchi* a été longuement utilisée comme antirhumatismale et diurétique [62]. Au Maghreb, *A. baetica* L. et *A. debilis* Sieb & Zucc sont toujours utilisées traditionnellement pour traiter les troubles digestifs ou le diabète [63]. Au niveau mondial, 99 espèces d'aristoloches utilisées comme plantes médicinales ont été identifiées [61].

La toxicité de ces plantes est longtemps passée inaperçue, probablement en raison de l'absence de toxicité aiguë. Leur dangerosité ne se révèle qu'après ingestion au moyen et long terme.

En Belgique, dans les années 1990, plus d'une centaine de cas de fibrose rénale interstitielle à progression rapide – dont l'étiologie est restée inexpliquée pendant un temps – ont été diagnostiqués [64]. Les patients avaient tous consommé des gélules présentées comme amaigrissantes et supposées contenir entre autre 2 plantes chinoises *Stephania tetrandra* S. Moore et *Magnolia officinalis* Rehder & Wilson prescrites par une personne se présentant comme "amaigrisseur" ; ce qui a conduit à parler de "néphropathie aux plantes chinoises" (CHN = *Chinese herb nephropathy*).

La MTC autorise la substitution de plantes dont les noms chinois sont identiques sans que cela ne porte préjudice aux propriétés du remède [65] ; dans ce cas-ci, les racines de *S. tetrandra*, connues sous le nom chinois de Han Fang Ji, ont été substituées par des racines d'*Aristolochia fangchi* Y.C. Wu, une autre plante médicinale décrite dans la *Materia Medica* chinoise et connue sous le nom de Guang Fang Ji. Cette espèce, comme toutes les aristoloches, renferme des acides aristolochiques dont la néphrotoxicité a été à la base des cas d'insuffisance rénale chronique [64, 66].

La détérioration de la fonction rénale s'est poursuivie sur une période allant de 6 mois à plusieurs années, et ce malgré l'arrêt de la prise des gélules. Six ans après le retrait du marché des gélules, une centaine de patients étaient répertoriés en Belgique, dont 30 % présentaient une MRC modérée et 70 % connurent une IRT, obligeant une prise en charge dans des programmes de TRR (dialyse : 12 % ; transplantation : 88 %) [67, 68].

Aujourd'hui, étant donné l'identification de l'agent causal, on parle plus volontiers de néphropathie aux acides aristolochiques (AAN = aristolochic acid nephropathy) [69].

1.3.1.2. Stratégie de néphroprotection

Vu l'évolution inexorable de l'atteinte rénale vers l'IRT – en dépit de la suppression de l'agent causal – un traitement à base de corticostéroïdes a été envisagé. Ceci a fait l'objet d'une étude pilote menée sur 35 patients présentant une CHN. Pour quelques patients, le traitement a permis de ralentir la progression de la néphropathie, repoussant l'incidence de l'insuffisance rénale terminale de 1 à 3 ans au mieux [70]. Aucune amélioration de la fonction rénale n'a pu être objectivée après blocage du système rénine-angiotensine [56].

1.3.1.3. De la néphropathie aux plantes chinoises aux carcinomes urothéliaux

L'évolution de la fibrose interstitielle dans le cadre de l'AAN semble rapide et dose-dépendante : de par les cas diagnostiqués en Belgique, il a été estimé qu'une ingestion cumulée de 138 g de poudre contenue dans les gélules suffisait à déclencher une MRC, et qu'à 192 g l'IRT était installée [67]. La période d'ingestion des gélules contaminées (telles que prescrites) a été évaluée à 13,3 mois en moyenne ; les patients ont atteint l'IRT 3 à 85 mois après avoir stoppé l'ingestion [71].

Les biopsies rénales pratiquées ont révélé une importante fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire sévère ; et, dès 1994, la présence de cellules atypiques au niveau de l'épithélium urothélial a été détectée sur 3 reins natifs issus de patients transplantés quelques mois plus tôt [71]. La suspicion de carcinome urothélial a été rapidement confirmée chez 2 patients victimes de CHN, ce qui a conduit à conseiller une néphrectomie prophylactique aux 43 patients traités pour leur insuffisance rénale terminale (12 dialysés, 31 transplantés) [71]. Sur 39 patients ayant accepté l'intervention, 18 (soit 46 %) présentaient un cancer au niveau des bassinets et/ou des urètres.

Tous ces cas de carcinomes urothéliaux ont été associés à la présence d'adduits d'AA à l'ADN, ceux-ci étant vraisemblablement impliqués dans la cancérogénèse vu leur caractère mutagène [71].

1.3.1.4. Autres cas de néphropathies aux acides aristolochiques dans le monde

Si la majorité des cas d'AAN ont été répertoriés en Belgique, 2 autres ont été rapidement signalés en France : une première patiente avait consommé des gélules supposées contenir *S. tetrandra* pendant 15 mois et avait été hospitalisée 2 ans après ; l'autre avait suivi des cures de 1 mois, 3 ou 4 fois par an au cours des 3 années précédentes [59, 72]. Au total, 7 cas d'AAN ont été diagnostiqué en 1994 [72]. Au Royaume-Unis, 2 autres cas ont été signalés : la consommation d'un remède chinois dénommé Mu Tong, normalement constitué d'*Akebia quinata* (Thunb.) Decne., pourrait – selon le principe de substitution de MTC – avoir été remplacé par Chuan Mu Tong (*Clematis armandii* Franch.) ou par Guan Mu Tong (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) [59, 72]. En 2001 au Royaume-Uni, une étude identifiait que 40 % des produits censés être constitués – au moins en partie – de Fang Ji ou Mu Tong (*7*], ou au Japon [72, 75].

Entre 1964 et 1999, seulement 5 cas de néphropathie ont été répertoriés en Chine ; il s'agit alors d'ARA dont l'étiologie a facilement pu être attribuée à la consommation d'*Aristolochia fangchi* et d'*Aristolochia manshuriensis* [76]. En 2008, la Chine ne faisait état que de 116 cas d'AAN [77]. En effet, la Pharmacopée Chinoise n'a pas encore banni toutes les parties d'aristoloches de sa *Materia Medica* (seules les racines sont interdites à la consommation) ; et leur usage doit être encadré par un praticien de MTC [61, 78]. La diffusion de produits contenant des aristoloches profite également de la vente par internet [61].

En outre, la *Materia Medica* chinoise préconise la consommation de Guang Fang Ji à raison de 1 à 3 qían par jour (ce qui correspond à une dose de 3,7 à 11,1 g) [79], tout en reconnaissant que le produit doit être utilisé avec précaution chez les enfants [78]. Avec une concentration en AAI & AAII pouvant atteindre 4,5 mg/g de racine [80], la dose absorbée s'élève à 17-51 mg par jour.

Etant donné que la MTC est encore largement plébiscitée par une majorité de Chinois, il y a lieu de s'attendre à une forte prévalence d'AAN et de carcinomes urothéliaux en Chine ; ce qui ne semble pas être le cas. A l'échelle mondiale, l'exposition humaine aux AA est supposée largement sousestimée [61]. Plusieurs paramètres peuvent être à l'origine de ce biais :

- l'apparente sécurité liée à des pratiques millénaires ainsi que la confiance accordée à la MTC en Chine pousse bon nombre de patients souffrant d'effets secondaires à ne pas rapporter l'utilisation de plantes médicinales ;
- le développement de pathologies sur le long terme (parfois longtemps après avoir consommé les plantes toxiques) peut contribuer à ne pas en détecter l'agent causal ;
- le manque de pharmacovigilance, dont l'implémentation ne date que de l'année 1999 en Chine, et n'est pleinement efficace que depuis 2004 seulement, peut également expliquer que de nombreux cas sont passés inaperçus [81].

La prévalence de l'AAN dans le monde reste à l'heure actuelle difficile à estimer. Certaines médecines traditionnelles (en Inde, au Maroc, au Brésil,...) ont encore recours à l'utilisation d'aristoloches [62].

De plus, des produits contaminés par des AA continuent de circuler (en majorité via internet) ; ceci a notamment été révélé en Europe [82, 83] ou en Australie [84] jusqu'en 2012.

1.3.1.5. Néphropathie dite endémique des Balkans

L'apparition de CHN en Belgique a permis de suspecter une cause identique pour les cas alors inexpliqués de néphropathie dite endémique des Balkans (BEN = *Balkan endemic nephropathy*) sévissant depuis plusieurs décennies. Dans la BEN, l'apparition de la néphropathie tubulointerstitielle semble communautaire : elle touche des membres d'une même famille, d'un même village, et se localise essentiellement aux alentours des affluents du Danube et en Roumanie [69]. De nombreux facteurs environnementaux ont été proposés afin d'expliquer l'origine de la maladie : mycotoxines (telles que l'ochratoxine A), métaux lourds, virus, déficiences en oligoéléments. Toutefois, les tableaux cliniques de la BEN et de la CHN présentant de nombreuses similitudes, la responsabilité des AA a alors été envisagée. Il avait déjà été supposé en 1969 que la présence abondante d'*Aristolochia clematitis* dans les champs de blé pouvait être à l'origine du problème ; l'intoxication étant expliquée par la consommation de pain préparé à partir de farines de blé contaminées issues de ces champs. La confirmation fut apportée en 2007 par la mise en évidence d'adduits à l'ADN sur des fragments tissulaires rénaux et des tumeurs urothéliales [69].

L'implication des AA dans la BEN reste encore contestée ; l'argument alors mis en avant est l'évolution plus lente (environ 20 ans) que pour l'AAN [72]. Ce cas illustre le terme d'AAN environnementale, par opposition à l'AAN iatrogène.

1.3.1.6. Néphrotoxicité des acides aristolochiques

L'enzymurie caractérisant les cas d'AAN décrits en Belgique a vite permis de supposer une atteinte des cellules du TCP [85]. Il a ensuite pu être démontré que les AA pénètrent dans les RPTECs par les OAT1, OAT2 et OAT3, ce qui ne suggère pas seulement une entrée par le pôle apical, mais également par le pôle basolatéral [85, 86].

Dans le cytoplasme, ils connaissent une nitroréduction principalement catalysée par la NAD(P)H quinone oxydoréductase et par la xanthine oxydase ; les CYP 1A1 et 1A2 interviennent dans une moindre mesure [77]. Cette réduction fournit les aristolactames correspondants, c'est-à-dire les métabolites capables de former les adduits à l'ADN. En effet, la réaction implique la formation d'un ion N-acylnitrénium intermédiaire, dont la charge positive est délocalisable et capable de réagir avec les fonctions amines de bases puriques telles que l'adénine ou la guanine (Figure 11).



Figure 11 : schéma réactionnel des acides aristolochiques (AAI : R = OCH3 / AAII : R = H) menant à la formation des aristolactames correspondants. L'intermédiaire de réaction, un ion nitrenium, est capable de former des adduits à l'ADN, notamment sur les bases adénine (dA-AA) et guanine (dG-AA).

Les adduits à l'ADN sont responsables des propriétés cancérigènes des AA. Toutefois, la compréhension des mécanismes menant à la néphrotoxicité reste partielle. Les lésions occasionnées par les AA se soldent par une MRC à évolution rapide ou plus lente. De rares cas de NTA ont été rapportés ; et si ceux-ci semblent être liés à l'emploi de hautes doses d'AA, cela suggère néanmoins une évolution bi-phasique de l'AAN [85].

Les RPTECs du segment S3 sont les cibles préférentielles des AA qui induisent une NTA par le biais de lésions mitochondriales conduisant à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. La non-régénération des cellules tubulaires conduit à une atrophie sévère (Figure 12).



Figure 12 : photographies d'un rein atteint d'AAN après néphrectomie, et caractérisation anatomo-pathologique du tissu fibrotique (apparaissant en vert-bleuté) [87].

La fibrose interstitielle conduit à la perte irréversible de la structure du parenchyme rénal. Elle survient en partie à la suite de l'EMT des RPTECs, mais également par activation des fibroblastes résidents. La sécrétion de TGF-β joue ici aussi un rôle déterminant [85].

1.3.2. Le cisplatine

1.3.2.1. Rappels historiques

Le cisplatine (Figure 13) et ses dérivés comptent parmi les agents antinéoplasiques les plus employés. C'est en 1965 que Barnett Rosenberg met en évidence par hasard les propriétés antitumorales du platine : il observa une inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* lorsque le milieu de culture contient du chlorure d'ammonium et qu'il est soumis à un courant électrique à l'aide de 2 électrodes de platine. Il démontra par la suite que l'effet antiproliférateur n'était pas dû au courant électrique, mais était attribuable à la formation d'un complexe, le dichlorodiaminoplatine (II) (= CDDP ou CisPt), provenant du platine libéré par les électrodes et des ions chlorures et ammoniums présents dans le milieu de culture [88].



Figure 13 : structure moléculaire du cisplatine.

Cette observation a conduit Rosenberg à étudier les effets antitumoraux du CisPt chez les animaux, puis chez l'homme.

1.3.2.2. Mécanisme d'action

Dans le milieu extracellulaire, le CisPt circule sous forme non-ionisée. Il est librement filtré par le glomérule et atteint rapidement le TCP et, du fait de sa grande concentration, pénètre dans les RPTECs par diffusion passive [89]. Cependant, d'autres mécanismes de transport ont été décrits récemment : ils semblent impliquer les OCT-2, largement exprimés au niveau apical, ainsi que le transporteur de cuivre Ctr1. Les récepteurs OCT-1 et OCT-3 exprimés au niveau basolatéral assurent un passage du CisPt depuis la circulation sanguine vers les RPTECs [90].

De plus, les récepteurs apicaux "*multidrug and toxic compound extrusion*" (= MATE) sont impliqués dans le transport de molécules cationiques et interviennent dans l'efflux de CisPt [90].

Lors de sa pénétration cytoplasmique le CisPt est rapidement hydrolysé : la concentration d'ions chlorures chute de 103 mM (milieu extracellulaire) à 4 mM (milieu intracellulaire) provoquant la perte des 2 chlorures, dont la liaison covalente est plus labile que celle des ammoniums (Figure 14).



Figure 14 : réactions d'hydrolyse du CisPt. Lors de sa pénétration cytosolique, le complexe perd rapidement ses 2 ions chlorures, remplacés par des hydroxyles plus labiles. Les formes mono et di-hydratées (diaquaplatine) sont beaucoup plus réactives que les formes porteuses de chlorures.

Le complexe de CisPt forme une structure plane ; l'ion platine peut interagir de part et d'autre avec des composants cellulaires nucléophiles (notamment l'ADN, le glutathion, les protéines porteuses de groupement thiols), engendrant la perte des Cl⁻ ou OH⁻, et formant de nouvelles liaisons covalentes.

Une des cibles du CisPt est l'ADN, dont les nucléotides porteurs de nombreux atomes d'azote en font un nucléophile appréciable. Il se lie presque systématiquement au N7 des purines ; les 2 liaisons qu'il établit peuvent se faire avec :

- la même base (notamment avec le N1 de l'adénine) ;
- avec une autre base (N1 ou N7 de l'adénine, N7 de la guanine, N3 de la cytidine), et ceci sur le même brin ou sur le brin complémentaire d'ADN.

L'analyse des adduits a révélé que près de 60-65 % des ponts sont formés entre 2 guanines intrabrins. Des ponts entre adénines et guanines représentent 20-25 % des adduits ; et les ponts intrabrins, entre 2 guanines non adjacentes, 5-6 % des adduits. Les autres liaisons sont formées entre des azotes appartenant à une même base ou par d'autres combinaisons inter- ou intrabrins [91].

La formation de ces adduits entraîne la présence d'un groupement étranger induisant une gêne stérique sur les brins d'ADN ainsi que la création de ponts intra- ou inter-brins capables de recourber la molécule d'ADN. Ceci perturbe fortement les processus de transcription et de réplication, conduisant respectivement à un arrêt de la synthèse protéique et de la prolifération cellulaire. Si la réplication est possible, elle mène fréquemment à une inversion G \rightarrow T. L'arrêt de la réplication est associé à un blocage du cycle cellulaire en phase G₂/M. A partir de ce stade, les enzymes de

réparation vont tenter de restaurer la structure initiale de l'ADN. En cas d'échec, la mort cellulaire par apoptose pourra être déclenchée [15].

Si l'ADN est la cible la plus sensible du CisPt, elle n'est toutefois pas la seule : l'ARN (qu'il soit messager, ribosomal ou de transfert) ou les phospholipides et phosphatidylsérine membranaires réagissent également. Les protéines porteuses de thiols peuvent fixer du CisPt, ce qui implique par exemple une re-conformation du cytosquelette et une perturbation de la polymérisation de l'actine. Finalement, des adduits à l'ADN mitochondrial ont été retrouvés en quantités 4 à 6 fois supérieures comparé à l'ADN génomique ; cette sensibilité a été attribuée à l'absence d'histones [88].

1.3.2.3. Données pharmacothérapeutiques

Indications Le CisPt est un agent alkylant utilisé dans de nombreuses formes de cancer, notamment des testicules, de l'ovaire, du col de l'utérus, de la sphère ORL, de l'œsophage, de la vessie, du tractus urinaire supérieur, des bronches ou de l'estomac [91, 92].

Activité pharmacologique Elle est dictée par la perturbation de la réplication et de la transcription consécutive à la formation d'adduits, qui entrave la croissance et la prolifération des cellules tumorales. La déplétion en glutathion, entraînant la génération d'un stress oxydatif élevé, contribue également à endommager l'ADN et les protéines et à favoriser l'entrée en apoptose [91].

Posologie Le CisPt et ses dérivés s'administrent par voie intraveineuse. Le dosage est dépendant du type de cancer et des paramètres cliniques (entre 15 et 120 mg/m² à administrer en une fois ou sur 5 jours consécutifs ; le traitement étant répété sur 3 à 4 semaines) [93].

Pharmacocinétique Le CisPt circule dans le plasma (riche en chlorures) sous sa forme porteuse de 2 chlores. Il est fixé aux protéines plasmatiques à hauteur de 90-95 % et se distribue, par ordre de préférence, dans les reins, le foie, puis la rate. Il est éliminé essentiellement par le rein : dans les 24 h suivant l'administration, des processus de filtration glomérulaire, de réabsorption et de sécrétion tubulaire parviennent à éliminer 25 à 50 % de la dose de platine administrée [91].

Mécanismes de résistance Ils sont de 2 ordres : soit ils sont intrinsèques et sont présents dès l'apparition de la tumeur, soit ils sont acquis après exposition au platine [91].

Ces mécanismes comprennent :

- une diminution des transporteurs et/ou une augmentation des pompes à efflux conduisant à la diminution de l'accumulation intracellulaire de CisPt. Certaines lignées cellulaires résistantes ont montré une capacité à réduire leur concentration cellulaire de 20 à 70 % via ce mécanisme ;
- une amélioration de la réparation de l'ADN via les voies de réparation par excision de nucléotide et de réparation des mésappariements);

- une neutralisation du CisPt par production de davantage de glutathion et/ou de protéines riches en cystéine et méthionine, acides aminés porteurs de groupements qui piègeront l'agent antitumoral, protégeant ainsi l'ADN;
- une modification des protéines régulatrices du cycle cellulaire ;
- la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xl.

Contre-indications Le CisPt devrait être évité par les patients déshydratés, souffrant d'une immunosuppression médullaire ou de troubles rénaux ou auditifs pré-existants [93].

Effets indésirables La toxicité aiguë du platine est susceptible d'entraîner nausées et vomissements. Si l'effet est commun aux chimiothérapies anticancéreuses, le CisPt reste l'un des plus émétisants. Ceci est toutefois atténuable par l'administration de sétrons. Des réactions allergiques (dermatite, eczéma,...) sont également observées en phase aiguë [94]. A plus long terme, la néphrotoxicité est l'effet secondaire le plus préoccupant car elle interdit l'emploi de doses plus élevées (celle-ci est présentée plus en détails au point *1.3.2.5. Néphrotoxicité du cisplatine*). Une ototoxicité est fréquemment observée ; elle est attribuable à la production de ROS/RNS au niveau des cellules ciliées de la cochlée, ce qui entraîne une mortalité cellulaire importante et une perte possible de l'acuité auditive. Les autres effets secondaires comprennent une myélosuppression ou des neuropathies [91].

Interactions Elles concernent les médicaments ayant une activité néphrotoxique qui se cumule au CisPt (céphalosporines, aminoglycosides, produits de contraste iodés,...). Une éventuelle ARA induite par le traitement est capable de modifier les propriétés pharmacocinétiques de nombreux médicaments.

1.3.2.4. Dérivés du platine

D'autres dérivés du platine possédant également des propriétés antitumorales ont été synthétisés ; les principaux complexes commercialisés à l'heure actuelle sont le carboplatine et l'oxaliplatine (Figure 15). Ils se basent sur le même principe : le platine, à l'état II, est lié par des liaisons covalentes à 4 substituants, dont 2 substituants azotés peu labiles, et 2 plus labiles qui pourront être hydrolysés après pénétration dans le cytoplasme.



Figure 15 : structures du carboplatine et de l'oxaliplatine.

L'isomère transplatine est également capable de se fixer à l'ADN, mais n'affecte pas les processus de transcription et de réplication, ce qui lui confère des propriétés mutagènes. Il convient également de citer le nédaplatine, est utilisé au Japon, et le lobaplatine, utilisé en Chine [91].

Tous ces dérivés ont le même mode d'action. Leur pharmacocinétique, leurs effets secondaires, ainsi que leur spectre d'activité varient d'une molécule à l'autre ; le plus puissant agent anti-tumoral reste le cisplatine.

1.3.2.5. Néphrotoxicité du cisplatine

Elle se déclenche chez environ un tiers des patients sous chimiothérapie et se manifeste par une ARA. Elle est expliquée par la capacité du CisPt à se concentrer dans les RPTECs où il pourra induire des phénomènes d'apoptose et/ou de nécrose résultant en une perte massive de cellules fonctionnelles. Comme pour les tumeurs, il forme des adduits spécifiques à l'ADN et perturbe ainsi les mécanismes de transcription et de réplication [95-97].

De plus, la production de ROS/RNS intervient directement dans les dommages aux cellules – notamment à leur ADN – et dans le déclenchement de l'apoptose, mais pas dans la nécrose [91]. L'élévation du stress oxydatif pourrait être expliquée par la capacité du platine à se lier spontanément au GSH, formant un conjugué qui pourra être éliminé plus facilement par les RPTECs. Cette conjugaison est assortie d'une déplétion en glutathion qui affaiblit les défenses antioxydantes de la cellule [15].

De plus, il a été montré dans un modèle *in vitro* que des cellules traitées avec du CisPt (à des concentrations de 50 à 500 mM) connaissaient une inhibition de leurs complexes I et IV de la chaine respiratoire mitochondriale après 20 min d'incubation seulement. L'ATP cellulaire est réduit de 70 %, induisant un phénomène de nécrose cellulaire [15].

Des perturbations de l'hémodynamique intra-rénale, par vasoconstriction des capillaires, surviennent rapidement après l'administration de CisPt. Plus tard, l'augmentation de cytokines (et notamment de TNF- α) induit une inflammation intra-rénale qui se traduit par la différenciation, la maturation et l'activation de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes T infiltrant l'interstitium rénal [97].

Une régénération tubulaire déficiente renforce la durée et la sévérité de l'ARA ; dans ce cas, la pathologie est souvent accompagnée d'une cicatrisation de type fibrotique. La fibrose est la pierre angulaire du développement d'une MRC : la production de tissu inerte, non résorbable, conduit à une perte irréversible de néphrons. Il est ainsi démontré que des administrations récurrentes de

CisPt occasionnent des ARA à sévérité exacerbée et qui tendent à durer plus longtemps, conduisant à une MRC potentiellement terminale et nécessitant le recours à la dialyse [98].

1.3.2.6. Stratégies de néphroprotection

A l'heure actuelle, la seule mesure permettant de réduire la néphrotoxicité du CisPt consiste à augmenter la diurèse (1 à 2 litres de liquide, 8 à 12 h avant et après le traitement) : la perte rapide de grands volumes liquidiens contribue à assurer un débit tubulaire tel que la capture par RPTECs est réduite [92]. Le maintien d'une concentration élevée de chlorures (par l'utilisation de solutions de perfusion à base de NaCl) permet également d'éviter la formation de dérivés mono et di-hydratés plus réactifs. L'efficacité de ces stratégies reste toutefois incomplète et aléatoire [89].

Une approche complémentaire à l'augmentation de la diurèse consiste à administrer une substance cytoprotectrice concomitamment au CisPt. L'amifostine (Figure 16), utilisée aux Etats-Unis et au Canada, permet de réduire le risque de néphrotoxicité par son activité neutralisant les ROS ; cette activité ne semble pas s'opposer à la régression de la tumeur. D'autres effets incluant une accélération de la réparation de l'ADN et une inhibition de l'apoptose pourrait contribuer à la protection rénale [99].

NH₂

Figure 16 : structure de l'amifostine.

D'autres antioxydants, tels que la N-acétylcystéine, le glutathion, la vitamine E ou le thiosulphate de sodium pourraient également permettre de réduire la néphrotoxicité du traitement par CisPt. Alors que les preuves cliniques restent insuffisantes pour ces agents protecteurs (notamment dans des essais de neuroprotection) [100], certains sont de surcroi suspectés de favoriser la survie tumorale [89].

Des approches pharmacologiques – autres que l'administration d'antioxydants – permettant de réduire la toxicité rénale du CisPt et de minimiser le risque d'ARA ont été testées. Celles-ci ont notamment révélé un effet néphroprotecteur pour la cimétidine, dont le transport par les OCT-2 entre en compétition avec celui du CisPt [101]. De plus, en inhibant certains CYP450, la cimétidine permettrait de limiter la génération de radicaux libres.

Une autre stratégie visant à limiter l'entrée de CisPt dans les RPTECs pourrait être un blocage du transporteur Ctr1 [89]. Cette stratégie reste discutable en raison de la présence de Ctr1 dans de

nombreuses cellules, dont les cellules tumorales [102]. Au contraire, les OCT-2 sont distribués essentiellement dans le rein, la cochlée et les neurones et son peu présents dans les tumeurs. Alternativement, la recherche se concentre sur la découverte de nouveaux composés, notamment d'origine naturelle, qui pourraient être administrés parallèlement au CisPt. De nombreuses études publiées à ce sujet rapportent entre-autres des réductions de mortalité cellulaire, de stress oxydatif ou de dégâts à l'ADN [103-105].

En cas de surdosage en CisPt, il est possible d'administrer du diéthyldithiocarbamate afin de chélater le platine (II) et de faciliter son élimination rénale. A l'instar de l'administration d'amifostine ou d'acétylcystéine, l'efficacité de cette mesure reste limitée [106]. Toutefois, en pratique, l'hémodialyse permet d'épurer le sang en limitant la fixation au parenchyme rénal [94].

1.3.3. La ciclosporine A

1.3.3.1. Rappels historiques

En 1958, l'industriel pharmaceutique suisse Sandoz démarre un programme de recherche visant à identifier de nouveaux antifongiques. Dans le but de constituer des banques de microorganismes producteurs de métabolites potentiellement prometteurs, les employés sont encouragés à collecter des échantillons de terre lors de leurs déplacements en dehors de la Suisse. C'est ainsi qu'en 1969 lors d'un voyage en Norvège, Hans Frey ramène un champignon nommé *Tolypocladium inflatum* capable de produire de la ciclosporine A (CsA). Ce champignon est toutefois largement distribué hors de Norvège (Danemark, Etats-Unis, Canada, Népal,...) ; et d'autres espèces telles que *Fusarium spp.* ou *Neocosmospora spp.* sont également capables de synthétiser de la CsA [107].

Afin de maximiser les chances de découverte de nouvelles molécules médicamenteuses, Sandoz invite ses différents laboratoires à s'échanger les composés prometteurs pour les inclure dans de larges programmes de screening ; en 1972, la CsA dévoile alors ses propriétés immunosuppressives [107]. Après l'avoir montrée efficace dès 1980 chez une patiente ayant bénéficié d'une transplantation hépatique, Sandoz met sur le marché Sandimmun® en 1983. Une formulation plus récente (une capsule molle contenant une microémulsion disponible sous le nom de Neoral Sandimmun®) permet l'administration orale de CsA. La ciclosporine permet toujours à l'heure actuelle d'assurer le succès de milliers de transplantations chaque année [108].

La CsA est un peptide cyclique de 11 acides aminés assemblés par une peptide-synthase nonribosomique et contenant 3 acides aminés n'intervenant pas dans la constitution de protéines : une alanine de configuration D, un acide butyrique et un dérivé de la thréonine (Figure 17) [109].



Figure 17 : structure de la CsA.

1.3.3.2. Mécanisme d'action

La ciclosporine se fixe à la cyclophiline présente dans les lymphocytes. Le complexe CsA-cyclophiline inhibe la calcineurine, une phosphatase dont l'activité permet la translocation nucléaire du "*nuclear factor of activated T-cell*" (NFAT) qui est impliqué dans la transcription de l'interleukine 2 (IL-2). La CsA permet ainsi une inhibition de l'activation des lymphocytes T effecteurs. Elle bloque également l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial, entravant la libération du cytochrome C dans le cytosol et inhibant de ce fait l'entrée dans un processus d'apoptose [110].

1.3.3.3. Données pharmacothérapeutiques

Indications La CsA est indiquée dans la prévention des rejets suivant une transplantation d'organes solides (rein, cœur, foie, poumon, pancréas) ou de moelle osseuse. Elle est également indiquée dans le traitement des formes sévères de maladies auto-immunes telles que le psoriasis, le syndrome néphrotique, l'arthrite rhumatoïde, l'uvéite auto-immune ou la dermatite atopique [93].

Activité pharmacologique La ciclosporine est un inhibiteur de la calcineurine, une phosphatase qui stimule la sécrétion de divers facteurs de croissance, dont l'interleukine-2, cytokine intervenant dans la croissance et la différenciation des lymphocytes T.

Posologie Le traitement à la ciclosporine suivant une greffe d'organe solide requiert des doses de 10 à 15 mg/kg/j en 2 prises dans les 2 semaines suivant l'intervention. Cette dose est ensuite réduite à 2 à 6 mg/kg/j en 2 prises. Dans le cas de greffe de moelle osseuse, une perfusion i.v. est mise en place pendant 2 semaines avant d'être remplacée par une administration orale de 12,5 mg/kg/j en 2 prises pendant 3 à 6 mois. Le traitement des maladies auto-immunes requiert une administration de 2,5 à 6 mg/kg/j devant être diminuée progressivement après l'arrêt des symptômes [93].

Pharmacocinétique La ciclosporine est rapidement résorbée après ingestion, avec une biodisponibilité étant de 30 à 60 %. Elle est substrat du CYP 3A4 et de la P-gp. Seuls 6 % de la dose sont excrétés par voie urinaire, dont 0,1 % sous forme inchangée ; la majorité est excrétée par voie biliaire [110].

Contre-indications L'insuffisance rénale est une contre-indication au traitement par ciclosporine.

Effets indésirables Outre les effets secondaires communs aux immunosuppresseurs tels qu'une diminution de la résistance face aux microorganismes pathogènes, une augmentation du risque de développement de lymphomes et autres tumeurs malignes (en particulier de la peau), une insuffisance rénale consécutive à une néphrotoxicité doit être envisagée. En cas d'utilisation prolongée, une fibrose rénale interstitielle peut se développer ; des lésions ont été retrouvées chez 72 % des patients traités [108].

Interactions Le cytochrome P450 3A4 est responsable de la métabolisation de la ciclosporine. Si son inhibition conduit à une augmentation des doses pouvant donner lieu à une exacerbation des effets secondaires, son activation implique quant à elle une diminution des concentrations sériques limitant l'efficacité du traitement. Des cas de rejets de greffons rénaux ont été signalés chez des patients pour lesquels les concentrations sériques de ciclosporine ont chuté consécutivement à l'ingestion d'extraits de millepertuis (*Hypericum perforatum* L.), un phytomédicament en vente libre utilisé pour traiter les cas de dépression modérée ou d'anxiété [111, 112]. Cette interaction est expliquée par une induction du CYP 3A4 et par une activation de la P-gp, dont la ciclosporine est un substrat [113].

Précautions d'emploi Etant donné la marge thérapeutique étroite, un contrôle des concentrations sanguines s'impose [112]. En raison de ses effets secondaires, des évaluations régulières de la pression artérielle et de la fonction rénale doivent être mises en place parallèlement au traitement. L'utilisation concomitante d'autres médicaments néphrotoxiques augmente le risque de développement d'une insuffisance rénale [93].

1.3.3.4. Néphrotoxicité de la ciclosporine

Si l'utilisation des inhibiteurs des calcineurines (CsA ou tacrolimus) s'avère indispensable au succès d'une transplantation rénale, leurs effets à court et long termes ont été associés à une incidence accrue de dommages irréversibles incluant une fibrose interstitielle, une atrophie tubulaire et une glomérulosclérose [110]. Cependant, il n'existe pas de tableau histologique spécifique à la néphrotoxicité induite par la CsA. La physiopathologie de la néphrotoxicité de la CsA est imparfaitement comprise, mais serait en partie liée à l'inhibition de la translocation du "*nuclear*

factor of activated T-cell". L'inhibition de la transcription du gène de l'interleukine 2 est accompagnée d'une altération transcriptionnelle des gènes de la NOS, de l'endothéline, du collagène l et IV, du TGF-β et de Bcl-2 [15, 114].

Une autre raison de la rénotoxicité de la CsA provient de l'interférence avec l'hémodynamique intrarénale consécutive à une vasoconstriction de l'artériole afférente glomérulaire. Cet effet, qui s'expliquerait par une stimulation de la synthèse d'endothéline, est réversible et peut être atténué par réduction de la dose administrée [115].

Toutefois, l'activation de certains phénomènes est reconnue responsable de la néphrotoxicité : la CsA provoque une augmentation du stress oxydatif qui altère la structure de biomolécules. Elle cause notamment des dégâts à l'ADN, induisant un blocage des cellules en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire [116]. Si ces dégâts ne peuvent être réparés, la cellule entrera dans un processus apoptotique. Bien que les mitochondries soient des organites importants dans la génération de ROS/RNS, leur élévation intervient indépendamment du blocage du pore de transition de perméabilité mitochondrial [117]. L'apoptose est présentée comme une cause majoritaire de la dysfonction rénale [118]. *In vitro*, des doses de CsA de l'ordre du nM induisent de l'apoptose, alors qu'au µM, la nécrose est le processus de mort cellulaire majoritaire [116].

Une fibrose interstitielle est fréquemment diagnostiquée après des traitements au long terme. Si celle-ci a été supposée être une conséquence de la réduction du débit sanguin (causée par une diminution de sécrétion de NO au niveau des artérioles), il a été prouvé plus tard que les RPTECs sont également des cibles de la CsA. Celles-ci peuvent se dédifférencier suivant un processus d'EMT, permettant ainsi l'apparition de fibroblastes et de myofibroblastes au niveau rénal [119]. Ces cellules sont capables de sécréter des composants de la MEC tels que les collagènes I et III, de la fibronectine et produisent de l' α -SMA. Cependant, comme il l'a été mentionné dans le paragraphe 1.2.3. Transition épithélio-mésenchymateuse et fibrose, la translocation transmembranaire de RPTECs vers l'interstitium n'est pas un processus ayant pu être objectivé à l'heure actuelle.

1.3.3.5. Stratégies de néphroprotection

A l'heure actuelle, il n'existe aucun recours contre la néphrotoxicité de la CsA. Les mesures conservatrices se basent sur une évaluation de l'intégrité de la fonction rénale, ainsi que sur la minimisation des doses et dans certains cas sur le remplacement par un autre immunosuppresseur (le sirolimus par exemple) [110].

Il a été démontré qu'une exposition à la CsA induit l'expression du transporteur *adenosine triphosphate-binding cassette protein B1* au niveau de la bordure en brosse rénale. Celui-ci est impliqué dans l'efflux de CsA hors des RPTECs et constitue un mécanisme de protection rénale. La capacité individuelle à réguler son expression influence la susceptibilité à développer des altérations du parenchyme rénal [110].

1.3.4. Autres agents néphrotoxiques

De nombreuses autres substances peuvent présenter une toxicité rénale, parmi lesquelles :

- les aminoglycosides, des médicaments antibactériens qui s'accumulent dans les lysosomes des RPTECs et perturbent leur métabolisme. Une NTA apparait chez 10 à 20 % des patients après 8 à 10 jours de traitement ; la fonction rénale se normalise progressivement à son arrêt [2, 15, 120].
- l'amphotéricine B, un polyène amphotère à action antimycosique utilisé contre les levures (e.g. Candida albicans) et les champignons (e.g. Aspergillus). La création de pores aqueux perturbe l'équilibre hydro-électrolytique transmembranaire, ce qui explique sa néphrotoxicité [15].
- les métaux lourds principalement le mercure, le cadmium, le plomb, l'étain et l'arsenic peuvent engendrer des dysfonctions mitochondriales à la base de déplétions en ATP perturbant le métabolisme cellulaire rénal [15]. Des conjugaisons au GSH ou aux cystéines protéiques sont à la base d'une élévation du stress oxydatif.
- les ochratoxines, des mycotoxines produites par des champignons du genre Aspergillus ou Penicilium impliquées dans la contamination de divers aliments destinés à l'homme ou aux animaux [15]. Au niveau rénal, elles induisent de la nécrose et de l'apoptose, de l'EMT et stimulent la réponse inflammatoire, ce qui peut conduire à l'installation de la fibrose.
- les agents de contraste et de radiodiagnostic, et notamment les produits de contraste iodés fréquemment responsables d'hospitalisations. Ceux-ci perturbent l'hémodynamique rénale et provoquent une ischémie menant à la NTA chez 7 % des patients [121]. La normalisation de la fonction urinaire se fait endéans les 7 à 10 jours [2]. Les dérivés du gadolinium, utilisés en résonance magnétique, sont aussi à risque de déclencher des ARA [15]. Ils déclenchent un trouble appelé fibrose systémique néphrogénique, principalement chez les patients atteints de MRC et dialysés. La physiopathologie est mal connue, mais se caractérise par une fibrose sévère de la peau et des tissus sous-jacents [122].
- les agents anesthésiants (halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane, desflurane) provoquent fréquemment des insuffisances rénales post-opératoires légères à modérées par des effets cardiovasculaires [15]. Le débit sanguin rénal étant diminué, le DFG chute et l'urine ne parvient

pas à éliminer suffisamment de Na⁺. Ces troubles fonctionels sont limités dans le temps et se normalisent endéans les quelques jours suivant l'anesthésie [2].

1.4. Plantes médicinales considérées comme néphroprotectrices abordées dans ce travail

1.4.1. Angelica sinensis (Oliv.) Diels

1.4.1.1. Description botanique

La plante, classée dans la famille des Apiaceae, ordre des Apiales [123], est retrouvée en Chine, en Corée et au Japon [124]. Après 3 ans de vie, elle produit des ombelles sphériques de fleurs de couleur blanc-vert, qui évoluent en ombelles de graines [125].

La drogue (Figure 18) est constituée par la racine pivotante se divisant rapidement en une dizaine (voire plus) de racines coniques. L'ensemble mesure entre 15 et 25 cm de long. La racine principale est large de 1,5 à 4 cm et est de couleur jaune-brun à brun foncé. Sa surface est grumeleuse, irrégulière, striée longitudinalement et montre des cicatrices de racines secondaires. Les ramifications ont des diamètres allant de 0,3 à 1 cm pour leur partie supérieure ; la partie inférieure pouvant quant à elle devenir très fine. La racine séchée est de texture friable. La coupe transversale laisse apparaitre une écorce épaisse avec quelques fissures et de nombreuses ponctuations brunes provenant de canaux sécréteurs. La couleur est brunâtre à l'extérieur et blanc crémeux à l'intérieur [126]. Son caractère aromatique en fait une épice appréciée dans la cuisine chinoise.



Figure 18 : échantillon de racine d'Angelica sinensis.

53

1.4.1.2. Description phytochimique

Plus de 70 composés bioactifs ont été identifiés. Les plus étudiés sont le Z-ligustilide et l'acide férulique.

Huile essentielle Elle est notamment composée des phtalides décrits ci-dessus. On retrouve également du carvacrol, du crésol, du gaïacol et du safrole connu pour son action cancérigène [126]. L'huile essentielle est présente dans la racine à hauteur de 0,4 à 0,7 % [127] ; la Pharmacopée Chinoise impose une quantification de l'huile volatile dont la teneur minimum doit être de 0,4 % (v/m) [78].

Phtalides Il s'agit d'une classe de molécules retrouvée dans l'huile essentielle d'*A. sinensis*, de faible polarité et pouvant être extraites par des solvants tels que l'hexane, l'éther de pétrole, le dichlorométhane, le méthanol ou l'éthanol à 70 %. Au total, 18 phtalides ont été identifiés ; parmi les plus abondants, on retrouve les isomères E et Z du ligustilide, le n-butylphtalide ou le n-butylidenephthalide (isomères E et Z), certains éventuellement sous forme dimérisée (tels que l'angélicide ou le Z-ligustilide dimère E-232) (Figure 19) [128, 129].

La teneur en Z-ligustilide varie entre 1,3 et 37,7 mg/g de racine séchée [128].



Figure 19 : structure des phtalides principaux isolés de l'angélique chinoise.

Acides organiques La racine d'A. sinensis contient une série d'acides organiques tels que les acides férulique (FA = ferulic acid), caféique, protocatéchique, phtalique, p-hydroxybenzoïque, vanillique, succinique, nicotinique et les acides folinique et folique [129].

Le coniféryl férulate, un ester de l'acide férulique, a également été décrit [129] (Figure 20). Ses activités biologiques sont similaires (mais plus intenses) à celles de l'acide férulique ; il est toutefois relativement instable et rapidement hydrolysé [130].



Figure 20 : structures de l'acide férulique et du coniféryl férulate.

L'acide férulique est souvent employé comme traceur de qualité d'A. sinensis. Sa teneur varie entre 0,21 et 1,75 mg/g de racine sèche [128].

Polysaccharides La plante contient également des polysaccharides qui ont montré des effets immunostimulateurs et antitumoraux [128, 129]. Leurs structures sont imparfaitement connues ; ils contiennent de l'arabinose, du fucose, du galactose, du glucose, du rhamnose et du xylose.

Coumarines L'effet anticoagulant de la plante est à attribuer à la présence de coumarines telles que l'osthole [124]. Des furocoumarines telles que le psoralène, l'angélicine et le bergaptène sont quant à elles responsables de l'effet photosensibilisant [124].

1.4.1.3. Usages médico-traditionnels

Selon les concepts de MTC, la racine d'*A. sinensis*, aussi connue sous le nom de *Dang gui*, est utilisée pour *tonifier le Sang et le Foie* [78, 79]. Elle permet en outre de soigner l'anémie, d'atténuer les symptômes liés à une perte de sang, ainsi de régulariser le cycle menstruel [126, 127]. Les premières traces de son utilisation ont été retrouvées dans le *Shennong Bencao Jing* (la Materia Medica de l'empereur Shennong) rédigé entre 200 et 300 av. J.-C. [128].

1.4.1.4. Données pharmacothérapeutiques

Indications A. sinensis est indiquée dans le traitement des troubles menstruels tels que les dysménorrhées, les syndromes prémenstruels ou les ménorragies, ainsi que pour atténuer les symptômes de la ménopause [79, 124, 127, 131]. Il est à noter que les études cliniques justifiant un tel emploi sont encore rares et controversées [130].

D'autres indications incluent les maux de tête, les névralgies, les infections herpétiques, la malaria, le vitiligo ou l'anémie [124].

Activité pharmacologique De nombreuses activités ont été décrites. Elles incluent une activité antiinflammatoire (sur un modèle *in vivo*) corrélée à une diminution de la sécrétion du TNF-α et de la prostaglandine E2 et à l'inhibition de l'activité du NF-κB [127, 128]. Des effets immunomodulateurs ont été observés chez la souris [128]. Des effets antitumoraux, observés *in vitro*, sont attribuables à un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à une diminution de la survie des cellules cancéreuses par apoptose vraisemblablement induite par une augmentation de la génération de ROS. Une activité neuroprotectrice a été mise en évidence dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion ; elle a été corrélée à une augmentation des activités de la GSH-Px et de la SOD, et donc à une neutralisation plus efficace des ROS [128].

L'acide férulique est un antioxydant reconnu [128] ; il n'est toutefois pas spécifique à A. sinensis, mais se retrouve dans bon nombre d'aliments courants (café, agrumes, banane, céréales, choux, épinard,...) [132].

Posologie La Materia Medica Chinoise préconise une consommation quotidienne de 1 à 5 qian, ce qui correspond à une masse de 3,7 à 18,5 g [79]. La Pharmacopée Chinoise moderne recommande quant à elle une consommation de 6 à 12 g par jour [78].

Contre-indications L'utilisation d'A. *sinensis* n'est pas recommandée durant la grossesse, bien que la médecine chinoise l'ait préconisée dans certaines situations [124]. L'allaitement ne constitue pas une contre-indication. Seules les personnes présentant des troubles de la coagulation (ou suivant un traitement anticoagulant) ou des menstruations excessives devraient l'éviter.

Effets indésirables Outre des effets non spécifiques tels que des nausées, vomissements, diarrhées ou anorexie, les dérivés coumariniques d'*A. sinensis* sont susceptibles d'augmenter le volume des menstruations et d'engendrer des troubles de l'hémostase. La présence de furocoumarines rend la plante photosensibilisante [124].

Interactions Deux cas d'interactions médicamenteuses ont été rapportées avec la warfarine ; les raisons supposées de cette interaction s'appuient sur la présence de coumarines et sur l'inhibition du CYP 2C9, enzyme impliquée dans la métabolisation de la warfarine [111, 127]. En conséquence, *A. sinensis* ne devrait pas être utilisée avec les anticoagulants et les antiagrégants plaquettaires ; elle pourrait également potentialiser l'activité anticoagulante du trèfle (*Trifolium pratense* L.) [124].

Des interactions avec les œstrogénomimétiques et les contraceptifs hormonaux sont à suspecter, bien qu'elles n'aient encore jamais été observées [124].

Une inhibition des cytochromes P450 2D6 et 3A4 a été mise en évidence sur des microsomes hépatiques de rat [128] ; cette activité ne semble cependant pas avoir de conséquence clinique.

1.4.1.5. Potentiel néphroprotecteur

Dans un screening impliquant 47 plantes sélectionnées sur base de leur usage traditionnel dans des pathologies impliquant le rein ou le système urinaire, ainsi que sur base de rapports faisant état d'un potentiel néphroprotecteur ou néphrotoxique, Wojcikowski et al. montrèrent que des extraits au méthanol ou à l'acétate d'éthyle d'*A. sinensis* permettent d'augmenter la survie cellulaire de cellules NRK-52E et NRK-49F lorsque ces dernières sont traitées pendant 20 h avec du H_2O_2 [133]. Ceci a conduit les auteurs à supposer une activité protectrice exercée par le biais d'un effet antioxydant.

Les effets néphroprotecteurs d'A. *sinensis* ont souvent été étudiés dans le cadre d'une combinaison avec la racine d'Astragalus membranaceus, utilisée en MTC notamment pour traiter les syndromes néphrotiques [79, 127, 134]. Cette association, administrée oralement à des rats a augmenté la génération basale de ROS dans les reins ainsi que la production de NO par la eNOS [128]. Cependant, les rats ayant subi une UUO ont présenté une meilleure capacité de neutralisation des ROS. La combinaison des 2 plantes a également permis de diminuer les taux intra-rénaux de TGF-β, d'atténuer l'activation des fibroblastes, de réduire l'infiltration de macrophages et de limiter l'apoptose de cellules tubulaires.

D'autres bénéfices de cette association ont été démontrés dans un modèle de néphrotoxicité induite par la puromycine : une décoction de ces plantes a permis de limiter les altérations de la structure rénale, notamment en limitant la production de MEC (collagène III & IV, fibronectine) et en limitant l'apparition d'un profil fibroblastique (objectivé par l' α -SMA). L'effet a été corrélé à une diminution de l'ARN et de la synthèse de TGF- β 1 [135].

Plus tard, une étude est parvenue à démontrer une synergie pour les activités de l'acide férulique et de l'astragaloside IV, deux composés issus respectivement de l'angélique et de l'astragale [136]. Dans un modèle UUO, l'examen de coupes histologiques de rein n'a pas permis de révéler une réduction des atteintes tubulaires pour le FA ou pour l'astragaloside IV, pris séparément. La combinaison a toutefois présenté un effet bénéfique sur l'atrophie tubulaire et s'est traduite par une diminution de l'expression de fibronectine, d' α -SMA et de TGF- β 1. Sur des cellules NRK-49F et HK-2 en culture, la combinaison a également permis de réduire l'expression de fibronectine et d' α -SMA [136].

Dans un modèle de néphrectomie 5/6, la combinaison d'*A. sinensis* et *A. membranaceus* a également permis de limiter le dépôt de MEC au niveau de la membrane basale du glomérule et du tubule. Les réductions de la glomérulosclérose et de la fibrose interstitielle ont été associées à une préservation des capillaires et au maintien de la fonction vasculaire [137].

Un dernier exemple d'effet néphroprotecteur apporté par cette combinaison a été fourni sur un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat : le mélange d'angélique et d'astragale a induit une récupération plus rapide de la structure et de la fonction rénales. Les reins de rats traités par le mélange présentaient plus de cellules positives pour le *proliferating cell nuclear antigen*, et une plus forte activité de la c-Jun N-terminal kinase, deux facteurs qui pourraient expliquer une amélioration de la prolifération après l'atteinte ischémique [138].

1.4.2. Eleutherococcus senticosus (Rupr. & Maxim.) Maxim.

1.4.2.1. Description botanique

L'espèce *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim (anciennement dénommée *Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxim.)) est classée dans la famille des Araliaceae, ordre des Apiales [123]. La plante se retrouve dans l'extrême Est de la Russie, dans le Nord-Est de la Chine, en Corée et au Japon [139]. En raison d'une activité adaptogène comparable à celle du *Panax ginseng* (cf. chapitre 1.4.3. Panax ginseng C.A. Meyer), il est souvent dénommé ginseng sibérien.

C'est un arbuste de 2 à 3 m (pouvant atteindre 6 m) dont les branches portent de minces épines qui tendent à se disperser avec l'âge. Les feuilles, palmées, sont composées d'un long pétiole rougeâtre, et de 5 folioles elliptiques à bords dentelés. Sur la face supérieure, elles portent de petites épines le long de leur nervure. Les fleurs sont réunies en ombelles et sont blanc-verdâtre. Leur corolle est violette pour les mâles et jaunâtre pour les femelles. Les ovaires sont entourés par un disque sécrétant du nectar. Les fruits réunis en grappes sont des baies ovoïdes noires [125, 140, 141].

La drogue est constituée par le rhizome noueux, de forme cylindrique irrégulière et dont le diamètre varie de 1,5 à 4,0 cm. Sa couleur varie de brun-gris à brun-noir. La surface est rugueuse et sillonnée de rides longitudinales. Sur la face inférieure du rhizome, on note de nombreuses racines cylindriques de couleur identique au rhizome. Elles sont noueuses, d'une taille de 3,5 à 15 cm de longueur et de 0,3 à 1,5 cm de diamètre [142].

De par ses effets adaptogènes supposés similaires à ceux du ginseng, on la surnomme également "ginseng sibérien", en dépit d'une composition phytochimique différente.

1.4.2.2. Description phytochimique

Eleuthérosides II s'agit d'une famille de composés issus de classes chimiques diverses et supposés responsables de l'activité de l'éleuthérocoque. Leurs structures sont très variées : de nombreuses molécules ayant démontré une activité biologique ont été *de facto* nommées "éleuthéroside" [139] ; par exemple, les éleuthérosides I et M sont des triterpènoïdes, les 2 principaux médiateurs de bioactivité, l'éleuthéroside B (syn. = syringine) et l'éleuthérosides E, sont respectivement un phénylpropanoïde et un lignane (Figure 21) [143].


Figure 21 : structures des éleuthérosides B et E.

Afin de déterminer la qualité de la drogue, la Pharmacopée Européenne se base sur la quantification de ces 2 substances présumées actives, responsables – au moins en partie – de l'activité adaptogène [143]. Elle préconise que la somme des teneurs en éleuthérosides B et E doit être au minimum de 0,08 % (m/m), calculée par rapport à la drogue desséchée [142].

Autres lignanes La drogue contient de la sésamine et du syringarésinol et ses glucosides [143].

Autres phénylpropanoïdes On retrouve de l'acide caféique, de l'alcool sinapylique et du coniférylaldéhyde [143].

Coumarines II s'agit de l'isofraxidine et ses glucosides [143].

Triterpènes Le daucostérol (aussi appelé éleuthéroside A) et l'hédérasaponine B sont des triterpènes glycosylés, les classant dans le groupe des saponines. On note la présence de β -sitostérol et d'acide bétulinique [143].

Vitamines On retrouve également de la vitamine E et de la pro-vitamine A (β -carotène) [139].

1.4.2.3. Usages médico-traditionnels

Bien que l'usage traditionnel ne fasse pas encore consensus [144], le ginseng sibérien aurait été utilisé depuis environ 2.000 ans en MTC pour une large variété d'indications [145]. On lui reconnaît traditionnellement des effets adaptogènes, consistant en une myriade d'effets tels qu'un renforcement de l'immunité, une amélioration du tonus et des performances sportives, une diminution des processus inflammatoires et une atténuation des insomnies [124]. Il serait en outre capable d'aider à réguler le stress, qu'il soit d'origine psychique, physique ou chimique et améliorerait la vitalité générale [146].

1.4.2.4. Données pharmacothérapeutiques

Indications L'éleuthérocoque est un adaptogène, c'est-à-dire, selon le concept introduit la fin des années 1950 par des scientifiques soviétiques, une substance qui permet d'accroître la résistance de l'organisme vis-à-vis de stress psychiques, physiques, chimiques ou biologiques qu'ils soient d'origine interne ou externe [139]. Plus précisément, il est utilisé comme tonique, pour combattre l'asthénie générale ou sexuelle, et pour renforcer la vitalité de l'organisme [139].

Activités pharmacologiques Les effets de l'éleuthérocoque se traduisent par une activité sur une multitude d'organes (glandes surrénales, glande thyroïde, reins), sur les lymphocytes ainsi que sur la pression artérielle [124]. En outre, il aide à réguler la cholestérolémie et la glycémie et possède des effets antioxydants, anticancéreux, radioprotecteurs, anti-inflammatoires, antipyrétiques et antibactériens [60].

Posologie Le traitement par l'éleuthérocoque se base sur l'administration d'infusion, de teinture, de poudre ou d'extrait sec à prendre à raison d'une dose équivalent à 0,5 à 4 g de drogue brute par jour, en une à trois prises. Le traitement ne doit pas se prolonger plus de 2 mois [146].

Effets indésirables De hautes doses peuvent générer une augmentation de la pression artérielle, de la tachycardie, des maux de tête, des insomnies, des étourdissements, de l'anxiété, de l'agitation, ainsi qu'une augmentation des taux d'œstrogènes et des menstruations abondantes [124, 146].

Contre-indications L'utilisation d'E. senticosus est déconseillée aux patients souffrant d'hypertension [146]. Les femmes enceintes et allaitantes devraient également éviter d'en consommer : la littérature médicale décrit un cas d'androgénisation chez le nouveau-né nourri par une mère supplémentée en éleuthérocoque [147].

Interactions L'éleuthérocoque peut inhiber les cytochromes P450 1A2, 2C9, 2D6 et 3A4 [124] ; les taux sériques de nombreux médicaments sont à risque d'augmenter. Toutefois, une étude menée chez des volontaires sains n'a pas permis de mettre en évidence d'inhibition significative pour les CYP 2D6 et 3A4 [148]. Une augmentation du taux sérique de la digoxine, un hétéroside cardiotonique, a été rapportée [149] ; l'éleuthérocoque s'est montré capable d'interférer avec le dosage (test ELISA) de la digoxine sérique [111]. Cependant, des analyses de laboratoire ont montré que de nombreuses préparations souffraient d'une mauvaise identification, et ont notamment été substituées par *Periploca sepium* Bunge (la périploque de Chine), une plante contenant des hétérosides cardiotoniques (qui pourraient avoir interféré avec le dosage de la digoxine) et des stéroïdes (qui pourraient expliquer le cas d'androgénisation décrit ci-dessus) [150].

Une augmentation des concentrations plasmatiques des antidiabétiques oraux tels que la metformine, le tolbutamide ou le glizipide est également suspectée [124]. L'effet des stimulants du système nerveux central (*e.g.* xanthines, éphédra,...) peuvent être renforcés.

1.4.2.5. Potentiel néphroprotecteur

La supposition d'effets néphroprotecteurs est dictée d'une part par le fait que l'éleuthérocoque est présenté comme un succédané du *Panax ginseng* C.A. Meyer, une plante ayant déjà montré une activité rénoprotectrice (voir section suivante). Ainsi, en tant qu'adaptogène supposé, l'éleuthérocoque est censé améliorer la résistance de l'organisme / d'un organe vis-à-vis de divers facteurs pathogènes ; et devrait par extension être capable d'améliorer la résistance du rein aux stress toxiques induits par des xénobiotiques. D'autre part, son potentiel antioxydant pourrait permettre de limiter les dégâts causés aux cellules par des xénobiotiques exerçant leur toxicité par augmentation du stress oxydatif [145].

Quelques rares études se sont intéressées à l'éventuel effet protecteur de l'éleuthérocoque. Parmi celles-ci, l'équipe de Yokozawa a montré en 2003 qu'un extrait aqueux d'*E. senticosus* était capable d'améliorer le pronostic vital suite aux dommages occasionnés par endotoxémie induite par des lipopolysaccharides (LPS) chez le rat [151]. Au niveau rénal, les activités de la catalase et de la glutathion peroxydase (GSH-Px) étaient significativement augmentées dans le groupe pré-traité par l'extrait d'*E. senticosus*, ce qui s'est traduit par une tendance à la normalisation des taux sériques de créatinine et d'urée. Cet effet suppose une meilleure capacité de défense vis-à-vis du stress oxydatif, et donc un effet néphroprotecteur de l'éleuthérocoque passant par la neutralisation des ROS.

L'effet rénoprotecteur pourrait également être supporté *in vivo* par l'éleuthéroside E, via la répression de gènes tels que l'interleukine-6 ou la cyclooxygénase-2 confèrant une activité antiinflammatoire [145].

L'éleuthéroside B a été testé pour ses capacités à réduire les conséquences de l'insuffisance hépatique aiguë induite par du LPS et de la D-galactosamine chez la souris. Il a ainsi pu démontrer un effet hépatoprotecteur provenant d'une diminution de l'apoptose hépatocytaire, de l'activité de la myéloperoxydase et de l'expression de TNF- α [152].

Dans un modèle de rats intoxiqués au chloroforme, la fonction hépatique a pu être préservée par administration d'éleuthéroside B. Les auteurs ont relevé des augmentations de l'activité catalytique de la superoxide dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxidase. La capacité de neutralisation des radicaux libres était quant à elle modérée [153].

Chez la souris, une administration d'éleuthérocoque concomitante à une injection de cadmium a permis de diminuer la proportion de cellules apoptotiques dans le foie [154].

L'effet neuroprotecteur de l'éleuthérocoque vis-à-vis de l'ischémie cérébrale a aussi été investigué: des acteurs de l'inflammation (notamment la cyclooxygénase-2) ont pu être atténués par administration post-traitement d'un extrait éthanolique à 70 % sur un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat, résultant en une amélioration de la survie astrocytaire et une moindre altération des capacités cognitives [155].

1.4.3. Panax ginseng C.A. Meyer

Le ginseng est sans doute la plante chinoise la plus connue. Utilisée depuis environ 7.000 ans, elle compte également parmi les plus étudiées et les plus consommées [126].

1.4.3.1. Description botanique et pharmaceutique

Le Panax ginseng C.A. Meyer est classé dans la famille des Araliaceae, ordre des Apiales [123]. Il s'agit d'une petite plante vivace de 1 m environ à feuilles palmatilobées portées par une longue tige. Après 3 ans, la plante produit une ombelle de fleurs blanches qui aboutit à la formation de 2 à 3 baies rouges [125, 144].

L'espèce *P. ginseng* est originaire de la péninsule coréenne ; toutefois, on le retrouve également en Chine. D'autres espèces appartenant au genre *Panax* et également dénommée ginseng sont endémique d'Amérique du Nord (*P. quinquefolium* L. = ginseng américain), de Chine et du Japon (*P. notoginseng* (Burkill) F. H. Chen = notoginseng), du Vietnam (*P. vietnamensis* Ha & Grushv. = ginseng vietnamien), de l'Himalaya (*P. pseudoginseng* Wall. = ginseng népalais ou pseudoginseng) [156].

D'autres plantes n'appartenant pas au genre *Panax* sont également dénommées "ginseng" en raison d'activités biologiques similaires : *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (le ginseng sibérien), *Lepidium meyenii* Walp. (le ginseng péruvien ou bolivien), *Withania somnifera* (L.) Dunal (le ginseng indien) ou *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen (le ginseng brésilien).

En Chine, la plante pousse spontanément dans les zones montagneuses, du Népal à la Manchourie, de la Sibérie Orientale à la Corée [144]. La surexploitation des sites naturels a progressivement conduit à sa raréfaction ; son prix – ayant évolué en conséquence – peut atteindre plusieurs milliers d'euros pour des spécimens âgés. En Russie, le ginseng est inscrit dans les annexes de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction (CITES) [157], limitant la récolte des racines en milieu naturel. Cette initiative vise à empêcher la disparition des spécimens sauvages, à l'instar des forêts chinoises et coréennes dans lesquelles l'espèce est pratiquement éteinte.



Figure 22 : vitrine d'un magasin spécialisé dans le ginseng (Tianjin, Chine). La racine évoque une forme anthropomorphe.

La drogue est constituée par les parties souterraines : rhizomes, racines et radicelles. Sa forme anthropomorphe (Figure 22) justifie les usages en MTC ; elle est fusiforme à cylindrique, plus ou moins ramifiée, parfois arquée et recourbée sur elle-même, et ses dimensions peuvent atteindre 20 cm de longueur pour 2,5 cm de diamètre. La couleur de la racine varie de jaune pâle ou crème pour le "ginseng blanc", à brun rouge pour le "ginseng rouge" (voir ci-après). La surface présente des stries longitudinales. De fines radicelles sont abondamment présentes sur la partie inférieure ; celles-ci sont absentes sur le ginseng rouge [142, 144].

En MTC, le ginseng, aussi connu sous le nom chinois de *Ren Shen*, est décliné sous plusieurs formes : la racine peut être séchée (ginseng blanc) ou étuvée à la vapeur d'eau avant séchage afin d'en renforcer l'activité (ginseng rouge). Plus récemment, une nouvelle méthode de transformation est apparue : elle se base sur une exposition à de la vapeur d'eau à température supérieure à celles nécessitée pour produire le ginseng rouge (*sun ginseng*) [158].

Le ginseng est disponible sous forme de racine fraîche, séchée, pulvérisée, macérée dans de l'alcool, ou d'alcoolature.

1.4.3.2. Description phytochimique

Triterpènes Les ginsénosides sont les constituants majoritairement actifs du ginseng. Ils dérivent du dammarane et sont basés sur une génine de type (20S)-protopanaxadiol ou (20S)-protopanaxatriol glycosylée [159]. On en dénombre une trentaine, comptant pour environ 1 à 3 % de la drogue sèche

[144], parmi lesquels 7 (les ginsénosides Rg1, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re et Rf) comptent pour plus de 90 % du contenu total en saponines (Tableau 3) [160].





Ginsénoside Ro

(20S)-protopanaxadiol

(20S)-protopanaxatriol

Ginsénoside	Génine	R ₁	R ₂	R ₃
Rb1	(20S)-protopanaxadiol -	Glc ² -Glc	Glc ⁶ -Glc	100
Rb2		Glc ² -Glc	Glc ⁶ -Arap	1.0
Rc		Glc ² -Glc	Glc ⁶ -Araf	-
Rd		Glc ² -Glc	Glc	-
Re		Н	Glc	Clo2-Rha
Rf	(20S)-protopanaxatriol	Н	н	Glc ² -Glc
Rg1		н	Glc	Glc

Tableau 3 : structure des 7 ginsénosides majoritaires.

Par opposition aux précédents, qualifiés de neutres, une autre variété de ginsénosides est dite acide : ils comprennent un ginséncside atypique (Ro) dont la génine est issue de l'acide oléanolique, et 4 dérivés malonylés des ginsénosides Rb1, Rb2, Rc et Rd [161]. Ces derniers sont instables, leur fonction ester étant rapidement dégradée à la chaleur ; ceci explique l'augmentation de la quantité de ginsénosides neutres lorsque les racines sont exposées à la vapeur d'eau pour produire du ginseng rouge [162].

Les ginsénosides sont présents dans toute la plante. Leur teneur est conditionnée par l'âge des racines avant la récolte : une étude ayant dosé les 7 ginsénosides majoritaires dans des racines âgées de 1 à 5 ans a montré que leur concentration augmentait d'année en année [163], accréditant ainsi la coutume de MTC qui stipule que les racines les plus efficaces n'ont pas été récoltées avant l'âge de 6 ans.

La Pharmacopée Européenne utilise les ginsénosides Rg1 et Rb1 comme marqueurs afin d'évaluer la qualité de la racine de ginseng : la somme de ces 2 principes actifs doit être au minimum de 0,40 % par rapport à la drogue desséchée [142] ; les ginsénosides Rg1 et Rb1 étant présents à hauteur de 0,2

et 0,1 % au minimum [161]. La Pharmacopée précise également que les extraits standardisés de ginseng contiennent au minimum 3 % (m/m) de ginsénosides.

Le ratio des ginsénosides Rb1/Rg1 est également proposé pour identifier l'espèce : le rapport se situe entre 1 et 3 pour le *P. ginseng*, alors qu'il est supérieur à 10 pour le *P. quinquefolium* [161]. L'absence du ginsénoside Rf est également spécifique au *P. quinquefolium*.

Polysaccharides II en existe une grande variété aux structures incomplètement connues ; ils sont généralement nommés panaxanes ou ginsenanes et possèderaient des propriétés immunomodulatrices et hypoglycémiantes [164].

Lignanes II s'agit de dérivés phénylpropanes comprenant la gomisine A et la gomisine N aussi connus sous les noms respectifs de schisandrol B et de schisandrine B [165]. Ces 2 composés, auxquels on attribue une activité antihépatotoxique, sont également retrouvés dans le *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., décrit ci-après.

Acides organiques Les acides caféique, férulique, p-coumarique, salicylique et vanillique ont été isolés du ginseng [165].

Vitamines La racine renferme des vitamines B₁, B₂, B₃, B₆ et B₈ [166].

1.4.3.3. Usages médico-traditionnels

Pendant plus de 5.000 ans, la MTC a utilisé la racine de ginseng comme un *Tonique Supérieur* [78]. Elle est surtout indiquée dans le traitement des états de fatigue chronique, pour développer l'endurance physique ou encore pour améliorer les capacités de résistance au stress [79]. On l'emploie encore de nos jours comme tonique et adaptogène.

Il est intéressant de remarquer que l'espèce américaine *P. quinquefolium* n'a jamais été utilisée de façon traditionnelle ; son utilisation semble avoir été motivée par la renommée croissante du *P. ginseng* [139].

1.4.3.4. Données pharmacothérapeutiques

Indications Elles sont nombreuses, essentiellement en raison du fait que l'effet adaptogène est susceptible de s'exercer sur une multitude d'organes. Le ginseng est fréquemment utilisé pour stimuler le système immunitaire, pour promouvoir le bien-être général, pour tonifier l'organisme, pour traiter la dysfonction érectile, pour stimuler la mémoire et les performances physiques, pour atténuer les symptômes de la ménopause. Il est également utilisé pour prévenir et traiter le cancer et comme thérapie complémentaire dans le diabète de type 2 [124, 156, 167, 168]. Activités pharmacologiques Des recherches cliniques récentes ont démontré un effet bénéfique du ginseng sur la fatigue chronique, sur les performances sportives ainsi que sur les facultés cognitives [124]. Il a également démontré des effets anticonvulsivants (sur un modèle convulsif tonico-clonique murin), antidiabétiques (vraisemblablement attribuables à l'adénosine qu'il contient). Une diminution du risque de cancer a été observée chez les personnes consommant du ginseng de manière chronique [124]. Le protopanaxadiol, un métabolite du ginseng, peut se fixer au récepteur aux glucocorticoïdes et aux œstrogènes [164]. Il a des effets antioxydants par régulation de la synthèse des enzymes impliquées dans la détoxification des ROS/RNS (CAT, GSH-Px et SOD) [156].

Posologie En MTC, la Pharmacopée Chinoise préconise une consommation de 3 fen à 3 qían par jour – ce qui correspond à une masse de 1,1 à 11,1 g – de racine à préparer en décoction [79]. En Allemagne, la Commission E recommande une consommation quotidienne de 1 à 2 g de racine standardisée à 4–5 % de ginsénosides pendant 3 mois [156].

Les extraits de ginseng disponibles sur le marché sont généralement standardisés à hauteur de 5 % (m/m) vis-à-vis de leur teneur en ginsénosides. Toutefois, une lettre publiée en 1994 dans The Lancet souligne que sur 50 produits vendus aux Etats-Unis, au Royaume-Unis et en Suède, les teneurs en ginsénosides variaient entre 1,9 et 9,0 % [169]. Le rapport révèle que 6 préparations ne contenaient pas de ginseng, qu'une présentait une adultération et une autre comportait de l'éphédrine.

Pharmacocinétique En administration orale, les ginsénosides ont une faible biodisponibilité en raison de leur caractère hydrophile [156]. Ils sont intensivement métabolisés par la flore intestinale qui produit entre autres le composé K (métabolite issu des protopanaxadicls), et les ginsénosides Rh1 (métabolites issus des protopanaxatriols), plus lipophiles et donc mieux absorbés [164]. Les ginsénosides Rb1 et Rb2, abondamment présents dans la racine, ne seraient pas retrouvés dans le plasma après administration orale. Une majeure partie de l'effet du ginseng pourrait ainsi être attribuée aux substances issues de la métabolisation par la flore intestinale. Toutefois, quelques études portant sur la pharmacocinétique des ginsénosides après administration orale de ginseng décrivent le devenir de ginsénosides dans le plasma ainsi que leurs distributions tissulaires [170, 171]. Il convient de mentionner que ces études ont été menées sur base d'administrations orales d'extraits de ginseng largement supérieures à celles préconisées pour un usage chez l'humain.

Effets indésirables Ils sont rares, et généralement associés à des utilisations à doses élevées et/ou prolongées [156]. Ils peuvent être d'ordre neurologique, engendrant de l'agitation, de l'anxiété, de l'hypertonie, des céphalées ou des maux de tête. Une augmentation de la tension artérielle, de l'intervalle QT et des palpitations sont susceptibles d'être observées. Des effets secondaires sur le tractus digestif peuvent également être constatés (nausées, vomissements, diarrhées,...) [124, 156].

Interactions Quelques interactions ont été décrites avec les anticoagulants coumariniques (tels que la warfarine) pour lesquels l'effet risque d'être atténué ; ceci résulte d'une induction du CYP 2C9,

66

cytochrome métabolisant la warfarine [172]. Dans un cas extrême, l'effet a été associé à une thrombose. Une étude *in vitro* a également montré une activité antiagrégant plaquettaire par inhibition de la formation de thromboxane ; ceci ne semble cependant pas avoir d'implication clinique [111].

D'autre interactions ont été révélées avec les antidiabétiques dont l'effet peut être renforcé [156] ; les immunodépresseurs dont l'activité est diminuée [59, 124] ; les IMAOs (en particulier la phénelzine) et les stimulants du système nerveux central dont les effets secondaires tels que l'agitation ou les troubles du sommeil sont susceptibles d'être renforcés [111, 124, 156]. La consommation concomitante de produits à base de plantes contenant des stimulants peut donner lieu aux mêmes symptômes (café, thé, maté, guarana).

Dans une étude clinique, des volontaires sains ont ingéré de l'alcool simultanément au ginseng ou pas (chaque volontaire étant son propre contrôle). Le ginseng a permis de diminuer le taux sérique d'éthanol, probablement de par sa capacité à induire les enzymes hépatiques alcool et aldéhyde déshydrogénases [111].

Le ginseng peut également interférer avec certains tests de laboratoire tels que les dosages du glucose (dû à la diminution des taux sériques), de la digoxine (augmentation attribuable à une interférence avec le dosage ELISA), des œstrogènes sériques (augmentation) et des tests de coagulation (augmentation de l'INR) [111, 124].

Contre-indications Le ginseng est contre-indiqué chez les personnes présentant des troubles cardiaques ou de l'hypertension.

1.4.3.5. Potentiel néphroprotecteur

La renommée du ginseng a conduit à la publication de nombreuses études (incluant aussi *P. quinquefolium* ou *P. notoginseng*), notamment sur ses possibles effets néphroprotecteurs. Les travaux apportant une explication sur le mécanisme d'action d'une telle néphroprotection reste toutefois rares : si la diminution du stress oxydatif semble être un point clé de la capacité à limiter les atteintes rénales, la production de NO induite par les ginsénosides a également été suspectée comme étant à la base des effets néphroprotecteurs [173].

Le ginsénoside Rg1 a pu démontrer un effet protecteur vis-à-vis de podocytes en culture. Brièvement, le modèle de toxicité s'est basé sur un facteur du complément impliqué dans les glomérulonéphrites ; les effets de celui-ci ont pu être atténués : la génération de ROS/RNS a pu être limitée par co-traitement avec le ginsénoside Rg1, ce qui a notamment été corrélé à une mortalité cellulaire réduite [174]. Le ginseng s'est également montré capable de protéger des cellules auditives (HEI-OC1) qui sont également des cibles du CisPt. L'ototoxicité a pu être réduite par ajout d'un extrait aqueux de ginseng rouge au traitement par le CisPt ; ceci a été objectivé par mesure de la survie cellulaire, de la génération de ROS, des dégâts causés à l'ADN et de l'activité de la caspase-3 [175].

Une autre équipe a mis en évidence un effet bénéfique du *sun ginseng* sur des cellules LLC-PK₁ traitées par du CisPt. Au terme d'un criblage bioguidé impliquant un test de survie cellulaire, les ginsénosides Rh4 et Rk3 ont été proposés comme étant les protecteurs et les plus puissants [176]. Un extrait brut de saponines isolées du *P. notoginseng* s'est également révélé capable de réduire la mortalité induite par le CisPt chez des cellules primaires du TCP de lapin. Les auteurs ont également révélé une réduction de liens interbrins de l'ADN lorsque l'extrait était ajouté en plus du CisPt [177].

Une étude s'intéressant à l'effet protecteur du ginsénoside Rd vis-à-vis de la néphrotoxicité induite par le CisPt sur des rats a révélé une augmentation de l'activité de la SOD et de la CAT, associée à une altération moindre de la fonction rénale. L'effet a été rapproché d'une diminution du stress oxydatif, objectivée par une diminution des teneurs en malondialdéhyde aux niveaux sérique et rénal [178].

Yokozawa et al., ont pu montrer qu'un extrait composé des saponines du ginseng, administré orallement pendant 90 jours à des rats néphrectomisés 5/6, était capable de normaliser la fonction rénale : la créatinine et l'urée plasmatiques ont été réduites, de même que l'albuminurie. Les auteurs ont également pu constater de légères diminutions des atteintes extratubulaires, de la sclérose glomérulaire et des lésions interstitielles par rapport aux rats néphrectomisés n'ayant pas reçu l'extrait [179].

Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont également montré que le ginsénoside Rd, administré pendant 30 jours avant une ischémie-reperfusion, améliorait la fonction rénale ; ceci est probablement corrélé à une augmentation de l'activité de la SOD, de la CAT et de la GSH-Px dans le tissu rénal des rats ayant reçu du ginsénoside Rd qui sont donc moins sensibles aux dégâts oxydatifs. Ces derniers présentaient également des taux sériques et rénaux de malondialdéhyde moins élevés que les rats ayant subi une ischémie-reperfusion seule [180].

Finalement, dans un modèle *in vitro*, Yokozawa a montré que la fragmentation de l'ADN de cellules LLC-PK₁ induite par traitement au CisPt pouvait être réduite par administration concomitante de ginsénoside Rd [181].

Les effets du ginsénoside Rg1 ont été étudiés sur un modèle d'EMT induite par UUO (obstruction urétérale unilatérale) chez le rat. Xie et al. ont ainsi pu démontrer que ce ginsénoside était capable

de limiter la perte d'E-cadhérine et l'acquisition d' α -SMA. Ces effets sont expliqués par une moindre sécrétion de TGF- β 1, un médiateur clé de l'EMT. En conséquence, la phosphorylation de la Smad2, un messager secondaire de la voie du TGF- β , a été réduite par rapport au groupe UUO [182]. Dans une seconde étude *in vitro*, la même équipe a traité des cellules NRK-52E par du TGF- β 1 afin d'induire une différenciation phénotypique. L'administration concomitante de ginsénoside Rg1 a permis de réduire l'expression de protéines exprimées par les myofibroblastes telles que l' α -SMA, le collagène I ou la fibronectine et de limiter la perte de E-cadhérine. Ces résultats prometteurs ont été approfondis par la mise en évidence d'une phosphorylation réduite des protéines "*extracellular signal-regulated kinases 1/2*", des médiateurs intracellulaires activés par stimulation de la voie du TGF- β et responsables, entre autres effets, de la croissance et de la prolifération cellulaires [183].

Dans un modèle de néphropathie diabétique chez le rat, un extrait de ginseng a permis de normaliser les concentrations de créatinine et d'urée au niveau plasmatique et de protéines au niveau urinaire [158]. La protection de la fonction rénale, qui ne serait pas uniquement consécutive à une diminution de la glycémie, a également été attribuée à une diminution du stress oxydatif. Ceci a été confirmé plus tard, et été renforcé par la découverte d'une réduction de la sécrétion de TNF- α a niveau rénal, ce qui contribue à limiter les dégâts occasionnés par infiltration inflammatoire [184].

Pour finir, dans un modèle de néphrotoxicité induite par la gentamicine chez le rat, un extrait de ginseng a permis de normaliser la fonction rénale et de limiter l'atrophie tubulaire [185].

1.4.4. Schisandra chinensis (Turcz.) Baill.

1.4.4.1. Description botanique

Il s'agit d'une liane monoïque appartenant à la famille des Schisandraceae, ordre des Magnoliales [123] ; la tige peut atteindre 10-15 m de longueur et 1,5 cm de diamètre. La liane s'enroule autour du tronc des arbres ; ses feuilles sont alternes, groupées le long des tiges, de couleur vert foncé, légèrement dentées, elliptiques et cuspidées. Les fleurs unisexuées, dont la couleur va de blanc à blanc-crème voire rose, sont d'aspect cireux. Les fruits sphériques de couleur rouge vive sont la partie utilisée en médecine traditionnelle. Ils mûrissent vers le mois de septembre sous forme de grappes [125, 141]. La plante se retrouve dans le Nord-Est de la Chine, dans l'Est de la Russie, en Corée et au Japon [124, 186].

La drogue est constituée par les fruits mûrs séchés (Figure 23). Leur pulpe est sucrée et très acide, alors que le noyau est amer, astringent et salé ; c'est pour cette raison que la MTC les appelle Wu Wei Zi (= Fruits aux 5 saveurs) [186]. La baie est plus ou moins sphérique, d'un diamètre pouvant atteindre 8 mm et de couleur rouge à brun-rouge ou noirâtre. Le péricarpe est fortement fripé. Il renferme 1 à 2 graines brun-jaune et luisantes [142].



Figure 23 : fruits du schisandra.

1.4.4.2. Description phytochimique

Lignanes II s'agit des principes actifs du schisandra qui se concentrent principalement dans les graines [187]. Il en existe une trentaine ; la schisandrine (syn. = schisandrol) et la schisandrine B (syn. = γ-schisandrine) (Figure 24), les composés majoritaires, sont présents à des teneurs de l'ordre de 0,5 et 0,3 % de la drogue en moyenne [188].

La Pharmacopée Européenne préconise une teneur en schisandrine de 0,4 % (m/m) au minimum calculée par rapport à la drogue desséchée [142].



Schisandrine B

Figure 24 : Structures de la schisandrine et de la schisandrine B, les deux principaux lignanes du fruit de S. chinensis.

La schisandrine peut être extraite par des solvants peu polaires tels que l'éther de pétrole ou plus polaire comme l'éthanol [188].

Le schisandra entre dans de nombreuses formules chinoises basées sur des décoctions. La présence d'autres espèces phytochimiques est susceptible d'augmenter le rendement d'extraction des lignanes en comparaison à une décoction de schisandra pris isolément. Ceci a été mis en évidence pour les racines de ginseng et d'ophiopogon [189].

Vitamines Les fruits contiennent également d'importantes quantités de vitamines A, C et E.

1.4.4.3. Usages médico-traditionnels

Le fruit de schisandra a longtemps été utilisé en MTC pour le traitement de nombreux troubles, notamment pour traiter l'asthénie sexuelle et l'impuissance, la spermatorrhée, la gonorrhée, les énurésies diurnes et nocturnes, les troubles urinaires, la diarrhée, la dysenterie, la sudation et les sueurs nocturnes, la toux, l'asthme, la respiration dite sifflante, l'essoufflement, la jaunisse, un pouls faible, les palpitations, la fatigue, l'asthénie, l'insomnie et le diabète [188].

Elle a été utilisée par des chasseurs de Russie Orientale comme tonique, pour améliorer la vision nocturne et pour diminuer les sensations de faim et de soif. Dans le début des années 1960 en URSS, la plante a été reconnue comme adaptogène [188].

1.4.4.4. Données pharmacothérapeutiques

Indications Le schisandra est utilisé en tant qu'adaptogène ; principalement comme tonique, comme stimulant du SNC et du système immunitaire. En MTC, il intervient également dans de nombreux remèdes destinés à traiter des pathologies de la sphère respiratoire [126].

Activités pharmacologiques Des études menées sur des animaux ont montré que les fruits de schisandra pouvaient augmenter les capacités de travail physique et renforcer la résistance vis-à-vis d'un large panel de facteurs tels que les chocs thermiques, les brûlures de la peau, les refroidissements, les engelures, l'immobilisation, la nage avec le port d'une charge et sous pression atmosphérique réduite, les inflammations, les irradiations et les intoxications aux métaux lourds.

Les effets s'exercent sur les systèmes nerveux central, sympathique, endocrinien, cardiovasculaire, respiratoire, gastro-intestinal et immunitaire. On note également une activité sur le développement de l'athérosclérose expérimentale, sur la glycémie et l'équilibre acido-basique, et une activité myotonique utérine [188]. Des études menées sur chez l'humain démontrent un effet bénéfique sur les performances sportives ainsi que sur les capacités cognitives [186]. Le schisandra est aussi doté d'une activité immunostimulante [124]. Des recherches plus récentes ont souligné des activités hépatoprotectrices et régénératives [124, 144], probablement dues au potentiel antioxydant et à la stimulation des enzymes CAT et SOD par les lignanes contenus dans les fruits [144, 186, 188].

Posologie La diversité des préparations utilisées rend difficile l'estimation des doses généralement consommées. Les teintures réalisées à l'aide d'éthanol à 95 % sont prises à raison de 20-30 gouttes

par jour ; les fruits secs éventuellement pulvérisés, à raison de 0,5 à 1,5 g par jour ; les extraits fluides réalisés à l'aide d'éthanol à 95 % à raison d'une dose de 0,05 à 0,2 ml/kg/j [188]. La Pharmacopée Chinoise préconise une consommation journalière de fruits correspondant à 5 fen à 3 qían (soit 1,8 à 11,1 g) [79].

Une toxicité a pu être observée pour des doses de 10-15 g/kg chez la souris ; ce qui équivaudrait à une dose de 0,8-1,2 g/kg chez l'humain ou 48-72 g pour une personne de 60 kg [190].

Effets indésirables De rares cas de dépression du système nerveux central ont été rapportés [124]. Les effets secondaires apparaitraient après des expositions à des doses élevées et/ou prolongées [186].

Interactions Le schisandra est un inducteur du cytochrome P450 3A4 [191]. Il doit être suspecté de réduire l'efficacité d'immunosuppresseurs tels que l'azathioprine, les corticostéroïdes, le mycophénolate ou le tacrolimus [124]. Le bifendate, un dérivé de lignane obtenu à partir du schisandra, a induit une diminution des taux sériques de ciclosporine chez 2 patients ayant subi une transplantation rénale sans que l'issue ait été négative [111].

1.4.4.5. Potentiel néphroprotecteur

Le fait que les lignanes du schisandra soient dotés d'une activité adaptogène – c'est-à-dire permettant d'améliorer les capacités de résistance au stress de diverses origines – a permis de lui supposer des effets chémopréventifs et néphroprotecteurs. Cette hypothèse est renforcée par la connaissance des effets antioxydants des lignanes qui seraient également à la base de l'activité hépatoprotectrice [192].

Sur des cellules mésangiales du rein de souris (MMC) soumises à des concentrations élevées de glucose, la schisandrine a permis de limiter le stress oxydatif. Ce modèle de néphropathie diabétique a aussi pu mettre en évidence une diminution de la production de TGF- β et de synthèse de collagène IV et de fibronectine, deux protéines retrouvées dans la MEC du tissu fibrotique [193].

Le schisandra s'est montré capable, sur un modèle de cellules musculaire de l'aorte de rat, de réprimer la voie de signalisation du TGF- β 1 par inhibition des Smad2/3 et de leur translocation nucléaire. Cet effet a été attribué en majorité à la schisandrine B et pourrait contribuer à atténuer la sévérité de la fibrose rénale en limitant la dédifférenciation et la prolifération des fibroblastes [194].

La toxicité du mercure a pu être diminuée par l'utilisation de schisandrine B dans des modèles *in vivo* et *in vitro* : chez le rat, les atteintes tubulaires et les débris nécrotiques induits par l'administration de mercure ont pu être réduits par la schisandrine B [195]. La cytochrome-C oxydase, une enzyme libérée par les mitochondries en cas de stress oxydatif intense, était également moins présente dans le groupe recevant le lignane, ce qui suggère un effet antioxydant bénéfique confirmé sur cellules NRK-52E. Ceci a pu être également mis en lumière sur des lymphocytes chez qui le traitement par de la schisandrine B a permis une diminution du stress oxydatif ainsi qu'une augmentation du glutathion sous sa forme réduite [196].

Dans un modèle murin de néphropathie à la ciclosporine, la schisandrine B a permis de maintenir des taux de GSH élevés, limitant ainsi les atteintes cytotoxiques du stress oxydatif et se traduisant par une moindre apparition de malondialdéhyde rénal. Les souris traitées concomitamment par de la schisandrine B présentaient des reins dont l'histopathologie et l'insuffisance fonctionnelle étaient améliorées. La même équipe a mis en évidence, sur des cellules HK-2, une diminution du stress oxydatif corrélée à des réductions des processus apoptotiques et de la mortalité cellulaire [197].

Dans une étude menée au départ d'un modèle de néphrotoxicité induite par la gentamicine chez le rat, la schisandrine B a permis de préserver la fonction rénale (objectivée par dosage de la créatinine et de l'urée). Ceci a été mis en relation avec une diminution de la toxicité mitochondriale, occasionnant une réduction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité et du relargage du cytochrome-c, en conséquence d'une réduction du stress oxydatif [198].

1.4.5. Silybum marianum (L.) Gaertn.

Les fruits du chardon marie ont bénéficié d'une longue utilisation contre les troubles hépatiques. En Belgique, un phytomédicament enregistré sous le nom de Légalon[®] est constitué d'un extrait sec des fruits de *Silybum marianum* (nommé silymarine) et est utilisé comme hépatoprotecteur [93, 144].

1.4.5.1. Description botanique

Le chardon marie appartient à la famille des Asteraceae, ordre des Asterales [123]. Sa distribution géographique est large ; on le retrouve dans une majorité des pays de l'Europe ainsi qu'au Nord de l'Afrique, en Amérique du Nord et du Sud, au Sud de la Russie et en Asie mineure [199].

Il s'agit d'une plante bisannuelle, mesurant de 40 cm à 1,5 m, à tige robuste et ramifiée. Les feuilles sont lobées et bordées d'épines et de cils épineux. Leur face supérieure présente généralement des marbrures blanches le long des nervures (ce qui lui a valu le nom de *Milk thistle* en anglais). Les capitules floraux (comestibles) comprennent un involucre hémisphérique à folioles glabres de 3 cm de diamètre au moins, et entre 25 et une centaine de fleurs tubuleuses roses à pourpres.

La drogue est constituée par les fruits, des akènes ovoïdes allongés de 6 à 8 mm de longueur (Figure 25). Leur surface externe est lisse et luisante, à fond gris ou brun pâle strié de bandes longitudinales brun foncé à noir. L'apex porte une écaille beige, restants de la couronne florale [141, 142, 144].



Figure 25 : graines de Silybum marianum.

1.4.5.2. Description phytochimique

Silymarine II s'agit de la substance reconnue active dans le chardon marie ; elle est constituée d'un mélange de 6 flavonolignanes lipophiles : la silicristine, la silidianine, la silibinine A, la silibinine B, l'isosilibinine A et l'isosilibinine B (Figure 26).



Figure 26 : structures des 6 composants de la silymarine.

Selon la 8^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne, la teneur en silymarine dans les fruits mûrs est comprise entre 1,5 et 2,0 % ; et la teneur nominale en silymarine dans l'extrait sec standardisé doit se trouver dans un intervalle allant de 30 à 65 %.

Flavonoïdes La silymarine contient également de la quercétine et de la taxifoline [200]. *Lipides* La drogue renferme 20 à 30 % de lipides [144].

1.4.5.3. Usages médico-traditionnels

Les graines de chardon marie ont été utilisées depuis plus de 2000 ans pour le traitement des troubles hépatiques et de la vésicule biliaire tels que les hépatites, la cirrhose et la jaunisse, ainsi que pour prévenir l'hépatotoxicité attribuable aux toxines environnementales (telles que les morsures de serpents, les piqûres d'insectes, l'empoisonnement aux champignons et à l'alcool) [200]. La drogue figurait déjà dans la *Materia Medica* de Dioscoride rédigée au 1^{er} siècle après J.-C.

1.4.5.4. Données pharmacothérapeutiques

Indications Elles sont limitées à la prévention des hépatotoxicités d'origine alcoolique, virale (notamment de l'hépatite C) ou d'empoisonnement par l'amanite phalloïde [124] (les effets n'étant que partiels si la silymarine est administrée après l'intoxication [144]). Elle est également indiquée dans le traitement des troubles fonctionnels digestifs associés aux hépatopathies [144].

Activités pharmacologiques Les mécanismes hépatoprotecteurs pourraient provenir d'un effet antioxydant (par neutralisation des radicaux libres), d'une stimulation de la synthèse protéique et de l'ADN, d'un effet sur le métabolisme du glutathion et des phospholipides, et d'une stabilisation de la membrane de l'hépatocyte [93]. La silymarine aurait également un effet anti-inflammatoire et des propriétés régénératives contribuant à la prévention de la fibrose hépatique [124]. Ses propriétés antiradicalaires en feraient un agent cytoprotecteur et anticarcinogène [200]. La silymarine a notamment démontré son aptitude à protéger le foie dans un modèle d'intoxication au chloroforme chez le rat : la fibrose (traduite par la présence de collagène), l'expression de α-SMA et la libération des transaminases hépatiques ont pu être significativement réduites par administration de silymarine après induction de la cirrhose par le chloroforme [201] ; ce qui indiquerait une amélioration des capacités régénératives des hépatocytes.

La prévention par la silymarine des intoxications à la phalloïdine suivant l'ingestion d'amanite phalloïde est attribuable à une inhibition compétitive des transporteurs aux anions organiques OATP2 qui empêche la pénétration de l'agent toxique dans les hépatocytes [202].

Elle réprime la sécrétion de TNF-a, ce qui lui confère des propriétés anti-inflammatoires et

immunomodulatrices ; elle possède une activité galactogène [199].

Posologie Le Légalon[®] est composé de gélules contenant 140 mg de silymarine (exprimé en équivalent silibinine). La posologie recommandée est de 1 à 3 gélules par jour [93].

Pharmacocinétique La silibinine, composant majoritaire de la silymarine, n'est absorbée qu'à concurrence de 20-50 % de la dose ingérée. La faible biodisponibilité peut être expliquée par une faible solubilité de la silymarine qui n'est que peu compensée par la présence de co-solubilisants ainsi que par les doses administrées, généralement élevées. Malgré la standardisation requise, les différences de composition des extraits peut faire varier significativement la biodisponibilité [199].

Contre-indications L'utilisation de Légalon[®] ne doit pas se faire en cas de pathologie hépatique grave [93]. De manière plus générale, la prise de silymarine par des femmes enceintes ou allaitantes est déconseillée, essentiellement par manque de données permettant d'en garantir la sécurité [124].

Effets indésirables Hormis quelques réactions aspécifiques telles que des diarrhées, nausées et vomissements, l'extrait de silymarine est susceptible d'être mal toléré à hautes doses, et d'induire des céphalées ou des troubles menstruels [124]. Ces effets resteraient relativement isolés ; leur rareté pourrait être expliquée par la faible solubilité des composants de la silymarine, rendant quasiimpossible l'atteinte de taux plasmatiques toxiques [200].

Interactions La silymarine est un substrat inhibiteur des cytochromes P 450 2C9 et 3A4 pouvant virtuellement augmenter la concentration plasmatique de substances métabolisées par ces enzymes [124]. Ces suppositions ont été tirées d'études *in vitro* pour lesquelles les doses employées excédaient largement les concentrations atteintes *in vivo* [200]. Le chardon marie a montré une activité modulatrice de la P-gp qui ne semble toutefois pas avoir de conséquence clinique [113]. Les tests de la fonction hépatique tels que le dosage sanguin de l'AST, de l'ALT ou de la phosphatase alcaline, peuvent être affectés par une consommation de silymarine.

1.4.5.5. Potentiel néphroprotecteur

Les effets hépatoprotecteurs observés pour la silymarine ont rapidement laissé supposer une activité protectrice pour d'autres organes, notamment dans le but de démontrer une activité antifibrotique rénale. Une étude *in vitro* menée sur des cellules Vero et BSC-1 (isolées de l'épithélium rénal du singe *Cercopithecus aethiops*) a démontré des effets sur les capacités régénératives similaires à ceux observés sur les hépatocytes pour la silibinine et la silicristine (mais pas pour l'isosilibinine ni pour la silidianine). Ceux-ci concernent la prolifération cellulaire, la synthèse des protéines et de l'ADN – susceptibles d'améliorer les capacités de régénération tubulaires – et la réduction du relargage de la lactate déshydrogénase induite par différents xénobiotiques néphrotoxiques [203].

In vitro, la silibinine a permis de réduire la toxicité de la vincristine et du paracétamol ; ceci ayant été

objectivé au moyen de cellules Vero via des tests de dénombrement cellulaire, de synthèse protéique et de relargage de la LDH [203].

Une autre étude *in vitro* impliquant des cellules HK-2 a démontré qu'un pré-traitement à la silymarine pouvait réduire significativement les processus apoptotiques caractéristiques de la toxicité du CisPt, ce qui a permis de d'améliorer la survie cellulaire globale [204].

La quercétine, un flavonoïde présent dans la silymarine, pourrait également être un médiateur important des effets du chardon marie [89, 205]. Ceci fut mis en évidence lors d'une étude *in vitro* impliquant des cellules LLC-PK1 qui n'a pas objectivé de réduction de la toxicité du CisPt pour la silymarine comme ce fut le cas pour la quercétine [206]. Il convient de noter que la concentration de CisPt employée ici était environ 13 fois plus élevée que dans les travaux précédents.

Ce flavonoïde a aussi démontré une action protectrice sur un modèle de néphrotoxicité à la ciclosporine chez le rat ; son pouvoir antioxydant étant supposé responsable de l'activité observée pour le chardon marie [207].

La première étude *in vivo* qui mit en évidence un effet néphroprotecteur de la silymarine a été menée sur un modèle de toxicité au CisPt chez le rat. Injectée 1 h avant le traitement, la silibinine (200 mg/kg) permit d'éviter la protéinurie, la perte de clairance de la créatinine et le relargage d'enzymes de la bordure en brosse et de Mg²⁺ consécutifs à la NTA induite par le CisPt. Les altérations morphologiques du segment S-3 du néphron étaient diminuées en parallèle [208].

De plus, des effets néphroprotecteurs de la silymarine vis-à-vis de mycotoxines telles que l'aflatoxine B_1 et la fumonisine B_1 ont pu être observés, respectivement chez le rat par réduction du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique [209] et sur des cellules LLC-PK1 par diminution de la sécrétion de TNF- α [210].

De par son effet antioxydant, la silymarine a été envisagée en tant qu'adjuvant de thérapies anticancéreuses afin de protéger les tissus sains. L'activité a notamment été documentée pour protéger les reins de la toxicité du cisplatine. Une étude de Bokemeyer et al., a mis en évidence une réduction de l'excrétion urinaire des enzymes de la bordure en brosse ainsi qu'une amélioration de la clairance de la créatinine et une diminution des taux plasmatiques d'urée chez des rats traités concomitamment par de la silibinine et du CisPt par rapport au groupe CisPt [211].

La doxorubicine, un médicament utilisé dans les chimiothérapies anticancéreuses, est également connue pour sa cardiotoxicité et sa néphrotoxicité ; cette dernière a pu être limitée chez le rat prétraité par de la silymarine. Ceci fut expliqué par des taux de GSH supérieurs pour le groupe protégé, améliorant la capacité de neutralisation des ROS [207]. D'autres études *in vivo* ont pu déterminer que la néphroprotection conférée par la silymarine vis-àvis de la toxicité du CisPt présentait un avantage supérieur lorsqu'elle était administrée en prétraitement plutôt qu'en post-traitement [207].

In vitro, l'adjonction de silibinine n'a pas permis de réduire l'activité cytotoxique du CisPt et du 4hydroperoxyfosfamide sur 3 lignées de cancer testiculaire [211]. De la même manière, l'ajout de silymarine à des cellules de cancer mammaire (MCF-7) et de cancer ovarien (A2780) n'a pas permis de les protéger vis-à-vis du traitement au cisplatine [200]. Ces données indiquent que l'effet chémopréventif attribuable à la silymarine pourrait contribuer à protéger les reins sans nuire à l'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse. Ces conclusions ont également été complétées par des études *in vivo* qui ont montré une potentialisation de l'activité antitumorale chez la souris [200].

D'autres effets rénoprotecteurs de la silymarine ont été rapportés vis-à-vis de divers xénobiotiques. Il s'agit notamment d'une limitation de l'augmentation de la créatinine sérique et de l'urée ainsi que d'une amélioration du taux de filtration glomérulaire constatés lors de l'injection de gentamicine chez le chien [207].

2. Objectifs du travail

A partir de données expérimentales et d'informations issues de médecine traditionnelle, une série de plantes susceptibles de présenter des effets néphroprotecteurs a été sélectionnée. Celles-ci incluent *Angelica sinensis, Eleutherococcus senticosus, Panax ginseng* et *Schisandra chinensis*. Une cinquième plante, *Silybum marianum*, connue pour ses effets protecteurs vis-à-vis de la fibrose hépatique, a également été incluse dans cette étude.

A partir de ces plantes, des extraits polaires bruts ont été réalisés. Leur activité néphroprotectrice éventuelle a été évaluée à l'aide d'une batterie de tests biologiques *in vitro* ; l'objectif recherché vise une atténuation des phénomènes impliqués dans la tubulotoxicité de substances telles que les acides aristolochiques, le cisplatine et la ciclosporine.

Après détermination des doses de travail pour les agents néphrotoxiques et les extraits bruts, les tests biologiques mis en œuvre afin de juger de l'effet néphroprotecteur incluent :

- L'évaluation de l'effet des extraits vis-à-vis de la mortalité induite par les agents néphrotoxiques.
 Celui-ci sera éventuellement confirmé par estimation du taux d'apoptose ;
- La recherche d'une activité bénéfique sur le stress oxydatif généré par les trois toxiques ;
- L'évaluation de l'effet des extraits sur la production de collagène induite par les agents néphrotoxiques;
- La mise en évidence d'un éventuel effet bénéfique quant à la dédifférenciation des RPTECs engendrée par l'exposition aux trois toxiques;
- L'amélioration des capacités de régénération tubulaire évaluée au moyen de tests de prolifération et de motilité cellulaires.

In fine, ces tests devront permettre de déterminer la plante possédant le potentiel tubuloprotecteur le plus prometteur. Les principes actifs putatifs de la plante en question seront alors évalués sur la batterie de tests biologiques. Notre travail vise donc à identifier une (des) molécule(s) dont le potentiel néphroprotecteur permettra de le(s) proposer dans de nouvelles stratégies de lutte contre la fibrose rénale iatrogène.

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel végétal et préparation des extraits

Le matériel végétal utilisé dans cette étude a été obtenu par le biais de fournisseurs commerciaux pratiquant les analyses de conformité de la Pharmacopée Européenne (version 2008).

- La racine d'Angelica sinensis, en vrac, a été gracieusement fournie par Complemedis AG (Trimbach, Suisse).
- La racine d'*Eleutheroccocus senticosus*, en vrac, a été gracieusement fournie par Phytax GmbH (Schlieren, Suisse).
- La racine de Panax ginseng, en vrac, a été achetée auprès de Pharmaflore SA (Deux-Acren, Belgique).
- Les fruits de Schisandra chinensis, en vrac, ont été gracieusement fournis par Phytax, GmbH (Schlieren, Suisse).
- L'extrait sec de Silybum marianum a été acheté auprès de Carlo Gérard (Bruxelles, Belgique).

Hormis le chardon marie, obtenu sous forme d'extrait standardisé à 80 % de silymarine (pureté 84,4 %), les matières premières en vrac ont été pulvérisées puis extraites par macération cinétique 1:10 (m/v) dans du méthanol pendant 1 nuit, puis 2 x 3 h. Les fractions ont été réunies et évaporées à sec sous pression réduite (Tableau 4).

Toutefois, pour *S. chinensis* ce mode d'extraction produit un extrait fluide huileux, ce qui constitue un obstacle pour les tests *in vitro* futurs. La procédure a été répétée après délipidation préalable (par de l'éther de pétrol) des fruits pulvérisés. Un extrait sec est ainsi produit.

Plante	Rendement d'extraction (%) 32,4	
Angelica sinensis		
Eleutherococcus senticosus	4,5	
Panax ginseng	37,2	
Schisandra chinensis (délipidé)	44,2	

Tableau 4: rendements obtenus pour l'extraction méthanolique des plantes sélectionnées pour cette étude.

Le choix du méthanol comme solvant d'extraction – plutôt que l'eau qui est utilisée pour produire des décoctions en MTC – est justifié par sa capacité à entrainer des composés dont la polarité se situe dans une gamme étendue, ce qui évite une éventuelle perte de molécules potentiellement active dans le résidu d'extraction.

3.2. Réactifs

Les solutions d'AA sont constituées par un mélange 50:50 (en masses molaires) d'AAI et d'AAII (Acros Organics, Geel, Belgium ; pureté 98,7 %) diluées à partir d'une solution stock de DMSO à 50 mM. Une solution stock de CsA à 16 mM dans du DMSO a été préparées à partir d'un échantillon pour essai clinique fourni par Novartis (Basel, Suisse).

Les solutions de CisPt ont été préparées à partir du médicament Cisplatine Hospira[®] (Hospira Benelux, Antwerpen, Belgique).

Le FA (pureté 99,3 %) a été obtenu auprès de Sigma-Aldrich (St Louis, USA) ; le Z-lig (pureté 99,5 %) auprès de Sequoia Research Products (Pangbourne, Royaume-Unis) ; et le E-lig (pureté 99,1 %) auprès de Extrasynthèse (Genay, France). Des solutions stocks (50 mM) sont préparée dans du DMSO, et conservées à – 20 °C pour le FA et à – 80 °C pour les Z et E-ligustilides.

Les éleuthérosides B (pureté 98,1 %) et E (pureté 99,4 %) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

Les ginsénosides Rb1 (pureté 100 %), Rf (pureté > 98 %) et Rg1 (pureté > 98 %) ont été obtenus auprès de Extrasynthèse (Genay, France) ; et les ginsénosides Rb2 (pureté 97,3 %), Rc (pureté 89,3 %), Rd (pureté 98,2 %) et Re (pureté 94,8 %) chez Chromadex (Irvine, USA).

La schisandrine (pureté 99,0 %) et la schisandrine B (pureté 98,0 %) ont été obtenues auprès de Sigma-Aldrich (St Louis, USA) et Finetech (London, Royaume-Unis), respectivement.

L'extrait de chardon marie SRC standardisé à 26,6 % de silibinine A + silibinine B a été obtenu auprès de la Pharmacopée Européenne (EDQM, Council of Europe, Strasbourg, France).

3.3. Analyses phytochimiques

3.3.1. Analyse de l'extrait d'A. sinensis

Pour cet extrait, 2 molécules supposées actives ont été dosées sur base de méthodes HPLC-UV adaptées de la littérature [142, 212].

3.3.1.1. Dosage de l'acide férulique

Le système était le suivant : pré-colonne : Adsorbosphere C18 All-Guard (5 μ m, 25 x 4.6 mm) ; colonne : Waters Symmetry 300 C18 (5 μ m, 150 x 3.9 mm) ; four thermostatisé à 35 °C ; phase mobile composée d'un mélange acétonitrile / eau + acide acétique 0,5% (8:92) (A) et d'acétonitrile (B) selon le gradient suivant : 0 min, 100% de A ; 19 min, 100% de A ; 20 min, 0% de A ; 28 min, 0% de A ; 29 min, 100% de A ; 34 min, 100% de A. Débit : 0,8 ml/min. Spectrophotomètre : 316 nm. Injection : 20 µl.

3.3.1.2. Dosage du Z-ligustilide

Le système était le suivant : pré-colonne : Adsorbosphere C18 All-Guard (5 μm, 25 x 4.6 mm) ; colonne : Waters Atlantis C18 (5 μm, 250 x 4.6 mm) ; four thermostatisé à 35 °C ; phase mobile composée d'un mélange eau + acide acétique 0,1% (A) et de méthanol (B) selon le gradient suivant : 0 min, 60% de A ; 3 min, 60% de A ; 18 min, 0% de A ; 21 min, 0% de A ; 22 min, 60% de A ; 23 min, 60% de A. Débit : 1,0 ml/min. Spectrophotomètre : 384 nm. Injection : 10 μl.

3.3.2. Analyse de l'extrait d'E. senticosus

Pour cet extrait, 2 molécules supposées actives, l'éleuthéroside B et l'éleuthéroside E, ont été dosées sur base d'une méthode HPLC-UV adaptée de la littérature [142]. Le système était le suivant : pré-colonne : Adsorbosphere C18 All-Guard (5 μ m, 25 x 4.6 mm) ; colonne : Waters Atlantis C18 (5 μ m, 250 x 4.6 mm) ; four thermostatisé à 35 °C ; phase mobile composée d'eau (A) et d'acétonitrile (B) selon le gradient suivant : 0 min, 90% de A ; 5 min, 90% de A ; 27 min, 80% de A ; 30 min, 50% de A ; 35 min, 50% de A ; 40 min, 90% de A ; 45 min, 90% de A. Débit : 1,0 ml/min. Spectrophotomètre : 215 nm. Injection : 20 μ l.

3.3.3. Analyse de l'extrait de P. ginseng

Pour cet extrait, 7 molécules présumées responsables de l'activité ont été dosées à l'aide d'une méthode HPLC-UV-ESI-MS [142]. Il s'agit des ginsénosides Rg1, Rd, Re, Rb1, Rb2, Rc, Rf. Le système comprenait les éléments suivants : colonne : Alltech Alltima C18 (5 μm, 250 x 4.6 mm) ; four thermostatisé à 35 °C ; phase mobile composée d'eau (A) et d'acétonitrile (B) selon le gradient suivant : 0 min, 80% de A ; 8 min, 80% de A ; 25 min, 60% de A ; 35 min, 40% de A ; 37 min, 0% de A ; 38 min, 0% de A ; 39 min, 80% de A ; 40 min, 80% de A. Débit : 1,0 ml/min. Spectrophotomètre : 203 nm. Injection : 20 μl. Les paramètres du spectromètre de masse étaient les suivants : mode négatif ; scan entre m/z 150,0 et 1400,0 ; flux de gaz principal, 40 UA (N₂) ; flux de gaz auxiliaire, 40 UA (N₂) ; température du capillaire, 260 °C ; tension du capillaire, 3,50 kV. Acquisition du courant ionique total et identification des espèces chimiques en fonction des m/z majoritaires : 799,5, 945,6, 945,6, 1107,7, 1077,6, 1077,6 and 799,5 pour les ginsénosides Rg1, Rd, Re, Rb1, Rb2, Rc et Rf respectivement.

3.3.4. Analyse de l'extrait de S. chinensis

Pour cet extrait, une méthode de dosage HPLC-UV de 2 des molécules reconnues actives, la shizandrine et la schisandrine B, a été mise au point. Le système était le suivant : pré-colonne : Adsorbosphere C18 All-Guard (5 μ m, 25 x 4.6 mm); colonne : Alltech Alltima C18 (5 μ m, 250 x 4.6 mm); four thermostatisé à 35 °C; phase mobile composée d'eau (A) et d'acétonitrile (B) selon le gradient suivant : 0 min, 98% de A; 15 min, 45% de A; 30 min, 40% de A; 50 min, 30% de A; 60 min, 0% de A; 70 min, 0% de A; 70 min, 98% de A; 75 min, 98% de A. Débit : 1,0 ml/min. Spectrophotomètre : 220 nm. Injection : 10 μ l.

L'extrait méthanolique produit après délipidation préalable par de l'hexane contient des quantités de schisandrine et de schisandrine B très inférieures à celles rapportées dans la littérature. Ceci est expliqué au point 4.1.4. Analyse de l'extrait de S. chinensis.

3.3.5. Analyse de l'extrait de S. marianum

Pour cet extrait commercial (à l'acétate d'éthyle) standardisé à 80% de silymarine, l'analyse phytochimique s'est concentrée sur la détermination de la silicristine, de la silidianine, de la silibinine A, de la silibinine B, de l'isosilibinine A et de l'isosilibinine B.

Le système était le suivant : pré-colonne : Adsorbosphere C18 All-Guard (5 μ m, 25 x 4.6 mm) ; colonne : Waters Symmetry 300 C18 (5 μ m, 150 x 3.9 mm) ; four thermostatisé à 30 °C ; phase mobile composée d'un mélange eau + acide acétique 0,5% (A) et méthanol + acide acétique 0,5% (B) selon le gradient suivant : 0 min, 75% de A ; 1 min, 75% de A ; 30 min, 60% de A ; 45 min, 60% de A ; 46 min, 20% de A ; 54 min, 20% de A ; 55 min, 75% de A ; 59 min, 75% de A. Débit : 0,8 ml/min. Spectrophotomètre : 288 nm. Injection : 20 μ l.

3.3.6. Recherche d'activité antioxydante

Principe

L'activité antioxydante a été déterminée par un test au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), un radical libre qui est stable en vertu de la délocalisation de son électron libre. Cette délocalisation lui confère une coloration mauve. Lorsque le DPPH se trouve en présence d'un antioxydant (donneur d'atome d'hydrogène), il est réduit et acquiert une coloration jaune (Figure 27) [213]. Le dosage de la disparition de DPPH se base sur une mesure colorimétrique. Les résultats sont exprimés en TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) qui est le rapport entre les IC₅₀ obtenues pour la substance à tester et le Trolox[®] (un composé antioxydant de référence) Sigma-Aldrich, St Louis, USA) [214].



Figure 27 : réaction de neutralisation du DPPH radicalaire.

Protocole

Pour chaque extrait de plante ou composé à tester, une série de dilutions est réalisée dans une plaque 96 puits avec du méthanol. Celles-ci sont mises en contact d'une solution méthanolique à 0,004% (m/v) de DPPH. La plaque est incubée 30 min à l'abri de la lumière, et les absorbances sont mesurées à 540 et 620 nm avec un spectrophotomètre iEMS Reader MF (Thermo Labsystems, Breda, The Netherlands). Pour chaque substance à tester, la concentration capable de piéger 50 % du DPPH radicalaire (*i.e.* son IC₅₀) est déterminée par ajustement aux points expérimentaux d'une fonction à deux paramètres (méthode des moindres carrés) :

$$N = N0 \times e^{-k \times C}$$

Où : N est le pourcentage d'inhibition ; NO, le pourcentage de DPPH à la concentration 0 et k, une constante.

3.4. Cultures cellulaires

La lignée cellulaire HK-2 (CRL-2190[™]) a été obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). Les cellules HK-2 sont des cellules épithéliales issues du tubule contourné proximal du rein. Il s'agit d'une souche établie à partir d'un cortex de rein sain d'un homme adulte et immortalisée par transfection des gènes E6/E7 du papilloma virus. Elles possèdent pratiquement les même caractéristiques que les cellules dont elles sont issues [215]; on note cependant la perte de l'expression de certaines protéines telles que le facteur VIII, l'antigène 6,19 ou encore l'endopeptidase neutre. Elles restent morphologiquement et fonctionnellement semblables aux cellules d'origine. Leur prolifération est dépendante du facteur de croissance EGF (*epidermal growth factor*).

Les réactifs employés pour la culture cellulaire ont été obtenus auprès de PAA Laboratories GmbH

(Pasching, Austria). Le milieu de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) à 1 g/l de glucose est supplémenté en L-glutamine (concentration finale de 2 mM) et en un mélange streptomycine/pénicilline (concentration finale de 0,03 % ; m/v). Du sérum bovin fœtal (FBS ; PAA Clone) est également ajouté (teneur totale de 10 % ; v/v) pour produire un milieu complet. Le sérum est préalablement décomplémenté par chauffage une demi-heure au bain-marie à 56°C.

Les cellules sont maintenues à 37 °C dans une atmosphère saturée en humidité et supplémentée en CO₂ à hauteur de 5 %. Les cultures sont divisées lorsque les monocouches cellulaires atteignentenviron 90 % de confluence.

3.5. Protocole expérimental

Les données expérimentales sont recueillies sur des cellules récoltées entre les passages 6 et 25. Les cellules sont décrochées par trypsinisation, et ensemencées selon les concentrations suivantes : 10⁴ cellules par puits dans des plaques 96 puits (Cellstar[®]; Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany); 1.10⁵ cellules par puits dans des plaques 12 puits (Cellstar[®]; Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany); 2.10⁵ cellules par puits dans des plaques 6 puits (Cellstar[®]; Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany); 4.10⁵ cellules par puits dans les boites de Pétri 60 mm (Cellstar[®]; Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany); 4.10⁴ cellules par puits sur les lames compartimentées à 8 chambres (Millicell EZ-slide; Millipore, Billerica, USA) et à 4 chambres (Nunc[™] Lab-Tek II[™]; NalgeNunc International, Rochester, USA).

Les cellules sont incubées pendant 24 h en milieu complet, puis rincées à l'aide de milieu dépourvu de sérum (milieu "serum-free" ou SF). Les incubations avec les substances à tester sont menées en SF afin de limiter la prolifération cellulaire et de limiter la fixation de substances à tester à l'albumine sérique, absente de l'ultrafiltrat glomérulaire en conditions physiologiques.

Les teneurs en DMSO des solutions stocks ont été choisies de sorte à ce qu'elles n'atteignent pas plus de 0,1 % (v/v) après dilution pour le traitement des cellules. L'absence d'effet (à cette concentration) a été vérifiée préalablement par mesure de la survie à l'aide des tests au MTT, à la résazurine et au violet de gentiane.

Les mesures spectrophotométriques sont effectuées à l'aide d'un lecteur de plaque iEMS Reader MF (Thermo Labsystems, Breda, Pays-Bas). Le cytomètre de flux employé est un FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, USA) ; les données enregistrées sont traitées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, Ashland, USA). La microscopie en fluorescence a été réalisée à l'aide du microscope Axioskop (Zeiss, Germany) équipé d'un appareil photo DP200 (Deltapix, Maalov, Denmark).

3.6. Détermination des doses de travail

Les doses de substances toxiques ou d'extraits de plantes auxquelles les cellules seront exposées dans la suite de ce travail ont été choisies après élaboration de courbes de survie via les tests basés sur le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium (MTT) [216], la résazurine [217, 218] et le violet de gentiane [219, 220].

3.6.1. Test au MTT

Principe

Les sels de tétrazolium, dont fait partie le MTT, sont une famille de senseurs redox qui peuvent être réduits en formazans par les cellules métaboliquement actives [221]. Ces derniers peuvent être quantifiés par spectrophotométrie. La mesure de survie cellulaire basée sur l'utilisation de sels de tétrazolium est une technique de laboratoire qui compte parmi les plus employées.

En 1963, Slater et al. rapportent pour la première fois que les sels de tétrazolium peuvent être réduits par la chaîne respiratoire mitochondriale [222]. En 1983, Mosmann suggère que cette propriété soit utilisée pour évaluer la prolifération et la survie cellulaire [216]. Il développe alors le test au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Depuis les années 60, il a été supposé que le clivage du cycle du MTT dépend du complexe II de la chaîne respiratoire des mitochondries, lequel comprend la succinate déshydrogénase. Des études ultérieures ont démontré que la majorité des réactions de réduction du MTT avaient lieu au niveau de sites extramitochondriaux impliquant les NADH et NADPH (Figure 28) [223].



Figure 28 : mécanisme de réduction du bromure de tétrazolium en formazan.

Protocole

Les cellules HK-2 sont ensemencées dans une plaque 96 puits (10.000/puits), incubées pendant 24 h, puis traitées par les substances à tester pendant 48 h. Les puits sont rincés 2 fois avec du SF et incubés pendant 3 h avec une solution à 1 mg/ml de MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). La plaque est retournée au-dessus d'un papier absorbant, les cristaux de formazan sont dissous avec du DMSO,

et les absorbances des puits sont mesurées à 540 et 620 nm avec un spectrophotomètre iEMS Reader MF.

L'absorbance mesurée à 620 nm est retranchée de celle à 540 nm. Le pourcentage de cellules métaboliquement actives est calculé par la formule suivante :

$$\% age = \frac{A \text{ puits} - A \text{ blanc}}{A \text{ ctrl} - A \text{ blanc}} \times 100$$

Où "A puits" est l'absorbance du puits contenant la solution à tester ; "A ctrl" est la moyenne des absorbances des puits contrôles ; et "A blanc" est la moyenne des absorbances des puits blancs.

3.6.2. Test à la résazurine

Principe

Le principe de fonctionnement du test à la résazurine est semblable à celui du MTT : la molécule peut être réduite en résorufine par des cellules métaboliquement actives (Figure 29). Le réactif (de couleur bleue) et le produit (de couleur rose) peuvent être dosés par spectrophotométrie ou, étant donné les propriétés fluorescentes de la résorufine, par fluorimétrie [221].



Figure 29 : mécanisme de réduction de la résazurine en résorufine au sein des cellules métaboliquement actives.

Protocole

Les cellules sont traitées comme décrit en *3.6.1. Test au MTT*. Les puits sont rincés 2 fois avec du PBS, incubés pendant 2 heures avec une solution à 0,44 mM de résazurine (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) diluée dans du PBS et les absorbances sont mesurées à 540 et 620 nm avec le spectrophotomètre iEMS Reader MF. Le pourcentage de résazurine réduite est calculé selon la formule suivante :

$$\% age = \frac{(\varepsilon OX)\lambda 2.A\lambda 1 - (\varepsilon OX)\lambda 1.A\lambda 2}{(\varepsilon RED)\lambda 1.A'\lambda 2 - (\varepsilon RED)\lambda 2.A'\lambda 1}$$

Où : ε_{OX} est le coefficient d'extinction molaire de la résazurine (soit 47.6 à 540 nm et 34.8 à 620 nm) ; ε_{RED} est le coefficient d'extinction molaire de la résorufine (soit 104.4 à 540 nm et 5.5 à 620 nm) ; A est l'absorbance des puits correspondant à la solution à tester ; A' est l'absorbance moyenne des puits blancs ; $\lambda 1 = 540$ nm; $\lambda 2 = 620$ nm. La mesure est normalisée par rapport au contrôle.

3.6.3. Test au violet de gentiane

Principe

Il s'agit d'une méthode dérivant de la coloration de Gram utilisée en bactériologie. Le violet de gentiane est porteur d'une charge cationique (Figure 30), ce qui le rend capable de se lier à des molécules anioniques telles que l'ADN ou certaines protéines. Ainsi, la fixation du colorant sera dépendante de la quantité de macromolécules biologiques ; et sa remise en solution permettra une détermination par spectrophotométrie [219, 220].



Figure 30 : structure du violet de gentiane (aussi appelé cristal violet).

Protocole

Les cellules sont traitées comme décrit en 3.6.1. Test au MTT, et les puits sont rincés 2 fois avec du PBS. Les cellules sont fixées pendant 10 min avec une solution à 2 % de paraformaldéhyde (m/v), puis marquées pendant 10 min à l'aide d'une solution de cristal violet à 1 % (m/v). Les puits sont rincés abondamment à l'eau de ville, et le cristal violet retenu par les cellules fixées est solubilisé par une solution de SDS à 1 % (m/v). L'absorbance est mesurée à 540 nm avec le spectrophotomètre iEMS Reader MF, et le pourcentage de cellules vivantes est calculé selon la formule suivante :

$$\% age = \frac{A \, puits - A \, blanc}{A \, ctrl - A \, blanc} \times 100$$

Où : "A puits" est l'absorbance du puits contenant la solution à tester ; "A ctrl" est la moyenne des absorbances des puits contrôles ; et "A blanc" est la moyenne des absorbances des puits blancs.

3.6.4. Dosage des protéines

Principe

Le dosage se base sur la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA) : en milieu alcalin, les protéines réduisent les ions Cu²⁺ en Cu⁺ (réaction du biuret); ces derniers sont alors complexés par le BCA qui acquiert une coloration violette dont l'absorbance maximale se situe à 562 nm (Figure 31) [224].



Figure 31 : principe du dosage des protéines à l'aide du BCA.

Protocole

Les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits, sont traitées et rincées 2 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite lysées avec une solution de lyse (Cell Lysis Buffer ; BD Pharmingen, San Diego, USA). Les protéines sont dosées à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, USA) suivant les instructions du fabricant.

L'absorbance est mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre iEMS Reader MF et les quantités de protéines présentes sont rapportées aux conditions contrôles.

3.6.5. Mise en équation des courbes de survie

Les données expérimentales (*i.e.* le pourcentage de cellules vivantes en fonction de la dose) obtenues pour les tests au MTT, au violet de gentiane et à la résazurine sont mises en graphique avec le logiciel GraphPad Prism 5 (La Jolla, USA). Après transformation des valeurs de concentration en leurs logarithmes, un modèle de régression non linéaire est appliqué de manière à tracer une courbe de survie d'équation :

$$y = \frac{100}{1 + 10^{(\log IC50 - x) \times a}}$$

Où : y représente le pourcentage de survie cellulaire ; IC_{50} , la concentration en substance test produisant une survie cellulaire de 50 % ; x, la concentration en substance test ; a, la pente de la courbe à l' IC_{50} .

De cette équation peuvent être calculées les concentrations produisant 25 % ou 1 % de mortalité (IC₂₅ ou IC₁) qui seront utilisées dans les expériences ultérieures.

3.7. Etude de la mortalité cellulaire

3.7.1. Evaluation de la survie

La survie globale des cellules HK-2 traitées avec les extraits et/ou les agents toxiques a été déterminée à l'aide du test à la résazurine décrit ci-dessus.

Dans certains cas, la quantité de protéines a été évaluée afin de confirmer les mesures de survies obtenues avec le test à la résazurine. En effet, ce dernier évalue la viabilité cellulaire en supposant que l'activité métabolique des cellules est directement proportionnelle à leur nombre. Une mesure de la quantité de protéines peut en effet indiquer un ralentissement de l'activité métabolique (*i.e.* un ralentissement de la respiration cellulaire) qui ne soit pas corrélé à une mortalité cellulaire.

3.7.2. Mesures d'apoptose

Principe

La proportion de cellules en apoptose a été déterminée par une méthode en cytométrie de flux reposant sur un double marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium (PI). En début de processus apoptotique, les résidus phosphatidylsérines de la membrane plasmique sont renversés de manière à être présentés sur la surface externe de la cellule (phénomène *flip-flop*). L'annexine V est une protéine sanguine capable de se fixer aux phosphatidylsérines ; son couplage à un fluorophore tel que le FITC (isothiocyanate de fluorescéine) permet la détection de cellules en apoptose. Le PI (Figure 38) est, quant à lui, un agent intercalant capable de se fixer à l'ADN et à l'ARN. Il ne pénètre dans le cytoplasme que lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est altérée, notamment au cours de la nécrose ou des phases tardives de l'apoptose [225].

Ces 2 marqueurs permettent de définir 4 populations cellulaires :

- Cellules viables : Annexine V / Pl
- Cellules en phase précoce d'apoptose : Annexine V⁺ / Pl⁻
- Cellules en phase tardive d'apoptose : Annexine V⁺ / PI⁺
- Cellules en nécrose : Annexine V^{*} / Pl^{*}

Protocole

Les cellules HK-2 sont ensemencées dans des plaques de culture à 12 puits (100.000 cellules par puits) et incubées pendant 24 h avant d'être traitées par les substances à tester. Les cellules sont récoltées par trypsinisation et centrifugées à 1400 g. Le surnageant est éliminé, et les cellules sont

remises en suspension dans une solution d'annexine V couplée au FITC et de PI (BD Pharmingen, San Diego, USA). La suspension est incubée 15 min à température ambiante, rincée avec du PBS, centrifugées à 1400 g, puis analysée par cytométrie de flux. Les débris et amas cellulaires sont éliminés à l'aide du logiciel FlowJo et les proportions de cellules vivantes, en nécrose, en phase précoce ou tardive d'apoptose sont déterminées.

3.8. Mesure du statut oxydatif

Principe

Cette méthode de quantification du statut oxydatif se base sur la conversion d'une sonde, le diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (H₂DCF-DA) (Figure 32), par des cellules vivantes. Cette molécule pénètre librement dans le cytoplasme où ses 2 fonctions acétates sont clivées par des estérases. Le H₂DCF résultant diffuse moins facilement à travers la membrane plasmique et se retrouve donc séquestré dans le cytosol. Les ROS/RNS présents dans la cellule pourront alors oxyder la sonde en DCF, dont la fluorescence pourra être quantifiée selon une méthode de cytométrie de flux [226].



Figure 32 : mode d'action du H₂DCF-DA : le marqueur traverse la membrane plasmique. Ses fonctions acétates sont rapidement clivées par des estérases cellulaires non spécifiques, limitant sa fuite du cytosol. Le dérivé est oxydé par des ROS, produisant du 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF), dont les propriétés de fluorescence permettent sa quantification.

Protocole

Les cellules sont traitées dans des plaques 12 puits, rincées 2 fois par du tampon HBSS, puis incubées à 37 °C pendant 30 min avec une solution à 10 µM de H₂DCF-DA (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) diluée dans du tampon HBSS. Les cellules sont ensuite récoltées par trypsinisation, centrifugées à 1400 g et analysée en cytométrie de flux. La fluorescence émise par le DCF est enregistrée. Les débris et amas cellulaires sont éliminés à l'aide du logiciel FlowJo, et l'intensité de fluorescence moyenne (MFI; moyenne géométrique) est estimée.

3.9. Production de matrice extracellulaire - dosage du collagène

Principe

Les RPTECs subissant des atteintes toxiques sont capables de synthétiser du collagène. Cette production de protéines de la MEC a pour but de cicatriser les tubules endommagés, en colmatant les lacunes laissées par la mort et le détachement de cellules environnantes. Toutefois, le remplacement massif de cellules tubulaires par un tissu cicatriciel inerte conduit à la perte irréversible de la fonction tubulaire. Limiter la production de collagène vise à empêcher l'apparition d'un tissu non fonctionnel et non résorbable.

Le collagène peut être détecté et quantifié à l'aide de rouge picrosirius (PSR) : ceci a été montré *in vivo*, notamment dans des biopsies de greffon rénal afin de pronostiquer le succès d'une transplantation rénale [46, 227]. La méthode a déjà été appliquée *in vitro*, notamment sur des cellules HK-2 [205, 228] : le PSR fixe les brins de collagène de cellules fixées. Le colorant est remis en solution et dosé par spectrophotométrie.

Toutefois, étant donné que le modèle de toxicité utilisé dans ce travail induit une certaine mortalité cellulaire, les valeurs d'absorbance attribuables au PSR seront corrigées par rapport à une activité métabolique, dont la corrélation avec la quantité de protéines a été préalablement vérifiée (cf. section 3.7.1. Evaluation de la survie).

Protocole

Les cellules sont traitées dans des plaques 96 puits et rincées par du PBS. L'activité métabolique de chaque puits est estimée selon le test à la résazurine décrit précédemment. Les puits sont ensuite rincés par du PBS et les cellules sont fixées par ajout de méthanol à – 20 °C et incubation pendant 1 h à 4 °C. Les puits sont rincés 2 fois avec une solution d'acide acétique à 1 % (v/v), et les fibres de collagène sont marquées par une solution 0,1 % (m/v) de PSR. Les puits sont rincés 3 fois par une solution d'acide acétique 1 % (v/v), et le colorant est resolubilisé par une solution de NaOH 0,1 M. Les absorbances de chaque puits sont mesurées à 540 nm avec un spectrophotomètre iEMS Reader MF, puis normalisées par rapport à l'activité métabolique déterminée précédemment. La corrélation entre le nombre de cellules par puits, l'activité métabolique (test à la résazurine) et la quantité de protéines (mesurée par la méthode à l'acide bicinchoninique) a été objectivée au cours d'expériences préliminaires.
3.10. Relocalisation de la β-caténine

La β -caténine est une protéine qui joue un double rôle dans la cellule : d'une part, elle intervient au niveau intracytoplasmique dans les jonctions cellulaires en liant la E-cadhérine au cytosquelette d'actine. Elle peut ainsi être utilisée comme marqueur de l'intégrité du phénotype épithélial [229]. D'autre part, lorsque les RPTECs subissent des atteintes toxiques, les jonctions intercellulaires sont rompues et la β -caténine, après reconfiguration structurelle [230], peut se relocaliser dans le noyau où elle exercera une activité de facteur de transcription en conjonction avec des facteurs de la famille Tcf/Lef, induisant la transcription de gènes impliqués dans les processus de fibrose [231]. Deux méthodes ont permis de mesurer la quantité de β -caténine sous sa forme membranaire et sous forme transitoire en cours de relocalisation (intracytoplasmique/nucléaire).

3.10.1. Perte de β-caténine membranaire

Principe

L'analyse de β -caténine membranaire a nécessité la mise au point d'une méthode de quantification de fluorescence par analyse d'image (QFIA = *quantitative fluorescence image analysis*) afin de quantifier la fluorescence attribuable à la forme membranaire de β -caténine après immunomarquage impliquant le fluorophore Cyanine-3 (λ_{Ex} = 548 nm / λ_{Em} = 563 nm). Pour cela, les intensités de fluorescence ont été évaluées par estimation de la luminance de chaque champ.

En imagerie numérique, la luminance correspond à une moyenne arithmétique des intensités des couleurs primaires (RGB) calculée selon la formule :

$$Luminance = \frac{R+G+B}{3}$$

Ainsi, pour une image codée sur 24 bits, la transformation en luminance fournira une image en niveaux de gris codée sur 8 bits. La somme (ou alternativement, la moyenne) des valeurs de gris obtenues après conversion fournit une appréciation de la quantité de lumière émise par le champ photographié en microscopie de fluorescence.

Le logiciel Fiji (Fiji is just ImageJ) a été utilisé : il s'agit d'un programme open-source permettant le traitement et l'analyse d'images. Son fonctionnement, basé sur le langage Java, permet la création et l'ajout de nouveaux plugins et macros ne figurant pas dans les options de base du programme.

Dans le cas présent, un script de métaprogrammation faisant appel aux fonctions de base de Fiji a été écrit. La macro élaborée tient compte du fait que les cellules HK-2 subissant des atteintes toxiques peuvent présenter de la β-caténine au niveau nucléaire (forme relocalisée ; Figure 33).



Figure 33 : immunomarquages de cellules traitées pendant 48 h avec ou sans AA (50 μM) et montrant la localisation de βcaténine aux niveaux membranaire et nucléaire (grossissement 400 x).

Afin d'éliminer l'éventuelle fluorescence émanant du noyau, les cellules ont été marquées par du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), un agent intercalant émettant une fluorescence bleue après fixation à l'ADN. Les images acquises seront ensuite traitées de manière à soustraire la forme des noyaux du reste de l'image (Figure 34).

La macro rédigée est la suivante :

```
input = getDirectory("Choose Input Directory");
output = getDirectory("Choose Output Directory");
list = getFileList(input);
setBatchMode(true);
for (i=0; i<list.length; i++){
showProgress(i+1, list.length);
open(input+list[i]);
run("Duplicate ... ", "title=copy");
selectWindow(list[i]);
run("Split Channels");
selectWindow(list[i] + " (green)");
close();
selectWindow(list[i] + " (red)");
close();
selectWindow(list[i] + " (blue)");
rename("blue");
setThreshold(0, 30):
run("Convert to Mask");
imageCalculator("Subtract", "copy", "blue");
selectWindow("blue");
close();
run("Subtract Background ... ", "rolling=50");
run("RGB to Luminance");
saveAs("Jpeg", output+"Processed "+list[i]);
run("Set Measurements...", " mean limit display scientific redirect=None decimal=3");
run("Measure");
close();
close();
}
```



Figure 34 : traitement des images avec Fiji : la forme des noyaux est repérée par leur fluorescence bleue (A), binarisée (B) et soustraite de l'image originale (C). L'image produite est convertie en niveau de gris par conversion en luminance (D). La quantité de fluorescence émise est ensuite évaluée par calcul de la valeur moyenne du niveau de gris codée sur 8 bits.

Des expériences préliminaires ont permis de juger de la validité de cette approche de QFIA. Le domaine de linéarité, ainsi que la reproductibilité de la méthode ont été évalués à l'aide de microbilles de 6,0 µm greffées avec un fluorophore dont les propriétés sont semblables à celles de la cyanine-3 utilisée pour l'immunomarquage de la β -caténine (InspeckTM Orange (λ_{Ex} = 540 nm / λ_{Em} = 560 nm) ; Molecular Probes, Eugene, USA).

Protocole

Les cellules sont traitées sur des lames compartimentées, rincées par du PBS, fixées à l'aide d'une solution à 4 % de paraformaldéhyde (m/v) pendant 20 min et perméabilisées par une solution de Triton X à 0,01 % pendant 5 min. Les lames sont à nouveau rincées, et les cellules sont incubées avec un sérum bloquant d'âne "*Normal Donkey Serum*" (sc-2044, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) pendant 1 h. Elles sont ensuite incubées avec un anticorps primaire "*Mouse anti-human β-catenin primary antibody*" (sc-7963, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) pendant 1 h, rincées 2 x dans du PBS et incubées avec un anticorps secondaire "*Cyanine-3 conjugated donkey anti-mouse secondary antibody*" (715-166-151, Immuno Research Lab Jackson) pendant 30 min. Après 2 rinçages dans du PBS, les lames sont montées avec un milieu de montage contenant du DAPI (DAPI-containing Prolong Gold antifade reagent ; Invitrogen, Eugene, USA). Les lames peuvent ensuite être observées sous le microscope en fluorescence Axioskop équipé de l'appareil photo DP200 au grossissement 400 x.

Pour chaque condition expérimentale, 10 images sont enregistrées et analysées avec le logiciel Fiji.

3.10.2. Acquisition de β-caténine intracytoplasmique/nucléaire

Principe

Les cellules HK-2 seront traitées dans les mêmes conditions que précédemment avant d'être décrochées et marquées à l'aide d'un anticorps ciblant la forme nucléaire de β-caténine. L'analyse de fluorescence attribuable à la forme relocalisée de la protéine sera réalisée par cytométrie de flux. Des immunomarquages sur lame et examen en microscopie de fluorescence (Figure 35) ont permis de confirmer visuellement que l'anticorps sélectionné ne ciblait pas la forme membranaire de β-caténine.



Figure 35 : immunomarquage de cellules HK-2 avec l'anticorps primaire dédié à l'analyse de la forme nucléaire de βcaténine. Les cellules ont été traitées pendant 48 h avec ou sans AA (50 μM) (grossissement 400 x).

Protocole

Les cellules sont traitées dans des plaques 12 puits, récoltées par trypsinisation, centrifugées à 500 g et fixées pendant 20 min à 4 °C à l'aide d'une solution Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego, USA). La suspension est rincée 2 fois avec du PBS avant d'être incubée avec un anticorps anti-β-caténine (*anti-human θ-catenin-phycoerythrin monoclonal antibody* ; R&D Systems, Mineapolis, USA) pendant 30 min à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite analysées à l'aide du cytométre de flux BD FACS Canto II. 10.000 évènements correspondant à des cellules HK-2 sont enregistrés. La mesure de fluorescence moyenne (MFI ; moyenne géométrique) se fait à l'aide du logiciel FlowJo après élimination des débris et amas cellulaires.

3.11. Caractérisation phénotypique par RT-qPCR

Principe

Cette technique permet la quantification de brins d'ARN codant pour des protéines spécifiques : il est ainsi possible d'évaluer l'activité transcriptionnelle pour un gène choisi. Dans un premier temps l'ARN total de cellules traitées est isolé.

Dans un second temps, l'ARN purifié va être retranscrit en ADN à l'aide d'une transcriptase inverse. Les brins d'ADN vont ensuite être dupliqués par PCR (*polymerase chain reaction*). Cette technique consiste à répéter des cycles de 3 étapes : (*i*) une dénaturation qui permet de séparer les brins d'ADN complémentaires et qui se fait par chauffage à 95 °C ; (*ii*) une hybridation durant laquelle les amorces (= brins d'ADN complémentaires du gène d'intérêt) vont s'apparier par complémentarité ; et (*iii*) une élongation visant à compléter la séquence d'ADN à l'aide d'une ADN polymérase.

Chaque cycle multiplie le nombre de brins par 2. De plus, l'élongation permet d'incorporer des nucléotides marqués par une sonde fluorescente, ce qui autorise la quantification des brins d'ADN auxquels elle est fixée. La sonde est marquée par un fluorochrome (le Sybr[®] Green) en 5' et par un quencher en 3'. Pendant l'étape d'hydridation, les amorces et les sondes s'apparient à leur séquence complémentaire. Lorsque les sondes sont intactes, le quencher permet d'inhiber la fluorescence du fluorochrome. Durant la polymérisation, la polymérase allonge la séquence d'ADN et clive le fluorochrome à l'aide de son activité exonucléase. Celui-ci n'est alors plus inhibé par le quencher et va pouvoir être quantifié.

Cette méthode est qualifiée de "PCR en temps réel" (*real time*, RT) étant donné qu'elle permet la quantification de l'ADN amplifié après chacun des cycles [232].

Protocole

Les cellules HK-2 sont traitées dans des plaques 6 puits, puis récoltées par trypsinisation, lysées par une solution de thiocyanate de guanidinium et conservées à – 80 °C jusqu'à leur analyse.

L'ARN des échantillons est extrait à l'aide d'un extracteur automatique et du kit MagNA Pure LC mRNA HS (Roche, Mannheim, Germany). Une sonde porteuse d'un groupement biotine est ajoutée aux échantillons ; elle s'hybride aux queues polyA de l'extrémité 3' de l'ARN. Des billes magnétiques recouvertes de streptavidine permettent d'isoler le complexe sonde-ARN. L'ADN génomique résiduel est dégradé grâce à de la DNAse, et les échantillons sont lavés et élués.

L'ARN isolé est ensuite dosé à l'aide d'une Nanodrop 2000 (Thermo Scientific Rockford, USA), et dilué de manière à produire des solutions d'ARN de concentrations identiques pour chacune des conditions à analyser.

La PCR est effectuée en une seule étape (*one-step PCR*), les échantillons sont additionnés dans un mélange réactionnel LightCycler[®] 480 RNA master hydrolysis probes (Roche, Mannheim, Germany) comprenant une ADN polymérase (thermorésistante) dotée d'une activité rétrotranscriptase ainsi que d'une activité ADN polymérase et exonucléase $5' \rightarrow 3'$. Cette enzyme permet d'effectuer la rétrotranscription et la PCR dans le même puits.

Les amorces Real Time Ready™ (Roche, Mannheim, Germany) présentaient les structures suivantes :

	Sens	Antisens
GAPDH	5'-cactaggcgctcactgttctc-3'	5'-gcccaatacgaccaaatcc-3'
E-cadh	5'-tggaggaattcttgctttgc-3'	5'-cgctctcctccgaagaaac-3'
a-SMA	5'-gacagcgccaagtgaagc-3'	5'-cttcgtcgcacattgtgtct-3'
Vim	5'-gaccagctaaccaacgacaaa-3'	5'-gaagcatctcctcctgcaat-3'
TGF-b1	5'-actactacgccaaggaggtcac-3'	5'-tgcttgaacttgtcatagatttcg-3'
TGF-b3	5'-aagaagcgggctttggac-3'	5'-cgcacacagcagttctcc-3'
cTGF	5'-gcctcctgcaggctagaga-3'	5'-gatgcactttttgcccttct-3'

Tableau 5 : amorces utilisées.

Lorsque suffisamment de fluorochrome a été libéré des sondes, le signal de fluorescence atteint le crossing point. Les quantités d'ARN sont déterminées par la méthode des $\Delta\Delta C$ t et sont normalisées par rapport au gène codant pour la GAPDH, exprimé de manière constante dans les cellules [233].

3.12. Recherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire

Dans cette série d'expériences, les extraits seront testés seuls, et non plus en combinaison avec les toxiques. Le but est ici de mettre en évidence un effet positif sur les capacités de régénération des RPTECs et non plus de les protéger vis-à-vis des effets délétaires des composés néphrotoxiques.

3.12.1. Evaluation de la prolifération cellulaire par l'index Ki-67

Principe

Stimuler la prolifération des RPTECs après une atteinte toxique permet en principe de limiter la durée et la sévérité de l'ARA faisant suite à la perte de cellules tubulaires [234, 235]. Pour évaluer la vitesse de prolifération des cellules HK-2, l'antigène Ki-67 sera marqué par une technique en immunofluorescence. Cette protéine est présente à la surface de noyaux de cellules dans les phases prolifératives du cycle cellulaire (G₁, S, G₂ et M) alors qu'elle reste absente en phase de quiescence (G₀) (Figure 36) [236]. Son rôle précis reste à ce jour inconnu ; bien que souvent utilisée comme marqueur dans l'évaluation du potentiel proliférateur de tumeurs, elle a déjà été impliquée dans des études *in vivo* et *in vitro* s'intéressant aux capacités de régénération tubulaire [47, 237].



Figure 36 : diagramme indiquant la présence de la protéine Ki-67 en fonction des phases du cycle cellulaire.

Protocole

A l'issue du traitement sur lames compartimentées, les cellules HK-2 sont rincées 2 x 5 min dans un bain de PBS, fixées à l'aide d'une solution à 4 % de paraformaldéhyde (m/v) pendant 20 min et perméabilisées par une solution de Triton X à 0,01 % pendant 5 min. Les lames sont ensuite incubées pendant 1 h à température ambiante avec une solution diluée de sérum de chèvre (PAA, Pasching, Austria), puis 1 h avec une solution d'anticorps primaire "*rabbit anti-human-Ki-67*" (Abcam, Cambridge, UK). Après 2 rinçages de 5 min avec du PBS, les lames sont à nouveau incubées avec un anticorps secondaire "*Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit antibody*" (Invitrogen, Eugene, USA) pendant 30 min. Les lames sont rincées avec du PBS, montées dans un milieu de montage contenant du DAPI (Invitrogen, Eugene, USA) et observées sous microscope en fluorescence Axioskop équipé d'un appareil photo DP200 au grossissement 400 x (Figure 37). 20 images par puits sont enregistrées ; l'index Ki-67 correspond au rapport du nombre de cellules positives pour l'antigène Ki-67 sur le nombre total de cellules.



Figure 37 : images obtenues en microcopie de fluorescence (grossissement 400x) après immunomarquages de l'antigène Ki-67 (vert) et des noyaux cellulaires (bleu) pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h en SF (Ctrl) ou avec du FBS (10 %) ou du CisPt (10 μM).

3.12.2. Analyse des phases du cycle cellulaire

Principe

Des molécules néphrotoxiques (notamment les AA et le CisPt) peuvent induire des dommages à l'ADN, par fixation ou par génération de ROS et RNS, et ainsi bloquer le cycle cellulaire [88]. Si le

blocage se fait en G₂/M, comme c'est le cas pour les AA et le CisPt, il en résulte un index Ki-67 artificiellement plus élevé ; celui-ci n'est en effet pas corrélé à une induction de la prolifération cellulaire mais à un blocage du cycle.

Cette manipulation vise à confirmer un éventuel effet sur l'induction de la prolifération des substances testées en réfutant un blocage en G₂/M.

Pour ce faire, l'ADN des cellules sera marqué avec du PI, un agent intercalant dont la fluorescence est exacerbée après fixation à des acides nucléiques (Figure 38).



Figure 38 : structure de l'iodure de propidium. Une fois intercalé dans la double hélice d'ADN, sa fluorescence est multipliée 20 à 30 fois [238].

L'ADN de chaque cellule pourra alors être quantifié par une méthode de cytométrie de flux à l'aide de la fluorescence qu'elle émet [239]. En effet, si une cellule en phase G₀ ou G₁ possède une quantité q d'ADN, alors une cellule en phase G₂ ou en mitose en possède 2q ; une cellule en phase S présente une quantité d'ADN entre q et 2q (Figure 39).



Figure 39 : diagramme du cycle cellulaire montrant les quantités d'ADN pour chacune des phases (A) ($q = G_0/G_1$; q - 2q = S; $2q = G_2/M$). Histogrammes obtenus après marquage au PI de cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec du milieu dépourvu de sérum (Ctrl) ou 50 μ M d'AA (B).

Protocole

Les cellules sont traitées dans des plaques 12 puits, récoltées par trypsinisation, puis fixées par une solution à 66 % d'éthanol (v/v) pendant 1 h à 4 °C. La suspension est centrifugée à 1400 g, et les culots rincés avec du PBS. La suspension est à nouveau centrifugée ; les cellules sont remises en suspension dans une solution de *PI/RNase Staining Buffer* (BD Pharmingen, San Diego, USA) suivant les recommandations du fabricant et incubées 15 min à température ambiante. Les cellules sont lavées par du PBS avant d'être analysées par le cytométre de flux BD FACS Canto II. 10.000 évènements correspondant à des cellules HK-2 sont enregistrés à une vitesse maximale de 200 évènements/s. L'analyse des cycles cellulaires se fait à l'aide du logiciel FlowJo après élimination des débris et amas cellulaires : les proportions de cellules en phases G₀/G₁, S ou G₂/M sont déterminées selon le modèle de Dean-Jett-Fox [240].

3.12.3. Test de cicatrisation

Principe

Le test de cicatrisation (aussi appelé *scratch assay* ou *wound healing assay*) est une méthode rapide et peu coûteuse, fréquemment utilisée pour évaluer l'activité cicatrisante de molécules ou d'extraits sur des épithélia [241, 242]. Elle consiste à gratter des monocouches cellulaires à l'aide d'une pointe de pipette de manière à produire une rayure linéaire. La vitesse de recolonisation (*i.e* de cicatrisation) de la zone éraflée est ensuite évaluée. De précédentes études ont suggéré qu'une augmentation de la vitesse de migration des RPTECs permetait une accélération de la régénération tubulaire [231].



Figure 40 : déroulement du test de cicatrisation. Les cellules arrivant à confluence sont privées de sérum pendant 24, et la monocouche cellulaire est grattée avec une pointe de pipette de manière rectiligne. 10 photos de la rayure sont prises et les substances à tester sont ajoutées. Après une incubation de 18 h, 10 nouvelles photos sont prises.

Protocole

Les cellules HK-2 sont ensemencées dans des boites de Pétri 60 mm ou dans des plaques 6 puits, incubées 48 h en présence de milieu complet, puis 24 h en milieu SF. Sur les monocouches cellulaires avoisinant les 100 % de confluence, une rayure linéaire est produite à l'aide d'une pointe de pipette stérile de 100 µl. Les débris cellulaires sont éliminés par rinçage, puis 10 photos sont prises (temps t₀) à l'aide d'un microscope Motic AE21 équipé d'un appareil photo Moticam 2300 (Motic, Wetzlar, Germany) au grossissement 100 x. Les cellules sont ensuite traitées pendant 18 h avec les substances à tester, et 10 nouvelles photos sont prises (temps t₁₈) (Figure 40). L'aire moyenne de chaque rayure est mesurée aux temps t₀ et t₁₈ grâce au logiciel TScratch [243], et la vitesse de migration des cellules est déduite.

3.13. Analyses statistiques

Sauf mention contraire, les expériences sont répétées 4 fois en utilisant des échantillons statistiquement indépendants. Les résultats devant être normalisés par rapport à une condition contrôle sont traités tels que décrits précédemment [244]. Après une analyse de variance ANOVA-1 voie, les données sont comparées paire à paire par un test-t suivant la correction de Bonferroni à l'aide du logiciel Prism 5 (GraphPad, San Diego, USA) [245, 246].

4. Résultats et discussion

4.1. Analyse phytochimique des extraits de plantes

La présente section décrit les résultats des analyses phytochimiques effectuées. Ces denières se sont intéressées à la teneur en molécules actives ou marqueurs retrouvés dans les extraits.

4.1.1. Analyse de l'extrait d'A. sinensis

L'analyse de l'extrait AS a porté sur la quantification de 2 molécules majoritairement étudiées pour leurs propriétés biologiques : l'acide férulique (FA) et le Z-ligustilide (Z-lig).

Dosage de l'acide férulique

Une méthode HPLC-UV, dont un chromatogramme est présenté en Figure 41, adaptée de la Pharmacopée Chinoise, a permis de déterminer que la quantité d'acide férulique présente dans l'extrait s'élève à 0,743 ± 0,005 mg/g (n = 3). Rapportée au matériel végétal pulvérisé, la teneur en FA est estimée à 2,3 mg/g. Ceci indique que l'échantillon est conforme aux critères de qualité requis par les Pharmacopées Chinoise et Européenne (minimum 0,050 %, soit 0,5 mg/g), et ceci en dépit d'un mode d'extraction sensiblement différent et possiblement sub-optimal (en effet, si les 2 Pharmacopées préconisent une extraction par chauffage à reflux pendant 30 minutes avec du méthanol à 70 %, le présent dosage a été fait pour l'extrait méthanolique produit par macération cinétique) [78, 142].



Figure 41 : chromatogramme obtenu après injection d'une solution d'extrait AS à 20 mg/ml. A l'aide d'une solution de référence, le temps de rétention de l'acide férulique a préalablement été évalué à 18,21 min (λ = 316 nm).

Enfin, la littérature répertorie des teneurs en FA comprises entre 0,21 et 3,75 mg/g [128].

Dosage du Z-ligustilide

Une méthode HPLC-UV, dont un chromatogramme est présenté en Figure 42, adaptée de la littérature [247] a permis de doser le Z-ligustilide : celui-ci est présent à hauteur de 30,6 ± 0,7 mg/g d'extrait (n = 3), soit 9,9 mg/g de matériel végétal pulvérisé.



Figure 42 : chromatogrammes obtenus après injections de solutions de Z-ligustilide à 1 mM (haut) ou d'AS à 10 mg/ml (bas) (λ = 254 nm).

A titre de comparaison, la quantité de Z-lig dans *A. sinensis* varie entre 1,26 et 37,7 mg par gramme de racine sèche [128].

4.1.2. Analyse de l'extrait de E. senticosus

L'analyse de l'extrait d'*E. senticosus* s'est concentrée sur la détermination des éleuthrosides B et E (Figure 43), deux substances auxquelles une partie de la bioactivité de la plante est attribuée.



Figure 43 : chromatogramme obtenu après injection de l'extrait ES (2,5 mg/ml) (λ = 215 nm). L'éleuthéroside B et l'éleuthéroside E ont été identifiés après comparaison des temps de rétentions obtenus avec les substances pures (13,75 et 25,68 min, respectivement). La pureté des pics a été vérifiée par inspection des spectres fournis par le détecteur à barettes de diodes.

La teneur en éleuthéroside B a été estimée à 8,5 \pm 0,1 mg/g d'extrait (n = 3). La teneur en éleuthéroside E a quant à elle été évaluée à 9,2 \pm 0,2 mg/g d'extrait. La somme des teneurs en éleuthérosides B & E est donc de 17,7 \pm 0,2 mg/g d'extrait, ce qui, rapporté à la plante desséchée, correspond à une teneur de 0,79 mg/g de drogue. Cette somme reste très légèrement inférieure à celle requise par la Pharmacopée Européenne 8.0 (0,08 %) ; cette différence peut être attribuable à un mode d'extraction différent de celui décrit dans la monographie. En effet, celle-ci prévoit une extraction de la drogue par chauffage à reflux en présence d'une solution hydroéthanolique à 50 %, dont la polarité supérieure autorise une extraction optimale des éleuthérosides.

4.1.3. Analyse de l'extrait de P. ginseng

L'analyse de l'extrait PG s'est focalisée sur la détermination des 7 ginsénosides majoritaires, dont la teneur totale atteint plus de 90 % de la somme des saponosides totaux. Du fait de leur relativement mauvaise absorption dans l'UV, la méthode HPLC-UV décrite dans la Pharmacopée Européenne 8.0 a été complétée par une quantification à l'aide d'un détecteur MS.

Chacun des ginsénosides a été injecté séparément de manière à identifier son temps de rétention. Le courant ionique total a été enregistré, et le m/z relatif au ginsénoside d'intérêt en a été extrait (l'exemple du ginsénoside Rb1 est présenté à la Figure 44).



Figure 44 : chromatogramme obtenu pour l'injection du ginsénoside Rb1 et monitoré à 203 nm (A). Le courant ionique total obtenu pour cette analyse révèle un pic dont le temps de rétention est similaire (B) et dont le spectre laisse apparaître un m/z majoritaire de 1107,7 (C), ce qui correspond à l'ion moléculaire du ginsénoside Rb1 en mode négatif.

Ginsénoside	tr (min)	m/z	Teneur dans l'extrait (mg/g)	Teneur dans la poudre (mg/g)
Rg1	19,84	799,4	8,63 ± 0,06	3,21 ± 0,02
Rd	30,45	945,6	13,81±0,42	5,14 ± 0,16
Re	19,60	945,6	8,00 ± 0,30	2,98 ± 0,11
Rb1	27,03	1107,7	20,33 ± 0,44	7,56 ± 0,16
Rb2	28,72	1077,6	24,08 ± 0,47	8,96 ± 0,17
Rc	27,96	1077,6	12,79 ± 0,35	4,76 ± 0,13
Rf	26,00	799,5	0,41 ± 0,00	0,15 ± 0,01
		Somme	88,1 ± 0,3	32,8 ± 0,1

Pour les 7 ginsénosides, le Tableau 6 indique les temps de rétention, la valeur de m/z ainsi que le résultat du dosage pour chacun des ginsénosides.

Tableau 6 : résultats du dosage des ginsénosides dans l'extrait PG. Les teneurs ont été extrapolées à la poudre brute. Les valeurs fournies sont des moyennes ± ET de 3 dosages indépendants.

La somme des ginsénosides Rg1 et Rb1 représente 29,0 mg/g d'extrait, ou 10,8 mg/g de poudre de ginseng brute. Cette dernière est en accord avec la Pharmacopée Européenne 8.0 qui préconise une teneur de 0,40 % au minimum.

De même, cette analyse permet de confirmer l'identité de la racine : la présence de ginsénoside Rf est spécifique au *Panax ginseng*, alors qu'il demeure absent de *Panax quinquefolium* et de *Panax notoginseng* [164]. Le chémotype du *P. ginseng* présente un ratio Rb1/Rg1 < 5, ce qui est le cas de l'échantillon testé (2,4).

4.1.4. Analyse de l'extrait de S. chinensis

0.18 Schisandrine 0.15 0.14 0.12-0.10-2 0.08-Schisandrine B 0.06-0.04-0.02-0.00 5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00 40.00 45.00 50.00 55.00 60.00 65.00 70.00 75.00 Minutes

L'injection des substances de référence, la schisandrine et la schisandrine B, a permis d'évaluer leurs temps de rétentions à 21,5 et 47,0 min, respectivement (Figure 45).

Figure 45 : chromatogramme obtenu après injection des 2 substances de référence (λ = 254 nm).

L'inspection des spectres obtenus grâce au détecteur à barettes de diodes révèle que l'absorbance maximale des 2 composés est de 217 nm. A cette longueur d'onde, le chromatogramme obtenu pour une solution d'extrait de *Schisandra chinensis* permet d'identifier les pics correspondant à la schisandrine et à la schisandrine B (Figure 46).



Figure 46 : chromatogramme obtenu après injection de 10 μl de l'extrait Schisandra chinensis (50 mg/ml) (λ = 217 nm).

Préalablement à l'extraction du schisandra par du méthanol, une étape de délipidation (par percolation à l'éther de pétrole) a été entreprise afin d'éliminer la fraction huileuse des graines. Sans cette étape, l'extrait *Schisandra chinensis* se présente sous la forme d'un extrait fluide visqueux, dont la solubilisation totale en milieu aqueux – et donc dans les milieux de culture cellulaire – est impossible. L'extrait délipidé est, quant à lui, soluble en milieu aqueux et donc compatible avec les tests biologiques qui seront menés dans la suite de ce travail.

Afin de vérifier si l'étape de délipidation n'entraîne pas une proportion importante de schisandrine et de schisandrine B, la fraction huileuse a été injectée dans les mêmes conditions (Figure 47).



Figure 47 : chromatogramme obtenu après injection de la fraction huileuse (délipidation) des fruits de schisandra (λ = 217 nm). Les pics obtenus pour la schisandrine et la schisandrine B ont des valeurs d'absorbance maximale environ une dizaine de fois supérieures à celles obtenues pour l'injection de l'extrait Schisandra chinensis (délipidé).

Le chromatogramme obtenu révèle que la majeure partie de la schisandrine et de la schisandrine B a été entrainée dans le solvant de délipidation. Pour des solutions injectées à 50 mg/ml, les valeurs respectives en Schi et Schi B ont été estimées grossièrement à 44 et 8 µg/ml pour l'extrait *Schisandra chinensis*, et à 3430 et 1410 µg/ml pour l'huile provenant de la délipidation.

Nous avons par conséquent décidé que nous n'évaluerons pas l'activité néphroprotectrice du schisandra sur un extrait méthanolique ; les substances de références seront testées directement sur les modèles cellulaires.

4.1.5. Analyse de l'extrait de S. marianum

Par comparaison des chromatogrammes obtenus pour l'extrait à tester (Figure 48) avec la référence fournie par la Pharmacopée Européenne, les pics correspondant à la silicristine, à la silidianine, aux silibinines A et B, et aux isosilibinines A et B sont identifiés. Les temps de rétentions de chacune sont indiqués dans le Tableau 7.



Figure 48 : chromatogramme obtenu pour l'extrait de S. marianum.

	tr (min)
Silicristine	18,72
Silidianine	20,03
Silibinine A	32,56
Silibinine B	34,53
Isosilibinine A	41,14
Isosilibinine B	43,00

Tableau 7 : temps de rétentions pour les 6 flavolignanes majoritaires de la silymarine.

Conformité du système

Le chromatogramme obtenu pour l'extrait sec de *S. marianum* présente un profil semblable au chromatogramme de référence fourni par la Pharmacopée Européenne 8.0. De plus, selon les préconisations de la monographie, la résolution entre les pics dus à la silibinine A et à la silibinine B doit être au minimum égale à 1,8. Selon nos conditions expérimentales, la résolution obtenue s'élève à 2,8. Le système est donc conforme aux exigences de la Pharmacopée.

Calcul des teneurs des composés à doser

Les teneurs relatives en silicristine + silidianine, silibinine A + B et isosilibinine A + B sont calculées par évaluation des aires sous les pics obtenus après injection d'une solution standard de silymarine et d'une solution de l'extrait à tester. La teneur en silymarine, correspondant à la somme des teneurs de ces 6 molécules, est également calculée.

Les résultats sont consignés dans le Tableau 8 :

	Moyennes (%)	E.T (%)	Normes Ph. Eur. (%)
Calcul de la teneur en silymarine	50,4	0,5	30 à 65
Teneur en silicristine + silidianine	30,6	0,1	20 à 45
Teneur en silibinine A + B	58,5	0,2	40 à 65
Teneur en isosilibinine A + B	10,8	0,1	10 à 20

Tableau 8 : résultats du dosage pour l'extrait de S. marianum. Les pourcentages moyens ont été calculés après 3 injections faites en triplicats.

Les teneurs mesurées pour l'extrait de chardon marie fourni se situent dans les intervalles préconisés par la Pharmacopée Européenne.

4.2. Détermination des doses de travail

Cette étape, préliminaire à la recherche d'effets néphroprotecteurs, a été menée à l'aide de tests de viabilité cellulaire après avoir incubé les cellules HK-2 pendant 48 h avec la substance à évaluer. Cette durée est justifiée par le recours à des timings similaires dans la suite des essais de néphroprotection.

4.2.1. Détermination des doses de travail pour les 3 substances néphrotoxiques

Pour chacune des substances néphrotoxiques sélectionnées dans ce travail, des estimations de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration ont été faites à l'aide de 3 tests courants basés sur

le MTT, le violet de gentiane (VG) et la résazurine. Les points expérimentaux ont permis de mettre en équation des courbes de survie (Figure 49, Figure 50 et Figure 51), et d'extrapoler les doses de travail pour chacun des toxiques. Celles-ci sont choisies comme étant proches de leur IC₂₅ en raison d'une cytotoxicité bien présente à cette concentration, sans qu'elle n'occasionne une perte trop massive nombre de cellules risquant d'impacter la lecture des essais ultérieurs.



Figure 49 : courbes de survies pour les AA tracées à partir des points expérimentaux obtenus pour les tests au MTT, au VG et à la résazurine (n = 3).



Figure 50 : courbes de survies pour le CisPt tracées à partir des points expérimentaux obtenus pour les tests au MTT, au VG et à la résazurine (n = 3).



Figure 51 : courbes de survies pour la CsA tracées à partir des points expérimentaux obtenus pour les tests au MTT, au VG et à la résazurine (n = 3).

Le tableau ci-dessous récapitule les valeurs d'IC₂₅ calculées selon chaque test de survie et pour chaque toxique après traitement de 48 h :

	MTT	VG	Résazurine
AA	55 ± 20	58 ± 18	45 ± 2
CisPt	13±2	14±1	11±1
CsA	9+2	12 ± 1	23±6

Tableau 9 : IC25 (en µM) calculées pour les 3 substances néphrotoxiques selon les 3 tests de survie (n = 3).

En conséquence, dans les essais de mise en évidence d'une activité néphroprotectrice, les cellules HK-2 seront traitées avec une dose de 50 μ M d'AA, de 10 μ M de CisPt ou de 10 μ M de CsA.

L'application de différents tests visant à évaluer la survie cellulaire permet de limiter le risque de biaiser les résultats obtenus. A titre d'exemple, une substance toxique qui aurait un effet stimulant sur la respiration mitochondriale pourrait augmenter l'activité métabolique des cellules, alors que leur survie pourrait se trouver inférieure aux conditions contrôles. Il en résulterait une conclusion d'innocuité faussement positive.

Ce risque peut être réduit par la mise en œuvre d'un second test de viabilité cellulaire ne reposant pas sur les mêmes principes de fonctionnement [221]. Dans notre cas, le test au MTT – évaluant la survie cellulaire par le biais de l'activité métabolique – a été complété par un test au VG qui se base sur l'évaluation des quantités de biomolécules telles que les protéines et l'ADN.

Les valeurs d'IC₂₅ obtenues pour ces 2 tests sont relativement similaires (Tableau 9).

Un test à la résazurine, lui aussi basé sur la mesure de l'activité métabolique des cellules après traitement, a également été appliqué. Etant donné que ce test sera employé dans la suite des essais visant à rechercher une activité néphroprotectrice, les résultats obtenus permettent de juger de la concordance des mesures de survie avec les tests au MT et au VG.

Si les 3 tests de survie mis en œuvre donnent des courbes de survie similaires pour les AA et le CisPt, la valeur d'IC₂₅ obtenue pour le test à la résazurine avec la CsA double en comparaison aux tests précédents. Ceci peut être expliqué par la faible pente de la courbe, et donc par un déplacement ample le long des abscisses pour de faibles variations selon les ordonnées.

4.2.2. Détermination des doses de travail pour les extraits de plantes

La détermination des doses de travail pour les extraits végétaux s'est elle aussi basée sur l'élaboration de courbes doses-réponses grâce auxquelles la survie a été estimée au moyen des tests au MTT et au VG (Figure 52, Figure 53, Figure 54 et Figure 55).

Cependant, étant donné leur longue utilisation traditionnelle, les plantes incluses dans cette étude sont supposées non toxiques ; et donc, les doses de travail seront sélectionnées de manière à ne pas induire de mortalité (dose NOEL = no observed effect level), tel que déterminé expérimentalement, et ne pas occasionner plus de 5 % de mortalité, tel que déterminé par calcul.

Dans le but de comparer les efficacités des différents extraits, des doses identiques seront appliquées pour chacune des plantes.



Figure 52 : courbes de survies pour l'extrait AS tracées à partir des points expérimentaux obtenus pour les tests au MTT et au VG (n = 3).



Figure 53 : courbes de survies pour l'extrait ES tracées à partir des points expérimentaux obtenus pour les tests au MTT et au VG (n = 3).



Figure 54 : courbes de survies pour l'extrait PG tracées à partir des points expérimentaux obtenus pour les tests au MTT et au VG (n = 3).



Figure 55 : courbes de survies pour l'extrait SM tracées à partir des points expérimentaux obtenus pour les tests au MTT et au VG (n = 3).

Les courbes de survie obtenues selon la gamme de concentrations testées suggèrent une mortalité s'installant rapidement pour l'extrait de chardon marie (Figure 55). En effet, alors que les extraits méthanoliques des autres plantes (AS, ES et PG) ne montrent pas de cytotoxicité pour des doses atteignant 50-100 µg/ml, l'extrait commercial de SM semble déjà induire de la mortalité cellulaire pour la plus petite dose testée (survie cellulaire proche de 95 % à environ 10 µg/ml). Des observations en immunofluorescence ont également révélé des altérations morphologiques aux doses de 50 et 10 µg/ml. Ceci peut être expliqué par le fait que cet extrait, produit à l'aide d'acétate d'éthyle, a subi un processus de purification, et est donc constitué d'une teneur en principes actifs certainement bien plus importante que les extraits méthanoliques bruts. De par sa plus grande pureté, la concentration en molécules actives est renforcée, et l'effet toxique peut apparaître pour des doses d'extrait plus faibles.

Dès lors, la dose de travail pour l'extrait SM sera réduite à 2 μ g/ml. En effet, la caractérisation de l'extrait SM a révélé une teneur de 50,4 ± 0,5 % en silymarine (exprimé en équivalent silibinine). A la dose de 2 μ g/ml, la quantité de silymarine mise en présence de cellules HK-2 est ainsi égale à 1 μ g/ml – soit une concentration de 2,09 μ M – ce qui reste dans la gamme de doses employées dans les précédentes études *in vitro*, voire inférieur [200, 203, 206, 207].

Pour les 3 autres extraits testés, la dose de 50 µg/ml correspond à la dose NOEL (obtenue expérimentalement). Le tableau ci-dessous indique les pourcentages de mortalité cellulaire induits par chacun des extraits, et calculés à l'aide de l'équation des courbes de survie.

	MTT	VG
AS 50 µg/ml	0,2 %	0,1 %
ES 50 µg/ml	0,8 %	0,6 %
PG 50 µg/ml	0,7 %	1,2 %
SM 2 µg/ml	0,4 %	0,1%

Tableau 10 : mortalité induite à la dose de 50 µg/ml (AS, ES et PG) ou de 2 µg/ml (SM), calculée par l'intermédiaire de l'équation des courbes de survie obtenus par les tests au MTT et au VG.

Les 2 molécules actives de *S. chinensis*, la schisandrine et la schisandrine B, seront étudiées à des doses de 1 μ M. Ce choix se justifie par l'usage en MTC qui préconise une administration d'environ 3 qián (~ 10 g) de schisandra par prise [79], la teneur minimale en schisandrine telle que requise par la Pharmacopée Européenne 8.0 étant de 0,4 % par rapport à la drogue desséchée [142]. Ceci suggère une ingestion de 40 mg de schisandrine par prise. Or, dans une étude pharmacocinétique, l'administration per os de 5 mg/kg de schisandrine à des rats (équivalent chez l'humain à une ingestion globale de 50 mg du produit [190]) a conduit à une concentration plasmatique de 1,17 μ M [189]. Supposant que le filtrat glomérulaire est essentiellement similaire au plasma sanguin, la dose de 1 μ M a ainsi été choisie en raison de sa pertinence avec la pratique clinique.

4.3. Recherche d'effets néphroprotecteurs des extraits bruts

Afin de juger du potentiel protecteur de chacun des extraits vis-à-vis de chacun des xénobiotiques néphrotoxiques, les cellules HK-2 ont été utilisées comme modèle dans une série de tests s'articulant autour de plusieurs phénomènes impliqués dans les ARA et la fibrose rénale.

Ces tests comprennent :

- (i) L'évaluation de la survie cellulaire globale, par mesure de l'activité métabolique, ainsi que la détermination des taux d'apoptose – une voie de mort cellulaire associée aux toxicités des AA, du CisPt et de la CsA – par marquage à l'annexine V et détection en cytométrie de flux.
- (ii) La mesure du stress oxydatif, phénomène clé de la cytotoxicité de nombreux xénobiotiques, par une technique de cytométrie de flux après oxydation d'une sonde sensible aux ROS/RNS.
- (iii) La production de MEC, objectivée par dosage du collagène, une protéine sécrétée lors des processus de cicatrisation et conduisant au remplacement des RPTECS par un tissu non fonctionnel.
- (iv) L'examen du phénotype cellulaire à l'issue du traitement : les phénomènes de dédifférenciation des RPTECs constituant un des piliers du déclenchement de la fibrose rénale, la perte du phénotype épithélial sera mise en évidence par une relocalisation de la β-caténine du niveau membranaire vers le cytoplasme et le noyau, selon des méthodes d'immunofluorescence quantitative en microscopie et en cytométrie de flux. La dédifférenciation sera également investiguée par dosage d'ARN codant pour des protéines impliquées dans les phénotypes épithéliaux ou mésenchymateux/fibroblastiques selon une méthode de RT-qPCR.
- (v) Les phénomènes de régénération, dont l'accélération pourrait conduire à une récupération plus rapide de la fonction et de la structure rénale, limitant ainsi la sévérité de l'ARA et le risque de

développement de fibrose. Ceux-ci seront examinés au moyen d'un immunomarquage de la protéine Ki-67 permettant de déterminer le taux de prolifération cellulaire, ainsi que la détermination de la distribution des cycles cellulaires par cytométrie de flux. Enfin, la vitesse de migration cellulaire, mesurée grâce à un test de cicatrisation, permettra d'apprécier la capacité des RPTECs à recoloniser les tubules endommagés.

Afin de simplifier la compréhension et de permettre une comparaison rapide entre les extraits, les pages suivantes présenteront les résultats obtenus sous forme de tableaux. Des résultats plus détaillés sont présentés sous forme de graphiques en annexes.

4.3.1. Mesures de survie cellulaire

L'évaluation de la survie cellulaire, mesurée à l'aide du test à la résazurine, a permis d'obtenir les résultats consignés dans le Tableau 11.

<u>NB</u> : la survie cellulaire obtenue en présence des composés toxiques est donnée à titre indicatif. Cependant, afin de simplifier la lecture et l'interprétation des résultats, la survie mesurée pour chaque composé néphrotoxique a été normalisée à 100 %, et les effets de chacun des extraits exprimés par rapport à cette valeur. Ainsi, une survie > 100 % suggère un effet protecteur de l'extrait, alors qu'une survie < 100 % marque un renforcement de la mortalité.

		AA	CisPt	CsA
	Survie cellulaire	77±3%	76±3%	75±3%
	Rapporté à	100 %	100 %	100 %
THE REAL PROPERTY AND	AS 50 µg/ml	109 ± 5 %	110 ± 4 %	90 ± 2 %
en	AS 5 µg/ml	110 ± 6 %	104 ± 6 %	103 ± 6 %
es (tra	ES 50 µg/ml	89±5%	97±3%	64 ± 12 %
lair s ex	ES 5 µg/ml	112 ± 6 %	104 ± 3 %	80±9%
dei	PG 50 µg/ml	81±3%	85±5%	81±5%
is c	PG 5 µg/ml	103 ± 11 %	96±4%	96±5%
irvie	Schi 1 µM	104 ± 5 %	108 ± 1 %	99±3%
Su	Schi B 1 µM	107 ± 2 %	115 ± 3 %	101 ± 3 %
	SM 2 µg/ml	110 ± 6 %	102 ± 6 %	96±8%

Tableau 11 : détermination de la survie cellulaire de cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les extraits à tester en conjonction avec chacun des 3 toxiques. Les données sont présentées sous forme de pourcentages de survie (moyenne ± ET ; n =4) par rapport au toxique (100 %).

Pour cette première recherche d'activité néphroprotectrice, c'est l'extrait d'A.sinensis (AS) qui semble le plus à même de restreindre la mortalité. En effet, il permet d'améliorer la survie de cellules HK-2 traitées par des AA ou du CisPt ; il semble toutefois renforcer la mortalité induite par la CsA.

D'autres effets intéressants sont observés pour l'extrait de chardon marie (SM) vis-à-vis de la toxicité des AA, ou pour la schisandrine et la schisandrine B (Schi et Schi B) vis-à-vis du CisPt.

L'éleuthérocoque (ES) et le ginseng (PG) semblent tous les deux capables d'exacerber la toxicité induite par les composés toxiques, ce qui se traduit par une diminution de la survie cellulaire.

Ces résultats sont présentés sous forme de graphiques dans les annexes.

4.3.2. Protection vis-à-vis du stress oxydatif

L'intensité du stress oxydatif a été évaluée à l'aide du test H₂DCF-DA. Une augmentation de l'oxydation de cette sonde n'a pas pu être mise en évidence pour la CsA, au contraire des AA et du CisPt (Tableau 12). L'effet pour chaque composé néphrotoxique a été normalisé à 100 % comme en *4.3.1. Mesures de survie cellulaire.*

		AA	CisPt
	Statut oxydatif	142 ± 15 %	148 ± 22 %
	Rapporté à	100 %	100 %
	AS 50 µg/ml	100 ± 5 %	100 ± 2 %
ince	AS 5 µg/ml	100 ± 8 %	97±4%
i sta ése its	ES 50 µg/ml	70±9%	64,9±7%
n pr tra	ES 5 µg/ml	90±11%	83,6 ± 7 %
f er s ex	PG 50 µg/ml	85±17%	93±9%
uat lati de:	PG 5 µg/ml	83±8%	100 ± 10 %
xyo	Schi – Schi B 1 µM	NT	NT
 0	SM 2 µg/ml	95±6%	102 ± 10 %

Tableau 12 : évaluation du stress oxydatif de cellules HK-2 traitées pendant 24 h avec les extraits à tester. Les données sont présentées sous forme de pourcentages de réduction (moyenne ± ET ; n =4) par rapport au toxique (NT = non testé).

Ces essais ont permis de mettre en évidence un effet bénéfique pour l'éleuthérocoque (ES). Les extraits AS et SM n'ont pas permis de réduire l'intensité du stress oxydatif. Finalement, le ginseng (PG) semble être doté d'un effet antioxydant modeste.

Des graphiques présentant les résultats obtenus lors de l'évaluation du statut oxydatif sont fournis en annexe au présent travail.

Afin d'étayer ces résultats, des mesures de la capacité des extraits à neutraliser les radicaux libres ont été réalisées à l'aide du test DPPH (Figure 56).





	TEAC
AS	465,9
ES	6,3
PG	> 666
SM	15,2

Les capacités antioxydantes ont été exprimées en équivalent Trolox® :

Tableau 13 : valeur des capacités antioxydantes exprimées en équivalent Trolox® (TEAC) mesurées pour les extraits (moyennes ± ET ; n =3) permettant d'évaluer leur efficacité à neutraliser les radicaux libres.

L'extrait ES a montré le meilleur potentiel antioxydant ; ce qui corrobore la diminution du stress oxydatif observée lors du test au H₂DCF-DA. Les extraits AS et PG n'ont pratiquement pas de potentiel antioxydant (comme indiqué sur la Figure 56, l'extrait PG à 20 mg/ml ne parvient pas à neutraliser au moins 50 % du DPPH ; son IC₅₀ n'est dès lors pas calculable, mais peut être estimée supérieure à cette concentration).

L'extrait SM montre une activité antioxydante relativement médiocre ; ce dernier n'a par ailleurs pas permis de réduire l'intensité du stress oxydatif induit par les traitements aux AA ou au CisPt.

4.3.3. Quantification du collagène

L'évaluation des effets sur la production de MEC, et plus particulièrement du collagène mesuré à l'aide d'un marquage par le PSR, est résumée dans le Tableau 14. L'effet pour chaque composé néphrotoxique a été normalisé à 100 % comme en *4.3.1. Mesures de survie cellulaire*. Le détail des résultats obtenus pour chaque combinaison extrait-toxique est fourni dans les annexes sous forme de graphiques.

		AA	CisPt	CsA
	Quantité de collagène	134 ± 8 %	132 ± 4 %	119±3%
	Rapporté à	100 %	100 %	100 %
	AS 50 µg/ml	80 ± 11 %	91 ± 3 %	110 ± 8 %
enc	AS 5 µg/ml	80±9%	93±3%	96 ± 8 %
uan rési s	ES 50 µg/ml	91±3%	91±3%	109 ± 4 %
a q n p rait	ES 5 µg/ml	96±4%	93±5%	106 ± 10 %
i e l ie e exti	PG 50 µg/ml	102 ± 11 %	101 ± 10 %	106 ± 5 %
ion gèn es	PG 5 µg/ml	81±8%	101 ± 6 %	92 ± 3 %
uat olla d	Schi 1 µM	91 ± 22 %	92 ± 15 %	95 ± 18 %
e co	Schi B 1 µM	93 ± 20 %	90 ± 10 %	97 ± 16 %
	SM 2 µg/ml	84±9%	93±4%	95 ± 2 %

Tableau 14 : évaluation de la production de MEC par détermination de la quantité de collagène. Les résultats sont présentés comme des pourcentages de réduction (moyenne ± ET ; n =4) de la quantité de PSR fixée et normalisée par rapport à celle mesurée en présence du toxique inducteur de la synthèse de collagène (100 %).

Ces résultats illustrent que la réduction de déposition de collagène la plus importante a été obtenue avec l'extrait AS (en co-traitement avec les AA ou le CisPt).

Si la CsA produit des augmentations de collagène (environ 120 % par rapport aux contrôles), les taux ne sont toutefois pas modifiés par adjonction d'une des substances à tester.

Des effets similaires, quoique de moindre intensité, ont été observés avec l'éleuthérocoque (ES), avec le chardon marie (SM) et avec les schisandrine et schisandrine B (Schi et Schi B).

4.3.4. Mesures de β-caténine aux niveaux membranaire ou nucléaire

L'évaluation des quantités de β-caténine membranaire par une méthode de QFIA a permis de révéler des activités bénéfiques pour l'extrait SM vis-à-vis des 3 toxiques (Tableau 15). Ces résultats sont également présentés sous forme de graphiques dans les annexes.

		AA	CisPt	CsA
	β-caténine membranaire	31±6%	32 ± 2 %	55 ± 7 %
	Rapporté à	100 %	100 %	100 %
9 9	AS 50 µg/ml	93±16%	153 ± 14 %	112 ± 10 %
air	AS 5 µg/ml	115 ± 10 %	146 ± 18 %	110 ± 17 %
iran extr	ES 50 µg/ml	81 ± 18 %	123 ± 5 %	92 ± 10 %
tion mb	ES 5 µg/ml	92 ± 16 %	135 ± 21 %	107 ± 19 %
fica me ce d	PG 50 µg/ml	109 ± 18 %	141 ± 16 %	103 ± 13 %
ntil ine enc	PG 5 µg/ml	113 ± 28 %	130 ± 13 %	97±6%
lua téni rés	Schi 1 µM	101 ± 9 %	149 ± 21 %	88 ± 19 %
-cat	Schi B 1 µM	114 ± 16 %	164 ± 30 %	94 ± 24 %
e e	SM 2 µg/ml	122 ± 24 %	168 ± 43 %	125±6%

Tableau 15 : évaluation des quantités de β-caténine membranaire par QFIA. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 3 expériences indépendantes (pour Schi et Schi B, n = 4) calculées par rapport au toxique (100 %).

De manière globale, aucun extrait n'a permi une réelle restriction de la perte de β -caténine membranaire lorsque les cellules étaient traitées par des AA ou par la CsA, sinon avec une intensité modeste. Cependant, ils se sont tous révélés actifs en présence de CisPt ; l'activité la plus importante a été observée pour les principes actifs du schisandra et pour l'extrait SM. L'extrait AS a également permis de maintenir une quantité appréciable de β -caténine au niveau membranaire après traitement par le CisPt.

Parallèlement, la détermination par cytométrie de flux de la forme nucléaire/cytoplasmique de β caténine a permis de compléter les observations précédentes (Tableau 16). Le design expérimental choisi pour cette étude ne permet pas d'observer d'augmentation de la forme nucléaire/cytoplasmique de β -caténine lors du traitement des cellules par de la ciclosporine.

			Ci-Dt
		AA	CISPt
	β-caténine relocalisante	216 ± 69 %	189 ± 28 %
	Rapporté à	100 %	100 %
s	AS 50 µg/ml	61±14%	65 ± 8 %
de n rait	AS 5 µg/ml	54 ± 13 %	61±9%
on o ne te e exti	ES 50 – 5 μg/ml	NT	NT
ati éni iant iant les	PG 50 µg/ml	97 ± 28 %	NT
tific cate alis e d	PG 5 µg/ml	95 ± 35 %	NT
lan β- β- β- β- β- β- β- β- β- β- β- β- β-	Schi 1 µM	89 ± 48 %	71 ± 21 %
Qu re	Schi B 1 µM	73 ± 14 %	56 ± 15 %
	SM 2 µg/ml	54±8%	60 ± 10 %

Tableau 16 : évaluation des quantités de β-caténine nucléaire/cytoplasmique par cytométrie de flux. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 (pour Schi et Schi B, n = 5) expériences indépendantes calculées par rapport aux toxiques (100 %) (NT = non testé).

Parmi les substances testées, les extraits AS et SM induisent des réductions de relocalisation de β caténine consécutives à l'exposition des cellules aux AA ou au CisPt. La schisandrine et la schisandrine B ont également permi de limiter de façon appréciable les quantités β -caténine sous sa forme nucléaire/cytoplasmique.

L'extrait de ginseng (PG) n'a pas été capable de s'opposer à la relocalisation de β -caténine lorsque les cellules étaient traitées par des AA.

4.3.5. Recherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire

Les résultats des essais de modulation des capacités de régénération des RPTECs, évalués à l'aide de l'index Ki-67 et du *scratch assay*, sont présentés dans le tableau ci-dessous :

FBS 10 %	Index Ki-67 307 ± 8 %	Scratch assay 193 ± 15 %
AS 5 µg/ml	135 ± 21 %	122 ± 9 %
ES 50 µg/ml	184 ± 27 %	114 ± 26 %
ES 5 µg/ml	112 ± 8 %	127 ± 10 %
PG 50 µg/ml	204 ± 11 %	146 ± 13 %
PG 5 µg/ml	129±9%	137 ± 19 %
Schi 1 µM	189 ± 12 %	103 ± 6 %
Schi B 1 µM	110 ± 13 %	102 ± 3 %
SM 2 µg/ml	129 ± 16 %	130 ± 16 %

Tableau 17 : récapitulatif des résultats obtenus pour les tests de régénération. Les résultats sont présentés comme des pourcentages d'augmentation moyenne ± ET (n = 4) par rapport au contrôle. Les analyses de cycles cellulaires permettant de réfuter un éventuel blocage en G₂/M à l'instar des AA ou du CisPt ne sont pas présentées dans ce tableau.

Ces résultats présentent de manière synthétique ceux obtenus sous forme de graphiques et fournis dans les annexes.

Il peut ainsi être constaté que l'extrait AS induit l'augmentation la plus importante d'index Ki-67. D'autre part, il permet une accélération de la migration cellulaire, même si celle-ci n'est pas aussi élevée que pour les extraits PG et SM.

En outre, le ginseng a accéléré la migration avec la plus grande intensité ; et en accord avec ses effets sur la prolifération, il pourrait également constituer un candidat prometteur pour promouvoir les capacités régénération tubulaire.

D'autres effets susceptibles d'améliorer les capacités de régénération en stimulant à la fois la prolifération et la motilité ont été observés avec une moindre ampleur pour les extraits ES et SM.

4.3.6. Sélection de l'extrait le plus intéressant

Le meilleur compromis – en termes de diversité et d'intensité des activités néphroprotectrices – a été mis en évidence pour l'extrait d'*A. sinensis*, et ce notamment vis-à-vis du CisPt [248]. En effet, cette plante issue de la MTC constitue le meilleur candidat de par son effet global sur l'ensemble des tests, même si celui-ci reste parfois modeste (e.g. pour la modulation du statut oxydatif) en égard aux autres plantes étudiées.

Effectivement, en s'opposant à l'entrée en apoptose induite par un traitement au CisPt, l'extrait s'est montré capable de diminuer la mortalité cellulaire globale. Il a également permis de limiter la synthèse de collagène par des cellules traitées par du CisPt, un phénomène impliqué dans les mécanismes de cicatrisation de type fibrotique. La relocalisation de β-caténine a pu être freinée, ce qui pourrait permettre d'assurer une meilleure adhésion cellulaire ainsi qu'une moindre activation de gènes impliqués dans la dédifférenciation des RPTECs. Finalement, la régénération tubulaire est susceptible d'être améliorée par stimulation des processus de prolifération et de migration.

Cependant, d'autres extraits pourraient présenter des effets potentiellement néphroprotecteurs. C'est par exemple le cas de l'éleuthérocoque, qui a présenté l'activité neutralisante vis-à-vis de radicaux libres la plus efficace (tel que déterminé par le test au DPPH). Appliqué aux cellules HK-2, cet extrait a été le plus performant pour limiter l'élévation du stress oxydatif. S'il a montré d'autres effets aux intensités modérées, il a par ailleurs renforcé la mortalité cellulaire induite par les AA ou la CsA, ce qui constitue une influence suffisamment néfaste dans le cadre du pronostic des NTA pour justifier son abandon.

De la même manière, alors que le ginseng s'est montré très prometteur dans les essais de régénération en stimulant les phénomènes de prolifération et de migration cellulaire, sa capacité à renforcer la mortalité induite par chacun des 3 toxiques conduit *de facto* à son évincement de la suite des investigations [249].

Finalement, l'extrait de chardon marie aurait pu constituer un candidat intéressant pour la suite des essais de néphroprotection étant donné les activités observées sur une majorité des tests mis en œuvre. En accord avec des effets reconnus sur les hépatocytes et sur le développement de la fibrose hépatique, l'utilisation de la silymarine pourrait être étendue aux pathologies rénales sous réserve de confirmation des effets *in vivo* et chez des patients [199, 200, 207]. Toutefois, dans leur globalité, les ampleurs de ces effets restent voisines ou légèrement inférieures à celles obtenues avec l'angélique chinoise.

Ainsi, l'extrait AS apparait comme le candidat le plus prometteur des 5 plantes sélectionnées, plus particulièrement pour prévenir les NTA induites par le CisPt, et pourrait à plus long terme s'avérer utile afin de limiter l'installation et la progression de la fibrose rénale.

4.4. Recherche d'effets néphroprotecteurs de l'extrait d'*Angelica* sinensis vis-à-vis du cisplatine

La section suivante détaille les résultats obtenus lors des essais de néphroprotection obtenus pour la combinaison de l'extrait AS avec le CisPt.

4.4.1. Mesures de survie cellulaire

4.4.1.1. Estimation de la survie cellulaire globale

Le test à la résazurine a été mis en œuvre afin de déterminer le nombre de cellules viables après traitement par les composés à tester. Celui-ci se base sur une mesure de l'activité métabolique, dont l'intensité est en principe proportionnelle au nombre de cellules vivantes [250]. Ceci est démontré à la section 4.4.3. Mesure de la production de collagène pour des cellules traitées par chacun des 3 toxiques et pour des conditions contrôles.

Après traitement des cellules HK-2 pendant 48 h par l'extrait AS, aux doses de 50 et 5 μ g/ml, la viabilité cellulaire a été augmentée à 110 ± 2 et 109 ± 2 % par rapport au contrôle, respectivement (Figure 57).



Figure 57 : viabilité cellulaire mesurée à l'aide du test à la résazurine après incubation des cellules HK-2 pendant 48 h avec du CisPt (10 μM) et/ou l'extrait AS (50 ou 5 μg/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001).

Le traitement par le CisPt (10 μ M) seul a, quant à lui, abaissé la survie cellulaire à 76 ± 2 % par rapport au contrôle. Le co-traitement par CisPt et AS 50 μ g/ml a permis de limiter la mortalité cellulaire (84 ± 3 %), alors que la plus faible dose d'AS n'a pas induit de différence statistiquement significative (79 ± 4 %).

Cette première expérience permet donc de conclure en un effet protecteur de l'extrait AS à la dose de 50 µg/ml qui se traduit par une amélioration de la survie globale. Afin de confirmer cet effet, la détermination du nombre de cellules entrées dans un processus apoptotique a été entreprise après traitement dans les mêmes conditions.

4.4.1.2. Evaluation des taux d'apoptose

Une analyse en cytométrie de flux après un double marquage au PI et à l'annexine V-FITC a permis de quantifier la proportion de cellules viables, en phase précoce ou tardive d'apoptose ou en nécrose.

Dans notre modèle expérimental, le CisPt à 10 μ M n'a pas induit plus de nécrose que pour la condition contrôle. En effet, la nécrose n'est généralement observée que pour des concentrations en CisPt de l'ordre de 800 μ M [89].

Cependant, le CisPt à 10 µM induit une augmentation de l'apoptose (phase précoce + phase tardive) de 3,1 fois plus importante que celle observée pour les conditions contrôles (Figure 58).

Le co-traitement avec l'extrait AS à 50 et 5 µg/ml a permis de limiter cette induction d'apoptose en se traduisant par des augmentations à respectivement 1,5 et 1,6 fois celles des conditions contrôles.



Figure 58 : proportions de cellules HK-2 viables, en apoptose (phases précoce + tardive) ou en nécrose après traitement pendant 48 h avec du CisPt (10 μM) et l'extrait AS (50 ou 5 μg/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (*** : p<0,05 vs. Ctrl / ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. CisPt).

Ces résultats indiquent que l'extrait AS permet vraissemblablement de réduire la mortalité globale induite par le CisPt en réduisant l'entrée des cellules en apoptose. Cependant, la détermination des taux d'apoptose doit être interprétée comme une évaluation à un instant précis d'un processus durant dans le temps, au contraire du test à la résazurine qui mesure une survie cellulaire ponctuellement. Ces tests ayant tous 2 été menés après des incubations de 48 h, il reste possible – bien que peu probable – qu'une réduction de la mortalité cellulaire ne soit pas le reflet d'une diminution de leur entrée en apoptose, et que d'autres phénomènes concourent à influencer le test à la résazurine avant que la lecture d'apoptose ne soit faite.

En effet, des réductions du nombre de cellules en apoptose ont été observées pour les 2 doses d'AS testées, celles-ci n'apparaissant pas dose-dépendantes (Figure 58). Ces résultats, à eux seuls, ne

peuvent donc pas entièrement expliquer les effets obtenus lors de la mesure de survie par le test à la résazurine. L'intervention d'autres mécanismes agissant sur la viabilité cellulaire peut être supposée (par exemple une induction de la prolifération cellulaire, un moindre détachement cellulaire,...). Malgré tout, l'élévation de la viabilité cellulaire (Figure 57) induite par des traitements par 50 et 5 µg/ml de l'extrait AS complète des résultats préalablement rapportés : des polysaccharides d'A. *sinensis* (très certainement absents de l'extrait méthanolique qui a été testé ici) ont permis d'accélérer la prolifération d'une lignée cellulaire de l'épithélium gastrique [251].

4.4.2. Evaluation du statut oxydatif

Afin de déterminer si les effets protecteurs de l'extrait AS, traduits par une diminution d'apoptose et une amélioration de la survie de cellules traitées au CisPt, sont une conséquence d'une diminution de la génération de ROS et RNS, le statut oxydatif des cellules a été évalué.

Après traitement de cellules HK-2 pendant 24 ou 48 h avec du CisPt (10 μ M), l'oxydation de la sonde H₂DCF-DA en dérivé fluorescent a été respectivement augmentée de 130,8 ± 7,5 et 179,0 ± 11,6 % par rapport aux conditions contrôles (Figure 59).

Le co-traitement par l'extrait AS à 50 et 5 µg/ml n'a pas permis de limiter l'activité oxydative induite par le CisPt à aucun des temps d'incubation testés.



Figure 59 : intensité de fluorescence mesurée par cytométrie de flux de cellules HK-2 traitées par du H₂DCF-DA (10 μM) pendant 30 min après traitement pendant 24 ou 48 h avec du CisPt (10 μM) et l'extrait AS (50 ou 5 μg/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Le stress oxydatif est un facteur important dans la toxicité du CisPt : la production de ROS et RNS agit directement sur les biomolécules des RPTECs telles que l'ADN, les protéines, les phospholipides membranaires,... et modifie leurs structures et leurs fonctions [96]. Sans surprise, il est supposé qu'une atténuation du stress oxydatif généré chez les RPTECs lors d'un traitement au CisPt pourrait réduire le risque de développement d'une ARA [96]. Contrairement à cette étude, des travaux antérieurs ont mis en évidence un effet antioxydant modéré pour un extrait éthanolique d'*A. sinensis*, ainsi que pour ses polysaccharides, une famille de molécules qui peut être extraite par un solvant aqueux et qui a déjà montré une activité anti-hépatotoxique. Cette activité protectrice a été attribuée à une réduction de la génération de ROS faisant suite à l'induction d'enzymes antoxidantes [252, 253]. La totalité du mécanisme d'action permettant d'expliquer cette activation reste à ce jour inconnu.

Une autre étude a également mis en évidence sur des cellules Hep-G2 une activation de l'enzyme antioxydante NAD(P)H quinone oxydoréductase par des extraits d'A. *sinensis* produits à l'aide de solvants apolaires (chloroforme et éther de pétrole) ou à l'aide de CO₂ supercritique; les molécules à caractères lipophiles extraites, sont notamment constituées par les phtalides [254, 255].

4.4.3. Mesure de la production de collagène

Le marquage au PSR a été utilisé avec succès sur des cellules HK-2 pour détecter et doser les fibres de collagène après induction de l'EMT [228]. Le colorant, remis en solution et quantifié par spectrophotométrie, permet de fournir une estimation quant à la production de matrice extracellulaire. Etant donné la mortalité cellulaire induite par les AA, le CisPt ou la CsA lors du traitement, il est apparu nécessaire de rapporter la valeur lue à une quantité de protéines.

Le dosage des protéines impliquant la destruction de l'échantillon (empêchant dès lors le dosage ultérieur du collagène), c'est par une mesure de viabilité cellulaire (*i.e.* mesure d'activité métabolique par le test à la résazurine) que les valeurs obtenues par le test au PSR seront normalisées.

Des essais préliminaires ont investigué la corrélation entre le nombre de cellules ensemencées dans une plaque multipuits, et les valeurs obtenues pour les estimations de viabilité cellulaire et de quantification de protéines (Figure 60).



Figure 60 : vérification de la corrélation entre le nombre de cellules, la mesure de l'activité métabolique (test à la résazurine) et la quantité de protéines (test au BCA). Les cellules HK-2 ont été ensemencées dans une plaque 96 puits (0 – 12.000 cellules par puits) et incubées pendant 24 h avant que leur activité métabolique ne soit estimée par le test à la résazurine. Les puits ont ensuite été rincés avec du PBS et la quantité de protéines a été déterminée par la méthode au BCA. La corrélation a été vérifiée pour des cellules non traitées ou pré-exposées aux 3 toxiques pendant 48 h précédent leur mise en plaque. Les points expérimentaux correspondent à la moyenne ± ET de 3 expériences indépendantes.

Ceux-ci ont permis de confirmer la possibilité de substituer le dosage des protéines (méthode au BCA) par une évaluation de l'activité métabolique (test à la résazurine). Ce dernier ne provoquant pas la dénaturation de l'échantillon, il est ainsi possible de procéder ultérieurement au dosage du collagène par la méthode au PSR.

Afin de déterminer si les conditions expérimentales nécessitent le traitement des cellules HK-2 en présence ou en absence de FBS, un protocole d'orientation a été mis en œuvre. Celui-ci a évalué les quantités de collagène produites par des cellules traitées par des AA, du CisPt ou de la CsA, ainsi que par du TGF-β1, une cytokine dont les effets profibrosants laissent supposer une dédifférenciation des RPTECs en fibroblastes producteurs de collagène (Figure 61).


Figure 61 : quantités de collagène normalisées pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec du TGF-β1 (10 ng/ml), des AA (50 μM) du CisPt (10 μM) ou de la CsA (10 μM), en présence de doses croissantes de FBS. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001).</p>

Le graphique permet de montrer une induction de la synthèse de collagène par des cellules traitées par du TGF- β 1 (10 ng/ml) ; celle-ci apparaît d'autant plus importante que la dose de FBS présente dans le milieu de culture est faible. Le FBS (probablement en vertu des facteurs de croissance qu'il contient, notamment l'EGF) joue ici un rôle protecteur en limitant la production de matrice extracellulaire.

Ce protocole de validation met également en évidence une augmentation de la synthèse de collagène lorsque les cellules sont traitées par des AA, du CisPt ou de la CsA ; augmentations qui sont également limitées par la présence de FBS. Par la suite, les évaluations de production de collagène seront menées en l'absence de sérum.

L'application de ce test à l'étude de l'effet protecteur des extraits a révélé, dans un premier temps, que les 2 doses d'AS testées n'induisant pas une synthèse de collagène supérieure aux conditions contrôles (Figure 62). Par contre, le traitement par du CisPt (10 μ M) a induit une production de collagène 131 ± 6 % supérieure aux contrôles. Le co-traitement par AS à 50 et 5 μ g/ml a permis de limiter cette synthèse à une augmentation de 120 ± 4 % et de 122 ± 4 % par rapport au contrôle, respectivement.



Figure 62 : quantité de collagène normalisée de cellules HK-2 traitées 48 h avec du CisPt (10 μM) et/ou l'extrait AS (50 ou 5 μg/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001).

La production de MEC, dont fait partie le collagène, est un phénomène important intervenant dans un processus de cicatrisation. Si celui-ci est excédentaire par rapport au remodelage physiologique de la MEC, la fibrose s'installe. Qui plus est, le collagène agit également comme un composé profibrosant de par sa capacité à interagir et activer les cellules qui en sont productrices [235, 256]. Ainsi, limiter la production de MEC – tout en stimulant les propriétés de régénération tubulaire – permettrait d'éviter le remplacement de tissu fonctionnel par un tissu cicatriciel inerte. L'extrait d'A. *sinensis* pourrait ainsi être employé dans le but de limiter la synthèse de MEC et pourrait probablement atténuer la cicatrisation fibrotique consécutive aux ARA induites par le CisPt.

Cette supposition fait écho à la Médecine Traditionnelle Chinoise qui attribue à *Dang Gui* des effets bénéfiques pour le rein. Des études cliniques plus récentes ont suggéré une amélioration du syndrôme néphrotique [79], et notamment un ralentissement de la progression de la fibrose lorsque la plante était administrée en association avec l'astragale sur un modèle de néphrotoxicité à la puromycine chez le rat [127].

4.4.4. Relocalisation de la β-caténine

La relocalisation de la β -caténine a été évaluée suivant 2 volets : d'une part, la forme membranaire a été dosée par QFIA après immunomarquage, une approche qui autorise l'identification de la forme membranaire de la protéine ; d'autre part, la forme cytoplasmique/nucléaire a été quantifiée selon une méthode en cytométrie de flux. Les 2 méthodes reposent sur l'emploi d'anticorps sélectifs pour chacune des conformations de β -caténine.

4.4.4.1. Analyse de la forme membranaire de β-caténine

4.4.4.1.1. Validation de la méthode

La QFIA a nécessité une étape préliminaire de validation de l'approche consistant à vérifier que le signal enregistré et traité fournit une valeur dépendante (*i*) de l'intensité de fluorescence réelle de l'objet analysé, et (*ii*) de la surface totale occupée par des objets fluorescents sur chaque champ. Pour ce faire, des microbilles du kit InspeckTM Orange ($\lambda_{Ex} = 540$ nm / $\lambda_{Em} = 560$ nm ; Molecular Probes, Eugene, USA) ont été acquises. Le kit consiste en une série de microbilles en polystyrène d'un diamètre de 6 µm ; pour chacun des composants du kit, la surface des microbilles a été greffée avec des fluorophrores (Figure 63). Les intensités de fluorescences, mesurées par le fabricant par une méthode de cytométrie de flux, sont exprimées en pourcentages et varient de 0 % pour des microbilles non marquées à 100 % pour les microbilles présentant l'intensité de fluorescence la plus forte.





Chacun des 7 types de microbilles a été déposé sur une lame de microscopie compartimentée. La suspension a été séchée, fixée dans un milieu de montage (Prolong® Gold Antifade Mountant, Invitrogen, Eugene, USA), et chaque type de microbille a été examiné au binoculaire. Des images ont été acquises et les intensités de fluorescences ont été transformées en valeurs de luminances avec le logiciel Fiji.

Dans un premier temps, il a pu être vérifié que la valeur du signal mesurée selon l'approche mise au point avec le logiciel Fiji était bien corrélée à l'intensité de fluorescence annoncée par le fabricant

(Figure 64). Ceci confirme la capacité de l'outil à réagir proportionnellement à des intensités de fluorescence variables.



Figure 64 : mesure de l'intensité de fluorescence des microbilles : les 7 types de microbilles ont été analysés à l'aide de la macro Fiji décrite dans la section *Matériel et méthodes* (seuls 6 points expérimentaux figurent sur le graphique ; l'intensité de fluorescence 0 % ne pouvant se trouver sur une échelle logarithmique). Pour chaque champ, la valeur mesurée a été normalisée par le nombre de billes présentes. Les points expérimentaux correspondent à la moyenne ± ET de 5 expériences indépendantes ; une régression linéaire a été appliquée après transformation (logarithme) des intensités de fluorescences relatives.

Dans un second temps, il a été vérifié que les valeurs de fluorescences mesurées étaient corrélées à la surface totale occupée par les billes, et ceci indépendamment de leur intensité de fluorescence. Les images prises précédemment ont été analysées de la même manière, et la surface émettrice de fluorescence a été considérée comme étant directement proportionnelle au nombre de billes présentes sur le champ. Ceci a permis de confirmer que plus un objet fluorescent est grand, plus la quantité de lumière qu'il émet augmente, et plus le signal mesuré s'accroît (Figure 65).



Figure 65 : corrélation entre la surface émettant une fluorescence et l'intensité totale mesurée (n = 5). Une régression linéaire a été appliquée pour chacun des 6 composants fluorescents du kit (le composant A n'étant pas repris ici car non marqué par le fluorophore).

4.4.4.1.2. Application aux cellules HK-2

Les quantités relatives de β -caténine membranaire ont été évaluées pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec des AA, du CisPt ou de la CsA. Chacun des 3 agents néphrotoxiques a respectivement occasionné une perte de fluorescence attribuable à la β -caténine équivalente à 58,8 ± 3,2 %, 42,6 ± 6,2 % et 59,5 ± 3,7 % en comparaison aux conditions contrôles (Figure 66). Ceci indique que les 3 substances néphrotoxiques sélectionnées pour cette étude sont capables d'induire une perte de β -caténine membranaire quantifiable sur un modèle *in vitro*.



Figure 66 : quantification de la β-caténine membranaire pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h par des AA (50 μM), du CisPt (10 μM) ou de la CsA (10 μM). 10 images ont été acquises été traitées par Fiji. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 3) (*** : p<0,001).

La recherche d'effets protecteurs de l'extrait AS vis-à-vis de la perte de β -caténine membranaire induite par traitement au CisPt a indiqué qu'après 48 h d'incubation, l'agent néphrotoxique occasionnait une disparition de β -caténine membranaire objectivée par une réduction de fluorescence à 32 % du contrôle (Figure 67).

Lorsque les cellules HK-2 sont traitées concomitamment par l'extrait AS, cette réduction est limitée à environ 50 % celle du contrôle pour les 2 doses testées.

Ces résultats démontrent qu'A. sinensis est en partie capable de limiter la perte du phénotype épithélial des RPTECs. Ceci suppose des activités bénéfiques, d'une part sur l'adhérence qui s'oppose à la perte de cellules tubulaires et qui est susceptible de maintenir une fonction tubulaire stable ; et d'autre part sur une probable moindre relocalisation de β-caténine vers le noyau qui permettrait d'entraver l'expression de gènes contribuant à la progression de la fibrose.





Figure 67 : photographies en immunofluoresce de HK-2 traitées pendant 48 h avec du CisPt (10 μM) et/ou l'extrait AS (50 ou 5 μg/ml) (grossissement 400 X) (A). Intensités de fluorescence mesurées (B) ; les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 3) (* : p<0,05 ; *** : p<0,001).

4.4.4.2. Analyse de la forme cytoplasmique/nucléaire de β-caténine

La quantification de la forme nucléaire de β -caténine a permis d'apprécier les effets de l'extrait AS sur la relocalisation de la protéine induite par le CisPt. En effet, si cet agent néphrotoxique cause une augmentation de la fluorescence (attribuée à la forme nucléaire de β -caténine) de 2 fois par rapport aux conditions contrôles, le co-traitement par l'extrait AS aux doses de 50 et 5 µg/ml a permis de limiter cette augmentation à 1,3 et 1,2 fois celle du contrôle, respectivement (Figure 68).



Figure 68 : quantification de la β -caténine nucléaire par cytométrie de flux après traitement des cellules HK-2 pendant 48 h avec du CisPt (10 μ M) et l'extrait AS (50 et 5 μ g/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (** : p<0,01 ; *** : p<0,001).

Ceci permet de conclure que l'extrait AS est capable de prévenir la relocalisation nucléaire de β caténine consécutive au traitement par le CisPt. L'effet observé n'est à nouveau pas dose-dépendant. En limitant l'expression de gènes impliqués dans la dédifférenciation des RPTECs en fibroblastes, il pourrait contribuer à limiter l'induction et le développement de la fibrose rénale ultérieure. En effet, des travaux récents (menés sur un modèle de cellules incubées avec du TGF- β ou sur des animaux traités par de la doxorubicine ou subissant une obstruction urétérale unilatérale) ont montré qu'en inhibant la voie de la β -caténine, la fonction urinaire pouvait être préservée, et que les atteintes histopathologiques (notamment la fibrose) pouvaient être restreintes [257, 258].

4.4.5. Caractérisation phénotypique par RT-qPCR

La recherche d'effets du CisPt sur l'induction ou la répression de l'expression de gènes impliqués dans la fibrose rénale n'a pas permis de mettre en évidence de modifications significatives à la dose de 10 μ M. Toutefois, les AA, à 50 μ M, ont induit une modification de la transcription des gènes codants pour l'E-cadhérine (diminution à 0,47 ± 0,14 et 0,72 ± 0,09 fois la valeur observée pour le contrôle à 24 et 48 h, respectivement) et pour l' α -SMA (augmentation de 4,15 ± 0,63 et 7,13 ± 1,76 fois la valeur observée pour le contrôle à 24 et 48 h, respectivement) (Figure 69).





Ce protocole n'a donc pas pu être appliqué pour évaluer l'effet de l'extrait AS vis-à-vis de la toxicité du CisPt. Il convient toutefois de remarquer que la relocalisation de β -caténine observée précédemment en présence de CisPt supposait la régulation de gènes intervenant dans la fibrose ; et notamment la répression de E-cadhérine via l'acquisition du facteur Snail, elle-même consécutive à l'association de β -caténine et du facteur Tcf/Lef. Ceci n'apparaît pas dans cette expérience ; il reste possible que la dose (10 μ M) ou le temps d'incubation (24 et 48 h) ne soient pas suffisants pour activer la voie de signalisation menant à une dédifférenciation des cellules HK-2.

4.4.6. Recherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire

Les effets d'A. sinensis en tant que remède accélérant la cicatrisation des blessures de l'épiderme sont connus en MTC et ont été rapportés récemment : ils incluent une stimulation de la migration (montrée sur des cellules de l'épithélium gastrique), une augmentation de la prolifération (observée sur un modèle impliquant les cellules endothéliales HUVEC) et une accélération de l'angiogenèse (observée *in vivo* chez le poisson-zèbre) [251, 259].

Un effet bénéfique de l'extrait AS sur la régénération tubulaire a été investigué en 2 étapes :

- Dans un premier temps, la recherche d'un effet sur la prolifération cellulaire a été entreprise par évaluation de l'index Ki-67. Celui-ci permet de distinguer les cellules présentes dans les phases prolifératives du cycle cellulaire (G₁, S, G₂ et M) de celles en phase de quiescence (G₀). Ce test ne permettant pas de détecter les cellules bloquées dans une des étapes du cycle (par exemple en G₂/M), une analyse de la distribution des phases du cycle cellulaire par quantification de l'ADN a permis de confirmer les effets sur la prolifération.
- Dans un second temps, les effets de l'extrait AS vis-à-vis de la migration cellulaire ont été évalués par un test de cicatrisation (scratch assay).

4.4.6.1. Evaluation de la prolifération cellulaire par l'index Ki-67



Après avoir traité les cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester, la protéine Ki-67 a été marquée par immunofluorescence et la proportion de cellules positives a été évaluée.

Figure 70 : photographies de cellules marquées en immunofluorescence pour la protéine Ki-67 (en vert). Un contremarquage au DAPI (en bleu) permet de repérer les noyaux (grossissement 400 X).

Le FBS a été utilisé en tant que contrôle inducteur de prolifération ; en effet, celui-ci contient de nombreux facteurs de croissance (notamment, l'EGF) et hormones qui module la prolifération des cellules HK-2 [215]. Le traitement par du FBS (10 %) permet d'augmenter l'index Ki-67 à 306,8 ± 3,0 % par rapport au contrôle en l'absence de sérum (Figure 71).

Le CisPt (10 μ M) a également été capable d'induire une augmentation de l'index Ki-67 de 216,2 ± 4,9 % par rapport au contrôle (Figure 71). Ceci doit toutefois être interprété comme une conséquence de sa toxicité de par sa liaison à l'ADN et les ROS qu'il génère, l'intégrité du matériel génétique est altérée. Les cellules progressant dans les phases du cycle cellulaire tenteront de réparer ces dégâts avant leur division. Il en résulte un blocage du cycle au point de contrôle G₂/M, qui mène à une augmentation de l'index Ki-67 et à une conclusion faussement positive d'un effet simulant la prolifération cellulaire [88].



Figure 71 : index Ki-67 calculé pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (** : p<0,01 ; *** : p<0,001 par rapport au Ctrl) (valeur Ctrl = 0,22 ± 0,01).

L'extrait AS est lui aussi capable d'accroître l'index Ki-67 à 244,3 \pm 11,1 % et 135,4 \pm 20,9 % pour des doses de 50 et 5 µg/ml respectivement. Afin de déterminer si cette augmentation provient d'un effet réel sur la prolifération ou, à l'instar du CisPt, d'un blocage en G₂/M, une analyse de la distribution des phases du cycle cellulaire a été entreprise.

4.4.6.2. Analyse des phases du cycle cellulaire

Des cellules traitées dans les mêmes conditions que précédemment ont été analysées par une méthode de cytométrie de flux visant à déterminer leurs concentrations d'ADN respectives.

En accord avec ses effets stimulant la prolifération, le traitement par du FBS (10 %) a induit une légère diminution des cellules en G_0/G_1 (68,8 ± 2,2 % vs. 83,2 ± 1,0 % pour le contrôle) associée à une légère augmentation de la proportion de cellules en phases G_2 et M (18,7 ± 1,1 % vs. 9,5 ± 0,5 % pour le contrôle) (Figure 72).



Figure 72 : analyse des proportions de cellules présentes dans différentes phases du cycle cellulaire après traitement pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (** : p<0,01 ; *** : p<0,001 par rapport au contrôle).

Le CisPt a induit une forte augmentation de la proportion de cellules en G_2/M (76,1 ± 2,6 %) associée à une forte diminution de celles en phase G_0/G_1 (15,8 ± 1,4 %). Ceci confirme le blocage du cycle cellulaire.

Les 2 doses de l'extrait AS ont conduit à une faible diminution des cellules en G_0/G_1 (74,1 ± 1,1 % et 78,7 ± 1,4 % à 50 et 5 µg/ml d'AS respectivement) et à une faible augmentation des cellules en G_2/M (16,1 ± 2,6 % à 50 µg/ml d'AS et 11,7 ± 2,0 % (non statistiquement significative) à 5 µg/ml d'AS). Les profils obtenus après traitement par *A. sinensis* sont comparables à ceux obtenus pour le FBS, et permettent de conclure que l'augmentation de l'index Ki-67 observée précédemment est bien une conséquence d'un effet sur la prolifération cellulaire plutôt qu'un blocage des cellules en G_2/M , comme c'est le cas pour le CisPt.

L'extrait AS testé est donc capable de stimuler la prolifération de cellules HK-2. Ceci semblerait être la conséquence d'une sortie de la phase de quiescence (G_0), profitant à une entrée dans les phases prolifératives du cycle cellulaire ; en effet, la faible augmentation (généralement non statistiquement significative) de la proportion de cellules en phases S ou G_2/M ne permet pas d'expliquer la forte croissance de l'index Ki-67 après traitement par l'extrait AS. Il y a dès lors lieu de supposer qu'une majorité de cellules se trouvent en phase G_1 , sans que cela ne puisse être affirmé formellement sur base des 2 tests effectués.

Cet effet stimulant la prolifération par entrée dans le cycle cellulaire est confirmé par la mesure de la survie (4.4.1.1. Estimation de la survie cellulaire globale) qui avait révélé des viabilités supérieures aux conditions contrôles et s'élevant à 109 % lorsque les cellules HK-2 étaient traitées par de l'AS (50 ou 5 µg/ml).

Les effets proliférateurs d'A. sinensis ont déjà été démontrés in vitro sur des cellules épithéliales gastriques pour un extrait composé en grande partie de polysaccharides [251]. L'étude avait notamment démontré une induction de la synthèse d'ADN corrélée à une augmentation du nombre de cellules. Toutefois, l'extrait étudié dans ce travail ayant été produit à l'aide de méthanol ; la présence de polysaccharides, du moins de masse moléculaire élevée, reste incertaine.

4.4.6.3. Test de cicatrisation

Le scratch assay est couramment employé pour évaluer la motilité cellulaire. Il a dès lors été utilisé pour étudier l'effet de certaines substances sur la modulation des capacités de régénération, notamment sur la cicatrisation des épithélia [241]. Dans le cas des ARA, une réparation accélérée des tubules rénaux (par amélioration de la prolifération et de la migration) peut conduire à une

diminution de la sévérité et de la durée de l'atteinte, contribuant ainsi à limiter le risque de développement ultérieur de fibrose [260].

Après avoir créé une rayure sur des monocouches de cellules HK-2 à l'aide d'une pointe de pipette, le traitement par du FBS (10 %) a permis d'accélérer la migration des cellules à 1,9 fois celle observée pour des conditions contrôles (Figure 73).



Figure 73 : photographies pour le test de migration des cellules HK-2 dont la croissance a été arrêtée pendant 24 h par privation de sérum, grattées, puis traitées pendant 18 h avec les substances à tester (grossissement 100 X) (A). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl) (B).

Le traitement par l'extrait AS aux doses de 50 et 5 µg/ml a quant à lui engendré une accélération de la vitesse de migration de 1,3 et 1,2 fois supérieures aux conditions contrôles, respectivement.

La recolonisation plus rapide de la zone grattée ne peut pas s'expliquer seulement par une accélération de la prolifération cellulaire : en effet, des essais préliminaires ont permis d'évaluer que le temps de doublement (c'est-à-dire le temps nécessaire pour effectuer un cycle cellulaire) de cellules HK-2 mises en présence de FBS avoisinait une quarantaine d'heures. Ainsi, les 18 h d'incubation avec les composés à tester ne sont pas suffisant pour permettre une division cellulaire, phénomène qui aurait pu contribuer à accélérer la recolonisation sur les bords de la zone lésée (Figure 73.A).

Plusieurs raisons pouvant expliquer cette migration accélérée ont été publiées précédemment : sur des fibroblastes en culture, un extrait éthanolique d'A. sinensis (300 µg/ml) et l'acide férulique

(3,5 µM) ont tous deux montré une diminution de l'expression de MARE1 (*microtubule-associated protein RP/EB*) et de NDKB (*nucleoside disphosphate kinase B*), 2 gènes codant respectivement pour des protéines stimulant la polymérisation des microtubules (MARE1), et impliquée dans les phénomènes de migration, de prolifération, de différenciation et de développement cellulaire (NDKB) [261]. Ces observations, qui indiqueraient une possible diminution de la migration, sont à contrebalancer par l'activation des gènes ARPC5 (*actin-related protein 2/3 complex subunit 5*) et STMN1 (*stathmin*) par l'acide férulique (mais pas par l'extrait d'*A. sinensis*) qui sont respectivement responsables du remodelage des filaments d'actine et de l'inhibition de la polymérisation de microtubules. Ces effets conflictuels pourraient affecter la dynamique des microtubules, ce qui d'expliquerait l'effet positif sur la migration des fibroblastes [261].

Il est désormais reconnu que la stimulation de la prolifération et de la migration des RPTECs permet de dynamiser la régénération tubulaire ; ce qui constitue un caractère important dans le maintien de la fonction et de la structure tubulaire rénale suivant une atteinte toxique, notamment dans le cadre d'ARA successives aux traitements par le CisPt [98]. Au cours de cette pathologie, la perte massive de cellules tubulaires est associée à des troubles rénaux transitoires n'étant pas complètement irréversibles, sa répétition peut précipiter une évolution vers une MRC [262].

L'extrait méthanolique testé s'étant montré capable d'influencer positivement ces 2 phénomènes, il est possible de supposer qu'*A. sinensis* serait capable de réduire la sévérité et la durée des ARA induites par le CisPt. En effet, en régénérant plus rapidement l'intégrité tubulaire, *A. sinensis* pourrait contribuer à restaurer la structure et la fonction rénales plus rapidement et pourrait limiter le risque de progression vers une MRC.

Conclusion

Ces résultats mettent en valeur un potentiel néphroprotecteur prometteur pour l'extrait d'*A. sinensis*. Les principes actifs putatifs de cette plante (l'acide férulique, le Z-ligustilide ainsi que son isomère le E-ligustilide) ont été évalués sur l'ensemble des tests de mise en évidence d'un effet néphroprotecteur (Figure 74).



Figure 74 : démarche entreprise dans ce travail : l'activité protectrice des 5 plantes a été évaluée vis-à-vis des 3 substances néphrotoxiques. L'association extrait-toxique la plus prometteuse (AS vs. CisPt) a été présentée au chapitre précédent, et les molécules reconnues actives dans la plante concernée ont été testées de nouveau.

4.5. Recherche d'effets néphroprotecteurs des composés bioactifs majoritaires d'*A. sinensis*

L'extrait AS ayant montré le potentiel néphroprotecteur le plus prometteur, les 3 principes actifs majoritaires d'*A. sinensis* (à l'exception des polysaccharides) décrits dans la littérature ont été sélectionnés pour être évalués sur la batterie de tests décrits précédemment (Figure 75).



Figure 75 : rappel des structures des 3 principes actifs majoritaires d'A. sinensis testés (FA : acide férulique ; Z-lig : Z-ligustilide ; E-ligustilide).

NB : par la suite, ces 3 substances seront désignées PAAS (principes actifs d'Angelica sinensis).

Les essais biologiques opérés précédemment en présence de l'extrait brut d'A. sinensis mettaient en jeu des doses de 50 et 5 µg/ml. Le dosage de l'acide férulique et du Z-ligustilide ont permis de déterminer que ces doses exposaient les cellules à des concentrations de 2 et 0,2 µM en acide férulique et de 8 et 0,8 µM en Z-ligustilide, respectivement. En conséquence, les PAAS seront testés à des concentrations de 1, 10 et 50 µM.

4.5.1. Mesures de survie cellulaire

4.5.1.1. Estimation de la survie cellulaire globale

4.5.1.1.1. Modulation de la mortalité cellulaire induite par le CisPt

Après traitement des cellules HK-2 par du CisPt à 10 µM pendant 24, 48 ou 72 h, la survie cellulaire est tombée à 89 ± 2 %, 74 ± 3 % et 58 ± 3 %, respectivement, en comparaison aux conditions contrôle (Figure 76).



Figure 76 : viabilité cellulaire mesurée à l'aide du test à la résazurine après incubation des cellules HK-2 pendant 24, 48 ou 72 h avec du CisPt (10 µM) et/ou chacun des 3 PAAS à 50, 10 ou 1 µM. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 6 expériences indépendantes (*** : p<0,001 vs. Ctrl / * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. CisPt).

Co-traitement avec FA Les 3 concentrations testées, 50, 10 et 1 µM ont permis d'améliorer la survie cellulaire en limitant la baisse de viabilité à, respectivement, 98 ± 4 %, 94 ± 3 % et 92 ± 3 % (n.s) à 24 h; à 84 ± 3 %, 80 ± 3 % et 78 ± 4 % (n.s) à 48 h; et à 76 ± 5 %, 67 ± 4 % et 64 ± 3 % à 72 h.

Co-traitement avec Z-lig Aucune modification statistiquement significative n'a été observée lorsque les cellules ont été traitées avec la combinaison CisPt + Z-lig en comparaison au traitement par le CisPt seul.

Co-traitement avec E-lig A la dose de 50 μM, le co-traitement des cellules avec la combinaison CisPt + E-lig a renforcé la diminution de l'activité métabolique par rapport au traitement par CisPt seul : 86 ± 2 %, 67 ± 5 % et 49 ± 4 % pour des temps d'incubation de 24, 48 et 72 h, respectivement. Afin de confirmer si ces effets sont une éventuelle toxicité du E-lig lui-même, le test à la résazurine a été répété en l'absence de CisPt.

Les 3 temps d'incubation ont été choisis en raison de la pharmacocinétique du CisPt : la concentration plasmatique évolue de manière biphasique, avec un temps de demi-vie initial variant entre 25 et 50 minutes. Cette première phase est associée à une élimination urinaire rapide d'une majorité du CisPt sous forme libre. Le temps de demi-vie après la distribution et liaisons aux protéines plasmatiques varie entre 60 et 72 heures [263].

4.5.1.1.2. Effet des PAAS sur la survie cellulaire

Le test à la résazurine montre que l'exposition des cellules HK-2 à 10 μ M de CisPt reproduit le profil obtenu précédemment (Figure 77) ; les pourcentages de survie obtenus après 24, 48 et 72 h d'incubation atteignent 91 ± 4 %, 76 ± 5 % et 61 ± 6 %, respectivement.



Figure 77 : viabilité cellulaire mesurée à l'aide du test à la résazurine après incubation des cellules HK-2 pendant 24, 48 ou 72 h avec chacun des 3 PAAS à 50, 10 ou 1 μM. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Ces estimations de la survie cellulaire sont confirmées par un dosage des protéines par la méthode au BCA (Figure 78) qui indique que le traitement de cellules HK-2 pendant 24, 48 ou 72 h d'incubation avec 10 μ M de CisPt induit des survies de 83 ± 3 %, 79 ± 5 % et 64 ± 7 %, respectivement.



Figure 78 : viabilité cellulaire mesurée à l'aide du dosage des protéines à la BCA après incubation des cellules HK-2 pendant 24, 48 ou 72 h avec 10 μM de CisPt ou avec chacun des 3 PAAS à 50 μM. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (* : p<0,05 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Traitement par le FA En l'absence de CisPt, le traitement des cellules HK-2 par 50 et 10 μ M de FA a permis d'accroître l'activité métabolique à 110 ± 2 % et 106 ± 4 % (n.s) après 48 h, et à 115 ± 7 % et 111 ± 4 % (n.s) après 72 h, respectivement, par rapport aux conditions contrôles (Figure 77). Aucune modification n'a pu être observée pour la dose de 1 μ M.

Ces activités métaboliques supérieures ont pu être corrélées à une augmentation de la synthèse protéique à 112 ± 2 % par rapport au contrôle après 72 h d'incubation, et pour une dose de 50 μ M de FA (Figure 78). Ces résultats suggèrent une amélioration de la prolifération cellulaire (cf. 4.5.5. Recherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire).

Traitement par le Z-lig Aucune modification n'a pu être observée après traitement par le Z-lig (à aucune des doses et à aucun des 3 temps d'incubation) avec les tests à la résazurine (Figure 77) et le dosage des protéines à la BCA (Figure 78).

Traitement par le E-lig A 50 μ M, le E-lig induit une diminution de l'activité métabolique à 87 ± 6 % et 71 ± 8 % après 48 et 72 h d'incubation, respectivement, en comparaison aux conditions contrôles (Figure 77). Aucune modification n'est observée après 24 h d'incubation. Le dosage des protéines ne révèle quant à lui aucune modification par rapport aux conditions contrôles à aucun des 3 temps d'incubation (Figure 78), ce qui indique que le E-lig, à la dose de 50 μ M, permet en fait de diminuer l'activité métabolique des cellules HK-2 sans induire de perte de protéines, et *a fortiori* de perte de cellules.

En conclusion, ces résultats indiquent que :

 L'acide férulique semble à la fois capable de stimuler la prolifération cellulaire et de protéger les cellules vis-à-vis de la mortalité induite par le CisPt.

- Le Z-ligustilide ne produit aucune modification de viabilité cellulaire, que ce soit seul, ou en cotraitement avec le CisPt.
- Le E-ligustilide ne protège pas les cellules vis-à-vis du CisPt ; il diminue en outre leur activité métabolique sans provoquer leur mort.

4.5.1.2. Evaluation des taux d'apoptose

Les effets des PAAS observés dans les expériences de survie cellulaire ont été confirmés par évaluation des taux d'apoptose à l'aide d'un marquage à l'annexine V et au PI suivi d'une détection par cytométrie de flux.

En accord avec nos résultats précédents (cf. section 4.5.1.1.1. Modulation de la mortalité cellulaire induite par le CisPt), le traitement de cellules HK-2 par 10 μ M de CisPt pendant 24, 48 ou 72 h a accru de 3,1, 3,4 et 3,9 fois la proportion de cellules en apoptose en comparaison aux conditions contrôles, respectivement (Figure 79).



Figure 79 : proportions de cellules HK-2 en apoptose (phases précoce + tardive) après traitement pendant 48 h avec du CisPt (10 μM) et l'extrait AS (50 ou 5 μg/ml). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (*** : p<0,001 vs. Ctrl / * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. CisPt).

Le co-traitement au FA a permis de limiter ces proportions à des augmentations comprises entre 1,2 et 2,2 fois celles observées pour le contrôle, et ceci de manière dose-dépendante. Ce résultat confirme la capacité de l'acide férulique à réduire la mortalité induite par le CisPt mise en évidence précédemment.

De plus, le co-traitement avec la plus forte dose de Z-lig permet lui aussi de réduire la proportion de cellules en apoptose induite par le CisPt, et ceci aux 3 temps d'incubation testés. Ce résultat est en

désaccord avec les tests de viabilité effectués précédemment, pour lesquels aucune réduction de mortalité induite par le CisPt n'a pu être objectivée. Il y a dès lors lieu de supposer que si le Zligustilide protège les cellules vis-à-vis de l'entrée en apoptose, il ne permet pas d'améliorer la viabilité cellulaire globale selon d'autres mécanismes (par exemple par amélioration des capacités d'adhésion, de prolifération,...), comme semblerait le faire l'acide férulique.

Finalement, le E-lig n'augmente pas le nombre de cellules en apoptose ; ceci confirme que la diminution de viabilité observée lors du test à la résazurine (cf. 4.5.1.1.1. Modulation de la mortalité cellulaire induite par le CisPt) ne correspond pas à une exacerbation de la cytotoxicité du CisPt.

Ainsi, des 3 molécules testées, c'est l'acide férulique qui montre l'activité la plus intéressante pour réduire la mortalité induite par le cisplatine. La protection vis-à-vis de la cytotoxicité de cet agent anticancéreux doit être également envisagée pour les cellules tumorales, ce qui risquerait de compromettre l'efficacité de la chimiothérapie.

Toutefois, des études *in vitro* ont démontré la capacité de l'acide férulique à potentialiser la cytotoxicité de dérivés du platine (CisPt et carboplatine) et du 5-fluorouracile, ainsi qu'une exacerbation de la mortalité induite par des radiations chez des cellules cancéreuses [264]. Des effets antiproliférateurs ont été observés sur des cellules Hela ; les doses efficaces paraissent cependant difficiles à atteindre dans une pratique clinique ($IC_{50} \approx 320 \mu M$). A la lumière des données actuelles, il reste prématuré de conclure que l'acide férulique puisse améliorer l'efficacité des chimiothérapies au CisPt, tout en protégeant les reins de sa néphrotoxicité.

4.5.2. Evaluation du statut oxydatif

Les activités antioxydantes de chacun des PAAS ont été évaluées à l'aide du test au DPPH (Figure 80.A) par calcul de leurs TEAC, une mesure de leur potentiel antioxydant.

Pour l'acide férulique, un antioxydant bien connu [264], la TEAC a été estimée à 2,1.

Dans la gamme de concentrations testées, ni le Z-ligustilide, ni le E-ligustilide n'ont permis de neutraliser au moins 50 % du DPPH mis en présence. La TEAC de ces molécules ne peut être calculée ; elle peut toutefois être estimée supérieure à 50.



Figure 80 : courbes de neutralisation du DPPH obtenues pour chacun des PAAS ainsi que pour le Trolox (A). Intensité de fluorescences relatives enregistrées après traitement des cellules HK-2 pendant 24 h avec 10 μM de CisPt et chacun des PAAS aux doses de 50, 10 ou 1 μM (B) ; l'activité oxydative est révélée par oxydation de la sonde H₂DCF-DA (10 μM pendant 30 min). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (^{ooe} : p<0,001 vs. Ctrl / *** : p<0,001 vs. CisPt).

Lorsque les cellules ont été traitées par 10 μ M de CisPt pendant 24 h, la mesure du stress oxydatif avec la sonde H₂DCF-DA a permis de mettre à nouveau en évidence une augmentation de la génération de ROS/RNS à 151,5 ± 5,1 % par rapport au contrôle (Figure 80.B). Les 2 ligustilides (Z et E) ont empêché cette augmentation (100,8 ± 5,6 % et 86,0 ± 10,4 %, respectivement) à la dose de 50 μ M. Les concentrations plus faibles (10 et 1 μ M) n'ont quant à elles pas permis de limiter la génération de ROS/RNS induite par le CisPt.

Finalement, le FA ne s'est pas montré efficace pour limiter les quantités de ROS/RNS produites à aucune des 3 concentrations testées.

Ces résultats vont à l'encontre des mesures des potentiels antioxydants (par neutralisation de molécules radicalaires), qui suggéraient que l'acide férulique était plus à même de réduire la génération de radicaux libres néfastes aux constituants cellulaires. Toutefois, les effets antioxydants des ligustilides ont été documentés dans des études antérieures qui ont rapporté (*i*) une métabolisation reposant principalement sur des mécanismes de conjugaison ne permettant pas de supposer l'acquisition d'un potentiel réducteur direct [130], et (*ii*) leur capacité à accroitre les activités d'enzymes impliquées dans les défenses antioxydantes (GSH-Px, CAT et SOD) et donc à améliorer la résistance des cellules face aux ROS et RNS [128]. Une autre étude a rapporté une stimulation par le Z-ligustilide et le 3-butylidènephthalide de l'expression du facteur Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* ou NFE2L2) connu pour son implication dans la transcription de gènes codant notamment pour les enzymes antioxydantes NAD(P)H quinone oxydoréductase, glutathion-S-transférase ou hème oxygénase [254]. Selon le même principe, l'induction de

l'expression de l'hème oxygénase par le Z-ligustilide a permis de réduire le stress oxydatif dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale chez le rat [265].

Au vue des résultats obtenus ici, il y a lieu de supposer que l'activation de ce mécanisme confère une meilleure protection aux cellules vis-à-vis du stress oxydatif en comparaison à l'administration de molécules à pouvoir réducteur élevé. Il serait dès lors intéressant de mettre en évidence une probable synergie lors du traitement des cellules par de l'acide férulique et du E- et/ou Z-ligustilide, tous 3 présents dans *A. sinensis*.

4.5.3. Mesure des quantités de collagène produites

La mesure des quantités de collagène produites fournit une estimation de la production de MEC. Dans les conditions expérimentales choisies, un traitement de 48 h avec 10 μ M de CisPt a induit une augmentation de collagène de 135 ± 4 % par rapport au contrôle (Figure 81).



Figure 81 : quantité de collagène normalisée dosée par la méthode au PSR pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec du CisPt (10 μ M) et/ou chacun des PAAS (50, 10 ou 1 μ M). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl / ** : p<0,001 vs. CtsPt).

Cette augmentation a pu être limitée par ajout concomitant de FA aux doses de 50, 10 et 1 μ M à 112 \pm 2 %, 120 \pm 3 % et 126 \pm 3 %, respectivement. Les Z et E-ligustilides n'ont permis de réduire la quantité de collagène produite à aucune des concentrations testées.

Seul l'acide férulique est donc capable de limiter le dépôt de collagène consécutif au traitement des cellules HK-2 par du CisPt. Cette protéine de la MEC, lorsqu'elle est produite en excès durant une cicatrisation tissulaire, entraîne une fibrose irréversible conduisant à l'atrophie – voire à la disparition – des tubules. L'acide férulique pourrait donc permettre de prévenir la détérioration irréversible de la

fonction rénale, ce qui permettrait, en théorie, aux cellules résiduelles de régénérer les tubules altérés en contournant une cicatrisation fibrotique indésirable.

Les effets antifibrosants de l'acide férulique ont auparavant été mis en évidence *ex vivo* sur des coupes de foies de rats traités par de l'acétaldéhyde : l'expression de α-SMA et la sécrétion de TGF-β ont été réduites par ajout de férulate de sodium lors de l'exposition au toxique. La protection du foie aurait également été médiée par induction de l'expression de métalloprotéinases matricielles (e.g MMP-1) et de la répression de l'expression d'inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases matricielles (e.g TIMP-1) [266]. Ce dernier phénomène a pu être démontré *in vivo* sur des modèles d'hépatotoxicités induites par l'alcool ou par les acides gras chez le rat et se sont soldés par une réduction de l'accumulation de collagène [267].

4.5.4. Relocalisation de la β-caténine

4.5.4.1. Analyse de la forme membranaire de β-caténine

Les quantités de β-caténine membranaire ont été déterminées à l'aide de la méthode QFIA : les cellules HK-2 ont été traitées pendant 48 h avec les composés à tester, et analysées après immunomarquage fluorescent (Figure 82).



Figure 82 : signal de fluorescence mesuré pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec du CisPt (10 μM) et/ou les PAAS aux doses de 50, 10 et 1 μM. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (° : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl / * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. CisPt).</p>

En l'absence de CisPt, chacun des PAAS, à la dose de 50 μ M, a augmenté la fluorescence attribuable à la β -caténine membranaire de 1,2 fois par rapport au contrôle ; à 10 μ M, seul le FA a pu produire un effet similaire (augmentation de 1,1 fois supérieure au contrôle). Ceci indique que les 3 PAAS, et plus

particulièrement le FA, sont capables de promouvoir l'acquisition de β -caténine au niveau membranaire – c'est-à-dire en tant que facteur d'adhésion cellulaire – ce qui confirme le phénotype épithélial des RPTECs.

Le traitement des cellules par 10 μ M de CisPt a produit une perte de β -caténine membranaire équivalente à 0,5 fois celle observée pour les conditions contrôles. Cette réduction a toutefois pu être limitée par additions concomitante de 50 μ M de FA, Z-lig ou E-lig à 0,8, 0,8 ou 0,7 fois par rapport au contrôle, respectivement. A la dose de 10 μ M, seul le FA s'est montré capable de limiter cette perte à 0,7 fois celle du contrôle. Ces résultats indiquent que si les 3 PAAS permettent de prévenir la perte de β -caténine membranaire – et donc du phénotype épithélial des RPTECs – l'effet le plus intense a été observé pour l'acide férulique.

4.5.4.2. Analyse de la forme cytoplasmique/nucléaire de β-caténine

L'analyse des quantités de la forme relocalisante de β -caténine s'est faite au moyen d'une technique par immunomarquage fluorescent suivie d'une détermination par cytométrie de flux. Après traitement par 10 μ M de CisPt pendant 48 h, les cellules HK-2 ont connu une augmentation de 2,5 fois de leur quantité en β -caténine nucléaire par rapport au contrôle (Figure 83).



Figure 83 : quantification de la β -caténine nucléaire par cytométrie de flux après traitement des cellules HK-2 pendant 48 h avec du CisPt (10 μ M) et les PAAS aux doses de 50, 10 et 1 μ M. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl / * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. CisPt).

Les 3 PAAS testés, quelle que soit la dose, ont permis de limiter cette augmentation entre 1,7 et 1,9 fois la fluorescence observée pour le contrôle. Dans ce protocole, les 3 composés semblent dotés de la même efficacité.

Toutefois, en égard aux résultats obtenus précédemment, il y a lieu de noter que l'acide férulique est le composé le plus prometteur pour :

- stimuler l'acquisition de β-caténine membranaire, et ainsi renforcer le phénotype épithélial des cellules ; ce qui pourrait permettre une amélioration des capacités de régénération tubulaire post-NTA ;
- prévenir la relocalisation de la β-caténine de la membrane vers le noyau, limitant ainsi l'association au facteur Tcf/Lef et l'expression de gènes tels que Snail impliqués dans l'EMT et dans la fibrose. De plus, en préservant sa localisation membranaire, les capacités d'adhésion cellulaire sont maintenues, ce qui évite le détachement et la perte intraluminale de RPTECs.

4.5.5. Recherche d'effets potentiels sur la régénération tubulaire

4.5.5.1. Evaluation de la prolifération cellulaire par l'index Ki-67

Afin d'évaluer si les PAAS peuvent stimuler la prolifération cellulaire, des cellules HK-2 ont été traitées pendant 48 h avec chacun des composés aux doses de 50, 10 et 1 μ M avant immunomarquage de la protéine Ki-67. Le FBS, choisi comme contrôle positif, a induit une augmentation de 326 ± 9 % en comparaison aux conditions contrôles privées de sérum bovin (Figure 84).



Figure 84 : index Ki-67 pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; *** : p<0,001 par rapport au Ctrl) (valeur Ctrl = 0,26 ± 0,02).

A nouveau, le traitement par 10 μ M de CisPt a induit une élévation de l'index Ki-67 à 224 ± 10 %. Comme expliqué précédemment, ceci doit être interprété comme une conséquence de sa toxicité et du blocage du cycle cellulaire en phase G₂/M (cf. 4.4.6.1. Evaluation de la prolifération cellulaire par l'index Ki-67 et 4.4.6.2. Analyse des phases du cycle cellulaire). Les 3 PAAS testés ont également été capables d'accroître l'index Ki-67 de façon dose-dépendante. Les valeurs d'augmentation les plus importantes ont toutefois été observées pour le FA. A nouveau, une analyse de la proportion de cycles cellulaires a été entreprise afin de vérifier que les augmentations de l'index Ki-67 sont bien corrélées à une accélération de la prolifération et non à un blocage des cellules en G₂/M.

4.5.5.2. Analyse des phases du cycle cellulaire

En comparaison au contrôle, le profil obtenu pour le FBS est similaire à celui observé précédemment (cf. 4.4.6.2. Analyse des phases du cycle cellulaire) : une légère diminution des cellules en phases G_0/G_1 (76,0 ± 2,8 % vs. 85,8 ± 2,4 % pour le contrôle) et une légère augmentation de la proportion de cellules en phases G_2/M (18,4 ± 2,7 % vs. 8,8 ± 0,8 % pour le contrôle) ont été observées (Figure 85). Egalement, le traitement par le CisPt a causé une forte baisse de la proportion de cellules en G_0/G_1 (10,2 ± 0,8 %) associée à une forte augmentation de celles en G_2/M (83,2 ± 3,9 %).



Figure 85 : analyse des proportions de cellules présentes dans différentes phases du cycle cellulaire après traitement pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Finalement, les profils obtenus pour les 3 PAAS à chacune des 3 doses sont similaires à celui obtenu pour le FBS, ce qui écarte la possibilité d'un blocage des cellules en phase G_2/M .

Il est donc possible de conclure que l'élévation de l'index Ki-67 observée précédemment est en relation avec une prolifération accrue.

L'effet observé ici pourrait être expliqué par une sortie de la phase de quiescence (G₀), profitant à une entrée dans les phases prolifératives du cycle cellulaire, et notamment au profit de la phase G₁:

à l'instar des résultats obtenus pour l'extrait brut AS, l'augmentation de la proportion de cellules en phases S ou G₂/M ne semble pas pouvoir expliquer la forte croissance de l'index Ki-67.

4.5.5.3. Test de cicatrisation

Le scratch assay a été utilisé afin d'évaluer l'effet des 3 PAAS sur la motilité cellulaire. Le FBS, utilisé comme contrôle positif a permis d'accélérer de 1,9 fois la vitesse de migration par rapport au contrôle (Figure 86).



Figure 86 : vitesses de migration des cellules HK-2 dont la croissance a été arrêtée pendant 24 h et traitées pendant 18 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 6) (** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Les trois doses de FA, 50, 10 et 1 μ M ont été capables d'accélérer la vitesse de migration de 1,7, 1,6 et 1,4 fois par rapport au contrôle, respectivement. A l'instar d'*A. sinensis*, la littérature rapporte une stimulation de la migration de fibroblastes lors de l'exposition à une solution à 3,5 μ M d'acide férulique [261]. Ceci a été discuté à la section *4.4.6.3. Test de cicatrisation*.

Le Z-lig n'a pas produit de modification statistiquement significative. Enfin, le E-lig, à la dose de 50 µM, a freiné la migration de cellules HK-2 à 0,7 fois la valeur du contrôle. En conjonction avec sa capacité à réduire l'activité métabolique des cellules HK-2, il est possible de suggérer que le E-ligustilide est un composé à potentiel antitumoral. Cependant, aucune publication n'a à ce jour tenté d'évaluer son activité anticancéreuse.

Finalement, toutes ces données suggèrent que l'acide férulique est le composé le plus à même d'améliorer les capacités de régénération tubulaire. En agissant sur la prolifération et sur la migration de RPTECs saines, il pourrait garantir une restauration plus rapide de la structure et de la fonction tubulaire rénale ; il limiterait ainsi l'initiation d'une cicatrisation fibreuse et l'émergence d'altérations structurelles et fonctionnelles irréversibles [262].

5. Conclusion générale et perspectives

Dans le présent travail, nous avons sélectionné une série de plantes pour lesquelles les usages traditionnels ainsi que la littérature scientifique rapportent des activités néphroprotectrices *in vivo*, mais pour lesquelles les mécanismes pharmacologiques sous-tendant l'activité ne sont que partiellement expliqués.

Nous nous sommes focalisés sur les cellules de l'épithélium tubulaire proximal qui sont les cibles privilégiées de nombreuses substances toxiques d'origine médicamenteuse (cisplatine, ciclosporine A) ou environnementale (acides aristolochiques).

Les activités néphroprotectices d'extraits de 5 plantes ont été évaluées sur des cellules HK-2. Ce modèle *in vitro* a permis d'investiguer une série de paramètres biologiques visant à mettre en évidence :

- Une réduction de la mortalité induite par les agents néphrotoxiques. Des éventuels effets bénéfiques ont été confirmés par détermination des taux d'apoptose;
- Une atténuation des dégâts oxydatifs générés par l'exposition aux trois toxiques ; ceci ayant été évalué par le biais d'une mesure du pouvoir antioxydant des substances à tester, ainsi que par l'estimation de la génération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote *in vitro*;
- Une restriction de la production de collagène constituant essentiel de la matrice extracellulaire produit lors de processus de cicatrisation fibrotique – induite par les agents néphrotoxiques;
- Une limitation du processus de dédifférenciation des RPTECs engendré par l'exposition aux trois toxiques ; ce phénomène a été objectivé par mesure des quantités de β-caténine aux niveaux membranaire ou cytoplasmique/nucléaire ;
- Une amélioration des capacités de régénération tubulaire évaluée au moyen de tests de prolifération et de motilité cellulaires.

Au terme de ces tests biologiques, c'est l'extrait d'A. sinensis qui a montré le potentiel néphroprotecteur le plus prometteur (ceci étant justifié par la présence d'activités bénéfiques sur une majorité des tests utilisés et/ou par la magnitude des effets observés). Ses principes actifs majeurs, tels que décrits dans la littérature, ont été à nouveau évalués sur la batterie de tests afin d'identifier une molécule susceptible d'être proposée comme néphroprotectrice vis-à-vis des traitements à base de CisPt. Ainsi, bien que les E et Z-ligustilide aient démontré des activités néphroprotectrices intéressantes, c'est l'acide férulique qui a montré le plus fort potentiel à limiter les atteintes toxiques induites par le CisPt.

La néphrotoxicité est sans aucun doute l'effet secondaire le plus préoccupant du CisPt. Il apparait nécessaire de développer de nouvelles stratégies basées sur l'emploi d'agents pharmacologiques qui pourraient diminuer les lésions occasionnées aux RPTECs [89, 96]. A ce titre, l'acide férulique s'est montré capable de réduire la mortalité cellulaire par abaissement des taux d'apoptose.

Malgré un effet antioxydant reconnu [264], il n'a pas été capable de protéger les cellules HK-2 du stress oxydatif selon le modèle utilisé dans cette étude.

Il a toutefois permis de limiter la synthèse de collagène induite par un traitement au CisPt et pourrait ainsi s'avérer utile pour prévenir l'accumulation de MEC associée à un processus cicatriciel excessif. Enfin, ses effets s'opposent à la relocalisation de β -caténine de la membrane vers le noyau. Ceci permettrait de renforcer les capacités d'adhésion des cellules, prévenant ainsi leur détachement et leur perte intraluminale ; et s'opposerait en outre à l'activation de la voie de la β -caténine, associée à la modulation de gènes responsables du développement de la fibrose [257, 258].

Perspectives

L'étude réalisée ici constitue la première étape d'une démarche dédiée à la découverte d'une molécule utilisable dans le cadre de la prévention des ARA et des fibroses secondaires associées aux traitements par le CisPt. La route vers l'élaboration d'un médicament potentiel reste encore longue. Les effets de l'acide férulique vis-à-vis de la néphrotoxicité induite par le CisPt devraient ainsi être confirmés et investigués plus en détails :

- Dans un premier temps, la mise au point d'un modèle animal devrait venir confirmer le potentiel néphroprotecteur de l'acide férulique *in vivo*. Celui-ci devrait en outre s'attacher à l'évaluation de la fonction rénale (créatininémie, DFG, enzymurie,...) et aux répercussions histopathologiques associées aux injections de CisPt.
- La batterie de tests utilisée pourrait ensuite être transposée à un modèle *in vitro* basé sur une culture de cellules primaires humaines. Celles-ci pourraient être obtenues par isolement de RPTECs à partir d'un rein humain, obtenu suite à une néphrectomie.

De la même manière, les effets bénéfiques de l'acide férulique pourraient intéresser d'autres lignées cellulaires, impliquant par exemple des cellules endothéliales afin de mettre en évidence un effet bénéfique potentiel sur l'EndoMT. D'autres recherches pourraient tenter de déterminer si l'acide férulique permet de diminuer l'activation et la prolifération de fibroblastes en culture, contribuant ainsi à limiter la synthèse de MEC.

 Dans un second temps, comme il a été démontré au cours de cette étude que l'acide férulique pouvait réduire la mortalité induite par le CisPt par réduction du déclenchement de l'apoptose, il serait judicieux de déterminer si la même protection est obtenue vis-à-vis de cellules tumorales en culture. Si tel était le cas, la protection rénale devrait être assurée par ciblage spécifique des RPTECs.

- De plus, des molécules de structure proche de l'acide férulique devraient être testées afin d'apprécier leurs relations structure-activité. Ces analogues pourraient entre autres comprendre l'acide caféique, le coniféryl férulate, l'acide cinnamique, l'acide sinapique, la curcumine, l'acide chlorogénique, la cynarine, l'acide rosmarinique... D'autres dérivés produits par hémisynthèse pourraient également être proposés. Cette étape de pharmacomodulation doit permettre d'optimiser l'activité de la molécule candidate.
- Ensuite, de nouvelles expériences in vitro impliquant les cellules HK-2 et/ou des cultures primaires devraient venir étayer le cortège d'arguments proposant l'acide férulique (ou un éventuel dérivé) comme substance néphroprotectrice. Celles-ci pourraient notamment inclure :
 - La recherche d'un effet protecteur sur la survie cellulaire lors d'utilisation de doses plus élevées de CisPt inductrices de nécrose.
 - La détermination de la voie d'apoptose (intrinsèque ou extrinsèque) ayant été inhibée ainsi que le mécanisme sous-jacent.
 - La mise en évidence d'un renforcement de l'adhésion cellulaire (supposé par le maintien de la forme membranaire de β-caténine), prévenant le détachement et la perte de cellules.
 - La confirmation selon laquelle la répression de la voie de la β-caténine est bien associée à une induction réduite de l'activité du facteur de transcription Snail. Ceci pourrait éventuellement être objectivé indirectement par la mise en évidence de l'EMT via l'expression génomique et protéique de marqueurs tels que la vimentine ou la α-SMA.
 - La recherche d'effets sur la sécrétion de cytokines telles que le TGF-β, le TNF-α ou l'interleukine-6, impliquées dans les phénomènes d'EMT, d'activation de fibroblastes et de recrutement de leucocytes ; 3 facteurs favorisant la fibrose rénale interstitielle.
- Pour terminer, la vectorisation de l'acide férulique (ou de son analogue) devra assurer la délivrance du principe actif au cœur des RPTECs à protéger avant l'administration de CisPt et permettra de limiter la distribution à l'ensemble de l'organisme, en ce compris la tumeur à traiter. Ceci pourrait être mis en œuvre en tirant profit de récepteurs plus ou moins spécifiques des RPTECs (par exemple par pénétration via le complexe mégaline-cubiline présent sur leur pôle luminal ; ou encore par formation d'un adduit à la 25-hydroxy-vitamine D qui est totalement réabsorbée par les RPTECs). Cette démarche permettrait en outre de protéger le médicament par un brevet, étant donné que l'acide férulique, issu du règne végétal, est accessible à tout industriel pharmaceutique.

6. Bibliographie

- 1. Marieb E. Anatomie et physiologie humaines. 6th ed. Paris: Pearson Education; 2005
- 2. Noël L-H. Atlas de pathologie rénale. Paris: Flammarion Médecine-Science; 2008
- Tortora G, Grabowski S. Principes d'anatomie et de physiologie. 3rd ed. Louvain-la-Neuve: De Boeck; 2001
- 4. Mundel P, Schwarz K, Reisen J. Biologie du podocyte : un nouveau pas en avant. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2001: 219-224
- Maxwell PH. Le facteur HIF-1 induit par l'hypoxie et la sensibilité à l'oxygène. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2006: 51-66
- 6. De Beuf A. Erythropoietin in acute and chronic renal disease: featuring new applications of an old drug. Antwerp, Universiteit Antwerpen, Laboratory of Pathophysiology; 2010: 209
- Bachmann S, Theilig F. Appareil juxtaglomérulaire, monoxyde d'azote et signalisation à la macula densa. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2000: 245-254
- Hasler U, Leroy V, Martin P-Y, Féraille E. Expression de l'aquaporine 2 dans les cellules principales du canal collecteur du rein : une question d'équilibre. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2009: 157-168
- 9. Naughton CA. Drug-induced nephrotoxicity. Am Fam Physician 2008; 78: 743-750
- Verroust PJ, Christensen EI. Megalin and cubilin--the story of two multipurpose receptors unfolds. Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 1867-1871
- 11. Hamburger J. Acutalités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine-Science; 2000
- 12. Anzai N, Endou H. Renal drug transporters and nephrotoxicity. AATEX 2007; 14: 447-452
- 13. Hilton R. Acute renal failure. BMJ 2006; 333: 786-790
- 14. Crowley L, Ostermann M. Acute kidney injury (AKI). 2014. In: RenalMed, London.
- 15. Multiple authors. Clinical nephrotoxins: Renal injury from drugs and chemicals. 3rd ed. New-York: Springer; 2008
- 16. National Kidney Foundation. KDOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Am J Kidney Dis 2002; 39: S1-266
- Lameire N, Jager K, Van Biesen W, de Bacquer D, Vanholder R. Chronic kidney disease: a European perspective. Kidney Int Suppl 2005: S30-38
- Hassan Y, Al-Ramahi R, Abd Aziz N, Ghazali R. Drug use and dosing in chronic kidney disease. Ann Acad Med Singapore 2009; 38: 1095-1103
- Bacchetta J, Jolivot A, Souberbielle J-C, Charrié A, Guebre F, Chauvet C, Fouque D.
 Parathormone et maladie rénale chronique. Néphrologie & Thérapeutique 2007; 3: 133-138
- 20. Hannedouche T, Krummel T, Parvez-Braun L. Néphroprotection. Comment ralentir l'évolution de l'insuffisance rénale chronique ? Néphrologie & Thérapeutique 2005; 1: 135-144
- 21. Multiple authors. Larousse Médical. Paris: Larousse; 2006
- 22. Chadban SJ, Atkins RC. Glomerulonephritis. The Lancet 2005; 365: 1797-1806
- 23. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. The Lancet 2005; 365: 417-430
- Lord A, Ménard C. La néphrotoxicité médicamenteuse : comment limiter les dégâts ? Le Médecin du Québec 2002; 37: 55-59
- 25. Baudoux T, Madhoun P, Carlier E, Richard T, Vanhaeverbeek M. Thrombocytopenia and acute kidney injury. Revue Médicale de Bruxelles 2009; 30: 63-67
- Collège de Néphrologie. Rapport commun du GNFB et du NBVN pour le Collège de Néphrologie et des centres de traitement de l'insuffisance rénale chronique. 2012. In: SPF Santé Publique, Brussels.

- Ruilope LM, Campo C, Segura J, Rodicio JL. Quelle est la cible optimale de pression artérielle chez les sujets avec une maladie rénale ? In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2001: 49-57
- 28. Fouque D. Doit-on encore prescrire une réduction de l'apport protéique en cas de maladie rénale chronique ? Néphrologie & Thérapeutique 2006; 2: 419-421
- Ryckelynck J-P, Lobbedez T, Hurault de Ligny B. Dialyse péritonéale. Néphrologie & Thérapeutique 2005; 1: 252-263
- Kessler M, Büchler M, Durand D, Kolko-Labadens A, Lefrançois G, Menoyo V, Mourad G, Peraldi M-N, Pouteil-Noble C, Yver L, Zins B, Hourmant M. Quand faut-il inscrire un patient sur la liste d'attente de transplantation rénale ? Néphrologie & Thérapeutique 2008; 4: 155-159
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S. Reactive oxygen species and aging in Caenorhabditis elegans: causal or casual relationship? Antioxid Redox Signal 2010; 13: 1911-1953
- 32. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82: 47-95
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem Pharmacol 2003; 66: 1499-1503
- Okamura DM, Himmelfarb J. Tipping the redox balance of oxidative stress in fibrogenic pathways in chronic kidney disease. Pediatric Nephrology 2009; 24: 2309-2319
- Impellizzeri D, Esposito E, Attley J, Cuzzocrea S. Targeting inflammation: New therapeutic approaches in chronic kidney disease (CKD). Pharmacol Res 2014; 81C: 91-102
- Kaysen GA. Inflammation et stress oxydant dans l'insuffisance rénale terminale. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2000: 35-46
- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. N Engl J Med 2009; 361: 1570-1583
- 38. Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. Herz 1999; 24: 189-195
- Carew RM, Wang B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis. Cell Tissue Res 2011; 347: 103-116
- Schmeiser K, Grand RJ. The fate of E- and P-cadherin during the early stages of apoptosis. Cell Death Differ 1999; 6: 377-386
- Prozialeck WC, Edwards JR. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. Pharmacol Ther 2007; 114: 74-93
- Hertig A, Xu-Dubois Y-C, Rondeau E. Transition épithélio-mésenchymateuse : un marqueur utile en transplantation rénale. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2008: 99-111
- Garcia-Sanchez O, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM. An integrative view on the role of TGF-beta in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. Kidney Int 2010; 77: 950-955
- Feige J-J, Quirin N, Souchelnitskiy S. TGFβ, un peptide biologique sous contrôle : formes latentes et mécanismes d'activation. MS Médecine sciences 1996; 12: 929-939
- Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. Kidney Int 2003; 64: 844-856
- 46. Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. Curr Opin Nephrol Hypertens 2012; 21: 289-300
- Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'Neill A J, Fitzpatrick JM, Watson RW. TGFbeta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation. Am J Physiol Renal Physiol 2006; 290: F1202-1212
- Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. J Am Soc Nephrol 2008; 19: 2282-2287
- Fogo AB. Fibrose rénale et système rénine-angiotensine. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2001: 73-88
- LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. Nat Med 2013; 19: 1047-1053

- Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. Kidney Int 2009; 75: 1145-1152
- Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 1-12
- Ameisen JC. Le suicide des cellules et le système immunitaire. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2001: 1-14
- 54. Vielhauer V, Anders H-J, Schlöndorff D. Le rôle des chimiokines et de leurs récepteurs dans l'initiation et la progression des maladies rénales In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2002: 159-178
- 55. Wilson HM, Kluth DC, Erwig L-P, Rees AJ. Macrophages et maladies rénales. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2005: 37-57
- Debelle FD. Modèle expérimental de fibrose interstitielle induite par les acides aristolochiques [MD Thesis]. Brussels, Université Libre de Bruxelles, Unité de Néphrologie Expérimentale; 2005: 190
- 57. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. Kidney Int 2006; 70: 1914-1919
- Boffa J-J, Chatziantoniou C, Dussaule J-C. Progression et régression de la fibrose rénale. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2004: 67-78
- Bruneton J. Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 3rd ed. Paris: Lavoisier; 2005
- 60. Barnes J, Anderson L, Phillipson D. Herbal Medicines. 3rd ed. London; 2007
- 61. Michl J, Ingrouille MJ, Simmonds MS, Heinrich M. Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. Nat Prod Rep 2014; 31: 676-693
- Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C, Simmonds MS. Local uses of Aristolochia species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2 - A global assessment based on bibliographic sources. J Ethnopharmacol 2009; 125: 108-144
- 63. Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Paris: Ibis Press; 1999
- 64. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, Richard C, Vandervelde D, Verbeelen D, Vanhaelen-Fastre R, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. Lancet 1993; 341: 387-391
- 65. Wu KM, Farrelly JG, Upton R, Chen J. Complexities of the herbal nomenclature system in traditional Chinese medicine (TCM): lessons learned from the misuse of Aristolochia-related species and the importance of the pharmaceutical name during botanical drug product development. Phytomedicine 2007; 14: 273-279
- Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherweghem JL. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. Lancet 1994; 343: 174
- Martinez MC, Nortier J, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of *Aristolochia fangchi* ingested dose. Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 408-412
- Vanherweghem LJ. Misuse of herbal remedies: the case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy). J Altern Complement Med 1998; 4: 9-13
- De Broe ME. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. Kidney Int 2012; 81: 513-515
- Martinez MC, Nortier J, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Steroid therapy in chronic interstitial renal fibrosis: the case of Chinese-herb nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 2033-2034
- Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierreux MF, De Pauw L, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). N Engl J Med 2000; 342: 1686-1692

- 72. HMPC (Comitee on herbal medicinal products). Public statement on the risks associated with the use of herbal products containing *Aristolochia* species. 2005. In: Herbal medicinal products, EMEA: European Medicines Agency, London. EMEA/HMPC/138381/2005
- Pena JM, Borras M, Ramos J, Montoliu J. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis due to a chronic intake of a herb (*Aristolochia pistolochia*) infusion. Nephrol Dial Transplant 1996; 11: 1359-1360
- 74. Krumme B, Endmeir R, Vanhaelen M, Walb D. Reversible Fanconi syndrome after ingestion of a Chinese herbal 'remedy' containing aristolochic acid. Nephrol Dial Transplant 2001; 16: 400-402
- 75. Tanaka A, Nishida R, Yoshida T, Koshikawa M, Goto M, Kuwahara T. Outbreak of Chinese herb nephropathy in Japan: are there any differences from Belgium? Intern Med 2001; 40: 296-300
- Li X, Wang H. Aristolochic acid nephropathy: what we know and what we have to do. Nephrology (Carlton) 2004; 9: 109-111
- Debelle FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. Kidney Int 2008; 74: 158-169
- The State Pharmacopoeia Comission of P.R. China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 9th ed. Beijing: China Medical Science Press; 2010
- Bensky D, Gamble A, Kaptchuk T, Bensky L. Chinese Herbal Medicine: Materia Medica. 4th ed. Seattle: Eastland Press; 1986
- Zhang C, Wang X, Shang M, Yu J, Xu Y, Li Z, Lei L, Li X, Cai S, Namba T. Simultaneous determination of five aristolochic acids and two aristololactams in Aristolochia plants by highperformance liquid chromatography. Biomed Chromatogr 2006; 20: 309-318
- Bunel V. Le circuit du médicament traditionnel en Chine : de la plante au patient [Master thesis]. Brussels, Université Libre de Bruxelles, Laboratoire de Pharmacognosie, de Bromatologie et de Nutrition Humaine; 2009: 94
- Ioset JR, Raoelison GE, Hostettmann K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. Food Chem Toxicol 2003; 41: 29-36
- Rueda DC, Zaugg J, Quitschau M, Reich E, Hering S, Hamburger M. Discovery of GABA_A receptor modulator aristolactone in a commercial sample of the Chinese herbal drug "Chaihu" (*Bupleurum chinense* roots) unravels adulteration by nephrotoxic *Aristolochia manshuriensis* roots. Planta Med 2012; 78: 207-210
- Coghlan ML, Haile J, Houston J, Murray DC, White NE, Moolhuijzen P, Bellgard MI, Bunce M. Deep sequencing of plant and animal DNA contained within Traditional Chinese Medicines reveals legality issues and health safety concerns. PLoS Genet 2012; 8: e1002657
- Pozdzik A. Caractérisation de l'atteinte tubulo-interstitielle au cours de la fibrose rénale expérimentale (néphropathie aux acides aristolochiques) [MD thesis]. Brussels, Université Libre de Bruxelles, Unité de Néphrologie Expérimentale; 2009: 125
- Baudoux TE, Pozdzik AA, Arlt VM, De Prez EG, Antoine MH, Quellard N, Goujon JM, Nortier JL. Probenecid prevents acute tubular necrosis in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. Kidney Int 2012; 82: 1105-1113
- Depierreux M, Van Damme B, Vanden Houte K, Vanherweghem JL. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. Am J Kidney Dis 1994; 24: 172-180
- Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. Chem Rev 1999; 99: 2467-2498
- 89. dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. Arch Toxicol 2012; 86: 1233-1250
- Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). J Pharmacol Exp Ther 2006; 319: 879-886
- Thomas F, Chatelut E. Les dérivés du platine. La Revue Francophone de Formation en Oncologie 2007; 9: 741–745

- Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. Kidney Int 2008; 73: 994-1007
- Multiple authors. Répertoire commenté des médicaments. 26th ed. Gent: (CBIP) Centre Belge d'Informations Pharmacothérapeutiques,; 2013
- 94. Reichl F-X. Guide pratique de toxicologie. 2nd ed. Brussels: de Boeck; 2002
- Hilal G, Albert C, Vallée M. Mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité. Annales de Biologie Clinique du Québec 2005; 42: 29-35
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: A review. Am J Med Sci 2007; 334: 115-124
- 97. Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. Kidney Int 2007; 72: 37-44
- 98. Wynn TA. Fibrosis under arrest. Nat Med 2010; 16: 523-525
- Block KI, Gyllenhaal C. Commentary: the pharmacological antioxidant amifostine -- implications of recent research for integrative cancer care. Integr Cancer Ther 2005; 4: 329-351
- 100. Albers JW, Chaudhry V, Cavaletti G, Donehower RC. Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds. Cochrane Database Syst Rev 2011: CD005228
- Katsuda H, Yamashita M, Katsura H, Yu J, Waki Y, Nagata N, Sai Y, Miyamoto K. Protecting cisplatin-induced nephrotoxicity with cimetidine does not affect antitumor activity. Biol Pharm Bull 2010; 33: 1867-1871
- Wensing KU, Ciarimboli G. Saving ears and kidneys from cisplatin. Anticancer Res 2013; 33: 4183-4188
- Nagwani S, Tripathi YB. Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity by PTY: A herbal preparation. Food Chem Toxicol 2010; 48: 2253-2258
- Sohn SH, Lee H, Nam JY, Kim SH, Jung HJ, Kim Y, Shin M, Hong M, Bae H. Screening of herbal medicines for the recovery of cisplatin-induced nephrotoxicity. Environ Toxicol Pharmacol 2009; 28: 206-212
- Nitha B, Janardhanan KK. Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium Morchella esculenta, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. Food Chem Toxicol 2008; 46: 3193-3199
- Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. Drug Saf 2009; 32: 1109-1122
- Svarstad H, Bugge HC, Dhillion SS. From Norway to Novartis: Cyclosporin from *Tolypocladium* inflatum in an open access bioprospecting regime. Biodiversity and Conservation 2000; 9: 1521-1541
- 108. Abramowicz D, Wissing KM, Broeders N. Stratégies d'immunosuppression en transplantation rénale au début du troisième millénaire. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2000: 99-113
- Felnagle EA, Jackson EE, Chan YA, Podevels AM, Berti AD, McMahon MD, Thomas MG. Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. Mol Pharm 2008; 5: 191-211
- Issa N, Kukla A, Ibrahim HN. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. Am J Nephrol 2013; 37: 602-612
- 111. Multiple authors. Stockley's Drug Interactions. 9th ed. London: Pharmaceutical Press; 2010
- Breidenbach T, Hoffmann MW, Becker T, Schlitt H, Klempnauer J. Drug interaction of St John's wort with cyclosporin. Lancet 2000; 355: 1912
- 113. Petitet F. Interactions pharmacocinétiques entre préparation à base de plantes et médicament : une revue de l'importance clinique. Phytothérapie 2012; 10: 170-182
- Kamar N, Rostaing L. Surveillance de la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine. Néphrologie & Thérapeutique 2008; 4, Supplement 1: S13-S17
- Vanrenterghem Y. Néphrotoxicité des traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation rénale. In: Hamburger J ed, Actualités néphrologiques. Paris: Flammarion Médecine Science; 2001: 259-266

- 116. Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan MP. Apoptosis and necrosis: mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. Kidney Int 1998; 54: 1955-1966
- 117. van der Toorn M, Kauffman HF, van der Deen M, Slebos DJ, Koeter GH, Gans RO, Bakker SJ. Cyclosporin A-induced oxidative stress is not the consequence of an increase in mitochondrial membrane potential. FEBS J 2007; 274: 3003-3012
- Xiao Z, Shan J, Li C, Luo L, Lu J, Li S, Long D, Li Y. Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review. Am J Nephrol 2013; 37: 30-40
- Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. Am J Pathol 2005; 167: 395-407
- 120. Karie S, Launay-Vacher V, Deray G, Isnard-Bagnis C. Toxicité rénale des médicaments. Néphrologie & Thérapeutique 2010; 6: 58-74
- Amet S, Zimner-Rapuch S. Toxicité rénale des produits de contraste iodés. La Lettre d'ICAR en néphrologie 2012; April: 1
- 122. ICAR. Fibrose systémique néphrogénique : un nouvel effet indésirable chez les patients insuffisants rénaux recevant des produits de contraste à base de Gadolinium. La Lettre d'ICAR en néphrologie 2007; May: 1
- Stevens PF. Angiosperm Phylogeny Website. In. 13th ed. St Louis: Missouri Botanical Garden; 2001
- Skidmore-Roth L. Mosby's handbook of Herbs & Natural Supplements. 4th ed. St. Louis: Elsevier; 2010
- Bremness L, Desgranges T, Ward M, Fletcher N, Griggs P. Plantes aromatiques et médicinales. 2nd ed. Paris: Larousse; 2005
- 126. Multiple authors. Encyclopédie des plantes médicinales. 2nd ed. Paris: Dorling Kindersley; 2008
- Fang L, Xiao X-f, Liu C-x, He X. Recent advance in studies on Angelica sinensis. Chinese Herbal Medicines 2012; 4: 12-25
- Chao WW, Lin BF. Bioactivities of major constituents isolated from Angelica sinensis (Danggui). Chin Med 2011; 6: 1-7
- 129. Chen XP, Li W, Xiao XF, Zhang LL, Liu CX. Phytochemical and pharmacological studies on Radix Angelicae sinensis. Chin J Nat Med 2013; 11: 577-587
- 130. Hook IL. Danggui to Angelica sinensis root: are potential benefits to European women lost in translation? A review. J Ethnopharmacol 2014; 152: 1-13
- Low Dog T. Menopause: A review of botanical dietary supplements. Am J Med 2005; 118 Suppl 12B: 98-108
- Zhao Z, Moghadasian MH. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. Food Chem 2008; 109: 691–702
- Wojcikowski K, Wohlmuth H, Johnson DW, Rolfe M, Gobe G. An *in vitro* investigation of herbs traditionally used for kidney and urinary system disorders: potential therapeutic and toxic effects. Nephrology 2009; 14: 70-79
- Li X, Wang H. Chinese herbal medicine in the treatment of chronic kidney disease. Adv Chronic Kidney Dis 2005; 12: 276-281
- Wang H, Li J, Yu L, Zhao Y, Ding W. Antifibrotic effect of the Chinese herbs, Astragalus mongholicus and Angelica sinensis, in a rat model of chronic puromycin aminonucleoside nephrosis. Life Sci 2004; 74: 1645-1658
- 136. Meng LQ, Tang JW, Wang Y, Zhao JR, Shang MY, Zhang M, Liu SY, Qu L, Cai SQ, Li XM. Astragaloside IV synergizes with ferulic acid to inhibit renal tubulointerstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy. Br J Pharmacol 2011; 162: 1805-1818
- 137. Song J, Meng L, Li S, Qu L, Li X. A combination of Chinese herbs, Astragalus membranaceus var. mongholicus and Angelica sinensis, improved renal microvascular insufficiency in 5/6 nephrectomized rats. Vascul Pharmacol 2009; 50: 185-193
- 138. Cai Q, Li X, Wang H. Astragali and Angelica protect the kidney against ischemia and reperfusion injury and accelerate recovery. Chin Med J (Engl) 2001; 114: 119-123
- Davydov M, Krikorian AD. Eleutherococcus senticosus (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. J Ethnopharmacol 2000; 72: 345-393
- WHO. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Geneva: World Health Organization; 2004
- 141. eFloras. Flora of North America. In. St. Louis: Missouri Botanical Garden; 2008
- 142. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg: Tec & Doc; 2013
- Apers S, Naessens T, Van Miert S, Pieters L, Vlietinck A. Quality control of roots of Eleutherococcus senticosus by HPLC. Phytochem Anal 2005; 16: 55-60
- 144. Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 4th ed. Paris; 2009
- Huang L, Zhao H, Huang B, Zheng C, Peng W, Qin L. Acanthopanax senticosus: review of botany, chemistry and pharmacology. Pharmazie 2011; 66: 83-97
- 146. HMPC (Committee on herbal medicinal products). Community herbal monograph on Eleutherococcus senticosus (Rurp. et Maxim.) Maxim., Radix. 2008. In: Herbal medicines for human use, EMEA: European Medicines Agency, London. Ref. EMEA/HMPC/244569/2006
- 147. Awang DV. Maternal use of ginseng and neonatal androgenization. JAMA 1991; 266: 363
- Donovan JL, DeVane CL, Chavin KD, Taylor RM, Markowitz JS. Siberian ginseng (*Eleutheroccus senticosus*) effects on CYP2D6 and CYP3A4 activity in normal volunteers. Drug Metab Dispos 2003; 31: 519-522
- McRae S. Elevated serum digoxin levels in a patient taking digoxin and Siberian ginseng. CMAJ 1996; 155: 293-295
- 150. Awang DV. Siberian ginseng toxicity may be case of mistaken identity. CMAJ 1996; 155: 1237
- Yokozawa T, Rhyu DY, Chen CP. Protective effects of Acanthopanax Radix extract against endotoxemia induced by lipopolysaccharide. Phytother Res 2003; 17: 353-357
- 152. Gong X, Zhang L, Jiang R, Wang CD, Yin XR, Wan JY. Hepatoprotective effects of syringin on fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. J Appl Toxicol 2014; 34: 265-271
- Lee S, Son D, Ryu J, Lee YS, Jung SH, Kang J, Lee SY, Kim HS, Shin KH. Antioxidant activities of Acanthopanax senticosus stems and their lignan components. Archives of pharmacal research 2004; 27: 106-110
- 154. Smalinskiene A, Lesauskaite V, Zitkevicius V, Savickiene N, Savickas A, Ryselis S, Sadauskiene I, Ivanov L. Estimation of the combined effect of *Eleutherococcus senticosus* extract and cadmium on liver cells. Ann N Y Acad Sci 2009; 1171: 314-320
- Lee D, Park J, Yoon J, Kim MY, Choi HY, Kim H. Neuroprotective effects of *Eleutherococcus* senticosus bark on transient global cerebral ischemia in rats. J Ethnopharmacol 2012; 139: 6-11
- 156. Kitts D, Hu C. Efficacy and safety of ginseng. Public Health Nutr 2000; 3: 473-485
- CITES (Russian Federation). Inclusion in Appendix II of roots of *Panax ginseng*. 1999. In: Moscow.
- Kang KS, Kim HY, Yamabe N, Nagai R, Yokozawa T. Protective effect of sun ginseng against diabetic renal damage. Biol Pharm Bull 2006; 29: 1678-1684
- Fuzzati N, Gabetta B, Jayakar K, Pace R, Peterlongo F. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in *Panax ginseng* roots. J Chromatogr A 1999; 854: 69-79
- Jia L, Zhao Y. Current evaluation of the millennium phytomedicine ginseng (I): etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations. Curr Med Chem 2009; 16: 2475-2484
- Fuzzati N. Analysis methods of ginsenosides. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2004; 812: 119-133
- Kite GC, Howes MJ, Leon CJ, Simmonds MS. Liquid chromatography/mass spectrometry of malonyl-ginsenosides in the authentication of ginseng. Rapid Commun Mass Spectrom 2003; 17: 238-244
- Shi W, Wang Y, Li J, Zhang H, Ding L. Investigation of ginsenosides in different parts and ages of Panax ginseng. Food Chem 2007; 102: 664-668

- Kim DH. Chemical diversity of Panax ginseng, Panax quinquefolium, and Panax notoginseng. J Ginseng Res 2012; 36: 1-15
- Huh BH, Lee IR, Han BH. Lingans from Korean Red Ginseng. Archives of pharmacal research 1990; 13: 278-281
- 166. Cecchini T. Encyclopédie des plantes médicinales. Paris: Grafiche Milani; 2004
- Nocerino E, Amato M, Izzo AA. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. Fitoterapia 2000; 71 Suppl 1: S1-5
- 168. Jia L, Zhao Y, Liang XJ. Current evaluation of the millennium phytomedicine ginseng (II): Collected chemical entities, modern pharmacology, and clinical applications emanated from traditional Chinese medicine. Curr Med Chem 2009; 16: 2924-2942
- Cui J, Garle M, Eneroth P, Bjorkhem I. What do commercial ginseng preparations contain? Lancet 1994; 344: 134
- Li L, Sheng YX, Zhang JL, Wang SS, Guo DA. High-performance liquid chromatographic assay for the active saponins from *Panax notoginseng* in rat tissues. Biomed Chromatogr 2006; 20: 327-335
- 171. Liu H, Yang J, Du F, Gao X, Ma X, Huang Y, Xu F, Niu W, Wang F, Mao Y, Sun Y, Lu T, Liu C, Zhang B, Li C. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats. Drug Metab Dispos 2009; 37: 2290-2298
- 172. Elmer GW, Lafferty WE, Tyree PT, Lind BK. Potential interactions between complementary/alternative products and conventional medicines in a Medicare population. Ann Pharmacother 2007; 41: 1617-1624
- Han SW, Kim H. Ginsenosides stimulate endogenous production of nitric oxide in rat kidney. Int J Biochem Cell Biol 1996; 28: 573-580
- Zhang MH, Fan JM, Xie XS, Chen YP, Zhen R, Li J, Cheng Y, Wen J. Ginsenoside-Rg1 protects podocytes from complement mediated injury. J Ethnopharmacol 2011; 137: 99-107
- Im GJ, Chang JW, Choi J, Chae SW, Ko EJ, Jung HH. Protective effect of Korean red ginseng extract on cisplatin ototoxicity in HEI-OC1 auditory cells. Phytother Res 2010; 24: 614-621
- Baek SH, Piao XL, Lee UJ, Kim HY, Park JH. Reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by ginsenosides isolated from processed ginseng in cultured renal tubular cells. Biol Pharm Bull 2006; 29: 2051-2055
- 177. Liu SJ, Zhou SW. Panax notoginseng saponins attenuated cisplatin-induced nephrotoxicity. Acta Pharmacol Sin 2000; 21: 257-260
- Yokozawa T, Liu ZW. The role of ginsenoside-Rd in cisplatin-induced acute renal failure. Ren Fail 2000; 22: 115-127
- Yokozawa T, Zhou JJ, Hattori M, Inaba S, Okada T, Oura H. Effects of ginseng in nephrectomized rats. Biol Pharm Bull 1994; 17: 1485-1489
- Yokozawa T, Liu ZW, Dong E. A study of ginsenoside-Rd in a renal ischemia-reperfusion model. Nephron 1998; 78: 201-206
- Yokozawa T, Dong E. Role of ginsenoside-Rd in cisplatin-induced renal injury: special reference to DNA fragmentation. Nephron 2001; 89: 433-438
- 182. Xie XS, Yang M, Liu HC, Zuo C, Li Z, Deng Y, Fan JM. Influence of ginsenoside Rg1, a panaxatriol saponin from *Panax notoginseng*, on renal fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. J Zhejiang Univ Sci B 2008; 9: 885-894
- 183. Xie XS, Yang M, Liu HC, Zuo C, Li HJ, Fan JM. Ginsenoside Rg1, a major active component isolated from *Panax notoginseng*, restrains tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro. J Ethnopharmacol 2009; 122: 35-41
- Quan HY, Kim do Y, Chung SH. Korean red ginseng extract alleviates advanced glycation end product-mediated renal injury. J Ginseng Res 2013; 37: 187-193
- 185. Kalkan Y, Kapakin KA, Kara A, Atabay T, Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Can I, Yildirim S, Ozkanlar S, Sengul E. Protective effect of *Panax ginseng* against serum biochemical changes and apoptosis in kidney of rats treated with gentamicin sulphate. J Mol Histol 2012; 43: 603-613

- Hancke JL, Burgos RA, Ahumada F. Schisandra chinensis (Turcz.) Baill. Fitoterapia 1999; 70: 451-471
- Zhukovich EN, Bokareva SY, Sharikova LA, Pribytkova TF, Semenova MY, Korovina LM. Biologically active lignans in extract and seeds of *Schizandra chinensis*. Pharmaceutical Chemistry Journal 2007; 41: 94-96
- Panossian A, Wikman G. Pharmacology of Schisandra chinensis Bail.: an overview of Russian research and uses in medicine. J Ethnopharmacol 2008; 118: 183-212
- 189. Xu M, Wang G, Xie H, Huang Q, Wang W, Jia Y. Pharmacokinetic comparisons of schizandrin after oral administration of schizandrin monomer, Fructus Schisandrae aqueous extract and Sheng-Mai-San to rats. J Ethnopharmacol 2008; 115: 483-488
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J 2008; 22: 659-661
- Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, Hiratsuka A, Watabe T. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in schisandra fruit extract. Drug Metab Dispos 2004; 32: 1351-1358
- 192. Lam PY, Chiu PY, Leung HY, Chen N, Leong PK, Ko KM. Schisandrin B co-treatment ameliorates the impairment on mitochondrial antioxidant status in various tissues of long-term ethanol treated rats. Fitoterapia 2010; 81: 1239-1245
- Jeong SI, Kim SJ, Kwon TH, Yu KY, Kim SY. Schizandrin prevents damage of murine mesangial cells via blocking NADPH oxidase-induced ROS signaling in high glucose. Food Chem Toxicol 2012; 50: 1045-1053
- 194. Park EJ, Chun JN, Kim SH, Kim CY, Lee HJ, Kim HK, Park JK, Lee SW, So I, Jeon JH. Schisandrin B suppresses TGF-β1 signaling by inhibiting Smad2/3 and MAPK pathways. Biochem Pharmacol 2012; 83: 378-384
- Stacchiotti A, Li Volti G, Lavazza A, Schena I, Aleo MF, Rodella LF, Rezzani R. Different role of schisandrin B on mercury-induced renal damage in vivo and in vitro. Toxicology 2011; 286: 48-57
- 196. Checker R, Patwardhan RS, Sharma D, Menon J, Thoh M, Bhilwade HN, Konishi T, Sandur SK. Schisandrin B exhibits anti-inflammatory activity through modulation of the redox-sensitive transcription factors Nrf2 and NF-kappaB. Free Radic Biol Med 2012; 53: 1421-1430
- Zhu S, Wang Y, Chen M, Jin J, Qiu Y, Huang M, Huang Z. Protective effect of schisandrin B against cyclosporine A-induced nephrotoxicity *in vitro* and *in vivo*. Am J Chin Med 2012; 40: 551-566
- 198. Chiu PY, Leung HY, Ko KM. Schisandrin B enhances renal mitochondrial antioxidant status, functional and structural integrity, and protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Biol Pharm Bull 2008; 31: 602-605
- 199. Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. Phytother Res 2010; 24: 1423-1432
- Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin new effects and applications. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2005; 149: 29-41
- Tsai JH, Liu JY, Wu TT, Ho PC, Huang CY, Shyu JC, Hsieh YS, Tsai CC, Liu YC. Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. J Viral Hepat 2008; 15: 508-514
- Fehrenbach T, Cui Y, Faulstich H, Keppler D. Characterization of the transport of the bicyclic peptide phalloidin by human hepatic transport proteins. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2003; 368: 415-420
- Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R. Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290: 1375-1383
- 204. Ninsontia C, Pongjit K, Chaotham C, Chanvorachote P. Silymarin selectively protects human renal cells from cisplatin-induced cell death. Pharm Biol 2011; 49: 1082-1090
- Hu Q, Noor M, Wong YF, Hylands PJ, Simmonds MS, Xu Q, Jiang D, Hendry BM. In vitro antifibrotic activities of herbal compounds and herbs. Nephrol Dial Transplant 2009; 24: 3033-3041

- 206. Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Kohler H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. Arch Toxicol 1998; 72: 536-540
- Dashti-Khavidaki S, Shahbazi F, Khalili H, Lessan-Pezeshki M. Potential renoprotective effects of silymarin against nephrotoxic drugs: a review of literature. J Pharm Pharm Sci 2012; 15: 112-123
- Gaedeke J, Fels LM, Bokemeyer C, Mengs U, Stolte H, Lentzen H. Cisplatin nephrotoxicity and protection by silibinin. Nephrol Dial Transplant 1996; 11: 55-62
- 209. Rastogi R, Srivastava AK, Rastogi AK. Long term effect of aflatoxin B1 on lipid peroxidation in rat liver and kidney: effect of picroliv and silymarin. Phytother Res 2001; 15: 307-310
- He Q, Riley RT, Sharma RP. Pharmacological antagonism of fumonisin B1 cytotoxicity in porcine renal epithelial cells (LLC-PK1): a model for reducing fumonisin-induced nephrotoxicity in vivo. Pharmacol Toxicol 2002; 90: 268-277
- Bokemeyer C, Fels LM, Dunn T, Voigt W, Gaedeke J, Schmoll HJ, Stolte H, Lentzen H. Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. Br J Cancer 1996; 74: 2036-2041
- 212. Yan R, Ko NL, Li SL, Tam YK, Lin G. Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in Rhizoma Chuanxiong, in the rat. Drug Metab Dispos 2008; 36: 400-408
- 213. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT Food Science and Technology 1995; 28: 25-30
- 214. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 2004; 26: 211-219
- Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. Kidney Int 1994; 45: 48-57
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55-63
- Yu HG, Chung H, Yu YS, Seo JM, Heo JW. A new rapid and non-radioactive assay for monitoring and determining the proliferation of retinal pigment epithelial cells. Korean J Ophthalmol 2003; 17: 29-34
- 218. Dienstknecht T, Ehehalt K, Jenei-Lanzl Z, Zellner J, Muller M, Berner A, Nerlich M, Angele P. Resazurin dye as a reliable tool for determination of cell number and viability in mesenchymal stem cell culture. Bull Exp Biol Med 2010; 150: 157-159
- 219. Saotome K, Morita H, Umeda M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. Toxicol In Vitro 1989; 3: 317-321
- 220. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. Biol Pharm Bull 1996; 19: 1518-1520
- Bunel V, Ouedraogo M, Nguyen AT, Stévigny C, Duez P. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. Planta Med 2014; 80: 1210-1226
- 222. Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochim Biophys Acta 1963; 77: 383-393
- 223. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys 1993; 303: 474-482
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985; 150: 76-85
- 225. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 1995; 184: 39-51

- Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. J Biochem Biophys Methods 2005; 65: 45-80
- 227. Pape L, Henne T, Offner G, Strehlau J, Ehrich JH, Mengel M, Grimm PC. Computer-assisted quantification of fibrosis in chronic allograft nephropaty by picosirius red-staining: a new tool for predicting long-term graft function. Transplantation 2003; 76: 955-958
- 228. Xu Q, Norman JT, Shrivastav S, Lucio-Cazana J, Kopp JB. In vitro models of TGF-beta-induced fibrosis suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents. Am J Physiol Renal Physiol 2007; 293: F631-640
- Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J Clin Invest 2009; 119: 1429-1437
- Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. J Cell Biol 2004; 167: 339-349
- Bozic M, de Rooij J, Parisi E, Ortega MR, Fernandez E, Valdivielso JM. Glutamatergic signaling maintains the epithelial phenotype of proximal tubular cells. J Am Soc Nephrol 2011; 22: 1099-1111
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 2002; 29: 23-39
- 233. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; 25: 402-408
- Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. The cell cycle and acute kidney injury. Kidney Int 2009; 76: 604-613
- Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest 2007; 117: 524-529
- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. Journal of clinical oncology 2005; 23: 7212-7220
- Pozdzik AA, Salmon IJ, Debelle FD, Decaestecker C, Van den Branden C, Verbeelen D, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. Kidney Int 2008; 73: 595-607
- Johnson I, Spence M. The Molecular Probes[®] Handbook. 11th ed. Eugene: Life Technologies; 2010
- Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. Curr Issues Mol Biol 2001; 3: 67-70
- Anonymous. FlowJo, data analysis software for flow cytometry. In: Inc. TS ed, FlowJo Advanced Tutorial. 7.6.2 ed. Ashland: Tree Star Inc.; 2011: 37
- Ruszymah BH, Chowdhury SR, Manan NA, Fong OS, Adenan MI, Saim AB. Aqueous extract of Centella asiatica promotes corneal epithelium wound healing in vitro. J Ethnopharmacol 2012; 140: 333-338
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc 2007; 2: 329-333
- 243. Geback T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. TScratch: A novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. Biotechniques 2009; 46: 265-274
- Valcu M, Valcu CM. Data transformation practices in biomedical sciences. Nat Methods 2011; 8: 104-105
- 245. Buckingham SD. Stats for the stupified. Lab Times 2011; 2011: 55-56
- Ruxton GD, Beauchamp G. Time for some a priori thinking about post-hoc testing. Behav Ecol 2008; 19: 690-693
- Yi L, Liang Y, Wu H, Yuan D. The analysis of Radix Angelicae Sinensis (Danggui). J Chromatogr A 2009; 1216: 1991-2001
- 248. Bunel V, Antoine MH, Nortier J, Duez P, Stevigny C. Potential nephroprotective effects of the Chinese herb Angelica sinensis against cisplatin tubulotoxicity. Pharm Biol 2014; [Accepted for publication]:

- 249. Bunel V, Antoine MH, Nortier J, Duez P, Stevigny C. In vitro effects of Panax ginseng in aristolochic acid-mediated renal tubulotoxicity: apoptosis versus regeneration. Planta Med 2014:
- 250. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. Toxicol In Vitro 2004; 18: 703-710
- 251. Ye YN, Koo MW, Li Y, Matsui H, Cho CH. *Angelica sinensis* modulates migration and proliferation of gastric epithelial cells. Life Sci 2001; 68: 961-968
- 252. Yang WJ, Li DP, Li JK, Li MH, Chen YL, Zhang PZ. Synergistic antioxidant activities of eight traditional Chinese herb pairs. Biol Pharm Bull 2009; 32: 1021-1026
- 253. Yu F, Li H, Meng Y, Yang D. Extraction optimization of *Angelica sinensis* polysaccharides and its antioxidant activity *in vivo*. Carbohydr Polym 2013; 94: 114-119
- 254. Saw CL, Wu Q, Su ZY, Wang H, Yang Y, Xu X, Huang Y, Khor TO, Kong AN. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammation. Biopharm Drug Dispos 2013; 34: 303-311
- 255. Dietz BM, Liu D, Hagos GK, Yao P, Schinkovitz A, Pro SM, Deng S, Farnsworth NR, Pauli GF, van Breemen RB, Bolton JL. Angelica sinensis and its alkylphthalides induce the detoxification enzyme NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 by alkylating Keap1. Chem Res Toxicol 2008; 21: 1939-1948
- Liu Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. Kidney Int 2006; 69: 213-217
- 257. Hao S, He W, Li Y, Ding H, Hou Y, Nie J, Hou FF, Kahn M, Liu Y. Targeted inhibition of βcatenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol 2011; 22: 1642-1653
- He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. Blockade of Wnt/beta-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. J Am Soc Nephrol 2011; 22: 90-103
- 259. Majewska I, Gendaszewska-Darmach E. Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing a new face of old phytomedicines. Acta Biochim Pol 2011; 58: 449-460
- Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. J Am Soc Nephrol 2010; 21: 212-222
- 261. Hsiao CY, Hung CY, Tsai TH, Chak KF. A study of the wound healing mechanism of a Traditional Chinese Medicine, Angelica sinensis, using a proteomic approach. Evid Based Complement Alternat Med 2012; 2012: 1-14
- 262. Bucaloiu ID, Kirchner HL, Norfolk ER, Hartle JE, Perkins RM. Increased risk of death and *de novo* chronic kidney disease following reversible acute kidney injury. Kidney Int 2012; 81: 477-485
- 263. Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed: Mc Graw Hill; 1996
- 264. Mancuso C, Santangelo R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. Food Chem Toxicol 2014; 65: 185-195
- Peng B, Zhao P, Lu YP, Chen MM, Sun H, Wu XM, Zhu L. Z-ligustilide activates the Nrf2/HO-1 pathway and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury *in vivo* and *in vitro*. Brain Res 2013; 1520: 168-177
- Guo Y, Wu XQ, Zhang C, Liao ZX, Wu Y, Wang H. Protective effect of sodium ferulate on acetaldehyde-treated precision-cut rat liver slices. J Med Food 2012; 15: 557-562
- Rukkumani R, Priyanka A, Sankar P, Menon VP. Ferulic acid influences hepatic expression pattern of matrix metalloproteinases during alcohol and PUFA induced toxicity. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2012; 16: 2147-2153

Annexes

Les annexes sont constituées par les graphiques correspondant aux résultats non détaillés, mais résumés sous forme de tabeaux à la section 4.3. Recherche d'effets néphroprotecteurs des extraits bruts.

Autres résultats obtenus pour l'extrait AS

Mesures de viabilité

Survie cellulaire globale

Les graphiques ci-dessous font apparaître un effet bénéfique de l'extrait AS sur la survie lors d'un traitement par les AA, mais pas avec la CsA.



Figure 87 : viabilité cellulaire mesurée à l'aide du test à la résazurine après incubation des cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation du taux d'apoptose

L'extrait AS n'a pas permis de réduire l'apoptose induite par les AA ; toutefois, celle-ci est réprimée pour des traitements par CisPt et CsA et ce pour les deux doses testées (50 et 5 µg/ml).



Figure 88 : proportions de cellules HK-2 en apoptose (phases précoce + tardive) après traitement pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n = 3 pour AA / n 4 pour CsA) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation du statut oxydatif

L'extrait AS n'a pas été en mesure de réduire l'intensité du stress oxydatif généré ni par le traitement aux AA, ni par un traitement au CisPt.



Figure 89 : intensités de fluorescence mesurées après oxydation du H₂DCF-DA et dosage par cytométrie de flux de cellules HK-2 traitées pendant 48 h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Détermination de la quantité de collagène

L'extrait AS s'est montré capable de limiter la production de collagène induite par les AA et le CisPt, mais pas par la CsA.



Figure 90 : production de collagène mesurée par la méthode au PSR pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Relocalisation de la β-caténine

β-caténine membranaire

L'extrait AS, qui s'était montré actif dans le maintien du phénotype épithélial des cellules lors d'un co-traitement avec le CisPt, n'a pas été efficace dans des modèles incluant les AA ou la CSA.



Figure 91 : signaux de fluorescence mesurés pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester et marquées par immunofluorescence. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 3) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

β-caténine nucléaire

Tout comme pour le traitement au CisPt, l'ajout concomitant d'extrait AS lors d'une exposition des cellules aux AA permet de réduire la quantité de β-caténine nucléaire.



Figure 92 : quantification de la β-caténine nucléaire par cytométrie de flux après traitement de 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; vs. Ctrl).

Résultats obtenus pour l'extrait ES

Mesures de viabilité

Survie cellulaire globale

Aucun effet bénéfique n'a été observé pour l'extrait ES ; il renforce la mortalité induite par les AA ou la CsA.



Figure 93 : viabilités cellulaires mesurées à l'aide du test à la résazurine après incubation des cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester et présentées sous forme de moyennes ± ET (n = 4) (** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation du taux d'apoptose

L'extrait ES renforce l'apoptose induite par les AA. Au contraire, il diminue la proportion de cellules apoptotiques lors d'un traitement par le CisPt. Aucun effet n'a pu être observé lors d'un traitement à la CsA.



Figure 94 : proportion de cellules HK-2 en apoptose (phases précoce + tardive) après traitement pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n = 3 pour AA / n = 4 pour CsA) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation du statut oxydatif

L'extrait ES, à la dose de 50 μ g/ml, a permis de limiter le stress oxydatif induit par traitement aux AA et au CisPt. Un effet antioxydant est également observé à 5 μ g/ml, mais celui-ci n'est pas statistiquement significatif.



Figure 95 : intensités de fluorescence mesurées après oxydation du H₂DCF-DA et dosage par cytométrie de flux de cellules HK-2 traitées pendant 48 h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n = 3) (** ; p<0,01 ; *** ; p<0,001 vs. Ctrl).

Détermination de la quantité de collagène

L'extrait ES s'est montré capable de limiter la production de collagène induite par les AA (pour 50 µg/ml seulement) et le CisPt mais pas pour la CsA.





Figure 96 : production de collagène mesurée par la méthode au PSR pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Relocalisation de la β-caténine

β-caténine membranaire

L'extrait ES ne s'est pas montré apte à réduire la perte de β -caténine membranaire lors du traitement et ce pour chacun des 3 toxiques.



Figure 97 : intensités de fluorescence mesurées pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester et marquées par immunofluorescence. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 3) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Etant donné l'absence d'activité, une éventuelle inhibition de la relocalisation nucléaire de βcaténine n'a pas été recherchée.

Recherche d'effets sur la régénération cellulaire

Mesure de l'index Ki-67

L'index Ki-67 a permis de mettre en avant un effet stimulant la prolifération pour ES 50 μ g/ml. Le graphique ci-dessous montre également que les cellules traitées par des AA ou du CisPt connaissent une élévation de leur index Ki-67 du fait de l'arrêt du cycle en phase G₂/M ; la CsA ne provoquant pas de blocage ne modifie pas l'index Ki-67.



Figure 98 : index Ki-67 pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Etant donné les effets positifs du traitement par l'extrait ES à 50 μg/ml, les principes actifs de l'éleuthérocoque ont été testés. L'éleuthéroside B n'a pas permis d'induire la prolifération cellulaire, au contraire de l'éleuthéroside E.



Figure 99 : index Ki-67 pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation des phases du cycle cellulaire

Les profils de distribution des phases du cycle cellulaire obtenus pour les AA et pour le CisPt sont similaires, et sont associés à une forte diminution du nombre de cellules en phase G_0/G_1 ainsi qu'à une forte augmentation des cellules en phase G_2/M . Les profils obtenus avec l'extrait ES sont intermédiaires à ceux observés pour les conditions contrôle et FBS.



Figure 100 : distribution des phases du cycle cellulaire après traitement de cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Estimation de la vitesse de migration

L'extrait ES a permis d'améliorer la vitesse de migration cellulaire aux 2 doses testées.





Etant donnés les résultats positifs, les effets potentiels des 2 principes actifs supposés majeurs, les éleuthérosides B et E, ont été recherchés. Les doses employées ont été choisies comme les concentrations correspondant à des traitements de 50 ou 5 µg/ml d'extrait brut. Seul l'éleuthéroside E s'est montré actif pour stimuler la migration cellulaire.





Résultats obtenus pour l'extrait PG

Mesures de viabilité

Survie cellulaire globale

Aucun effet bénéfique n'a été observé pour l'extrait PG ; la plus forte dose de ginseng (50 μg/ml) renforce même la mortalité induite par les 3 toxiques. Ceci a été étudié plus en détails pour les AA au travers d'une évaluation de la viabilité après 3 temps d'incubation.





Figure 103 : viabilité cellulaire mesurée à l'aide du test à la résazurine après incubation des cellules HK-2 avec les substances à tester pendant 24, 48 ou 72 h pour les AA ou 48 h pour le CisPt ou la CsA. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation du taux d'apoptose

Etant donné l'aggravation de la viabilité cellulaire observée ci-avant pour un co-traitement impliquant des AA et du PG 50 µg/ml, les taux d'apoptose ont également été déterminés pour cette combinaison à 3 temps d'incubation distincts. De plus, les 2 doses de ginseng semblent limiter l'apoptose induite par la CsA ; un effet semblable est remarqué pour la dose de 5 µg/ml lors d'un traitement au CisPt, mais pas à 50 µg/ml.



Viable
Phase précoce d'apoptose
Phase tardive d'apoptose
Nécrose



Figure 104 : proportion de cellules HK-2 viables, en apoptose (phases précoce + tardive), ou en nécrose après traitement pendant 24, 48 ou 72 h avec les substances à tester (pour la combinaison AA + PG). Les graphiques correspondant au CisPt ou à la CsA ne montrent que les cellules en apoptose (phases précoce + tardive) après 48 h de traitement. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n = 3 pour AA / n = 4 pour CisPt et CsA) (***: p<0,001; * : p<0,05; **: p<0.01: *** : p<0.001).

Evaluation du statut oxydatif

L'extrait PG s'est avéré capable de limiter le stress oxydatif engendré par le traitement des cellules par les AA, mais pas par le CisPt.



Figure 105 : intensités de fluorescence mesurées après oxydation du H2DCF-DA et dosage par cytométrie de flux de cellules HK-2 traitées pendant 24 ou 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl / ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. CisPt).

Détermination de la quantité de collagène

L'extrait PG a permis des diminutions de sécrétion de collagène lorsque les cellules étaient traitées simultanément par des AA ou de la CsA : cet effet n'a toutefois été observé que pour la dose de 5 µg/ml. Aucune activité n'a été notée lors d'un traitement par le CisPt.



Figure 106 : production de collagène mesurée par la méthode au PSR pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl)

Relocalisation de la β-caténine

β-caténine membranaire

L'extrait PG ne s'est pas montré apte à réduire la perte de β-caténine membranaire lors du traitement et ce pour chacun des 3 toxiques.



xxiv



Figure 107 : intensités de fluorescence mesurées pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester et marquées par immunofluorescence. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 3) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

De plus, les effets du ginseng ont été investigués sur l'acquisition de β -caténine membranaire au cours du temps (Figure 108). Les cellules ont été incubées avec les substances à tester en milieu contenant du FBS (au contraire de l'expérience précédente) jusqu'à 24 h avant la fin de l'incubation. L'extrait PG s'est ainsi révélé capable de promouvoir de manière importante l'acquisition de β -caténine membranaire, et donc du phénotype épithélial. Ceci doit être rapproché d'une plus grande densité cellulaire lors de l'ajout de ginseng : les contacts et jonctions intercellulaires pourraient ainsi favoriser la présence de β -caténine au niveau membranaire.





Figure 108 : immunomarquage évaluant l'expression de β-caténine après 24, 48 ou 72 h de traitement (grossissement 400X).

β-caténine nucléaire

Lors d'un traitement de cellules HK-2 par des AA, l'extrait PG n'a pas permis de limiter la relocalisation de β-caténine vers le noyau. Les combinaisons incluant le CisPt ou la CsA n'ont pas été testées étant donné l'absence d'activité observée dans les expériences précédentes.



Figure 109 : quantification de la β-caténine nucléaire par cytométrie de flux après traitement des cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Recherche d'effets sur la régénération cellulaire

Calcul de l'index Ki-67

L'extrait PG a été capable d'augmenter l'index Ki-67. A nouveau, une analyse de cycles cellulaires a été entreprise afin de vérifier qu'il ne s'agissait pas d'un blocage des cellules en phase G₂/M.



Figure 110 : index Ki-67 de cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Etant donné que le ginseng a montré des résultats positifs, les effets potentiels de 3 de ses principes actifs, les ginsénosides, ont été recherchés. Les doses employées ont été choisies comme les concentrations correspondant à des traitements de 50 ou 5 µg/ml d'extrait brut. Parmi ceux-ci, seuls le ginsénoside Rb2 a permis d'élever l'index Ki-67 et ce aux deux doses testées.



Figure 111 : index Ki-67 de cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation des phases du cycle cellulaire

La comparaison des profils obtenus ne montre pas d'arrêt du cycle cellulaire lorsque les cellules sont traitées par l'extrait PG.



Figure 112 : distribution des phases du cycle cellulaire après traitement de cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

La même démarche a été appliquée à des cellules traitées concomitamment par des AA et l'extrait PG. Aucune réduction du nombre de cellules arrêtées en phase G2/M n'a pu être observée.



Figure 113 : distribution des phases du cycle cellulaire après traitement de cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Estimation de la vitesse de migration

L'extrait PG, aux 2 doses testées, a permis d'améliorer la migration de cellules.



Figure 114 : vitesses de migration déterminées selon le *scratch assay*. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl)

Résultats obtenus pour les principes actifs Schi et Schi B

Mesures de viabilité

Survie cellulaire globale

La schisandrine B a pu protéger les cellules HK-2 de la mortalité induite par les AA et par le CisPt. La schisandrine n'a été active que vis-à-vis du CisPt.



Figure 115 : viabilité cellulaire mesurée à l'aide du test à la résazurine après incubation des cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (* : p<0,05 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation du taux d'apoptose

L'évaluation des taux d'apoptose a permis de mettre en évidence un léger effet inhibiteur des 2 molécules testées vis-à-vis des AA et du CisPt.



Figure 116 : proportion de cellules HK-2 en apoptose (phases précoce + tardive) après traitement pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Détermination de la quantité de collagène

Les 2 molécules testées se sont montrées capables de limiter la production de collagène induite par les AA et le CisPt, mais n'ont pas modifié les taux lors d'un traitement par la CsA.





Figure 117 : production de collagène mesurée par la méthode au PSR pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Relocalisation de la β-caténine

β-caténine membranaire

Les 2 molécules, Schi et Schi B, sont capables de s'opposer à la perte de β-caténine membranaire induite par exposition de cellules HK-2 au CisPt. Elles n'ont cependant montré aucun effet lors d'un traitement par les AA.



Figure 118 : intensités de fluorescence mesurées pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester et marquées par immunofluorescence. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 3) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

β-caténine nucléaire

Les résultats précédents ayant mis en évidence une limitation de la perte de β -caténine membranaire lors d'un traitement par le CisPt, la recherche d'effets sur la relocalisation de la protéine au niveau nucléaire a été entreprise et a permis de démontrer un effet inhibiteur pour les 2 molécules testées.



Figure 119 : quantification de la β-caténine nucléaire par cytométrie de flux après traitement des cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 5) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 vs. Ctrl).

Recherche d'effets sur la régénération cellulaire

Mesure de l'index Ki-67

Parmi les 2 molécules testées, seule la schisandrine a été capable de stimuler la prolifération cellulaire.



Figure 120 : index Ki-67 des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation des phases du cycle cellulaire

La comparaison des profils obtenus ne montre pas d'arrêt du cycle cellulaire lorsque les cellules sont traitées par de la schisandrine ou de la schisandrine B.



Figure 121 : distribution des phases du cycle cellulaire après traitement de cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Estimation de la vitesse de migration

Aucune des 2 molécules testées n'a permis d'améliorer la motilité des cellules HK-2.



Figure 122 : vitesses de migration déterminées selon le *scratch assay*. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl)

Résultats obtenus pour l'extrait SM

Mesures de viabilité

Survie cellulaire globale

L'extrait SM a permis de réduire la mortalité induite par les AA, mais pas par le CisPt ou la CsA.



Figure 123 : viabilité cellulaire mesurée à l'aide du test à la résazurine après incubation des cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET de 4 expériences indépendantes (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Evaluation du taux d'apoptose

L'extrait SM a permis une diminution du taux de cellules apoptotiques pour les 3 substances néphrotoxiques. Ceci va toutefois à l'encontre des résultats concernant la survie cellulaire qui n'ont pas mis en évidence de réduction de la mortalité. D'autres mécanismes intervenant dans la perte de cellules sont donc à suspecter.



xxxiv





Evaluation du statut oxydatif

L'extrait de chardon marie ne permet pas de diminuer l'intensité du stress oxydatif généré par les traitements aux AA ou au CisPt.



Figure 125 : intensités de fluorescence mesurées après oxydation du H₂DCF-DA et dosage par cytométrie de flux de cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n = 4) (*** : p<0,001 vs. Ctrl).

Détermination de la quantité de collagène

L'extrait SM a été la substance la plus efficace pour s'opposer à la synthèse de collagène : il a permis d'en limiter la quantité après traitement par chacun des 3 toxiques.



Figure 126 : production de collagène mesurée par la méthode au PSR pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl)

Relocalisation de la β-caténine

β-caténine membranaire

L'extrait SM a été efficace vis-à-vis des 3 substances toxiques pour limiter la perte de β-caténine membranaire, et permettrait donc de promouvoir le maintien du phénotype épithélial des cellules HK-2.



xxxvi



Figure 127 : intensités de fluorescence mesurées pour des cellules HK-2 traitées pendant 48 h avec les substances à tester et marquées par immunofluorescence. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± ET (n= 3) (** : p<0,01 ; *** : p<0,001

β-caténine nucléaire

L'extrait SM a permis de réduire la quantité de β -caténine sous forme nucléaire pour des traitements aux AA et au CisPt.



Figure 128 : quantification de la β-caténine nucléaire par cytométrie de flux après traitement des cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Recherche d'effets sur la régénération cellulaire

Calcul de l'index Ki-67

L'extrait SM permet une augmentation de la prolifération des cellules HK-2, conformément aux données rapportées dans la littérature (cf. 1.4.5.5. Potentiel néphroprotecteur).





Evaluation des phases du cycle cellulaire

A nouveau, par comparaison des profils obtenus, l'extrait SM induit des modifications dans les phases du cycle cellulaire intermédiaires à celles observées pour les conditions contrôle et FBS.



Figure 130 : distribution des phases du cycle cellulaire après traitement de cellules HK-2 pendant 48 h avec les substances à tester. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± ET (n = 4) (* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 vs. Ctrl).

Estimation de la vitesse de migration

L'extrait SM a permis une augmentation de la vitesse de migration cellulaire lors du scratch assay.





Publications

Publications

- Bunel V., Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., Nephroprotective effects of ferulic acid, Z-ligustilide and E-ligustilide isolated from Angelica sinensis against cisplatin toxicity in vitro, Toxicology in vitro, [Accepted for publication].
- Bunel V., Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., In vitro effects of Panax ginseng in aristolochic acid-mediated renal tubulotoxicity: apoptosis versus proliferation, Planta Medica, [Accepted for publication].
- Bunel V., Hamel M., Duez P., Stévigny C., Artifactual generation of an alkaloid in the course of Mondia whitei (Hook.f.) Skeels roots extraction: a clue to endogenous-formed bioactive compounds?, Phytochemistry letters, 2014; 10: 101-116.
- Bunel V., Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., Potential nephroprotective effects of the Chinese herb Angelica sinensis against cisplatin tubulotoxicity, Pharmaceutical Biology [In press].
- Bunel V., Ouedraogo M., Nguyen A. T., Stévigny C., Duez P., Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. Planta Medica, 2014; 80 (14): 1210-26.
- Bunel V., Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., Protective effects of schizandrin and schizandrin B towards cisplatin nephrotoxicity in vitro, Journal of Applied Toxicology, 2014; 34 (12): 1311-9.

Communications

Communications orales

- Yamani A., <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., De Prez E., Husson C., Stévigny C., Elachouri M., Duez P., Nortier J.L., "*Remèdes traditionnels à base d'aristoloches et de bryone dioïque dans le Maroc oriental : risque d'intoxication des populations exposées*", 16^{ème} Réunion Commune de la Société de Néphrologie et de la Société Francophone de Dialyse, Saint-Etienne (France), 03/09-03/10/2014.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "Identification of naturally occurring substances for the prevention of cisplatin-induced kidney injury", Workshop for the establishment of Sino-Belgian collaborations at the Institute of Medicinal Plant Development (IMPLAD), Beijing (China), 22/07/2014.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "Exploration of herbal compounds for preventing CisPt-induced acute kidney injury", 3rd Annual Meeting of the Good Practice in Traditional Chinese Medicine Research Association (GP-TCM RA), Nanjing (China), 18-20/07/2014.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "*In vitro* protective effects of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. active compounds towards cisplatin tubulotoxicity", Annual Meeting of the Belgian Society of Nephrology, Brussels (Belgium), 25/04/2013.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "Involvement of Asian white ginseng in aristolochic acids-mediated nephrotoxicity: a potential herb-herb interaction", VII^{ème} PhD Day of the doctoral schools ULB/UMons, Brussels (Belgium), 16/10/2012.

- Bunel V., Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "Could Panax ginseng prevent aristolochic acids-induced nephrotoxicity?", GP-TCM congress, Leiden University (Netherlands), 16/04/2012.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "In vitro model for assessment of nephrotoxicity and nephroprotection of natural products", 15th Forum of Pharmaceutical Sciences, Belgian Society of Pharmaceutical Sciences, Spa (Belgium), 12/05/2011.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M-H., Nguyen K.Y. T.V., Husson C., Stévigny C., Duez P., Nortier J., "In vitro model assessing early nephrotoxicity of herbal products", Annual Scientific Meeting of the Belgian Society of Nephrology, Brussels (Belgium), 03/03/2011.
- <u>Bunel V.</u>, "Analysis of adaptogenic natural products: bioguided phytochemical caracterisation, pharmacological validation of their effect and toxicity evaluation", WP3 Kick-off meeting: Functional genomics and toxicological studies applied to Traditional Chinese Medicine, GP-TCM consortium, FP7, La Hulpe (Belgium), 25/10/2009.

Posters

- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "Exploration of herbal compounds for preventing CisPt-induced acute kidney injury", 3rd Annual Meeting of the Good Practice in Traditional Chinese Medicine Research Association (GP-TCM RA), Nanjing (China), 18-20/07/2014.
- Nachtergael A., Bunel V., Williamson E.M., Pelkonen O., <u>Duez P.</u>, "Top ten causes that can compromise the safety of herbal medicines", The 3rd Annual Meeting of The Good Practice in Traditional Chinese Medicine Research Association, Nanjing (China), 18-20/07/2014.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "In vitro assessment of the protective activity of Danggui against cisplatin-induced nephrotoxicity", 2nd Annual Meeting of the Good Practice in Traditional Chinese Medicine Research Association, Graz (Austria), 30/08/2013.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "In vitro assessment of the protective activity of Danggui against cisplatin-induced nephrotoxicity", 12th Meeting of the Consortium for Globalization of Chinese Medicine (CGCM), Graz (Austria), 27-29/08/2013.
- <u>Bunel V.</u>, Hamel M., Duez P., Stévigny C., "Formation of alkaloid artifacts may contribute to explain Mondia whitei (Hook.f.) Skeels bioactivity", AFERP & STOLON International Symposium, Brussels (Belgium), 22-24/05/2013.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nguyen V., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "*Quantitative determination of* β-catenin by immunofluorescence microscopy", 12^{ème} Journée des Doctorants en Sciences Biomédicales, Sciences Dentaires, Sciences Médicales, Sciences Pharmaceutiques, Brussels (Belgium), 20/12/2012.
- Bunel V., Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., <u>Stévigny C.</u>, "Protective effect of Angelica sinensis radix against aristolochic acids-induced nephrotoxicity in vitro", 22^{èmes} Journées scientifiques de Stolon, Paris (France), 30-31/08/2012.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "*Danggui: a Chinese herb that could prevent aristolochic acids-mediated nephrotoxicity*", 10^{ème} meeting of the FNRS contact group devoted to oxidative and antioxidative processes, "DNA damages and genotoxicity", Mons (Belgium), 11/05/2012.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nguyen V., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "*Experimental* in vitro approach in detecting early nephrotoxic effects of natural products", 10^{ème} Journée des Doctorants - Sciences Biomédicales, Sciences Dentaires, Sciences Médicales, Sciences Pharmaceutiques, Brussels (Belgium), 23/12/2010.
- <u>Bunel V.</u>, Antoine M.-H., Nguyen V., Nortier J., Duez P., Stévigny C., "*Experimental* in vitro approach in detecting early nephrotoxic effects of natural products", 9th meeting of the FNRS contact group devoted to oxidative and antioxidative processes, "Oxidative stress and cellular death", Brussels (Belgium), 22/12/2010.
- Kani Kani M., Bunel V., Duez P., Stévigny C., "Biologie et culture d'un produit forestier non ligneux, le kimbiolongo (Mondia whitei, Apocynaceae) au Bas-Congo (RD Congo)", Botanical Diversity, Meise (Belgium), 16-18/09/2010.

Pharmaceutical Biology	http://informahealthcare.com/phb ISSN 1388-0209 print/ISSN 1744-5116 online Editor-in-Chief: John M. Pezzuto
	Pharm Biol, Early Online: 1–10 © 2014 Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/13880209.2014.951726

Potential nephroprotective effects of the Chinese herb Angelica sinensis against cisplatin tubulotoxicity

Valérian Bunel^{1,2}, Marie-Hélène Antoine¹, Joëlle Nortier¹, Pierre Duez^{2,3}, and Caroline Stévigny²

14 Laboratory of Experimental Nephrology, Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium, ²Laboratory of Pharmacognosy, 15 Bromatology and Human Nutrition, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium, and ³Laboratory of Therapeutical 16

Chemistry and Pharmacognosy, Université de Mons (UMONS), Mons, Belgium 17

18

20

21

q

10

11 12

13

Abstract 19

ORIGINAL ARTICLE

Context: Acute kidney injury (AKI) is often encountered in patients receiving cisplatin (CisPt), a chemotherapeutic drug that induces numerous toxic side effects. Techniques used to limit nephrotoxicity during CisPt treatment are not fully effective; about a third of patients

- 22 experience AKI. New nephroprotective strategies, including pharmacological approaches, must 23 be developed.
- 24 Objective: The present study investigated the nephroprotective potential of Angelica sinensis (Oliv.) Diels (Apiaceae) root towards CisPt tubulotoxicity. 75
- Material and methods: HK-2 cells were incubated with CisPt (10 µM) and/or with a methanolic 26
- extract of A. sinensis (AS). Nephroprotective capacity was evaluated by means of cellular 27 viability (resazurin assay) and apoptosis (annexin-V/PI staining), oxidative stress generation
- 28 (H2DCF-DA oxidation), Ki-67 index (immunofluorescence), cell cycle analysis (DNA staining), cell 29 migration rate (scratch assay), extracellular matrix deposition (collagen determination), and
- B-catenin relocalization. 30

Results: CisPt decreased cell viability [76% versus Ctrl], what was associated with an increased apoptosis. Simultaneous treatment with 50 µg/ml AS-enhanced cell survival [84% 31

32 versus Ctrl] and decreased the apoptosis rate. AS could not alleviate CisPt-induced 11 oxidative stress; but doses of 5 and 50 µg/ml raised the Ki-67 index [135 and 244% versus

- 14 Ctrl] and cell migration rates [1.2 and 1.3-fold versus Ctrl]. Finally, both doses of AS limited the amount of collagen deposition [121.6 and 119.6% for 5 and 50 µg/ml, respectively, versus 35 131.0% for CisPt-treated cells] and prevented the relocalization of B-catenin from the
- 36 membrane to the nucleus. 37
- Conclusion: These results confirm the nephroprotective potential of A. sinensis and require 38
- further investigations aiming at identifying its active compounds.
- 39 40

Introduction 41

47 Because of their unique roles in the organism, the kidneys 43 are particularly vulnerable to the toxic effects of xenobiotics 44 such as drugs or environmental contaminants. In fact, the 45 kidneys receive about 25% of cardiac output. They are 46 especially dedicated to the elimination and reabsorption of 47 metabolites, and exert high metabolic activity. These factors 48 contribute to making the kidneys the preferential targets of 40 circulating toxic substances. 50

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum or CisPt) is a 51 metal complex used as a chemotherapeutic drug for the 52 treatment of a variety of solid-organ tumors, including non-53 small cell lung carcinoma, testicular, ovarian, breast, head, 5.4

- 55
- 56 Correspondence: Valérian Bunel, Laboratory of Pharmacognosy Bromatology and Human Nutrition, Bd du Triomphe, CP 205/9 1050 57 Brussels, Belgium, Laboratory of Experimental Nephrology, Campus Erasme, route de Lennik 808, 1070 Brussels, Belgium, Tel/Fax: +32 58
- 59 26505250/+32 26505430, +32 25556184/+32 25556186. E-mail:
- 60 valerian.bunel@outlook.com, vbunel@ulb.ac.be

Keywords

B-Catenin, apoptosis, collagen, HK-2 cells, Ki-67, nephroprotection, oxidative stress, regeneration

informa

healthcare

63

63

64 64 66

67 68

69 70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

N/I

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

04

105

96

97

98

00

History

Received 20 January 2014 Revised 15 May 2014 Accepted 17 July 2014 Published online

100 and neck cancers (Pabla & Dong, 2008). Although CisPt 101 appears to be a powerful drug for treating various forms of 102 cancers, its use is associated with major adverse side effects 103 such as nephrotoxicity, ototoxicity, neurotoxicity, bone 104 marrow suppression, nausea, and vomiting. Nephrotoxicity, 105 leading to acute kidney injury (AKI), is probably the most 106 concerning adverse effect of CisPt treatment. Thus, as the 107 drug is highly detrimental to the structure and function of the 108 kidneys, the dose must be limited, which may compromise the 109 anticancer therapy (Yao et al., 2007). 110

When nephrotoxicity occurs, renal proximal tubular 111 epithelial cells (RPTECs) undergo oxidative stress, which 112 modifies the structure of biomolecules such as DNA, 113 proteins, and lipids. This cytotoxic activity may lead to 114 cell death via apoptosis or necrosis (Lieberthal et al., 1996). 115 The lack of tubular regeneration capacity, along with the 116 resulting cell death, may lead to a transient loss of the kidneys function and structure. Fibrosis, a healing process 118 characterized by the deposition of fibrotic tissue in the renal 119 interstitium, is frequently observed. Fibrosis is a key element

2 V. Bunel et al.

121 in the onset and progression of chronic kidney disease 122 (Wynn, 2010).

123 AKI is partially reversible, but it can become more 124 severe and can last longer with repeated injections of CisPt. 125 Until now, the only successful strategy implemented clinically 126 to avoid the onset of AKI consists in ensuring adequate hydration and diuresis of treated patients. The outcomes 127 128 of this procedure are still not fully satisfactory, as about a third of patients treated with CisPt still experience AKI 120 130 (Yao et al., 2007).

131 Recent research has aimed at identifying protective 132 molecules and/or mechanisms that could be used to prevent 133 or alleviate CisPt insults and the onset of AKI (Barabas et al., 134 2008; dos Santos et al., 2012). These pharmacological approaches have mainly focused on discovering compounds 135 of natural origin (Nagwani & Tripathi, 2010; Nitha & 136 Janardhanan, 2008; Sohn et al., 2009), notably issuing from 137 138 Traditional Chinese Medicine (TCM) remedies.

139 The root of Angelica sinensis (Oliv.) Diels (Apiaceae), TCM drug also known as Danggui (or Dong Quai in 140 18 141 English), has been used traditionally as a blood tonic to 142 treat female sexual dysfunction such as menstrual disorders and menopausal symptoms (Chao & Lin, 2011; Low Dog, 143 144 2005). Modern research has highlighted several other pharmacological effects such as anti-inflammatory activity 145 146 (Chao & Lin, 2011), immunomodulation (Choy et al., 1994), anti-tumoral activity (Chao & Lin, 2011), neuroprotection 147 (Lin, 2011), and hepatoprotection (WHO, 2004). 148

In TCM treatments, Angelica sinensis is often prescribed 149 1.50 association with Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge (Fabaceae). Studies using this combination realized 151 in vitro (Wojcikowski et al., 2009) and in vivo (Meng et al., 152 153 2011; Wang et al., 2004) reported nephroprotective 154 activities towards various toxicity models. A renoprotective 155 activity has also been reported during clinical trials (Li & Wang, 2005). 156

The present in vitro study aimed at characterizing 157 158 how CisPt-mediated tubulotoxicity may be alleviated by A. sinensis extract. Five key biological processes occurring 159 during AKI were investigated: (i) cellular death mediated by 160 apoptosis (Havasi & Borkan, 2011; Pabla & Dong, 2008; 161 162 Wynn, 2010); (ii) increased oxidative stress; (iii) tubular 163 regeneration capacities of healthy cells (Lee & Kalluri, 2010; Megyesi et al., 2002; Wynn, 2010); (iv) extracellular 164 165 matrix (ECM) deposition, involving notably collagen (Yang et al., 2010; Wynn, 2010); and (v) dedifferentiation 166 processes of epithelial cells via activation of the β-catenin 167 pathway (Hao et al., 2011; Liu, 2010). 168 169

170 Material and methods

Herbal extract

Bulk Angelicae sinensis radix was kindly provided by 173 Complemedis AG (Trimbach, Switzerland). A certificate of 174 175 analysis issued by Phytax GmbH (Schlieren, Switzerland) reports compliance to the European Pharmacopoeia 6.0. 176 177 A voucher specimen was stored in our laboratory. The roots were ground into powder and extracted with methanol (1:10) 178 during 2 h under agitation. The extraction was repeated three 179 times; the solutions were filtered, combined, and evaporated 180

184

185

189

190

203

204

217

218

to dryness using an AES SpeedVac device (Savant, 181 Farmingdale, NY). The yield was 32.4%. The extract (AS) 182 was stored at -20 °C until use. 183

HPLC-UV for phytochemical analysis of the extract

The ferulic acid content and the Z-ligustilide content were determined in the AS methanolic extract.

Ferulic acid determination

The method was adapted from the European Pharmacopoeia 191 6.0 (Council of Europe, 2013). The chromatographic condi-192 tions were as follows: pre-column, Adsorbosphere C18 101 All-Guard 5 µm (25 × 4.6 mm i.d.; Alltech, Deerfield, MA); 194 column, Waters Symmetry C18 5µm (150×3.9 mm i.d.; 195 Milford, MA). The mobile phase consisted in a gradient of 196 acetonitrile/water (8:92)+0.5% acetic acid (solvent A) and 197 acetonitrile (solvent B): 0 min: 100% A; 19 min: 100% A; 198 20 min: 0% A; 28 min; 0% A; 29 min; 100% A; 34 min: 199 100% A. Oven temperature was maintained at 35 °C. The 200 injection volume was 20 µl and the flow rate was 0.8 ml/min. 201 The component was quantified at the wavelength of 316 nm. 202

Z-ligustilide determination

205 The chromatographic conditions were adapted from the 206 literature (Yan et al., 2008) as follows: pre-column, adsorbo-207 sphere C18 All-Guard 5 µm (25 × 4.6 mm i.d.; Alltech, 208 Deerfield, MA); column, Waters Atlantis C18 5 µm 209 (250×4.6 mm i.d.; Milford, MA). The mobile phase 210 consisted in a gradient of water+0.1% acetic acid (solvent 211 A) and methanol (solvent B): 0 min: 60% A; 3 min: 60% A; 212 18 min: 0% A; 21 min: 0% A; 22 min: 60% A; 23 min: 60% A. 213 Oven temperature was maintained at 35 °C. The injection 214 volume was 10 µl and the flow rate was 1.0 ml/min. The 215 component was quantified at the wavelength of 384 nm. 216

Cell culture and treatment

HK-2 cells, originating from RPTECs, were obtained from 219 American Type Culture Collection (CRL-2190, ATCC. 220 Manassas, VA), and grown in low-glucose DMEM containing 221 10% fetal bovine serum (FBS PAA Clone, PAA laboratories, 222 Pasching, Austria), 2 mM t.-glutamine and 1% penicillin-223 streptomycin. Cells were sub-cultured or harvested for 224 experiments when they reached about 90% confluence. For 225 experimental purposes, cells were used between passages 6 226 and 25, harvested by trypsinization and seeded on 60 mm 227 Petri dishes (4 × 10⁵ cells), 4-well-chambered slides (Lab-Tek 228 II, Nunc, Rochester, NY) (2.4 × 104 cells), 12-well plates 220 $(8 \times 10^4 \text{ cells})$ or 96-well plates $(1 \times 10^4 \text{ cells})$. Next, the 230 cells were incubated for 24h in FBS-containing medium, 231 rinsed twice with DMEM, and treated with the studied 232 substances in FBS-depleted medium. Cells assigned to be 233 protected against the nephrotoxic effect were pre-treated with 234 AS extract 1 h prior to the addition of CisPt solution. 235

CisPt solutions were prepared from the marketed drug 236 Cisplatine Hospira[®] (Hospira Benelux, Antwerpen, Belgium). 237 Working doses were selected according to the results obtained 238 from preliminary experiments based on MTT and crystal 239 violet assays (data not shown). The working concentration of 240 DOI: 10.3109/13880209.2014.951726

241 CisPt corresponded to its LD₂₅; and the working concentra-242 tion of AS extract corresponded to the highest no-effect

243 concentration (i.e. not exceeding LD1).

244

245 Cell viability assay

246 Cells were treated with CisPt, with AS, or with a combin-347 ation of CisPt and AS in 96-well plates, washed twice with 248 PBS, and assessed for their viability by incubation for 1.5 h 249 with 0.44 mM resazurin solution (Sigma-Aldrich, St Louis, 250 MO). Absorbances were measured at 540 and 620 nm using 251 iEMS Reader MF spectrophotometer (Thermo an 257 Labsystems, Breda, The Netherlands). The percentage of 251 reduced dye was calculated with the following formula: 254

 $(\varepsilon OX)\lambda 2 \cdot A\lambda 1 - (\varepsilon OX)\lambda 1 \cdot A\lambda 2$

 $(\varepsilon RED)\lambda 1 \cdot A'\lambda 2 - (\varepsilon RED)\lambda 2 \cdot A'\lambda 1$

- 755
- 256
- 257

where ε OX is the molar extinction coefficient of resazurin 259 (47.6 at 540 nm and 34.8 at 620 m); ε RED is the molar 260 extinction coefficient of resorufin (104.4 at 540 nm and 5.5 at 261 620 nm); A is the absorbance of test wells; A' is the mean 262 absorbance of blank wells; $\lambda 1 = 540$ nm; $\lambda 2 = 620$ nm. 263 Viability (i.e. metabolic activity) was normalized against 264 the control condition.

265 266 Apoptosis detection with annexin V/propidium iodide 267 staining

201

268 Cells were treated with CisPt or with a combination of CisPt 269 and AS in 12-well plates, harvested, and centrifuged at 270 1400 g. The supernatant was discarded and cells were 271 resuspended and incubated with an Annexin V-FITC detec-272 tion kit (BD Pharmingen, San Diego, CA) in the dark for 273 15 min. Suspensions were then analyzed using a BD 274 FACSCanto II flow cytometer (BD Pharmingen, San Diego, 275 CA) and 104 cells were recorded. The data were analyzed 276 with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OH); debris and 277 cell clumps were removed by gating, and the proportions of 778 living, apoptotic, and necrotic cells were calculated. 279

280 Oxidative stress measurement

281 Cells were treated with CisPt, with AS, or with a combin-282 ation of CisPt and AS in 12-well plates, rinsed, and treated 283 10 µM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate with 284 (H2DCF-DA) solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cells 285 were harvested, centrifuged at 1400 g, and analyzed using 286 a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Pharmingen, San 787 Diego, CA); 104 cells were recorded. The data were 288 analyzed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OH); 289 debris and cell clumps were removed by gating, and mean 290 fluorescence intensities (MFI; geometric mean) were 291 estimated. 292

293 294 Ki-67 immunostaining

295 Cells were treated with AS or CisPt on chambered 296 slides, rinsed twice in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde 297 solution for 20 min, then rinsed, and permeabilized with 298 0.01% Triton X for 5 min. Cells were blocked with goat 299 serum (PAA Laboratories, Pasching, Austria) for 1 h, 300 then incubated with a primary rabbit anti-Ki-67 antibody

Angelica sinensis reduces cisplatin nephrotoxicity 3

(Abcam, Cambridge, UK) for 1 h. The slides were rinsed 101 twice and incubated with a secondary Alexa Fluor 488 302 conjugated goat anti-rabbit antibody (Invitrogen, Eugene, 303 OR) for 30 min. The slides were rinsed twice, mounted with 304 DAPI-containing mountant (Invitrogen, Eugene, OR) and 105 examined with an Axioskop fluorescence microscope (Zeiss, 306 Germany) at magnification 400×. Twenty pictures per 307 chamber were acquired. The Ki-67 index was calculated by 308 dividing the number of Ki-67 positive cells by the total 3/16 number of cells (Yang et al., 2010). 310

311

317

170

330

344

345

Cell-cycle analysis

313 Following treatment in 12-well plates, cells were harvested 314 and fixed with ice-cold 66% ethanol, then incubated at 4°C 115 for 1 h. Pellets were centrifuged at 1400 g, washed with PBS, 316 resuspended in PI/RNase Staining Buffer (BD Pharmingen, 317 San Diego, CA) following the manufacturer's instructions, 318 then incubated at room temperature for 30 min. Cells were 319 washed, resuspended, and analyzed using a BD FACSCanto II 120 flow cytometer (BD Pharmingen, San Diego, CA). About 104 321 HK-2 cells were recorded using the BP 585/42 filter at a 133 maximum rate of 200 events/s. 323

Cell-cycle analysis was carried out with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OH): debris and cell clumps were removed by gating, and proportions of G0/G1, S, and G2/M cells were determined according to the Dean-Jett-Fox model (Anonymous, 2011).

Wound-healing assay

331 Cells were seeded on 60-mm Petri dishes, incubated for 48 h. yielding approximately 90-100% confluence, and were 112 333 then growth arrested by serum starvation for 24 h. Linear scratches were made through cell monolayers with a sterile 134 335 200 µl pipette tip. Debris were removed and 10 pictures 116 were taken (time to) using a Motic AE21 microscope 337 equipped with a Moticam 2300 camera (Motic, Wetzlar, 118 Germany) at magnification 100×. Cells were then treated 339 with AS or FBS for 18h, and 10 new pictures of the scratch 340 were taken (time t_{18}). The area of the scratch was measured 341 using TScratch (Geback et al., 2009) and the migration rate 142 (µm/h) was calculated. 343

Assessment of collagen synthesis

Cells were treated with CisPt, with AS, or with a combination 346 of CisPt and AS in 96-well plates, rinsed with PBS, and 147 assessed for their metabolic activity with the resazurin assay 348 as described above. Next, cells were washed with PBS, fixed 3.10 with ice-cold methanol for 1 h at 4 °C, rinsed twice with 1% 350 acetic acid, and stained for 2h with 0.1% picrosirius red 351 (PSR) staining solution (Hu et al., 2009). Wells were then 152 rinsed three times with 1% acetic acid. The dye was 153 solubilized in 0.1 M NaOH and the absorbances of the wells 154 were measured at 540 nm. Absorbances attributed to PSR 155 staining were normalized according to the metabolic activity 156 of each well. The correlation among the number of cells, 157 metabolic activity, and the amount of protein determined by 158 the bicinchoninic acid method was verified in preliminary 159 experiments. 360 4 V. Bunel et al.

361 B-Catenin determinations

362 363 Membranous β-catenin determination

364 Cells were treated with CisPt, with AS, or with a combination of CisPt and AS on 4-well chambered slides. The slides were 165 rinsed, fixed in 4% paraformaldehyde solution for 20 min, 366 rinsed, and permeabilized with 0.01% Triton X for 5 min. 367 The slides were rinsed again and cells were blocked with 368 donkey serum (sc-2044, Santa Cruz Biotechnology, Santa 160 Cruz, CA) for 1 h. The slides were then incubated with mouse 370 anti-human β-catenin primary antibody (sc-7963, Santa Cruz 371 Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 h, washed twice, 372 incubated with cyanine-3 conjugated donkey anti-mouse 171 secondary antibody (715-166-151, Immuno Research Lab 374 Jackson, West Grove, PA) for 30 min, rinsed twice, mounted 375 with DAPI-containing Prolong Gold antifade reagent 376 (Invitrogen, Eugene, OR), and examined at magnification 377 400× with an Axioskop fluorescence microscope 378 (Zeiss, Germany) equipped with a DP200 camera (Deltapix, 379 Maalov, Denmark). 380

Prior to the evaluation of fluorescence intensity, the domain of linearity and the reproducibility of the method were controlled using InspeckTM Orange ($\lambda_{Ex} = 540 \text{ nm}/$ $\lambda_{Em} = 560 \text{ nm}$) fluorescently labeled microbeads (6.0 µm diameter) (Molecular Probes, Eugene, OR).

For each condition, 10 pictures were taken, and analyzed 386 using Fiji (Fiji Is Just ImageJ) software (International 387 Association for Universal Design, Ohtsubo, Japan). The 388 fluorescence intensity was evaluated by the measurement 389 of luminance. The nuclei were counterstained with DAPI. 390 The blue-fluorescent areas were discarded from the pictures. 301 allowing removal of the signals corresponding to nuclear 392 191 B-catenin.

394 395

410

395 Cytoplasmic/nuclear β-catenin determination

Cells were treated with CisPt or with a combination of 397 CisPt and AS in 12-well plates, harvested, centrifuged at 398 500 g, and fixed in Cytofix/Cytoperm solution (BD 399 Pharmingen, San Diego, CA) for 20 min at 4°C. The 400 suspension was washed twice, and incubated with anti-401 human β-catenin-phycocrythrin monoclonal antibody (R&D 402 Systems, Mineapolis, MN) in the dark for 30 min. Cells were 403 washed twice and analyzed using a BD FACSCanto II flow 404 cytometer (BD Pharmingen, San Diego, CA). A minimum 405 of 10⁴ cells were recorded. The data were analyzed with 406 FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR): debris and cell 407 clumps were removed, and mean fluorescence intensities 408 (MFI; geometric mean) were calculated. 409

411 412 Statistical analysis

413 Unless otherwise stated, experiments were performed four times using biologically independent samples. Results to be 414 415 normalized against controls were treated as described previously (Valcu & Valcu, 2011). Data were compared by means 416 417 of a one-way ANOVA with post-hoc Student's t-test (Bonferroni correction) using GraphPad Prism 5 software 418 (GraphPad, San Diego, CA); p values <0.05 were considered 419 420 significant.

Pharm Biol, Early Online: 1-10

421

Phytochemical analysis of the AS extract

Results

423

434

435

446

447

Two compounds (ferulic acid and Z-ligustilide) were 424 assessed by means of HPLC-UV. The amounts of ferulic 425 acid content and Z-ligustilide content per g of crude 426 methanolic were $0.743 \pm 0.005 \, \text{mg}$ and extract 427 30.55 ± 0.71 mg, respectively. The chromatogram obtained 428 for ferulic acid determination, employing conditions adapted 470 from the European Pharmacopoeia 6.0, is displayed in 430 Figure 1(S) (Supplementary file). Both values are within 431 the range of concentrations previously reported for these 432 compounds (Chao & Lin, 2011; WHO, 2004). 433

AS protects HK-2 cells against CisPt-induced mortality

436 After treatment with 10 µM CisPt for 48h, HK-2 cell 437 survival dropped to 76 ± 2% compared with control con-438 ditions (Figure 1). Upon co-treatment with 50 µg/ml AS, the 439 cell survival was enhanced to 84±3% (p<0.01). No 440 statistically significant effect was observed for co-treatment 441 with CisPt and a concentration of 5 µg/ml AS compared with 442 CisPt treatment alone, Interestingly, cells treated with both 50 443 and 5µg/ml AS alone displayed higher viability rates 444 (110 ± 2% and 109 ± 2%, respectively). 445

AS reduces CisPt-induced HK-2 cells apoptosis

The protective effects of AS towards CisPt-induced cell 448 death were further confirmed by analyzing apoptosis rates. 449 To assess the proportions of cells undergoing apoptosis, 450 flow cytometry was used to detect annexin V/PI stained 451 cells. Necrotic cells - for which no modification was 452 observed upon treatment with CisPt as compared with the 453 control condition - were not taken into account. In fact, 454 necrosis only occurs at high concentrations of CisPt 455 (dos Santos et al., 2012). 456

The treatment of HK-2 cells with 10 μ M CisPt raised the proportion of apoptotic cells from 4.2 \pm 0.6% in the control 458



Figure 1. Cell survival rates estimated with resazurin assay after treatment for 48 h with 10 μ M CisPt and/or 50 or 5 μ g/ml AS. Results are displayed as means \pm SD of four independent experiments (*p < 0.05; *p < 0.01; **p < 0.001).

DOI: 10.3109/13880209.2014.951726

5.15

546

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591 592

593

\$9.5

595

596

407

598

condition to 12.9 ± 1.6% (Figure 2). Upon co-treatment with 481 both 50 and 5 µg/ml AS, the apoptosis rates were significantly 482 reduced to $8.4 \pm 1.7\%$ and $8.0 \pm 1.0\%$, respectively. 483

484 These results confirm the capability of A. sinensis to 485 reduce HK-2 cell mortality when given concomitantly with CisPt. This effect appeared to be mediated by a lower 486 487 apoptosis rate which was not concentration related in the 488 investigated range.

489

AS does not reduce CisPt-induced oxidative stress 490

491 After 24 and 48h treatment with 10 µM CisPt, HK-2 cells 492 exhibited increased fluorescence intensities (131±8% and 493 179 ± 12% above those in the control condition, respectively), 494





as detected by oxidized H2DCF-DA probe. The results 541 displayed in Figure 3 indicate that co-treatment with 50 or 542 5 µg/ml AS did not alleviate oxidative stress at either of the \$41 incubation times tested. 544

AS promotes HK-2 cell proliferation

\$47 The Ki-67 index was measured after immunostaining cells 548 treated for 48h with the AS extract or CisPt. Upon 5.40 treatment with 10% FBS, the proportion of proliferative 550 cells rose to 307 ± 3% as compared with the serum-depleted 551 control condition (Figure 4A). This phenomenon is due to 552 EGF (epidermal growth factor), which is present in FBS 553 (Ryan et al., 1994). CisPt treatment also increased the Ki-67 554 index to 216±5%, but this effect should be regarded as the 555 consequence of the toxic activity of CisPt that triggers a G2/ 556 M cell-cycle arrest, leading to artificially higher Ki-67 557 indexes (Bunel et al., 2013; Jamieson & Lippard, 1999). 558

AS treatment at doses of 50 and 5 µg/ml raised the Ki-67 \$59 index to 244 ± 11% and 135 ± 21%, respectively. A cell-cycle 560 analysis was performed to determine if increase in the Ki-67 561 index was a consequence of a cell-cycle arrest, or an 562 enhancement of the cell proliferation rate (Figure 4B). FBS \$63 induced a slight decrease in the proportion of G0/G1 cells 564 $(68.8 \pm 2.2\% \text{ versus } 83.2 \pm 1.0\% \text{ in the control condition})$ and 565 a slight increase in the proportion of G2/M cells (18.7 ± 1.1% 566 versus 9.5±0.5% in the control condition). CisPt treatment \$67 triggered G2/M checkpoint arrest, resulting in a sharp 568 decrease in G0/G1 cells (15.8±1.4%) associated with a \$69 sharp increase in G2/M cells (76.1 ± 2.6%). 570

Both 50 and 5 µg/ml doses of AS induced slight modu-571 lations in the cell-cycle phases distribution comparable with 572 those observed with FBS treatment: G0/G1 cells decreased 573 (74.1±1.1% and 78.7±1.4% for 50 and 5µg/ml AS, 574 respectively) and G2/M cells increased (16.1 ± 2.6% for 575 50 µg/ml and 11.7 ± 2.0% (not significant) for 5 µg/ml AS). 576 These results suggest that the AS effect on the Ki-67 index 577 was a consequence of an enhanced cell proliferation rate 578 rather than a cell-cycle arrest. 579



599 Figure 3. Fluorescence intensities recorded after flow cytometry assessment of HK-2 cells incubated for 24 or 48 h with test substances and probed \$40 with 10 µM H2DCF-DA. Results are displayed as means ± SD of four independent experiments (***p<0.001). 600



Figure 4. Proliferation (Ki-67) index (A) and cell-cycle distribution (B) assessments for HK-2 cells treated for 48 h with test-substances. Results are means ± SD of four independent experiments (**p<0.01; ***p<0.001 compared with the control group).

620 AS enhances cell motility

619

621 The scratch assay aims at evaluating the motility of cells and 622 is commonly used to assess the potential of substances to 623 enhance cellular regeneration capacity (Ruszymah et al., 624 2012). In an AKI setting, cellular migration may contribute to 625 tubules regeneration and thus curb the onset of fibrosis (Liu, 626 2006). After the scratch was created, a 10% FBS treatment 627 induced a 1.9-fold increase in cell migration rates over the 628 control condition (Figure 5), whereas 50 and 5 µg/ml AS 629 enhanced cell migration to approximately 1.3- and 1.2-folds 630 over the control condition, respectively. 631

⁶³² ₆₃₃ CisPt-induced collagen deposition is limited by AS ₆₃₄ co-treatment

635 Picrosirius red staining allows the collagen produced by cell 636 cultures to be quantified (Hu et al., 2009; Xu et al., 2007). 637 Exposure of HK-2 cells to 50 and 5 µg/ml AS for 48h did 638 not modify the amount of collagen produced as compared 6.10 with the control condition (Figure 6). However, when CisPt 640 produced a 131.0 ± 6.1% increase in collagen synthesis, both 641 doses of AS limited the deposition to 119.6 ± 4.1% (50 µg/ml) 642 and to 121.6 ± 4.4% (5 µg/ml). 643

644 645 Assessments of β-catenin

646 Membranous B-catenin

647 The amounts of membranous B-catenin were assessed 648 by means of quantitative fluorescence image analysis 649 (QFIA). After 48 h treatment with 10 µM CisPt, membranous 650 β-catenin expression was reduced 3.2-fold compared with 651 the control condition (Figure 7C). Upon co-treatment with 50 652 and 5 µg/ml AS, β-catenin losses in both cases fell 2.1-fold 651 below those in the control condition. This indicates that AS 654 was capable of preventing the loss of the epithelial phenotype 655 induced by CisPt.

656 657

658 Intracytoplasmic/nuclear β-catenin

659 HK-2 cells grown in the same conditions were stained for 660 intracytoplasmic/nuclear β-catenin and analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 7(F), compared with control 680 condition, CisPt induced a 2,0-fold increase in the fluorescence intensities attributed to the nuclear form of β -catenin. (682 Upon co-treatment with 50 and 5 µg/ml AS, the increase dropped to 1,3- and 1.2-folds, respectively. This indicates that AS prevented the relocalization of β -catenin from the membrane to the nucleus. (683

677 678

679

688

702

703

Discussion

689 CisPt exerts its action not only on tumor cells but also on 690 RPTECs that are exposed to the glomerular ultrafiltrate. 601 Through oxidative stress and DNA binding, CisPt triggers 692 apoptosis (Cummings & Schnellmann, 2002), cell-cycle 693 arrest (dos Santos et al., 2012), and cellular dedifferentiation 694 processes (Zeisberg & Duffield, 2010) that are the starting 605 points for AKI and fibrotic repair (Wynn, 2010). Effectively 696 preventing AKI may help to curb the onset of interstitial 697 fibrosis and the progression to end-stage renal disease. 698

In the present study, a crude polar (methanolic) extract of *A. sinensis* showed several protective effects towards the key biological phenomena involved in AKL. 701

Prevention of cell death via apoptosis

It has been reported that CisPt-mediated cell death *in vivo* 704 was governed by apoptotic and necrotic pathways depending on the concentration of the drug. The relative contribution of each process in nephrotoxicity and AKI has not yet 707 been determined (dos Santos et al., 2012). Nevertheless, 708 lowering the apoptosis rate may enhance overall cell survival, 709 and thus avoid the loss of functional tubules that is 710 responsible for the AKI setting. 711

In our experimental setting, both doses of AS (50 and 712 5 μ g/ml) were observed to prevent CisPt-induced cellular 713 death, as measured by the resazurin assay. However, only the 714 highest dose protected cells at a statistically significant level. 715 A significant reduction in the apoptosis rate was observed 716 at both tested doses. While CisPt induced a 3.1-fold increase 717 in the proportion of apoptotic cells compared with the control 718 condition, AS co-treatment decreased this rate to 1.6-fold. 719 As each dose of AS showed a similar efficacy in lowering 720



Figure 5. Scratch assay for HK-2 cells after 24h serum-deprivation. Monolayers were scratched with a pipette tip and incubated with test substances for 18h. Phase contrast microscopy images (100 × magnification) for control, FBS, 50, and 5 µg/ml AS treatments at start for (left pictures) and after 18h (right pictures). Migration rates are transported as means \pm SD of four independent experiments (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 compared with control conditions).

772

773

774 apoptosis, a lower apoptosis rate may not be the only factor 775 enhancing cell survival, which improved slightly with the 776 higher AS concentration. One would expect additional necrotic 777 processes to be a possible explanation for this discrepancy. 778 In our experimental conditions, CisPt did not produce higher 779 necrosis rates. Other mechanisms, such as an enhancement 780 in cellular proliferation or prevention of cell detachment, 780 in cellular proliferation.

Angelica sinensis reduces cisplatin nephrotoxicity 7

784

785

786

787

788

789

790

791

792

791

794

705

796

797

798

799

800

801

802

803

806

807

823

824



Figure 6. Collagen quantification upon treatment of HK-2 cells with test substances for 48 h and PSR staining. Absorbances were normalized according to their metabolic activity (resazurin assay) and compared with the control condition. Results are displayed as means \pm SD of four independent experiments (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

might be involved ("Factors possibly enhancing tubular regeneration" and "Membranous β-catenin" sections). 805

Effects on oxidative stress

808 After incubation with CisPt for 24 and 48 h, ROS/RNS 809 generation increased in HK-2 cells. Indeed, oxidative stress is 810 an important feature of CisPt toxicity in vivo (Yao et al., 811 2007). AS extract was tested for its potential to alleviate 812 oxidative stress, but none of the tested concentrations had a 813 beneficial effect. Thus, the protective effects of A. sinensis 814 towards CisPt-mediated nephrotoxicity in our model cannot 815 be explained by a neutralization of oxidative/nitrosative stress.

Previous studies have reported a moderate antioxidant activity for an ethanolic extract of *A. sinensis* (Yang et al., 2009), as well as for its polysaccharides. The polysaccharides can be extracted with water and have been shown to have a hepatoprotective activity mediated by oxidative stress reduction (Yu et al., 2013).

Factors possibly enhancing tubular regeneration

Enhancing the renewal of RPTECs, by increasing both 825 their cellular proliferation and migration capacity, is 826 important for successful tubule repair following CisPt insults 827 (Wynn, 2010). 828

The Ki-67 index was used to evaluate the proliferative 829 potential of healthy HK-2 cells. This protein is located on 830 the nuclei of proliferating cells (i.e. in G1, S, G2, and 831 M phases of the cell cycle) and remains absent in quiescent cells (G0) (Urruticoechea et al., 2005). Ki-67 is 833 commonly used to assess the proliferative capacities of 834 tumors. It has also been used *in vitro* and *in vivo* for the assessment of RPTEC regeneration (Docherty et al., 2006; 836 Pozdzik et al., 2008). 837

CisPt induced a 2.3-fold increase in the Ki-67 index 838 over that in the control condition. This effect was a 839 consequence of its toxicity rather than an enhancement of 840

V. Bunel et al.

\$58

COLOR 842

Online /843 B&W in Print 844

Figure 7. Immunostained

(A) and CisPt conditions (B). Ten images

intensities were measured; DAPI counter-

B-catenin translocated to the nucleus.

independent experiments (*p<0.05;

taining was subtracted to remove eventual

Luminance values were then recorded (C).

*p<0.001 compared with the control

group). Representative fluorescence images

tion of β-catenin for control (D) and CisPt

treatment (E). Cells were analyzed with a

flow cytometry technique and the geomet-

rical mean fluorescence intensity was eval-

uated (F). Means ± SD of four independent

experiments (**p<0.01; ***p<0.001).



cell proliferation. Indeed, it is well known that CisPt cross-links DNA strands and triggers cell-cycle arrest at G2/M checkpoint, giving rise to higher proportions of Ki-67 positive cells (Jamieson & Lippard, 1999). A flow cytometry analysis of the cell-cycle phases distribution confirmed this observa-tion: the CisPt treatment yielded a 8.0-fold increase in G2/M cells compared with the proportion in the control condition (Figure 4).

The use of FBS (10%) as a proliferation inducer increased the Ki-67 index 3.1-fold over that in the control condition. It also moderately increased G2/M cells by 2.0-fold. Both doses of AS yielded similar patterns: for 50 and 5 µg/ml AS, the Ki-67 index increased by 2.4- and 1.4-folds, respectively, whereas the proportion of G2/M cells rose by 1.7- and 1.2-folds, respectively.

The G0/G1 cell profiles measured in the presence of CisPt and CisPt/AS are consistent with these findings: when CisPt triggered a 5.3-fold decrease in the proportion of G0/G1, FBS produced a decrease of only 1.2-fold, and both 50 and 5 µg/ml triggered an approximately 1.1-fold decrease compared with the control condition. These results suggested that A. sinensis promoted the proliferation of healthy HK-2 cells, probably by stimulating G1 phase entrance, thus lowering the proportion of quiescent cells.

T

The results obtained for cell proliferation assays are consistent with previous works focusing on cellular prolifer-ation of gastric epithelial cells induced by A. sinensis (Ye et al., 2001). Furthermore, the higher cell survival rates (i.e. higher metabolic activities) observed for both 50 and 5µg/ml AS (Figure 1) can probably be explained by an enhanced cell proliferation capacity, as measured with 0.43 the Ki-67 index.

Cellular migration, assessed by a scratch assay, high-lighted an enhancement in motility rates for both tested doses of AS extract compared with the control conditions. Mechanisms that might explain the effects of A. sinensis on 0.48 wound healing have already been suggested in a previous 0.40 paper focusing on fibroblasts (Hsiao et al., 2012). These include the downregulation of MARE1 (microtubule-associated protein RP/EB) and NDKB (nucleoside dispho-sphate kinase B) and upregulation of ARPC5 (actin-related protein 2/3 complex subunit 5) and STMN1 (stathmin).

Considered altogether, these effects support the hypoth-esis that A. sinensis can help to accelerate cellular regener-ation following AKI, a disorder during which the loss of 957 RPTECs is associated with a transient - but not fully irreversible - loss of tubular structure and function (Bucaloiu 0.50 et al., 2012).

Pharm Biol, Early Online: 1-10

DOI: 10.3109/13880209.2014.951726

961 Reduction of collagen synthesis

962 Collagen is a component of fibrotic tissue that is secreted by 963 cells during the scarring process. It also acts as a fibrosis-964 promoting factor (Wynn, 2007). Thus, preventing its depos-964

ition may help to preserve the integrity of the interstitial 94 compartment and favor tubular regeneration. 967 Our results have shown that the tested AS extract reduced

968 the amount of collagen that was deposited following CisPt 968 treatment of HK-2 cells. Angelica sinensis could thus be 970 useful in lowering ECM production, and could probably 971 attenuate fibrotic repairs associated with AKI. 973

973 Localization of B-catenin 974

β-Catenin plays a dual role in RPTECs; it is involved in cell 974 976 adhesion, where it links E-cadherin to the actin cytoskeleton. 977 It may thus be used to evaluate the integrity of the epithelial phenotype in kidneys or cultured cells (Zeisberg & Neilson, 978 2009). When RPTECs are injured, these intercellular links 979 are disrupted and B-catenin relocalizes into the nucleus 980 981 after structural reconfiguration (Gottardi & Gumbiner, 2004). 982 It then associates with the TCF/LEF complex and rules the transcription of several genes, notably those involved 981 in fibrosis (Bozic et al., 2011). Research has suggested 984 that inhibiting the β-catenin pathway restrains the progression 985 986 of renal fibrosis (Hao et al., 2011; He et al., 2011).

987

QRM. Membranous 3-catenin

989 Quantitative fluorescence image analysis of HK-2 cells 990 revealed that CisPt treatment could trigger a massive loss of 001 membranous B-catenin (3.2-fold decrease) compared with 992 control conditions. The AS extract treatment alone did not 001 modify the amount of membranous 8-catenin. Co-treatment 994 with CisPt and AS limited this loss at both tested doses of 995 AS (2.1- and 2.2-folds decrease at 50 and 5 µg/ml, respect-694 ively). Angelica sinensis was thus able to prevent HK-2 cells 997 from losing their epithelial phenotype upon CisPt treatment. 008 This may prevent cells from detaching and enhance overall 000 survival by maintaining cell-cell interactions.

1000

1001 Internal 3-catenin 1002

Measurement by flow cytometry of the amount of 1003 relocalizing B-catenin revealed a 2.0-fold increase 1004 in 1005 nuclear/cystoplasmic proportions of this isoform upon CisPt 1006 treatment. Co-incubation with AS restrained the relocalizing 1007 form of B-catenin to a 1.3- and 1.2-fold increase over the control condition for 50 and 5 µg/ml AS, respectively. This 1008 1009 result indicates that A. sinensis could be effective in reducing 1010 the transcription of genes involved in fibrotic processes. 1011

1012 Conclusion 1013

When considered altogether, the results obtained in this 1014 work support in vivo data in the literature from a mechanistic 1015 1016 point of view, and thus confirm the promising nephroprotec-1017 tive potential of A. sinensis towards CisPt tubulotoxicity. 1018 This herbal remedy originating from TCM was found to 1019 prevent cell death by lowering CisPt-induced apoptosis 1020 rates, and to promote tubular regeneration by enhancing

Angelica sinensis reduces cisplatin nephrotoxicity 9

both cellular proliferation and the migration. It also lowered 1021 ECM deposition, a key process in fibrotic repair, and 1022 attenuated B-catenin relocalization, a process that involves 1023 the loss of the epithelial phenotype of RPTECs and the 1024 accumulation of its nuclear form. Angelica sinensis can thus 1025 be considered as a potential TCM remedy that can alleviate 1026 the severity and duration of CisPt-induced AKI, and in the 1027 longer term, prevent the onset of kidney fibrosis. 1078

Further studies aiming at identifying the compound(s) 1029 and the molecular mechanisms responsible for the activities 1030 of A. sinensis highlighted in this work are currently under 1031 1032 investigation.

Acknowledgements

1036 The authors are grateful to Complemedis AG (Trimbach, Switzerland) for kindly providing bulk Radix 1037 Angelicae sinensis. Thanks are also expressed to E. De Prez, 1038 M. Faes and O. Vaillant for skillful technical assistance 1039 1040 and to T. Baudoux and C. Husson for their valuable advice on flow cytometry. Prof. J. -M. Kauffmann and Prof. G. Lucy 1041 1042 are gratefully acknowledged for providing their help for the revision of the manuscript. 1043 1044

Declaration of interest

Valérian Bunel is a fellow of the Fonds de la Recherche 1047 Scientifique - FNRS (FRIA grant). The authors report no 1048 declarations of interest. 1049 1050

References

- Anonymous. (2011). FlowJo, data analysis software for flow cyton 1053 In: INC TS, ed. FlowJo Advanced Tutorial. 7.6.2 ed. Ashland: Tree 1054 Star Inc 1055
- Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. (2008). Cisplatin: A of toxicities and therapeutic applications. Vet Comp 1056 Oncol 6:1-18. 1057
- Bozic M, De Rooij J, Parisi E, et al. (2011). Glutamatergic signaling 1058 maintains the epithelial phenotype of proximal tubular cells. J Am Soc 1040 Nephrol 22:1099-111
- Bucaloiu ID, Kirchner HL, Norfolk ER, et al. (2012). Increased risk of 1060 death and de novo chronic kidney disease following reversible acute 1061 kidney injury. Kidney Int 81:477-85. 1062
- Bunel V, Antoine MH, Nortier J, et al. (2013). Protective effects of 1063 schizandrin and schizandrin B towards cisplatin nephrotoxicity 1064 in vitro. J Appl Taxicol 1. [Epub ahead of print].
- Chao WW, Lin BF. (2011). Bioactivities of major constituents isolated 1065 from Angelica sinensis (Danggui). Chin Med 6:1-7. 1066
- Choy YM, Leung KN, Cho CS, et al. (1994). Immunopharmacological 1067 studies of low molecular weight polysaccharide from Angelica sinensis. Am J Chin Med 22:137-45. 1068
- Council of Europe. (2013). European Pharmacopoeia. Strasbourg: 1069 Tec & Doc 1070
- Cummings BS, Schnellmann RG. (2002). Cisplatin-induced renal 1071 cell apoptosis: Caspase 3-dependent and -independent pathways. J Pharmacol Exp Ther 302:8-17. 1072
- Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, et al. (2006). TGF-beta1-1073 induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and 1074 is aided by EGF receptor activation. Am J Physiol Renal Plessiol 290: 1075 F1202-12
- Dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, Dos Santos AC. 1076 (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotec-1077 tion: An update. Arch Toxicol 86:1233-50. 1078
- Geback T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. (2009). TScratch: 1079 A novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. Bintechniques 46:265-74. 1080

1033

1034

1035

1045

1046

1051

10 V. Bunel et al.

- Gottardi CJ, Gumbiner BM. (2004). Distinct molecular forms of betacatenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. J Cell Biol 167:339–49.
- 1083 Hao S, He W, Li Y, et al. (2011). Targeted inhibition of -catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol 22: 1085 1642–53.
- 1085 Havasi A, Borkan SC. (2011). Apoptosis and acute kidney injury. Kidney Int 80:29–40.
- He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. (2011). Blockade of Wnt/beta-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 22:90–103.
- Hsiao CY, Hung CY, Tsai TH, Chak KF. (2012). A study of the wound healing mechanism of a Traditional Chinese Medicine, Angelica sinensis, using a proteomic approach. Evid Based Complement Mercent Med 1:1-14
- Alternat Med [1-14.
 Alternat Med [1-14.
 Hu Q, Noor M, Wong YF, et al. (2009). In vitro anti-fibrotic activities of herbal compounds and herbs. Nephrol Dial Transpl 24:3033-41.
- Jamieson ER, Lippard SJ. (1999). Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev* 99:2467–98.
- 1097 Lee SB, Kalluri R. (2010). Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 78:S22–6.
- 1099 Li X, Wang H. (2005). Chinese herbal medicine in the treatment of chronic kidney disease. Adv Chronic Kidney Dis 12:276–81.
- 1100 Lieberthal W, Triaca V, Levine J. (1996), Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: Apoptosis vs. necrosis. Am J Physiol 270:F700–8.
- necrosis. Am J Physiol 270:F700-8.
 Lin B. (2011). Polyphenols and neuroprotection against ischemia and neurodegeneration. Mini Rev Med Chem 11:1222-38.
- 1104 Liu Y. (2006). Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69:213–7.
- Liu Y. (2010). New insights into epithelial-mesenchymal transition in
- kidney fibrosis. J Am Soc Nephrol 21:212–22.
 Low Dog T. (2005). Menopause: A review of botanical dietary supplements. Am J Med 118:98–108.
- 1108 supplements. Am J Med 118:98–108.
 1109 Megyesi J, Andrade L, Vieira Jr JM, et al. (2002). Coordination of the
- 1110 cell cycle is an important determinant of the syndrome of acute renal, failure. Am J Physiol Renal Physiol 283:F810-6.
- Meng LQ, Tang JW, Wang Y, et al. (2011). Astragaloside IV
 synergizes with ferulic acid to inhibit renal tubulointerstitial
 fibrosis in rats with obstructive nephropathy. Br J Pharmacol
- 1114 162:1805–18.
 1115 Nagwani S, Tripathi YB. (2010). Amelioration of cisplatin induced
- nephrotoxicity by PTY: A herbal preparation. Food Chem Tanicol 48: 2253–8.
 Nitha B, Janardhanan KK. (2008). Aqueous-ethanolic extract of morel
- Nuta B, Janaruhanan KK. (2006). Adjective-enanotic extract of more mushroom mycelium Morchella esculenta, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. Food Chem Taxicol 46: 3193-9.
- Pabla N, Dong Z. (2008). Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 73:994–1007
- 1122
- 1123

02

- 1125
- 1126
- 1127
- 1128
- 1129
- 1130

1131

- 1132
- 1133

1135

- 1136
- 1137
- 1138

1139

- Pharm Biol, Early Online: 1-10
- Pozdzik AA, Salmon U, Debelle FD, et al. (2008). Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int* 73:595–607.
- Ruszymah BH, Chowdhury SR, Manan NA, et al. (2012). Aqueous 1143 extract of *Centella asiatica* promotes corneal epithelium wound 1144
- healing in vitro. J Ethnopharmacol 140:333-8. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, et al. (1994). HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. 1145
- *Kidney Int* 45:48–57. 1147 Sohn SH, Lee H, Nam JY, et al. (2009). Screening of herbal medicines 1148
- for the recovery of cisplatin-induced nephrotoxicity. Environ Taxicol Pharmacol 28:206–12. Urnaticoechea A, Smith IE, Dowsett M. (2005). Proliferation marker 1150
- Ki-67 in early breast cancer. J Clin Oncol 23:7212–20. 1151 Valcu M, Valcu CM. (2011). Data transformation practices in biomedical 1152
- sciences. Nat Methods 8:104–5. Wang H, Li J, Yu L, et al. (2004). Antifibrotic effect of the Chinese herbs. Astrogalus mongholicus and Angelica sinensis, in a rat model of chronic puromycin aminoniucleoside nephrosis. Life Sci 74:1645–58.
- WHO. (2004). WHO Monography on Selected Medicinal Plants. 1157 Geneva: World Health Organization. 1158 Medicine Medicinal & Wohlman DW et al. (2000). As for size 1158
- Wojcikowski K, Wohlmuth H, Johnson DW, et al. (2009). An in vitro investigation of herbs traditionally used for kidney and urinary 1159 system disorders: Potential therapeutic and toxic effects. Nephrology 1160 14:70-9. 1161
- Wynn TA. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest 117:524–9. 1162 Wynn TA. (2010). Fibrosis under arrest. Nat Med 16:523–5. 1163
- Wynn TA. (2010). Fibrosis under arrest. Nat Med 16:523–5. 1163 Xu Q, Norman FT, Shrivatav S, et al. (2007). In vitro models of TGF-beta-induced fibrosis suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents. Am J Physiol Renal Physiol 1165
- 293:F631-40. 1166 Yan R, Ko NL LTSL et al. (2008). Pharmacokinetics and metabolism 1167
- of ligustilide, a major bioactive component in Rhizoma Chuanxiong. 1168 in the rat. Drug Metab Dispos 36:400-8. 1169 Yang Li Besschetnova TY, Brooks CR, et al. (2010). Enithelial cell cycle 1169
- arfest in 62/M mediates kidney fibrosis after injury. Nat Med 16: 355–43. 1 p following 143.

Yang WJ, Li DP, Li JK, et al. (2009). Synergistic antioxidant activities of eight traditional Chinese herb pairs. *Biol Pharm Ball* 32:1021–6. 1173

- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. (2007). Cisplatin nephrotoxicity: A review. Am J Med Sci 334:115–24. 1174
- Ye YN, Koo MW, Li Y, et al. (2001). Angelica sinensis modulates migration and proliferation of gastric epithelial cells. Life Sci 68: 1176 961–8. Ye F, Li H, Mana X, Yang D, (2012). Estimation antipipation of 1177
- Yu F, Li H, Meng Y, Yang D. (2013). Extraction optimization of Angelica sinewsis polysaccharides and its antioxidant activity in vivo. Carbohydr Polym 94:114–19. 1179
- Zeisberg M, Daffield JS. (2010). Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. J Am Soc Nephrol 21:1247–53. 1180 Zeisberg M, Neilson EG. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal 1181
- Zeisberg M, Neilson EG. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J Clin Invest 119:1429–37. 1182

1183 1184 1185

Supplementary material available online

Supplementary Figure 1S.

lii

1187 1188 1189

1192

1193

1194

1195

1196

1197

1198

1100

1200

1186

Received: 2 August 2013,

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jat.2951

Revised: 14 September 2013,

Published online in Wiley Online Library: 24 October 2013

Applied Toxicology

Protective effects of schizandrin and schizandrin B towards cisplatin nephrotoxicity *in vitro*

Valérian Bunel^{a,b}*, Marie-Hélène Antoine^a, Joëlle Nortier^a, Pierre Duez^b and Caroline Stévigny^b

ABSTRACT: Renal proximal tubular epithelial cells are the main targets of toxic drugs such as cisplatin (CisPt), an alkylating agent indicated for the treatment of solid organ tumors. Current techniques aiming at reducing nephrotoxicity in patients receiving CisPt are still not satisfactory as they can only partially prevent acute kidney injury. New nephroprotective strategies remain to be developed. In the present *in vitro* study, schizandrin (Schi) and schizandrin B (Schi B), major phytochemicals from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. fruits, were tested on HK-2 cells along four processes that could help alleviate CisPt toxicity. Results indicated that: (i) both Schi and Schi B enhanced cell survival via reducing apoptosis rate; (ii) only Schi showed moderate effects towards modulation of regeneration capacities of healthy cells; (iii) both Schi and Schi B limited extracellular matrix deposition; and (iv) both compounds could help preventing dedifferentiation processes via the β -catenin pathway. Schi and Schi B present promising activities for future development of protective agents against CisPt nephrotoxicity. Copyright \circ 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: Apoptosis; B-catenin; Cisplatin; HK-2 cells; Schizandrin; Schizandrin B; Regeneration

Introduction

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum or CisPt) is an alkylating chemotherapeutic drug commonly used for the treatment of solid organ tumors such as lung, testis or ovarian cancers. In forming DNA-adducts, it may stop tumor cell growth and trigger their death. Unfortunately, CisPt treatment is often accompanied by severe detrimental side effects, such as nephrotoxicity, which limit the use of high dosages. Clinical data indicate that a single injection of the drug at 20 mg m induces acute kidney injury (AKI) in about a third of treated patients (Hilal et al., 2005; Yao et al., 2007) for high numbers of renal proximal tubular epithelial cells (RPTECs) die following an apoptotic process (dos Santos et al., 2012; Yao et al., 2007). The massive loss of cells triggers transient loss in kidney function and structure. The lack of efficient regeneration process of injured RPTECs can trigger the onset of severe atrophy, followed up by fibrotic repair progressively resulting in chronic kidney disease and irreversible loss of renal function (Wynn, 2010). Recurrent AKI episodes, which are partially irreversible, may become more severe and last longer with repeated injections of CisPt, leading to the progressive loss of renal function.

Numerous studies conducted worldwide aim at identifying protective molecules and/or mechanisms that could be used to prevent or alleviate CisPt insults and the onset of AKI (Barabas et al., 2008; dos Santos et al., 2012). Among these, various compounds of herbal origin have been tested (Nagwani and Tripathi, 2010; Nitha and Janardhanan, 2008; Sohn et al., 2009a, b). These are notably issued from traditional Chinese medicine remedies that benefit from long-term use probably justifying their safety.

The fruit of Schisandra chinensis (Turcz.) Baill., an ancient traditional Chinese medicine drug, is nowadays acknowledged as an adaptogen, i.e., a substance having the ability to increase non-specific resistance of organisms to biological, chemical, physical or emotional stress (European Medicines Agency, 2008). Although numerous phytochemical compounds have been characterized, major biological activities seem to be attributed to schizandrin (Schi) and schizandrin B (Schi B), two lignans presented in Fig. 1 (Panossian and Wikman, 2008). These compounds have been involved in recent *in vivo* and *in vitro* pharmacological studies, suggesting a protective effect in various pathological models (Jeong *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Sohn *et al.*, 2009a,2009b; Stacchiotti *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012).

The present *in vitro* study compares the activity of Schi and Schi B for possible alleviation of CisPt-mediated tubulotoxicity by investigating four processes involved in AKI processes: (i) apoptosis and cellular death (Havasi and Borkan, 2011; Pabla and Dong, 2008; Wynn, 2010); (ii) tubular regeneration capacities of healthy cells (Lee and Kalluri, 2010; Megyesi *et al.*, 2002; Wynn, 2010); (iii) acquisition of collagen, an extracellular matrix (ECM) protein (Wynn, 2010; Yang *et al.*, 2010); and (iv) dedifferentiation processes of epithelial cells via the β-catenin relocalization (Hao *et al.*, 2011; Liu, 2010).

*Correspondence to: Valérian Bunel, Laboratory of Pharmacognosy, Bramatology and Human Nutrition, 8d du Triomphe, CP 205/9, 1050 Brussels, Belgium, E-mail: valerian.bunel@outlook.com; vbunel@ulb.ac.be

⁴Laboratory of Experimental Nephrology, Faculty of Medicine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

*Laboratory of Pharmacognosy, Bromatology and Human Nutrition, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

1311

J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 1311-1319

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Figure 1. Structures of schizandrin (Schi) and schizandrin B (Schi B).

Material and methods

Reagents and culture media

CisPt solutions were prepared from the marketed drug Cisplatine Hospira* (Hospira Benelux, Antwerpen, Belgium). Schi (purity 99%) and Schi B (purity 98%) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA) and from Finetech (Wuhan, China), respectively. Cell culture medium and reagents were from (PAA Laboratories, Pasching, Austria).

Cell culture and treatment

HK-2 cells, originating from RPTECs, were obtained from American Type Culture Collection (CRL-2190), and grown in low glucose DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS, PAA Clone), 2 mwL-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Cells were subcultured or harvested for experiments when reaching about 90% confluence. For experimental purposes, cells were used between passages 6 and 25, harvested by scraping and seeded on 60-mm Petri dishes (4×10^5 cells), four-well chamber-slides (Lab-Tek II; Nunc, Rochester, NY, USA) (2.4×10^4 cells), 12-well plates (5×10^4 cells) or 96-well plates (1×10^4 cells). Cells were then incubated for 24 h in complete medium, rinsed twice with DMEM and treated with test substances for 48 h in FBS-free medium. The tests performed in this study, along with their relevance to AKI, are summarized in Table 1.

CisPt working dose corresponded to IC₂₅, as determined with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and crystal violet assays (data not shown). Schi and Schi B working doses (1 μ M) were calculated provided that traditional Chinese

Test	Why performed?	Relevance to AKI and fibrosis
Resazurin	To measure cellular viability	Cell survival is associated with improved renal function (Pabla and Dong, 2008).
Annexin V/PI	To confirm that cellular viability enhancement correlates with reduced apoptosis	CisPt induced cell death implies apoptotic and necrotic pathways <i>in vivo</i> . It is however acknowledged that only high doses of CisPt can induce necrosis (dos Santos et al., 2012).
Ki-67	To evaluate cellular proliferation	Enhancing proliferation rate of healthy cells can improve kidney repair following AKI-induced cell loss (Price et al., 2009; Wynn, 2007). Ki-67 antigen is present at the nuclear surface of proliferative cells commonly used to assess cellular proliferation capacity (Urruticoechea et al., 2005).
Cell cycles	To check for eventual cell cycle arrest/confirm proliferation highlighted with Ki-67	As DNA damages can cause cell cycle arrest at G ₂ /M phases – as it is the case for CisPt (Jamieson and Lippard, 1999) – they lead to an increased Ki-67 index not correlated to enhanced proliferation. Cell cycle analysis can evaluate the proportion of G ₂ /M cells and help discriminate between proliferative or cell cycle arrest effects.
Wound healing assay	To evaluate cellular motility	Enhancing migration rate of healthy cells can help recolonizing damaged tubules (Bozic et al., 2011).
Collagen assessment	To assess ECM protein synthesis	Collagen is a major constituent of ECM, replacing functional tissues by permanent fibrotic scar during abnormal wound healing. Limiting fibrogenesis and collagen accumulation can counter the irreversible loss of kidney function and structure (Wojcikowski et al., 2004; Wynn, 2007).
Membranous β-catenin	To estimate epithelial phenotype's integrity	β-catenin links E-cadherin to the cytoskeleton, thus ensuring intercellular adhesion. Preserving epithelial phenotype can prevent cell loss along the tubules (Bozic et al., 2011; Hao et al., 2011).
Cytoplasmic/nuclear β-catenin	To predict potential activation of genes involved in dedifferentiation	Inhibiting β-catenin relocalization is associated with hampered expression of genes involved in cellular de- differentiation, a phenomena involved in fibrogenesis (Bozic et al., 2011; Hao et al., 2011; He et al., 2011).

1312

wileyonlinelibrary.com/journal/jat

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 1311-1319



medicine monographs prescribes the use of 5. chinensis up to 3 qlån (≈ 10 g) per intake (Bensky *et al.*, 1986) and that the minimal content of Schi in crude drug is 0.4%, as stated by the European Pharmacopoeia (Council of Europe, 2007) (leading to the oral ingestion of at least 40 mg of Schi per intake). A pharmacokinetic study reports plasma levels of $1.17 \,\mu$ M after oral administration of Schi to rats at a dose of 5 mg kg⁻¹ body weight (Xu *et al.*, 2008), corresponding to a human equivalent dose of about 50 mg per intake (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Assuming that plasma and the glomerular filtrate have similar compositions, we decided to treat the cells with a concentration close to that reported above (i.e., 1 μ M).

Cell viability assay

Cells were treated with CisPt and/or Schi or Schi B in 96-well plates, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and assessed for their viability by incubation for 1.5 h with 0.44 mM resazurin solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Absorbances were measured at 540 and 620 nm using iEMS Reader MF spectrophotometer (Thermo Labsystems, Breda, The Netherlands). Percentage of reduced dye was calculated with the following formula:

$$\frac{(\epsilon OX)\lambda 2.A\lambda 1 - (\epsilon OX)\lambda 1.A\lambda 2}{(\epsilon RED)\lambda 1.A\lambda 2 - (\epsilon RED)\lambda 2.A\lambda 1}$$

Where ϵ_{OX} = molar extinction coefficient of resazurin (47.6 at 540 nm and 34.8 at 620 nm); ϵ_{RED} = molar extinction coefficient of resorufin (104.4 at 540 nm and 5.5 at 620 nm); A = absorbance of test wells; A^{*} = absorbance of blank well; λ 1 = 540 nm; λ 2 = 620 nm. Metabolic activity was normalized against control conditions.

Annexin V/propidium iodide staining assay

Cells were incubated in 12-well plates with 1 μ M Schi or Schi B and/or 10 μ M CisPt. At the end of treatment, cells were rinsed with PBS, harvested with trypsin/EDTA (0.5/0.2%) and centrifuged at 500 g. Supernatant was discarded. Cells were resuspended and incubated with Annexin V-FITC detection kit (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) in the dark for 15 min. Suspensions were then analyzed using a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Pharmingen). A total of 10⁴ cells were recorded. The data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA); debris and cell clumps were removed and the percentages of live and apoptotic cells were calculated.

Ki-67 immunostaining

Cells were treated on chamber slides with test substances. Slides were then rinsed twice in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde solution for 20 min, rinsed and permeabilized with 0.01% Triton X for 5 min. Slides were rinsed again. Cells were blocked with goat serum (PAA Laboratories) for 1 h, and then incubated with a primary rabbit anti-Ki-67 antibody (Abcam, Cambridge, UK) for 1 h. Slides were rinsed twice and incubated with a secondary Alexa Fluor 488 conjugated goat antirabbit antibody (Invitrogen, Eugene, OR, USA) for 30 min. Slides were rinsed twice and mounted with DAPI-containing mountant (Invitrogen) and examined with an Axioskop fluorescence microscope

J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 1311-1319

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

wileyonlinelibrary.com/journal/jat

(Zeiss, Oberkochen, Germany) at magnification 400 ×. Twenty pictures per chamber were acquired; the Ki-67 index was calculated by dividing the number of Ki-67-positive cells by the total number of cells.

Cell cycle analysis

Cells were treated and harvested as for the Annexin V/propidium iodide (PI) assay, resuspended in 1 ml PBS and manually counted using a Malassez hemocytometer. Cells were then fixed by adding 2 ml of ice-cold absolute ethanol, incubated during 1 h at 4 °C, centrifuged at 500 g and rinsed with PBS. Cells were resuspended in PI/RNase Staining Buffer (BD Pharmingen) following the manufacturer's instructions, incubated 30 mln at room temperature, centrifuged at 500 g, resuspended in 400 µl BD FACSFlow (BD Pharmingen) and analyzed using a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Pharmingen). A minimum of 10⁴ events corresponding to HK-2 cells were recorded using the BP 585/42 filter at a maximum rate of 200 events s⁻¹.

Cell cycle analysis was achieved with FlowJo software (Tree Star): debris and cell clumps were removed and proportions of G_0/G_1 , S and G_2/M were determined according to the Dean-Jett-Fox model.

Wound healing assay

Cells were seeded on 60 mm Petri dishes, incubated for 48 h, yielding approximately 90-100% confluence and were growth arrested for 24 h in serum-free medium. Monolayers were scratched in a linear fashion with a sterile 200 µl pipette tip and gently rinsed with serum-free medium to remove cell debris. Ten pictures of the initial scratch were taken (t_0) using Motic AE21 microscope equipped with a Moticam 2300 camera (Motic, Wetzlar, Germany) at magnification 100 x. Cells were then treated with test substances for 18 h, and 10 pictures of the scratch were taken (t_{18}).

The area of the scratch was measured using TScratch (Geback et al., 2009) and expressed as a mean width per image (μ m). For each condition, the migration rate (μ m h⁻¹) was calculated by subtracting the value obtained at t₁₈ to the value obtained at t₀, and reported to the duration of incubation.

Assessment of collagen synthesis

Cells were treated in 96-well plates for 48 h, rinsed with PBS and assessed for their metabolic activity with the resazurin assay as described above. Next, cells were washed with PBS, fixed with ice-cold methanol for 1 h at 4 °C, rinsed twice with 1% acetic acid and stained for 2 h with 0.1% picrosirius red staining solution. Wells were then rinsed thrice with 1% acetic acid, dyes were solubilized in 0.1 M NaOH, and absorbances of the wells measured at 540 nm. Absorbances attributed to picrosirius red staining were normalized according to the metabolic activity of each well (the correlation between the number of cells, metabolic activity and protein amount determined by the bicinchoninic acid method was verified in preliminary experiments).

β-catenin determinations

Membranous //-catenin determination

Cells were treated on chamber slides for 48 h in medium containing Schi or Schi B and/or CisPt. Slides were rinsed twice

in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde solution for 20 min, rinsed and permeabilized with 0.01% Triton X for 5 min. Slides were rinsed again and cells blocked with donkey serum (sc-2044; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 1 h. They were then incubated with mouse antihuman β-catenin primary antibody (sc-7963; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h, washed twice, incubated with cyanine-3 conjugated donkey antimouse secondary antibody (715-166-151, Immuno Research Lab Jackson, West Grove, USA) for 30 min, rinsed twice, mounted with DAPI-containing Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen) and examined at magnification 400 × with an Axioskop fluorescence microscope (Zeiss) equipped with a DP200 camera (Deltapix, Maalov, Denmark).

Before evaluation of the fluorescence intensity, the linearity and reproducibility of the method were controlled using InspeckTM Orange (λ_{tx} = 540 nm/ λ_{tm} = 560 nm) fluorescently labeled microbeads (6.0 µm diameter) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

For each condition, 10 pictures were taken, and analyzed using Fiji (Fiji Is Just ImageJ) software. The fluorescence intensity was evaluated by the measurement of luminance. DAPI counterstaining allowed removing the signal corresponding to eventual β -catenin translocated in the nucleus.

Cytoplasmic/nuclear []-catenin determination

Cells were treated in 12-well plates, rinsed with PBS, harvested with trypsin/EDTA (0.5/0.2%), centrifuged at 500 g and fixed in Cytofix/Cytoperm solution (BD Pharmingen) for 20 min at 4 °C. Suspension was washed twice, incubated with antihuman β-catenin-phycoerythrin monoclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in the dark for 30 min. Cells were washed twice and analyzed using a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Pharmingen). A minimum of 10⁴ cells were recorded. The data were analyzed with FlowJo software (Tree Star); debris and cell clumps were removed and mean fluorescence intensities (geometric mean) were calculated using BP 585/42 filter for phycoerythrin.

Statistical analysis

Unless stated otherwise, experiments were performed four times using independent samples. Results needing to be normalized versus controls were treated as described by (Valcu and Valcu, 2011). Data were compared through a one-way ANOVA with *post-hoc* Student's *t* test (Bonferroni correction) using Prism 5 software (GraphPad, San Diego, USA). *P* < 0.05 was considered significant.

Results

Effects of schizandrin and schizandrin B on cisplatin-induced cell death

Figure 2 shows the effects of CisPt incubation with or without Schi or Schi B (1 μ M) on the viability of HK-2 cells determined with resazurin assay. After 48 h incubation with CisPt, the proportion of live cells dropped to 76.2 ± 1.9%, whereas Schi and Schi B did not induce any statistically significant difference at tested concentrations. Upon cotreatment with CisPt and Schi O Schi B, cells exhibited significantly higher survival rates (82.1 ± 0.8% and 87.7 ± 2.0%, respectively; P < 0.001), as compared to CisPt treatment alone.

J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 1311-1319

V. Bunel et al.



Figure 2. Protective effects of Schi (1 μ M) and Schi B (1 μ M) towards CisPt-treated HK-2 cells were investigated with resazurin assay after 48 h treatment. Results are displayed as means ± SD of four independent experiments (***P < 0.001). CisPt, cisplatin; Ctrl, control; Schl, schizandrin.

Schizandrin and schizandrin 8 moderately reduce cisplatin-induced HK-2 cells apoptosis

To confirm further the protective effects observed with Schi and Schi B towards CisPt-Induced cell death, apoptosis rates were investigated. Annexin V/PI staining was used to identify cells in both early and late stages of apoptosis; necrotic cells were not taken into account as necrosis is normally induced with higher concentrations in CisPt (dos Santos *et al.*, 2012).

Treatment of HK-2 cells with 10 μ M CisPt induced an increase in number of apoptotic cells from 3.2 \pm 0.5% for control conditions to 16.4 \pm 0.6% (Fig. 3). Upon cotreatment with Schi and Schi B (1 μ M), the ratios of apoptotic cells were significantly reduced to 14.0 \pm 0.8% and 14.2 \pm 0.5%, respectively.



CisPt and/or Schi or Schi B (1 µM) for 48 h. Results are displayed as

means ± 5D of four independent experiments (**P < 0.01; ***P < 0.001).

CisPt, cisplatin; Ctrl, control; Schl, schizandrin.

Nephroprotection of Schisandra compounds against cisplatin toxicity

Applied Toxicology

Altogether, these results indicate that both Schi and Schi B, when given concomitantly with CisPt, are able to reduce cellular death, probably via lowering the apoptosis rate.

Schizandrin but not schizandrin B enhances cellular proliferation

Immunofluorescence staining of the Ki-67 marker after treatment for 48 h with test substances is displayed in Fig. 4. FBS was used as a positive control; indeed, HK-2 cell growth has been shown to be epidermal growth factor-dependent (Ryan *et al.*, 1994). As compared to control grown in the absence of serum, FBS induced a 3.1-fold increase in the number of cells staining positive for Ki-67. CisPt (10 μ M) also increased the Ki-67 index (2.3-fold over control). However, this effect probably does not correspond to enhanced cellular proliferation and could be a consequence of a G₂/M cell cycle arrest induced by CisPt-triggered DNA damages (Jamieson and Lippard, 1999).

Schi treatment also raised the Ki-67 index to about 1.9-fold over control. To determine whether this effect is a consequence of a proliferation enhancement, or a toxic effect as presumed for CisPt, an analysis of cell cycle distribution was carried out.

Cell cycle analysis

Figure 5 shows the cell cycle phases distribution of cells treated in the same conditions as for the Ki-67 index assessment. The positive control (FBS 10%) induced a slight decrease in the amount of G₀/G₁ cells (71.3 \pm 3.7% vs. 84.3 \pm 0.9% for control condition) and a slight increase in the amount of G₂/M cells (20.2 \pm 2.9% vs. 10.6 \pm 1.9% for control condition).

As expected, CisPt exposure induces a cell cycle arrest at G_2/M checkpoint, resulting in a sharp increase in G_2/M cells (76.8 ± 2.4%) and decrease in G_0/G_1 phases cells (16.0 ± 2.5%).



Figure 5. Cell cycle distribution after treatment of HK-2 cells for 48 h with test substances. Results are means \pm SD of four independent experiments (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.01 compared to control group). CisPt, cisplatin; Ctrl, control; FBS, fetal bovine serum; Schi, schizandrin.

Schi and Schi B treatments yielded the same patterns as observed for FBS treatment, with slight decreases of G₀/G₁ cells (77.3 \pm 2.5% and 78.5 \pm 3.0%, respectively); G₂/M cells show a slight increased trend, but were not statistically significant.

Schi and Schi B were not able to prevent CisPt-mediated G₂/M arrest (data not shown), which suggests that these compounds probably do not protect HK-2 cells against DNA damages.

Schizandrin and schizandrin B have no effect on wound healing

As Schi shows a Ki-67-enhancing effect, and as both Schi and Schi B promote the progression in cell cycle by reducing the proportion of G_D/G_1 cells, their ability to increase tubular



Figure 4. Fluorescence immunostaining pictures of Ki-67 antigen (green fluorescence) and nuclei (blue fluorescence) after HK-2 cells treatment with test substances for 48 h (magnification × 400). Pictures are representative of four independent experiments. The proliferation indexes assessment are displayed as means ± 5D of four independent experiments (***P < 0.001 compared to control group). CisPt, cisplatin; Ctrl, control; FBS, fetal bovine serum; Schi, schizandrin.

J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 1311-1319

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

wileyonlinelibrary.com/journal/jat



Figure 6. Wound healing assay. HK-2 cells were serum-deprived for 24 h, scratched with a pipette tip and incubated with test substances for 18 h. Phase contrast microscopy images (× 100 magnification) for control, FBS, Schi and Schi B treatments at t₀ (left pictures) and t₁₈ (right pictures). Migration rates are displayed as means ± SD of four independent experiments ("**P < 0.001 as compared to control conditions) (lgraph). CisPt, cisplatin; Ctrl, control; FBS, fetal bovine serum; Schi, schizandrin.

regeneration was investigated through the study of cellular migration enhancement.

FBS induced a 1.7-fold increase over control, but no effect could be observed upon treatment with 1 μ M Schi or 1 μ M Schi B (Fig. 6).

Both schizandrin and schizandrin B reduce cisplatin-induced collagen synthesis

Total collagen amounts, assessed with picrosirius red staining, were not modified upon treatment of HK-2 cells with both Schi

wileyonlinelibrary.com/journal/jat

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Appl. Taxicol. 2014; 34: 1311-1319

V. Bunel et al.



Figure 7. Collagen quantification upon treatment of HK-2 cells with test substances for 48 h and picrosirius red staining. Absorbances were normalized according to their metabolic activity (resazurin assay) and compared to control condition (means \pm SD of four independent experiments; *P < 0.05; ***P < 0.001). CisPt, cisplatin; Crtl, control; Schi, schizandrin.

and Schi B as compared to control condition (Fig. 7). However, if CisPt induced an increased collagen synthesis ($125 \pm 6\%$), both Schi and Schi B cotreatments were able to restrain this effect ($115 \pm 4\%$ and $110 \pm 4\%$, respectively).

Assessments of B-catenin

Membranous B-catenin

When HK-2 cells were treated with $10 \,\mu$ M CisPt, the membranous β -catenin expression was reduced by 1.8-fold as compared to control conditions (Fig. 8A). Upon cotreatment with Schi and Schi B, the β -catenin losses were limited to 1.2 and 1.1 respectively; this indicates that both compounds could prevent the loss of epithelial phenotype.

Intracytoplasmic/nuclear ß-catenin

HK-2 cells grown in the same conditions were stained for their intracytoplasmic/nuclear β -catenin and analyzed by flow cytometry. The observed loss of membranous β -catenin with CisPt treatment (Fig. 8A) correlates with an increased intracytoplasmic/nuclear isoform of 1.7-fold over control (Fig. 8B). Both Schi and Schi B cotreatments were effective in limiting this increase to 1.2- and 1.0-fold over control respectively. This indicates that both compounds are effective in preventing β -catenin relocalization.

Discussion

CisPt is an efficient chemotherapeutic agent, for which adverse effects, notably renal toxicity, remain highly detrimental to patients and often lead to a dose reduction of the drug, compromising the therapy. Until now, ensuring adequate hydration and diuresis represents the only strategy implemented for limiting the nephrotoxicity of the treatment.

CISPt concentrates in tumor cells, as well as in RPTECs and binds covalently to DNA, resulting in apoptosis and cell cycle arrest (dos Santos et al., 2012), both of which are starting points for AKI and fibrotic repair (Wynn, 2010). It is yet recognized

Nephroprotection of Schisandra compounds against cisplatin toxicity



Figure 8. Immunostained membranous (b-catenin after treatment for 48 h for control and CisPt conditions (A). Ten images were acquired per condition and fluorescence intensities were measured; DAPI counterstaining was subtracted to remove eventual (b-catenin translocated to the nucleus. Luminance values were then recorded (graph A). Results are displayed as means ± SD of four independent experiments (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 compared to control group). Fluorescence intensity was evaluated (graph B). Means ± SD of four independent experiments (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.01; **

that preventing AKI may contribute to restrain fibrosis onset and progression to end-stage renal disease.

The present in vitro study focused on four of the key elements involved in AKI.

Prevention of cell death via apoptosis

This is a mechanism leading to the loss of functional units of the tubules. Both Schi and Schi B enhanced the survival of cells treated with CisPt. This was confirmed for both compounds by a reduction in the number of cells undergoing apoptosis at end-point (48 h incubation) of experiment. As both Schi and Schi B showed similar efficacy in reducing the apoptosis rate, this factor alone does not explain the higher enhancement in cell survival for Schi B; other mechanisms may be involved. Nevertheless, these promising results are to be related to a potential reduction in the loss of tubular cells *in vivo*, what could reduce tubular atrophy and AKI. This has notably been demonstrated for Schi B in a cyclosporine A-mediated nephrotoxicity model (Zhu et al., 2012).

Promotion of tubular regeneration

Enhancing cellular proliferation and migration capacities could help tubules recover after CisPt insults and could thus reduce the duration and severity of AKI in avoiding functional and structural losses (Price *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010).

The proliferation enhancement was assessed by the Ki-67 index, commonly used to determine whether tumors have a high proliferative potential or not. Ki-67 is present at the nuclear surface of proliferating cells (i.e., in G₁, S, G₂ and M phases of the cell cycle) and remains absent in quiescent cells (G₀) (Urruticoechea *et al.*, 2005). Ki-67 has previously been used in vitro and *in vivo* for the assessment of RPTEC's proliferation/ regeneration (Docherty *et al.*, 2006; Pozdzik *et al.*, 2008).

CisPt increased the Ki-67 index by 2.3-fold over control conditions, but this increase is a consequence of its toxicity rather than an effect on proliferation; CisPt's binding to DNA strands is known to trigger cell cycle arrest at G_2/M checkpoint (Jamieson and Lippard, 1999), resulting in Ki-67-positive cells. This was confirmed by flow cytometry analysis of cell cycle phases that indicated a 7.2-fold increase in G_2/M cells.

J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 1311-1319

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

The addition of FBS (10%) or Schi (1 µM) induce 3.1- and 1.9-fold increases respectively in the Ki-67 index, whereas Schi B treatment does not produce any modification. Cell cycle analysis indicates that FBS treatment yields a 1.9-fold increase in G₃/M cells, whereas neither Schi nor Schi B induces a significant accumulation of cells in this phase. However, Go/G1 phases were significantly reduced upon Schi and Schi B treatment, suggesting that both compounds may promote cellular proliferation. The results obtained for the Ki-67 index assessment suggest that Schi actively instigates cell cycle entrance (G1), thus lowering the amount of quiescent cells. Schi B could influence the duration of definite phases of the cell cycle, without influencing the proportion of quiescent/proliferating cells. This should be confirmed by further investigations.

The cellular migration, assessed by a scratch assay, did not highlight any effect as compared to control conditions.

The regeneration potential of the two tested compounds appears somewhat limited. Only Schi seems capable of promoting the proliferation of tubular cells.

Cisplatin-induced collagen production

This ECM protein is secreted soon after injury to produce acellular non-functional scar tissue, filling eventual gaps left by dead cells along the tubule. However, collagen acts as a pro-fibrosis factor (Zeisberg and Neilson, 2010). The amounts of deposited collagen depend on the balance between its production by RPTEC and its degradation by matrix metalloproteinases. Preventing its deposition is likely to help recovery following CisPt-induced AKI and to avoid fibrosis onset.

In our model, we showed that both Schi and Schi B were effective at reducing CisPt-induced collagen synthesis. However, Schi B showed a higher effect than Schi. Evidence suggested that lowering the ECM protein synthesis correlates to attenuated fibrotic lesions in an obstructive nephropathy in vivo model (Hao et al., 2011).

Localization of 8-catenin

This is a protein playing a dual role in cell adhesion as well as in the transcription of genes. In adherens junctions, B-catenin links E-cadherin to the cytoskeleton, ensuring the epithelial phenotype of RPTECs. In case of cellular injury, these links disrupt and β-catenin may relocalize into the nucleus where it serves as a co-transcriptional activator with T-cell factor (Zeisberg and Neilson, 2009), a complex governing the transcription of genes involved in fibrosis (Bozic et al., 2011). Evidence suggested that blockade of the β-catenin pathway could reduce the onset and limit the progression of renal fibrosis (Hao et al., 2011; He et al., 2011). Moreover, Schi and Schi B are lignans, a class of compounds that have already proven their ability to inhibit the β-catenin transcription pathway in colorectal adenocarcinoma cells (Yoo et al., 2010).

Membranous 8-catenin

Quantitative fluorescence image analysis demonstrated that HK-2 cells treatment with CisPt induced a 1.8-fold decrease in the amount of membranous β-catenin, as compared to control condition. Cotreatment with Schi and Schi B restrained this loss to 1.2- and 1.1-fold, respectively. Both compounds have rather similar efficacy towards prevention of this

1318

epithelial phenotype loss. However, none had the ability to increase membranous β-catenin after 48 h treatment, indicating that they were not able to promote the protein's expression.

It is conceivable that, in preserving the adherens junction's tightness. Schi and Schi B can prevent cell detachment and thus influence the overall cellular viability.

Internal **B**-catenin

The amounts of nuclear/cytoplasmic isoforms of β-catenin were assessed by flow cytometry. Both Schi and Schi B could restrain the relocalization of the protein in the presence of CisPt; this indicates that they may be effective in reducing the transcription of genes involved in fibrosis development.

Altogether, these results point out a promising nephroprotective potential of Schi and Schi B towards CisPt toxicity. The prevention of cell death, along with the enhancement in tubular regeneration, restrained ECM deposition and prevention of β-catenin relocalization could help alleviate the severity and duration of CisPt-induced AKI, and, in the longer term, avoid the onset of kidney fibrosis.

Conclusion

Altogether, these results point out a promising nephroprotective potential of Schi and Schi B towards CisPt toxicity. The prevention of cell death, along with the slight enhancement in tubular regeneration, restrained ECM deposition and prevention of β-catenin relocalization could alleviate the severity and duration of CisPt-induced AKI, and, in the longer term, avoid the onset of kidney fibrosis.

Acknowledgments

Thanks are expressed to E. De Prez, M. Faes and O. Vaillant for technical assistance, T. Baudoux and C. Husson for their valuable advices on flow cytometry.

Conflicts of interest

The Authors did not report any conflict of interest.

Funding

Valérian Bunel is a fellow of the Fonds de la Recherche Scientifique - FNRS (FRIA grant).

References

- Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. 2008. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. Vet. Comp. Oncol. 6: 1–18. Bensky D, Gamble A, Kaptchuk T, Bensky L. 1986. Chinese Herbal Medicine:
- Materia Medica. Eastland Press: Seattle.
- Bozic M, de Rooij J, Parisi E, Ortega MR, Fernandez E, Valdivielso JM. 2011. Glutamatergic signaling maintains the epithelial phenotype of proximal tubular cells. J. Am. Soc. Nephrol. 22(6):1099–1111.
- Council of Europe. 2007. European Pharmacopoeia 6.0 Strasbourg, Council of Europe.
- Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'Neill AJ, Fitzpatrick JM, Watson RW. 2006. TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activa-tion. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 290(5):#1202-F1212.
- EMEA (European Medicines Agency) 2008. Reflection Paper on the Adaptogenic Concept. EMEA. HMPC: London. EMEA/HMPC/ 102655/2007.

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

J. Appl. Toxicol. 2014; 34: 1311-1319



- Geback T, Schulz MM, Koumoutsakos P, Detmar M. 2009. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques* 46(4):265–274.
- Hao S, He W, Li Y, Ding H, Hou Y, Nie J, Hou FF, Kahn M, Liu Y. 2011. Targeted inhibition of beta-catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. J. Am. Soc. Nephrol. 22 (9):1642–1653.
- Havasi A, Borkan SC. 2011. Apoptosis and acute kidney injury. Kidney Int. 80:29–40.
- He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. 2011. Biockade of Wnt/beta-catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. J. Am. Soc. Nephrol. 22:90–103.
- Hilal G, Albert C, Vallée M. 2005. Mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité. Ann. Biol. Clin. Qué. 42(3):29–35.
- Jamieson ER, Lippard SJ. 1999. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. Chem. Rev. 99(9):2467–2498.
- Jeong SI, Kim SJ, Kwon TH, Yu KY, Kim SY. 2012. Schizandrin prevents damage of murine mesangial cells via blocking NADPH oxidaseinduced ROS signaling in high glucose. Food Chem. Toxicol. 50(3–4): 1045–1053.
- Lee SB, Kalluri R. 2010. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. Kidney Int. 78 (Suppl. 119): 522–526.
- Lee TH, Jung CH, Lee DH. 2012. Neuroprotective effects of Schisandrin B against transient focal cerebral ischemia in Sprague–Dawley rats. Food Chem. Toxicol. 50(12):4239–4245.
- Liu Y. 2010. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. J. Am. Soc. Nephrol. 21(2):212–222.
- Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Jr, Safirstein RL, Price PM. 2002. Coordination of the cell cycle is an important determinant of the syndrome of acute renal failure. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 283(4):F810–816.
- Nagwani S, Tripathi YB. 2010. Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity by PTY: a herbal preparation. Food Chem. Toxicol. 48(8–9): 2253–2258.
- Nitha B, Janardhanan KK. 2008. Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium Morchella esculenta, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. Food Chem. Toxicol. 46(9): 3193–3199.
- Pabla N, Dong Z. 2008. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 73(9):994–1007.
- Panossian A, Wikman G. 2008. Pharmacology of Schisandra chinensis Bail: an overview of Russian research and uses in medicine. J. Ethnopharmacol. 118(2):183–212.
- Park EJ, Chun JN, Kim SH, Kim CY, Lee HJ, Kim HK, Park JK, Lee SW, So I, Jeon JH. 2012. Schisandrin B suppresses TGFbeta1 signaling by inhibiting Smad2/3 and MAPK pathways. *Biochem. Pharmacol.* 83(3): 378–384.
- Pozdzik AA, Salmon IJ, Debelie FD, Decaestecker C, Van den Branden C, Verbeelen D, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL, Nortier JL. 2008. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int.* **73**(5):595–607.
- Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. 2009. The cell cycle and acute kidney injury. *Kidney Int.* 76(6):604–613.

- Reagan-Shaw 5, Nihal M, Ahmad N. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J. 22(3):659–661.
 Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B.
- tyan MJ, Jonnson G, KIK J, Fuerstenberg SM, Zager KA, Torok-Storb B. 1994. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelia cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* **45**:48–57.
- normal adult human kidney. *Kidney Int.* **45**:48–57. dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. 2012. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch. Toxicol.* **86**(8):1233–1250.
- Sohn SH, Lee EY, Lee JH, Kim Y, Shin M, Hong M, Bae H. 2009a. Screening of herbal medicines for recovery of acetaminophen-induced nephrotoxicity. Environ. Toxicol. Pharmacol. 27(2):225–230.
- Sohn SH, Lee H, Nam JY, Kim SH, Jung HJ, Kim Y, Shin M, Hong M, Bae H. 2009b. Screening of herbal medicines for the recovery of cisplatininduced nephrotoxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28(2):206–212.
- Stacchiotti A, Li Volti G, Lavazza A, Schena I, Aleo MF, Rodella LF, Rezzani R. 2011. Different role of Schisandrin B on mercury-induced renal damage in vivo and in vitro. *Toxicology* 286(1–3):48–57.
- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. 2005. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. J. Clin. Oncol. 23(28):7212–7220.
- Valcu M, Valcu CM. 2011. Data transformation practices in biomedical sciences. Nat. Methods 8(2):104–105.
- Wojcikowski K, Johnson DW, Gobe G. 2004. Medicinal herbal extracts renal friend or foe? Part two: herbal extracts with potential renal benefits. Nephrology 9(6):400–405.
- Wynn TA. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J. Clin. Invest. 117(3):524–529.
- Wynn TA. 2010. Fibrosis under arrest. Nat. Med. 16(5):523-525.
- Xu M, Wang G, Xie H, Huang Q, Wang W, Jia Y. 2008. Pharmacokinetic comparisons of schizandrin after oral administration of schizandrin monomer, Fructus Schisandrae aqueous extract and Sheng-Mai-San to rats. J. Ethnopharmacol. 115(3):483–488.
- Yamamoto E, Izawa T, Juniantito V, Kuwamura M, Sugiura K, Takeuchi T, Yamate J. 2010. Involvement of endogenous prostaglandin E2 in tubular epithelial regeneration through inhibition of apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-induced rat renal lesions. *Histol. Histopathol.* 25(8):995–1007.
- Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. 2010. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. Nat. Med, 16(5):535–543, 531p following 143.
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. 2007. Cisplatin nephrotoxicity: a review. Am. J. Med. Sci. 334(2):115–124.
 Yoo JH, Lee HJ, Kang K, Jho EH, Kim CY, Baturen D, Tunsag J, Nho CW.
- Yoo JH, Lee HJ, Kang K, Jino EH, Kim CF, Baturen D, Tunsag J, Kino CW. 2010. Lignans inhibit cell growth via regulation of Wht/beta-catenin signaling. Food Chem. Toxicol. 48 (8–9):2247–2252.
- Zeisberg M, Neilson EG. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J. Clin. Invest, 119(6):1429–1437.
- Zeisberg M, Neilson EG. 2010. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. J. Am. Soc. Nephrol. 21(11):1819–1834.
- Zhu S, Wang Y, Chen M, Jin J, Qiu Y, Huang M, Huang Z. 2012. Protective effect of schisandrin B against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in vitro and in vivo. Am. J. Chin. Med. 40(3):551–566.

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Abréviations

A : absorbance

AA : acides aristolochiques

AAN : aristolochic acid nephropathy = néphropathies aux acides aristolochiques

ADH : antidiuretic hormone = hormone anti-diurétique ou vasopressine

ADN : acide désoxyribonucléique

AINS : anti-inflammatoire non-stéroïdien

ARA : atteinte rénale aiguë (N.B.: ce terme remplace celui d'IRA (insuffisance rénale aiguë), soit AKI (acute kidney injury) ou ARF (acute renal failure) en anglais).

ARN : acide ribonucléique

AS : extrait d'Angelica sinensis

α-SMA : α-smooth muscle actin

BCA : acide bicinchoninique

CAT : catalase

CHN : chinese herb nephropathy = néphropathie aux plantes chinoises

CisPt : cisplatine

CsA : ciclosporine A

cTGF : connective tissue growth factor

Ctr1: copper transporter 1 = transporteur de cuivre 1

DAPI: 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DFG : débit de filtration glomérulaire

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPA : dialyse péritonéale automatisée

DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire

EGF : epidermal growth factor = facteur de croissance épidermique

eGFR : estimated glomerular filtration rate = débit de filtration glomérulaire estimé

E-lig = E-ligustilide

EMT : epithelial-to-mesenchymal transition = transition épithélio-mésenchymateuse

EndoMt : endothelial-to-mesenchymal transition = transition endothélio-mésenchymateuse

EPO : érythropoïétine

ES : extrait d'Eleutherococcus senticosus

ET : écart type

FA : ferulic acid = acide férulique

FBS : fetal bovine serum = sérum bovin fœtal

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

GSH-Px : glutathion peroxydase

H₂DCF-DA : diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine

HPLC : high-performance liquid chromatography = chromatographie liquide haute performance

IC : inhibitory concentration = concentration inhibitrice

IRT : insuffisance rénale terminale

MEC : matrice extracellulaire

MMP : matrix metalloproteinase = métalloprotéinase matricielle

MRC : maladie rénale chronique (N.B.: ce terme remplace celui d'IRC (insuffisance rénale chronique), soit CKD (chronic kidney disease) ou CRF (chronic renal failure) en anglais).

MS : mass spectrometry = spectrométrie de masse

MTC : médecine traditionnelle chinoise

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit

NO : nitric oxide = oxyde nitrique

NOS : nitric oxide synthase = oxyde nitrique synthase

NTA : nécrose tubulaire aiguë

OAT : organic anion transporter = transporteur d'anions organiques

OCT : organic cation transporter = transporteur de cations organiques

PAAS : principes actifs d'Angelica sinensis

PBS : phosphate buffered saline = tampon phosphate salin

PCR : polymerase chain reaction = réaction en chaîne par polymérase

PG : extrait de Panax ginseng

P-gp: P-glycoprotéine

PI : iodure de propidium

PNF : pression nette de filtration

PSR : picrosirius red = rouge picrosirius

QFIA : quantitative fluorescence image analysis = analyse quantitative d'image en fluorescence

RNS : reactive nitrogen species = espèces réactives de l'azote

ROS : reactive oxygen species = espèces réactives de l'oxygène

RPTECs : renal proximal tubular epithelial cells = cellules épithéliales du tubule proximal

RT-qPCR : real-time quantitative polymerase chain reaction

SF : serum-free = milieu de culture dépourvu de sérum

SM : extrait de Silybum marianum

Smad 2/3 : small mothers against decapentaplegic 2/3

SOD : superoxyde dismutase

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

TCD : tubule contourné distal

Tcf/Lef : T cell factor/lymphoid enhancer factor

TCP : tubule contourné proximal

TEAC : Trolox® equivalent antioxidant capacity = capacité antioxydante en équivalent Trolox®

TGF-β: transforming growth factor-β

TNF- α : tumor necrosis factor- α = facteur de nécrose tumorale- α

TRR : thérapie de remplacement rénal

UUO : unilateral ureteral obstruction = obstruction unilatérale urétérale

VG : violet de gentiane

Z-lig = Z-ligustilide