

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES TABLEAUX	15
Chapitre 1. INTRODUCTION	16
A. Les Récepteurs à Domaine Discoïdine (DDR)	17
I. Structure et ligands	17
1. Structure génomique	17
a) Les gènes DDR	17
b) Les épissages alternatifs	18
2. Structure protéique	19
a) Structure protéique des DDR	19
b) DDR1 et DDR2, homologies et différences	19
c) Les isoformes de DDR1	20
3. Interactions des DDR avec leurs ligands	21
a) Quel(s) collagène(s) pour quel DDR	22
b) Bases moléculaires de la liaison du collagène	23
c) Mécanisme d'activation des DDR	23
II. Expression et fonctions physiologiques des DDR : Focus sur DDR1	25
1. Expression des DDR	25
2. Fonctions des DDR durant le développement	26
3. Fonctions des DDR chez l'adulte	27
III. Régulation de DDR1	27
1. Régulation transcriptionnelle de DDR1	27
2. Régulation de l'activité de DDR1	29

a)	Endocytose	29
b)	Clivage du domaine extracellulaire	30
IV.	Voies de signalisations induites par DDR1	31
1.	Les partenaires clés de DDR1	32
a)	Les protéines adaptatrices	32
b)	Les phosphatases	33
c)	Les kinases	33
d)	Les facteurs de transcription et enzymes	34
2.	Les interactions phosphorylation-indépendantes	35
3.	Les voies de signalisation	36
4.	Les « crosstalks » avec les autres récepteurs	37
a)	La protéine Wnt5a	37
b)	Les intégrines	38
c)	Les récepteurs Notch	40
5.	Quel(s) collagène(s) pour quelle(s) voie(s) ?	40
V.	Inhibiteurs pharmacologiques de DDR1	41
1.	Inhibiteurs de RTK utilisés en clinique	42
2.	Inhibiteurs spécifiques des DDR	43
a)	Les composés DDR1-IN-1 et DDR1-IN-2	43
b)	Le composé 7rh	43
B. Le DDR1 dans les pathologies		44
I.	Cancers	45
II.	Inflammation et fibrose	47
1.	Atherosclérose	47
2.	Fibrose pulmonaire	49
3.	Fibrose de la peau	49

4. Ischémie-reperfusion	50
III. Inflammation et fibrose : les pathologies rénales	50
C. Les pathologies rénales : MRC et MRA	53
I. Le rein : structure et fonction	53
1. Structure du néphron	53
a) Le glomérule rénal	54
b) Le tubule rénal	55
c) L'appareil juxta-glomérulaire	56
2. Filtration glomérulaire et maturation de l'urine	56
3. Régulation du FSR et du DFG	57
II. Les maladies rénales chroniques (MRC)	58
1. Définition et prévalance	58
2. Classification et étiologie	59
3. Physiopathologie de la fibrose rénale	60
a) Inflammation fibrosante	61
b) Accumulation de MEC	62
c) Principaux médiateurs et approches thérapeutiques	63
III. Les maladies rénales aigües (MRA)	65
1. Définition et prévalance	65
2. Classification et étiologie	66
3. Physiopathologie de l'agression rénale aigüe	67
a) Inflammation	67
b) Spécificité des MRA selon leur étiologie	69
c) Biomarqueurs et stratégies thérapeutiques	71
IV. La boucle MRA-MRC	73

D. Les modèles de néphropathies expérimentales	74
I. Glomérulonéphrite induite par injection de sérum néphrotoxique	75
1. Description du modèle	75
2. Physiopathologie du modèle	76
II. Obstruction Urétérale Unilatérale	77
1. Description du modèle	77
2. Physiopathologie du modèle	78
III. Ischémie-reperfusion rénale	80
1. Description du modèle	80
2. Physiopathologie du modèle	81
E. Objectifs de la thèse	85
Chapitre 2. Inhibition thérapeutique de DDR1 dans la MRC expérimentale	87
1^{er} ARTICLE : Protective effects of genetic inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 in experimental renal disease	88
Chapitre 3. Rôle de DDR1 dans la MRA expérimentale, Ischémie-Reperfusion rénale	99
2^{ème} ARTICLE : DDR1 induced by Endoplasmic Reticulum Stress Drives Ischemia/Reperfusion Renal Injury	100
Abstract	101
Introduction	102
Results	104
Discussion	109
Methods	114
References	122
Figure legends	127

Supplementary figure legends	133
Figures	134
Supplementary figures	148
Tables	150
Chapitre 4. Etude de la surexpression et/ou de l'activation de DDR1 <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	151
A. Introduction	152
B. Matériels et Méthodes	152
C. Résultats	157
D. Discussion	167
Chapitre 5. DISCUSSION GENERALE ET PERSECTIVES	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	179
ANNEXE	206

Liste des abréviations

A431 : Lignée cellulaire humaine dérivée d'un carcinome épidermoïde

aa : Acides aminés

ADAM : A disintegrin and metalloproteinase

Agt : Angiotensinogène

Ang II : Angiotensine II

AS : anti-sens

ATF6 : Activating transcription factor 6

Bcr-Abl : Breakpoint cluster region-abelson kinase

BMI-1 : B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homologue

BMP : Bone morphogenic proteins

BxPC3 : Lignée cellulaire humaine dérivée d'une tumeur pancréatique

CCR1/2 : C-C chemokine receptor type 1/2

Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog

Cdk 1ou 5 : Cyclin dependent kinase 1/5

CETP : Cellules épithéliales tubulaires proximales

CHOP : CCAAT/enhancer binding protein-homologous protein

Col4a3 : Chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV

CML : Cellules musculaires lisses

CSK : C-terminal Src tyrosine kinase

CTGF : Connective tissu growth factor

CXCL1/8 : Chemokine C-X-C ligand 1/8

DAG : Diacylglycérol

DAMP : Damage-associated molecular patterns

DARPP-32 : Dopamine and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein, molecular mass 32 kDa

DDR1/2 : Récepteur à domaine discoïdine 1/2

Dox : Doxycycline

DS : Domaine discoïdine

EGF : Epidermal growth factor

e/iNOS : endothelial/inducible Nitric oxide synthase

ERK1/2 : Extracellular-signal regulated kinase 1/2

ESRD : End-stage renal disease

ET-1 : Endothéline-1

FAK : Focal adhesion kinase

FRET : Fluorescence resonance energy transfer

FRS2 : Fibroblast growth factor receptor substrate 2

GBM : Glomerular basement membrane

Grb2 : Growth factor receptor bound protein 2

HEK : Human embryonic kidney

HES : Hairy and enhancer of split 1

HGF : Hepatocyte growth factor

IGFBP7 : Insulin growth factor-binding protein 7

IL-1 β : Interleukine-1 beta

IL-x : Interleukine-x

ILK : Integrin-linked kinase

IP₃ : Inositol 1-4-5, trisphosphate

I/R : Ischémie-reperfusion

IRE1 : Inositol-requiring kinase 1

Jak2 : Janus kinase 2

JM : Juxta-membrinaire

JNK : c-Jun N-terminal kinase

KIBRA : Kidney and brain expressed protein

Kim-1 : Kidney injury molecule 1

KO : Knock-out

Ldlr : Low-density lipoprotein receptor

L-FABP : Liver-type fatty acid-binding protein

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1

MDCK : Madin-darby canine kidney epithelial cells

MEC : Matrice extracellulaire

mESC : Mouse embryonic stem cells

MMP : Métalloprotéases matricielles

MPT : Mitochondrial permeability transition

MRC : Maladies rénales chroniques

MRA : Maladies rénales aigües

mTOR : Mammalian target of rapamycin

NFK : National kidney foundation

NF κ B : Nuclear factor κ B

NGAL : Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NK : Natural killer

NKC2 : Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NOX1/4 : NADPH oxidases 1/4

ODN : Oligodésoxynucléotides

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

Pax8 : Paxilin-8

PDGF : Platelet-derived growth factor

PERK : Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase

PI3K : Phosphoinositide-3-kinase

PIP₂ : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKA/C : Protein kinase A/C

PLC γ 1 : Phospholipase C gamma 1

PTB : Phosphotyrosine binding

Pyk2 : Protein tyrosine kinase 2

RANTES : Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

RasGAP : Ras GTPase activating protein

RE : Réticulum endoplasmique

ROS : Reactive oxygen species

RTK : Récepteur à activité Tyrosine-Kinase

rtTA : reverse tetracycline-dependent transactivator

SCr : Serum creatinine

SH2 : Src homology 2

SHC1/A : Src homology 2 domain-containing transforming protein 1/A

SHIP-1 et 2 : SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatases 1 et 2

SHP1/2 : Scr homology domain-containing phosphatase 1/2

SNT : Sérum néphrotoxique

STAT : Signal transducers and activators of transcription

Syk : Spleen tyrosine kinase

TGF β : Transforming growth factor β

TIMP-2 : Tissue inhibitor of metalloproteinase 2

TLR : Toll-like receptors

tPA : Tissue plasminogen activator

TRAF6 : TNF receptor associated factor 6

TRE : Tet responsive element

TrkA : Tropomyosin receptor kinase A

UPR : Unfolded protein response

UUO : Obstruction urétérale unilatérale

VEGFa : Vascular endothelial growth factor A

Wnt : Wingless-related

WT : Wild type

Y : Tyrosine

Liste des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique des épissages alternatifs donnant lieu aux différentes isoformes de DDR1 (Alves et al., 2001).

Figure 2 : Représentation schématique des structures des différentes isoformes de DDR1 (Alves et al., 2001).

Figure 3 : Mécanisme hypothétique d'activation des DDR (modifié d'après Carafoli et al., 2013).

Figure 4 : Mécanisme hypothétique de régulation de l'activité de DDR1 par endocytose (Mihai et al., 2009).

Figure 5 : Représentation schématique des partenaires de DDR1 et des voies de signalisation induites par son activation (Iwai et al., 2014)

Figure 6 : Représentation schématique de certains « Crosstalks » entre les voies induites par DDR1 et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, et leurs effets cellulaires (Leitinger, 2014).

Figure 7 : Stratégies pour le développement de nouveaux inhibiteurs des DDR (Li et al., 2015).

Figure 8 : Role des DDR dans les processus physiologiques (e.g., développement) et pathologiques (e.g., cancer, inflammation, fibrose) (Borza et Pozzi, 2014).

Figure 9 : Schéma représentatif du néphron.

Figure 10 : Représentation schématique du corpuscule rénal et détail du capillaire et de la barrière de filtration glomérulaire (d'après The McGraw-Hill Companies © et Tryggvason et Wartiovaara, 2005).

Figure 11 : Schéma représentatif de la maturation de l'urine le long du tubule rénal.

Figure 12 : Evènements pathologiques reliant les atteintes glomérulaire et tubulaire conduisant progressivement à un phénotype commun de MRC (López-Novoa et al., 2011).

Figure 13 : Schéma représentatif des différentes origines connues des myofibroblastes producteurs de MEC (Liu, 2015)

Figure 14 : Schéma représentatif de différentes stratégies antifibrotiques potentielles (Tampe et Zeisberg, 2014).

Figure 15 : Modélisation des phases inflammatoires intervenant dans un rein sain après un épisode de MRA (Rabb et al., 2015)

Figure 16 : Mécanisme physiopathologique de la nécrose tubulaire induite par l'I/R (Glodowski et Wagener, 2015)

Figure 17 : Modélisation de l'évolution des MRA intégrant les nouveaux biomarqueurs identifiés (Alge et Arthur, 2015)

Figure 18 : Schéma de synthèse représentant les évènements secondaires à une MRA conduisant au développement ou à l'aggravation d'une MRC (Venkatachalam et al., 2015).

Figure 19 : Image représentative d'un glomérule observé par microscopie électronique à transmission 10 jours après l'injection de SNT (Le Hir et al., 2001).

Figure 20 : Schéma représentant la contribution directe du modèle UUO à la compréhension des mécanismes d'inflammation et de fibrose rénaux et la transition MRA-MRC (Ucero et al., 2014).

Figure 21 : Schéma représentatif des interactions entre les cellules récrutées et résidentes dans un rein de rongeur soumis à l'UUO (Chevalier et al., 2009).

Figure 22 : Schéma représentatif de la modulation de la phase de réparation déterminant l'issu de l'I/R rénale (Jang et Rabb, 2015).

Figure 23 : Représentation schématique des « crosstalk » entre la réponse UPR, la dysfonction mitochondriale, l'autophagie, l'inflammation et la mort cellulaire dans l'I/R (Zuk et Bonventre, 2016).

Figure 24 : Représentation schématique des trois constructions insérées dans le génome des souris triples transgéniques permettant la surexpression inductible de DDR1 dans les cellules tubulaires rénales, le long du néphron.

Figure 25 : Images représentatives d'une coloration à la β -galactosidase effectuée sur des coupes congelées de reins de souris de type sauvage (A-B) ou double transgénique Pax8-rtTA x Tet-o/LacZ/DDR1 (C-D) traitées à la dox pendant 10 jours, dans le cortex (A, C) ou dans la médullaire (B, D) observées au microscope optique au grossissement X100.

Figure 26 : Images représentatives d'une immunohistochimie pour DDR1 effectuée sur des coupes en paraffine de reins de souris de type sauvage (A-B) ou triple transgénique (C-D) traitées à la dox pendant 10 jours, dans le cortex (A, C) ou dans la médullaire (B, D) observées au microscope optique au grossissement X100.

Figure 27 : Images représentatives d'une coloration au Trichrome de Masson effectuée sur des coupes en paraffine de reins de souris triples transgéniques traitées (B) ou non (A) à la dox pendant 4 semaines, dans la zone de transition cortico-médullaire, observées au microscope optique au grossissement X200.

Figure 28 : Evaluation des dépôts de collagènes fibrillaires interstitiels. (A-B) Images représentatives d'une coloration au Rouge Sirius effectuée sur des coupes en paraffine de reins de souris triples transgéniques traitées (B) ou non (A) à la dox pendant 4 semaines, dans la zone de transition cortico-médullaire, observées au microscope polarisé au grossissement X100. (C) Quantification des dépôts de collagènes fibrillaires interstitiels. N = 3-9. *** p<0.001 vs CTL.

Figure 29 : Evaluation de l'infiltat macrophagique dans l'interstitium rénal. (A-B) Images représentatives d'une immunohistochimie pour F4/80 effectuée sur des coupes en paraffine de reins de souris triples transgéniques traitées (B) ou non (A) à la dox pendant 4 semaines, dans la zone de transition cortico-médullaire, observées au microscope polarisé au grossissement X100. (C) Quantification du marquage F4/80. n = 3-9. ** p<0.01 vs CTL.

Figure 30 : Détection de la phosphorylation de DDR1 dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement ou non au collagène de type I à 1 μ g/ml pendant 6h, et dans deux contrôles négatifs : une lignée de cellules épithéliales humaines n'exprimant pas DDR1 à l'état basal, "HT1080 CTL", et un extrait protéique de rein d'une souris KO DDR1, "DDR1 KO mouse". (A) Western blot pour P-DDR1, DDR1 et une protéine de référence, Hsc70. (B-D) Quantifications des western blot. n = 3. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs CTL.

Figure 31 : Profil d'expression de DDR1 en immunocytofluorescence dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement (B) ou non (A) au collagène de type I à 1 μ g/ml pendant 6h, observée au microscope inversé à fluorescence au grossissement X400. Les flèches blanches indiquent la localisation nucléaire de DDR1.

Figure 32 : Expressions des gènes CD44 (A) et Vimentine (B), mesurées en qPCR et normalisées par l'expression du gène de référence 18S, dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement ou non au collagène de type I à 1 μ g/ml pendant 3, 6 et 9h. n = 3. * p<0.05, *** p<0.001 vs CTL.

Figure 33 : Détection de la phosphorylation de DDR1 dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement ou non au collagène de type I à 1 μ g/ml pendant 14h en présence ou non d'un inhibiteur commercial de tyrosine kinase : Dasatinib (A, B), Imatinib (C, D), Bosutinib (E, F), Nilotinib (G, H), Ponatinib (I, J). (A, C, E, G, I) Western blot pour P-DDR1, DDR1 et une protéine de référence, GAPDH. (B, D, E, H, J) Quantifications des western blot. n = 3. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs CTL ; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Col I.

Figure 34 : Détection de la phosphorylation de DDR1 dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement ou non au collagène de type I à 1 μ g/ml pendant 14h en présence ou non d'un inhibiteur non-commercial de tyrosine kinase : Composé A (A, B), Composé B (C, D). (A, C) Western blot pour P-DDR1, DDR1 et une protéine de référence, GAPDH. (B, D) Quantifications des western blot. n = 3. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs CTL ; ## p<0.01, ### p<0.001 vs Col I.

Figure 35 : Schéma conclusif des voies de signalisation démontrées ou vraisemblables de DDR1, intégrant les résultats de la thèse et les données de la littérature.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents stades des MRC tels que définis par la NKF basés sur le DFG exprimé en ml/min par 1,73 m² de surface corporelle et la symptomatologie (López-Novoa et al., 2011).

Tableau 2 : Comparaison des critères des classifications AKIN et RIFLE pour les MRA (KDIGO, 2013)

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour les génotypages des souris triples transgéniques.

Chapitre 1

Introduction

A. Les Récepteurs à Domaine Discoïdine (DDR)

Les Récepteurs à Domaine Discoïdine constituent une sous-famille de deux récepteurs, DDR1 et DDR2, à activité tyrosine-kinase (RTK) qui fût mise en évidence pour la première fois dans les années 1990, par plusieurs équipes cherchant à découvrir de nouveaux RTK par homologie de séquence (Di Marco et al., 1993 ; Johnson et al., 1993, Karn et al., 1993 ; Zerlin et al. 1993 ; Lai and Lemke 1994 ; Laval et al., 1994 ; Sanchez et al., 1994 ; Alves et al., 1995 ; Perez et al., 1994 ; Perez et al., 1996). Toutefois, ces récepteurs resteront orphelins jusqu'en 1997, quand deux équipes indépendantes découvrent simultanément que les ligands fonctionnels des DDR sont les collagènes (Shrivastava et al., 1997 ; Vogel Et al., 1997).

I. Structure et ligands

1. Structure génomique

a) Les gènes DDR

Le gène codant pour DDR1 se situe sur le chromosome 6 (6p21.3) chez l'humain, au niveau du locus du complexe majeur d'histocompatibilité, entre les gènes HLA-E et HLA-C. Chez la souris, il se situe sur le chromosome 17 (Perez et al., 1994 ; Edelhoff et al., 1995).

Le gène DDR1 s'étend sur environ 24 kb et comprend 17 exons (Playford et al., 1996). Les exons 1 à 8 codent pour le domaine extracellulaire et sont suivis de l'exon 9 qui code pour la région transmembranaire. Le domaine juxtamembranaire (JM) cytosolique est codé par les exons 10 à 12 et les 5 exons restant codent pour le domaine catalytique.

Le gène DDR2 se situe sur le chromosome 1 (1q23.3) chez l'Homme et chez la souris.

b) Les épissages alternatifs

Cinq isoformes différentes dérivées d'épissages alternatifs du gène DDR1 ont été mises en évidence. Le transcrit DDR1b contient tous les exons, tandis qu'il manque l'exon 11 au transcrit DDR1a (Alves et al., 1995). En revanche, le transcrit DDR1c contient 18 pb de plus que DDR1b qui découlent de la présence d'un site 5' alternatif au niveau de la limite intron/exon de l'exon 14 (Playford et al., 1996). Enfin, deux autres épissages alternatifs donnent naissance à deux autres isoformes, DDR1d et DDR1e. L'absence des exons 11, 12 et 14 dans la séquence codante pour DDR1d, et de la première moitié de l'exon 10 en plus des exons 11 et 12 dans la séquence de DDR1e, altère leur domaine catalytique (Fig. 1) (Alves et al. 2001).

Aucune isoforme de DDR2 n'a été mise en évidence à ce jour.

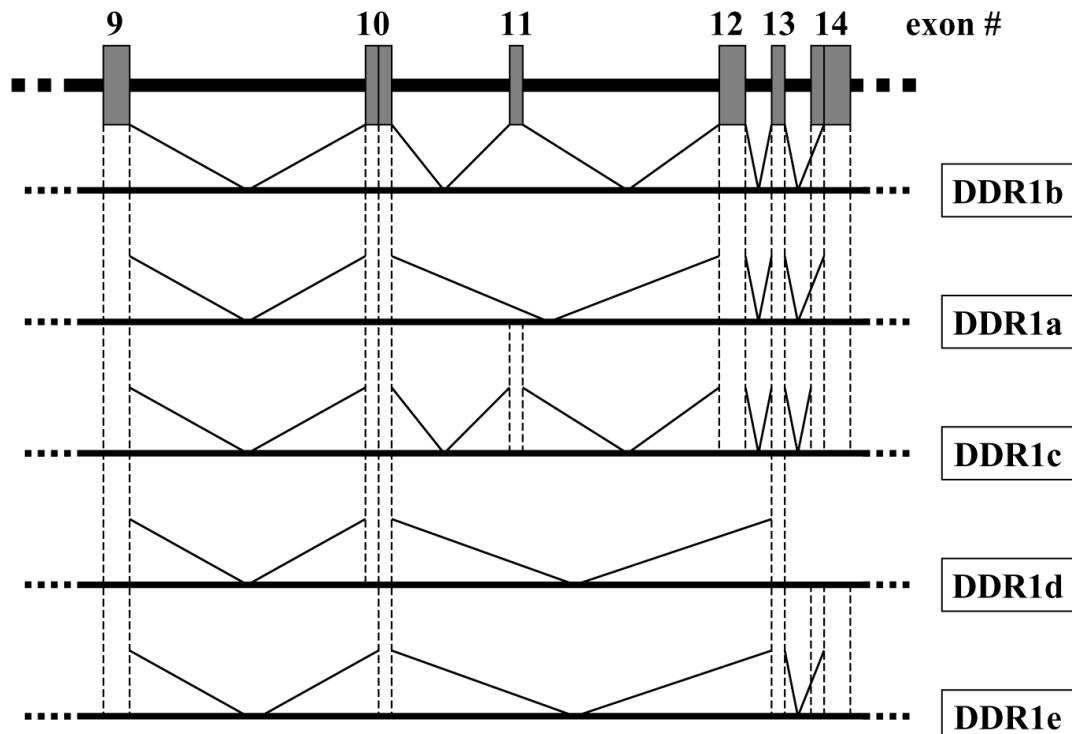


Figure 1 : Représentation schématique des épissages alternatifs donnant lieu aux différentes isoformes de DDR1 (Alves et al., 2001).

2. Structure protéique

a) Structure protéique des DDR

Comme tous les RTK, les DDR sont des protéines transmembranaires possédant un domaine catalytique à activité tyrosine-kinase en C-terminal dans leur région cytoplasmique.

Les DDR se distinguent des autres membres de la famille des RTK par la présence de deux domaines globulaires hautement conservés : un domaine discoïdine (DS) N-terminal et un domaine DS-like (Carafoli et al., 2013). Le DS est une région d'environ 160 acides aminés homologue à la discoïdine I, une protéine initialement identifiée chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*. La discoïdine I est une lectine liant le galactose qui joue un rôle dans le processus d'agrégation cellulaire de cet organisme (Alves et al., 1995 ; Johnson et al., 1993 ; Simpson et al., 1974). Le DS peut aussi être appelé domaine C type 5/8 en raison de son homologie avec des domaines des facteurs de coagulation V et VIII du sang (Baumgartner et al., 1998 ; Kiedzierska et al., 2007).

Tous les membres de la famille des DDR possèdent un DS accolé à un DS-like suivi d'une unique région transmembranaire qui se poursuit avec un long domaine JM et enfin un domaine catalytique à activité tyrosine-kinase.

b) DDR1 et DDR2, homologies et différences

DDR1 et DDR2 présentent un haut degré d'homologie au niveau de leur domaines globulaires : 59% d'homologie entre leurs domaines DS et 51% d'homologie entre leurs domaines DS-like. Entre les deux domaines globulaires et la région transmembranaire se trouve une courte région JM extracellulaire très peu conservée de 50 acides aminés (aa) chez DDR1 et de 30 aa chez DDR2 (Carafoli et al., 2013 ; Fu et al., 2013). La région JM intracellulaire est beaucoup plus longue chez les DDR que chez les autres RTK et se compose

d'environ 171 aa pour DDR1 selon l'isoforme, et de 142 aa pour DDR2. Enfin, les domaines kinases intracellulaires longs d'environ 300 aa sont suivis par une très courte queue à l'extrémité C-terminale, de 8 aa pour DDR1 et de 6 aa pour DDR2, ne contenant aucun résidu tyrosine.

Les deux DDR contiennent plusieurs sites de N- et O-glycosylation et les formes matures de ces protéines portent des carbohydrates glycosylés complexes dans leurs domaines DS-like et leurs régions JM (Curat et al., 2001 ; Ali et al., 2010 ; Phan et al., 2013).

Il a été noté, dans plusieurs lignées cellulaires et tissus, que DDR1 est clivé en une sous-unité beta de 62 kDa restant ancrée à la membrane et une sous-unité alpha soluble de 54 kDa contenant les domaines extracellulaires (Vogel, 2002). Par ses travaux, Vogel W. a démontré que l'activation de DDR1 induite par sa liaison au collagène induisait une augmentation de ce clivage. Ce point sera discuté dans la section « Régulation de l'activité de DDR1 – Clivage du domaine extracellulaire ». En revanche, aucun clivage de DDR2 n'a été mis en évidence.

c) Les isoformes de DDR1

Comme nous l'avons évoqué précédemment, cinq isoformes de DDR1 dérivées d'un épissage alternatif ont été identifiées (Alves et al. 2001). Elles sont toutes identiques dans leurs régions extracellulaires et transmembranaires, mais diffèrent dans leurs régions intracellulaires. Le transcrit le plus long code pour l'isoforme DDR1c contenant 919 aa alors que les isoformes DDR1a et DDR1b sont toutes deux amputées de 6 aa dans leurs domaines kinases. De plus, DDR1a possède 37 aa de moins que DDR1b dans sa région JM (Alves et al., 1995). Enfin, les isoformes DDR1d et DDR1e sont des variants tronqués non fonctionnels auxquels manquent soit le domaine kinase entier, soit des parties du domaine JM et du site de liaison à l'ATP (Fig. 2) (Alves et al., 2001).

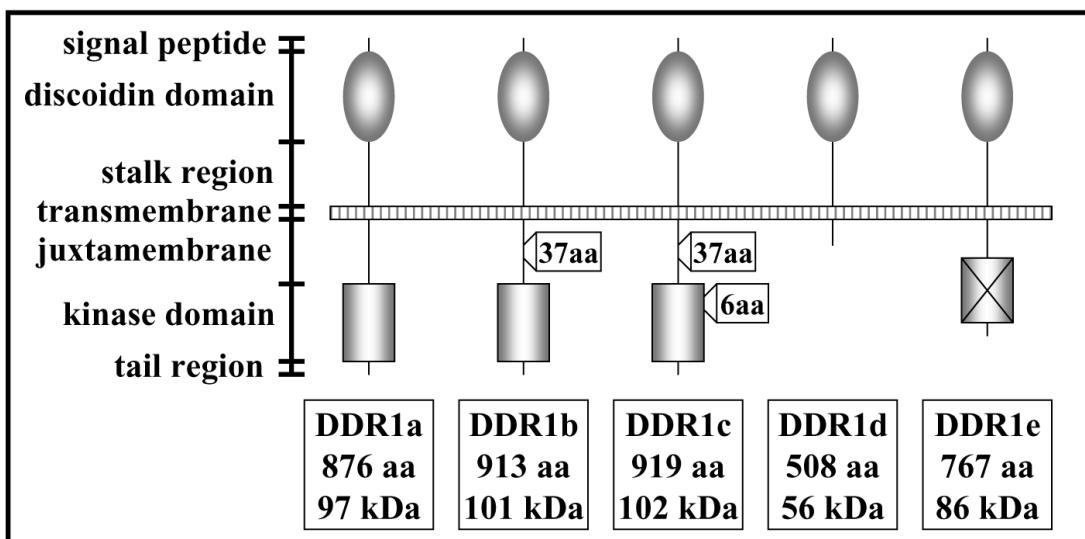


Figure 2 : Représentation schématique des structures des différentes isoformes de DDR1 (Alves et al., 2001).

Les deux isoformes les plus largement exprimées sont DDR1a et DDR1b. Toutefois, les mécanismes qui régulent la balance de leurs expressions sont complexes et incomplètement connus. De plus, le bénéfice apporté par les 6 aa supplémentaires que possède DDR1c par rapport à DDR1a et b n'est pas encore décrit. Pour finir, les isoformes tronquées DDR1d et e pourraient réguler l'activité des isoformes fonctionnelles lorsqu'elles sont co-exprimées mais aucun mécanisme de ce type n'a été identifié à ce jour.

3. Interactions des DDR avec leurs ligands

Lorsque les collagènes, composants majeurs de la matrice extracellulaire (MEC) (Kadler et al., 2007), furent identifiés comme ligands des DDR en 1997, ce fut la première fois que l'on démontrait un rôle direct de la MEC dans la signalisation des RTK (Shrivastava et al., 1997 ; Vogel et al., 1997). Jusque là, on considérait que les seules interactions entre ces deux éléments étaient indirectes et consistaient en la capture et le stockage de facteurs de

croissance par la MEC (Hynes et al., 2009). De plus, les seuls médiateurs connus de la signalisation du collagène étaient les intégrines et la glycoprotéine VI (Leitinger, 2011).

a) Quel(s) collagène(s) pour quel DDR ?

Chez les vertébrés, il existe 28 types de collagènes différents qui permettent des interactions cellulaires et qui sont les principaux constituants de la MEC, conférant ainsi ses caractéristiques biomécaniques au tissu qu'ils composent (Ricard-Blum, 2011). Tous les collagènes sont caractérisés par une structure en triple-hélice constituée de chaînes α polypeptidiques s'assemblant en homo- ou hétéro-trimères. Dans les tissus, ces collagènes s'assemblent pour former des structures supramoléculaires comme des fibres ou des réseaux. Les principales familles de collagènes sont les collagènes fibrillaires (collagènes de type I à III) et les collagènes matriciels formant des réseaux tels que le collagène IV, composant majeur des membranes basales.

Les DDR ne peuvent se lier qu'au collagène natif, sous sa forme en triple-hélice, et non aux collagènes dénaturés tels que la gélatine (Shrivastava et al., 1997 ; Vogel et al., 1997 ; Leitinger, 2003). Tandis que les deux DDR sont activés par les collagènes I à III (Shrivastava et al., 1997 ; Vogel et al., 1997), ils ont des préférences divergentes en ce qui concerne les collagènes non-fibrillaires. En effet, il a été décrit que DDR1, mais pas DDR2, peut lier le collagène de type IV (Shrivastava et al., 1997 ; Vogel et al., 1997), tandis que DDR2 semble avoir une spécificité accrue pour les collagènes de type II (Leitinger et al., 2004) et X (Leitinger et Kwan, 2006). DDR1 peut aussi se lier aux collagènes de type VIII et XV (Hou et al., 2001 ; Clementz et al., 2013). La capacité de DDR2 à lier ces types de collagènes n'a pas été testée.

b) Bases moléculaires de la liaison du collagène

Les sites d'interaction ligand-récepteurs des DDR sont tous localisés dans leur domaine DS, bien que cette interaction puisse probablement être modulée par le domaine DS-like et la région JM extracellulaire (Carafoli et al., 2013). Plusieurs résidus liant les collagènes ont été identifiés et sont hautement conservés entre DDR1 et DDR2. Cependant, certains aa à la périphérie d'un des site de liaison ne sont pas identiques et pourraient expliquer les spécificités des DDR pour certains collagènes (Leitinger, 2003 ; Abdulhussein et al., 2004 ; Ichikawa et al., 2007 ; Carafoli et al, 2009). Par exemple, la substitution de ces aa chez DDR2 par ceux de DDR1 a suffit à lui conférer la propriété de lier le collagène IV (Xu et al., 2011).

c) Mécanisme d'activation des DDR

En conditions basales, la plupart des RTK sont présents à l'état de monomère à la membrane des cellules et seuls quelques dimères inactifs existent. C'est uniquement lorsque la liaison avec le ligand se fait que le RTK va se dimériser. Ceci résulte alors en un rapprochement des domaines kinases des monomères permettant une autophosphorylation de certains résidus spécifiques dans les quelques secondes ou minutes suivant la liaison. Ce signal est ensuite très rapidement inhibé (Schlessinger 2000, Lemmon et al., 2010).

Les DDR sont différents des autres RTK car ils se présentent, à l'état basal, sous forme de dimères stables probablement formés durant leur biosynthèse. Malgré l'absence de liaison covalentes entre les deux monomères, la dimérisation des DDR semble dépendre de nombreux points de contacts dont le plus crucial est celui ayant lieu au niveau de la région transmembranaire (Noordeen et al., 2006 ; Mihai et al., 2009). De plus, la phosphorylation des DDR par leur liaison aux collagènes est lente et est parfois maintenue pendant plusieurs jours

(Shrivastava et al., 1997 ; Vogel et al., 1997). Cependant, la vitesse de phosphorylation des DDR est dépendante du type cellulaire. En effet, la phosphorylation de DDR1 dans des cellules de rein dérivées d'un embryon humain (Human Embryonic Kidney, HEK) devient maximale en 60 à 90 minutes d'exposition au collagène tandis que plusieurs heures peuvent s'écouler avant d'obtenir un signal détectable dans certaines lignées de cellules cancéreuses (Shrivastava et al., 1997 ; Vogel et al., 1997 ; L'Hote et al., 2002). De manière intéressante, deux études ont montré que la phosphorylation maximale de DDR2 était dépendante de la tyrosine kinase Src (Ikeda et al., 2002 ; Yang et al., 2005) ce qui semble également être le cas de DDR1 (Dejmek et al., 2003 ; Lu et al., 2011). Cependant, ce mécanisme n'est pas suffisant pour expliquer la lenteur de la phosphorylation des DDR et plusieurs hypothèses, encore non vérifiées ont été émises à ce sujet. Parmi elles figurent, une modulation de la vitesse de phosphorylation selon le caractère adhérent ou non de la cellule, la présence d'une phosphatase associée à DDR1 à l'état basal retardant la phosphorylation lors de la liaison ligand-récepteur, le blocage du site de liaison à l'ATP du domaine kinase par la région JM intracellulaire, la nécessité de la redistribution des dimères de DDR en une super-structure ou la présence d'une autre protéine à la membrane de la cellule pour obtenir une activation (Fig. 3) (Vogel et al., 2006 ; Leitinger, 2014).

Le mécanisme selon lequel la liaison du collagène induit l'autophosphorylation des DDR est actuellement inconnu. Les différentes cristallisations des DDR effectuées avec ou sans liaison du collagène n'ont pas permis de mettre en évidence une modification majeure de la conformation du récepteur après son association avec son ligand (Leitinger, 2014).

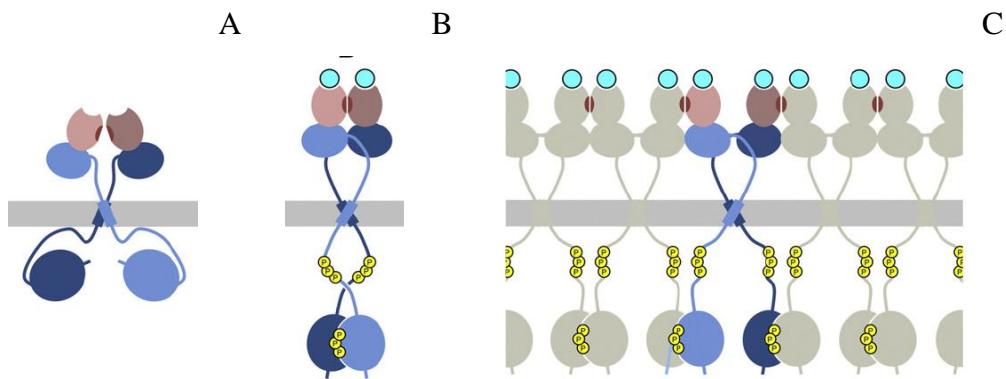


Figure 3 : Mécanisme hypothétique d'activation des DDR (modifié d'après Carafoli et al., 2013). (A) En absence de collagène, le DDR inactif est dimérisé principalement via une interaction entre les régions transmembranaires (Noordeen et al., 2006). La longue région JM intracellulaire pourrait être impliquée dans l'auto-inhibition des DDR. (B) Un dimère actif de DDR lié aux collagènes sous forme de triple-hélices (en cyan). (C) Une super-structure de dimères actifs de DDR liés aux collagènes.

II. Expression et fonctions physiologiques des DDR : Focus sur DDR1

1. Expression des DDR

Les DDRs sont des protéines exprimées très tôt durant le développement embryonnaire dans différents types de tissus chez l'humain et la souris. Il s'est avéré que DDR1 est préférentiellement exprimé dans les épithéliums tandis que DDR2 est plus présent au niveau des tissus conjonctifs, dérivés du mésoderme (Alves et al., 1995 ; Labrador et al., 2001). Plus précisément, l'expression de DDR1 a été décrite dans l'épithélium bronchique pulmonaire, les kératinocytes, l'épithélium du colon, le foie, la cornée et les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires chez l'Homme. Son expression a aussi été démontrée dans le neuroectoderme en développement, les glandes mammaires, le cerveau, le tubule distal et les CML vasculaires chez la souris et dans les cellules mésangiales, le tubule distal et les CML vasculaires chez le rat (Vogel et al., 2006). Cependant, aucune analyse systématique de la distribution cellulaire des DDR n'a été effectuée.

2. Fonctions des DDR durant le développement

Les deux récepteurs DDR jouent un rôle important dans le développement. DDR1 est plus impliqué dans l'organogénèse, tandis que DDR2 est nécessaire à la croissance osseuse.

Les fonctions des DDRs ont été principalement identifiées grâce au phénotype des souris génétiquement déficientes générées par Vogel et al. (2001, DDR1) et par Labrador et al. (2001, DDR2).

Les souris knock-out (KO) DDR1 sont plus petites que les souris de type sauvage (wild type, WT) sur leurs fonds génétiques mixtes 129/Sv-ICR et 129/Sv-C57/B6 d'origine. Cependant, ce phénotype a disparu après le transfert de fond génétique sur fond « pur » 129/Sv pour une raison inconnue (Flamant et al., 2006 ; Guerrot et al., 2011 ; Kerroch et al., 2012). De plus, les femelles KO présentent un défaut d'implantation des blastocystes, ce qui rend une majorité d'entre elles infertiles. Cependant, le phénotype principal de ces femelles est une anomalie de l'épithélium des glandes mammaires conduisant à une absence de processus de lactation. En effet, DDR1 est exprimé durant toutes les phases du développement des glandes mammaires (Barker et al. 1995). De ce fait, les souris KO ont une malformation des canaux galactophores, une hyper-prolifération des cellules épithéliales et un dépôt aberrant de MEC au niveau du stroma (Vogel et al., 2001). De plus, il a été montré que Wnt5a, une protéine nécessaire à la mise en place des canaux galactophores, peut réguler la phosphorylation de DDR1 induite par le collagène dans les glandes mammaires (Jonsson et Andersson, 2001 ; Dejmek et al., 2003 ; Roarty et Serra, 2007). Enfin, DDR1 participe au processus de lactation via le contrôle de la transcription et la phosphorylation de STAT5 (Faraci-Orf et al., 2006). Ces observations ont donc permis de prêter à DDR1 un rôle dans la différenciation cellulaire, la régulation de la MEC et la signalisation.

Les souris KO DDR1 présentent également d'autres phénotypes tels qu'une perturbation de l'architecture de l'oreille interne induisant une diminution importante de leur audition (Meyer

zum Gottesberge et al., 2008) ou encore un léger épaississement de la membrane basale glomérulaire, conduisant à une faible protéinurie non significative (Gross et al., 2004).

Enfin, les souris KO DDR2 sont atteintes de nanisme et présentent des os et un museau plus courts. Il a été démontré que ce phénotype est dû au rôle de DDR2 dans la prolifération et la maturation des chondrocytes (Labrador et al., 2001, Zhang et al., 2011), et la différenciation des ostéoblastes (Lin et al., 2010 ; Zhang et al., 2011).

3. Fonctions des DDR chez l'adulte

Les DDRs jouent un rôle important dans l'embryogenèse mais leurs fonctions chez l'adulte sont peu connues. La dysfonction des DDR est impliquée dans de nombreux processus pathologiques qui seront discutés dans la section « Le DDR1 dans les pathologies ». Dans l'ensemble, on considère que les DDR sont impliqués dans l'homéostasie tissulaire et dans la régénération (DDR2). Il a aussi été démontré que les DDR peuvent réguler l'expression et l'activité de certaines métalloprotéases matricielles (MMP) ainsi que certaines fonctions immunologiques via la migration des cellules pro-inflammatoires (Leitinger, 2014).

III. Régulation de DDR1

1. Régulation transcriptionnelle de DDR1

La régulation transcriptionnelle de DDR1 est très peu connue car la structure du gène DDR1 n'a pas encore été explorée en détails (Leitinger, 2014). Cependant, quelques études ont proposé l'implication de différents partenaires dans ce processus. Par exemple, le promoteur de DDR1 contient des séquences consensus permettant la liaison de la protéine p53 sur celui-ci (Sakuma et al., 1996 ; Ongusaha et al., 2003). L'induction de ce facteur de transcription par un stress génotoxique conduit à une augmentation de l'expression de DDR1 dans différentes

lignées cellulaires tumorales humaines (Sakuma et al., 1996 ; Ongusaha et al., 2003 ; Das et al., 2006). Il a également été montré que la protéine XRCC3, impliquée dans les processus de réparation de l'ADN, induit une surexpression de DDR1 dans le cadre d'un stress génotoxique (Martinez-Merignac et al., 2011). Ces observations suggèrent que l'expression de DDR1 est induite par le stress.

Deux études ont également proposé que la voie de signalisation Ras/Raf/ERK puisse réguler la transcription de DDR1. Par exemple, les récepteurs des cellules T peuvent induire l'expression de DDR1 dans des cellules T humaines *in vitro* via l'activation de cette voie et de la protéine kinase C (PKC) (Chetoui et al., 2011). De plus, DDR1 peut également augmenter sa propre expression via l'activation cette voie Ras/Raf/ERK dans les lignées cellulaires tumorales MCF7 et HCT116 (Ongusaha et al., 2003). De la même manière, la voie ERK1/2 activée par la phosphorylation de DDR2 dans des cultures primaires de fibroblastes de poumon conduit à une augmentation de l'expression de DDR1 (Ruiz et Jarai, 2011).

Enfin, il existe peu d'informations sur la façon dont l'expression de DDR1 est physiologiquement inhibée. Taube et al. ont montré la présence d'un site de liaison pour le facteur de transcription Zeb 1, impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse, sur le promoteur de DDR1. La liaison de ce facteur de transcription conduit à une diminution de l'expression de DDR1 (Taube et al., 2010; Koh et al., 2015). De plus, DDR1 peut être régulé de manière post-transcriptionnelle par des microARN. En effet, dans des cellules dérivées d'un carcinome hépatocellulaire, d'un cancer colorectal, d'un cancer du sein et dans des kératinocytes de la peau, le niveau d'expression du microARN-199a-5p était inversement corrélé à celui de DDR1 (Shen et al., 2010 ; Hu et al., 2014 ; Kim et al., 2015 ; Matà et al., 2016). De la même manière, le niveau d'expression du microARN-199b-5p était augmentée dans la moelle osseuse de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe et induisait une diminution de l'expression de DDR1 (Favreau et al., 2012).

Malgré ces travaux, les mécanismes régulant l'expression transcriptionnelle de DDR1 sont encore incompris.

2. Régulation de l'activité de DDR1

a) Endocytose

La signalisation des RTK peut être régulée de nombreuses façons y compris par endocytose. Le complexe récepteur-ligand est alors dégradé par fusion de l'endosome avec un lysosome ou le récepteur est recyclé à la membrane plasmique. Plusieurs études ont également prouvé que certains RTK peuvent continuer à induire des voies de signalisation alors qu'ils sont dans l'endosome (von Zastrow et Sorkin, 2007 ; Murphy et al., 2009). Malgré son appartenance à la famille des RTK, il est peu probable que l'activité de DDR1 soit régulée par endocytose étant donné le maintien de sa phosphorylation sur des durées prolongées. Toutefois, une étude menée par Mihai et al. montre une agrégation des récepteurs DDR1b-YFP (DDR1b fusionné à la « yellow fluorescent protein ») à la membrane de la cellule suite à leur liaison au collagène. Cet agrégat est ensuite internalisé par endocytose, puis les récepteurs sont recyclés à la surface de la cellule (Mihai et al., 2009). En se basant sur cette observation, ces auteurs ont proposé un modèle dans lequel DDR1b serait très rapidement internalisé à la suite de sa liaison au collagène, puis provoquerait une signalisation cellulaire depuis l'endosome avant d'être recyclé à la surface de la cellule (Fig. 4) (Mihai et al., 2009).

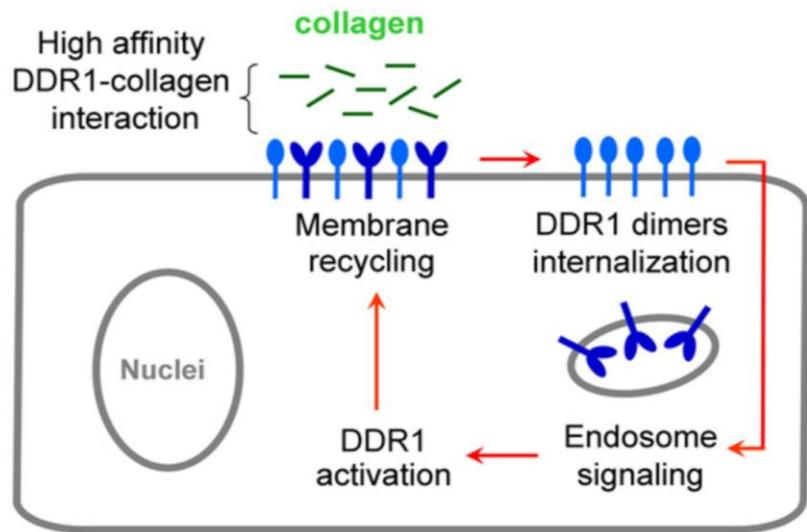


Figure 4 : Mécanisme hypothétique de régulation de l'activité de DDR1 par endocytose (Mihai et al., 2009).

Cependant, aucune autre étude n'a été faite sur un DDR1 non muté et aucune preuve n'indique que la phosphorylation de DDR1 se ferait dans un endosome plutôt qu'à la surface de la cellule.

b) Clivage du domaine extracellulaire

Le clivage du domaine extracellulaire des récepteurs transmembranaires constitue un système de régulation clé de l'activité de ces protéines (Arribas et Borroto, 2002 ; van Kilsdonk et al., 2010). En général, le clivage est effectué à proximité de la membrane plasmique par une protéase présente à la membrane permettant ainsi la régulation du nombre de récepteurs disponibles. Ce clivage résulte aussi en la libération d'une protéine soluble qui peut avoir des fonctions paracrites, ou inhibitrice de la formation du complexe récepteur-ligand par compétition, ou encore qui peut induire le clivage du domaine intracellulaire resté ancré à la membrane, permettant ainsi sa translocation vers le noyau (Higashiyama et al., 2011).

Le clivage constitutif de DDR1 a été mis en évidence pour la première fois par Alves et al. (Alves et al. 1995). Par la suite, des travaux réalisés par Vogel W et al. ont démontré que la liaison du collagène à DDR1 promeut le clivage de ce dernier par une enzyme de la famille

des ADAM (A disintegrin and metalloproteinase) (Volgel et al., 2002). Ces résultats ont été confirmés par une étude menée sur des cellules humaines A431 (lignée cellulaire humaine dérivée d'un carcinome épidermoïde) et HEK dans lesquels le traitement au collagène induisait la libération du domaine extracellulaire de DDR1 mesuré dans le milieu de culture (Slack et al., 2006). Ce n'est que récemment que Fu et al. ont démontré que le clivage constitutif de DDR1 est effectué par des MMP transmembranaires (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP) et non des MMP sécrétées (Fu et al., 2013). Les auteurs ont également déterminé les motifs des deux sites de clivage de ces enzymes se trouvant dans la région JM extracellulaire à 9 et 19 aa de distance du domaine transmembranaire. Enfin, Shitomi et al. ont montré que l'ADAM10 a aussi la capacité de cliver le domaine extracellulaire de DDR1 sous le contrôle de sa liaison aux collagènes (Shitomi et al., 2015).

Le rôle physiologique du clivage de DDR1, inactif ou activé par le collagène, n'est pas encore connu. Il est probable que le domaine extracellulaire soluble de DDR1 ait une fonction car il contient tous les motifs de liaison au collagène (Leitinger et al., 2003). Un rôle dans la modification de la synthèse du collagène (Agarwal et al., 2007 ; Flynn et al., 2010) ainsi que dans le blocage de l'activation des récepteurs non clivés (Hacheouche et al., 2010 ; Abbonante et al., 2013) a été proposé mais l'identification de son activité biologique requiert des études supplémentaires.

IV. Voies de signalisation induites par DDR1

Ces quinze dernières années, la connaissance des mécanismes induits par l'activation de DDR1, bien qu'encore incomplète, a beaucoup progressé. Différentes voies de signalisation découlant de l'activation de DDR1 ont été identifiées, dont certaines partagées avec d'autres récepteurs transmembranaires. Il a également été démontré que certains effets de DDR1 sont dépendants de sa liaison au collagène, mais pas de sa phosphorylation.

1. Les partenaires clés de DDR1

Les isoformes DDR1b et DDR1c possèdent 15 résidus phosphorylables répartis entre leurs longues régions JM intracellulaires, leurs domaines kinases et leurs extrémités C-terminales. En revanche, l'isoforme DDR1a n'en possède que 13 (Leitinger, 2014). Ces résidus sont des sites de liaison pour différents types de partenaires tels que des protéines adaptatrices, des phosphatases mais aussi des kinases, des facteurs de transcription et des enzymes (Fig. 5).

a) Les protéines adaptatrices

L'un des partenaire clé de DDR1b, mais pas de DDR1a, est la protéine adaptatrice ShcA (Src homology 2 domain-containing transforming protein A, aussi appelée SHC1) qui contient un domaine PTB (Phosphotyrosine binding) N-terminal et un domaine SH2 (Src homology 2) en C-terminal, tous deux capables d'interagir avec des résidus tyrosines phosphorylés. Il a été démontré que ShcA se lie au niveau d'un résidu tyrosine phosphorylé présent dans la région JM, de même que la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) (Vogel et al., 1997 ; Lemeer et al., 2012). Le recrutement de ShcA permet l'activation de voies de signalisation telles que p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et NF κ B (Nuclear factor κ B) via l'activation de TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) (Matsuyama et al., 2004).

D'autres protéines contenant des domaines PTB et SH2 ont été associées à DDR1. Par exemple, il a été démontré que la protéine adaptatrice NCK2 (Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 2) et la phosphatase SHP2 (Src homology domain-containing phosphatase 2), contenant toutes les deux des domaines SH2, peuvent se lier à des résidus tyrosines phosphorylés de DDR1 (Koo et al., 2006). Koo et al. ont montré que SHP2 se lie à un résidu dans le domaine kinase mais ce n'est que plus tard que Lemeer et al. ont identifié le

site exact de liaison de NCK2 dans la région JM (Koo et al., 2006 ; Lemeer et al., 2012). Dans la même étude, Lemeer et al. ont montré que DDR1 possède des résidus cibles de la protéine adaptatrice Crk-II et des facteurs d'échange de guanidine Vav2 et 3 qui peuvent aussi servir de protéines adaptatrices. Enfin, différentes expérimentations ont permis de démontrer que la protéine adaptatrice FRS2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2) est capable de se lier dans la région JM de DDR1a sans pour autant identifier un site de liaison précis (Foehr et al., 2000) (Fig. 5).

b) Les phosphatases

Des phosphatases peuvent aussi se lier aux résidus tyrosines de DDR1. Le recrutement de la phosphatase SHP2 a été évoquée précédemment mais les phosphatases SHIP-1 et SHIP-2 (SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatases 1 et 2) peuvent également se lier à DDR1. Ainsi, il a été démontré que DDR1 interagit avec SHP2 via des résidus situés dans la région JM et le domaine kinase (Koo et al., 2006 ; Wang et al., 2006; Lemeer et al., 2012). Cependant, la liaison entre SHP2 et DDR1 dépend certainement du contexte cellulaire et du niveau d'activation de cette phosphatase. Enfin, les phosphatases inositol SHIP-1 et SHIP-2 se lient à 6 résidus tyrosine différents sur DDR1 mais avec une affinité plus importante pour l'un d'entre eux (Lemeer et al., 2012). Les signaux induits via l'activation de DDR1 et la mise en jeu de ces phosphatases restent toutefois inconnus (Fig. 5).

c) Les kinases

Certaines kinases interagissent directement avec DDR1 comme la PI3K (phosphoinositide-3-kinase), au niveau du domaine kinase de DDR1, et ce, via le domaine SH2 de sa sous-unité régulatrice p85 en présence de collagène, dans des cellules dérivées d'un cancer du sein

(T47D) (L’Hote et al., 2002). La kinase Src se lie également à la région JM de DDR1 et contrôle son activité dans les CML vasculaires (Lu et al. 2011, Lemeer et al., 2012). De plus, la kinase qui régule négativement Src, la CSK (C-terminal Src tyrosine kinase), se lie à la région JM de DDR1 via son domaine SH2 (Yang et al., 2009 ; Lemeer et al., 2012). Enfin, il a été démontré que la tyrosine kinase Syk (Spleen tyrosine kinase) interagit de manière constitutive avec DDR1, induisant ainsi l’inhibition de la migration des cellules épithéliales mammaires (Neuhaus et al., 2011) (Fig. 5).

d) Les facteurs de transcription et enzymes

Les facteurs de transcription STAT (Signal transducers and activators of transcription) ont la particularité de se lier directement aux RTK puis de transloquer vers le noyau pour d’induire la transcription de gènes. Dans une lignée de cellules épithéliales mammaires, il a été montré que DDR1 peut interagir et phosphoryler STAT5 via l’activation de Jak2 (Janus kinase 2). De plus, STAT5b peut se lier sur différents résidus tyrosine dans la région JM et le domaine kinase de DDR1 (Lemeer et al., 2012). Mais DDR1 peut aussi avoir des effets inactivateurs comme par exemple sur STAT1/3 qui sont inhibés via la liaison de SHP2 au niveau du domaine kinase de DDR1 (Wang et al., 2006). Une autre étude a également montré que STAT1/3 avaient la possibilité de se lier directement sur le domaine kinase de DDR1 *in vitro* (Lemeer et al., 2012).

Enfin, les travaux de Lemeer et al. ont permis d’établir une interaction entre RasGAP (Ras GTPase activating protein), PLC γ 1 (Phospholipase C gamma 1) et DDR1. Si l’interaction entre RasGAP et la région JM de DDR1 n’a pas pu être confirmée par immunoprécipitation de DDR1, celle de la PLC γ 1 avec cette région et son domaine kinase a, en revanche, bien été démontrée (Fig. 5).

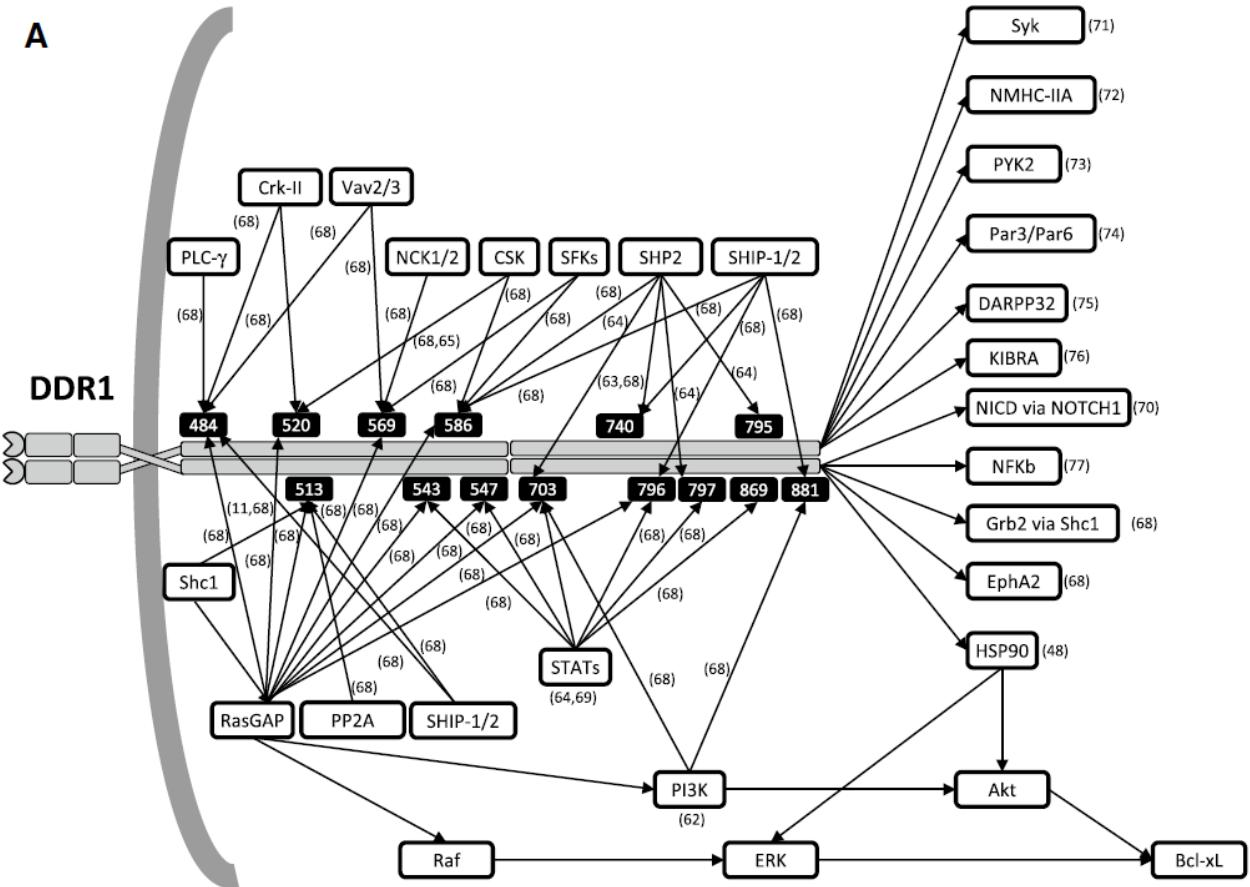


Figure 5 : Représentation schématique des partenaires de DDR1 et des voies de signalisation induites par son activation (Iwai et al., 2014)

2. Les interactions phosphorylation-indépendantes

De manière intéressante, plusieurs études ont démontré des interactions de DDR1 avec des protéines en absence de phosphorylation de ce dernier ou encore une auto-phosphorylation de DDR1 indépendante de sa liaison au collagène. Par exemple, Ongusaha et al. ont montré que DDR1 est auto-phosphorylé en réponse au stress génotoxique impliquant p53 (Ongusaha et al., 2003).

De plus, il a été démontré que la protéine KIBRA (Kidney and brain expressed protein) interagit avec DDR1 en formant un complexe trimérique avec la protéine PKC ζ (PKC zeta). La liaison des collagènes I ou IV sur DDR1 induit alors une dissociation de ce complexe se traduisant par l'activation de la voie ERK1/2 MAPK (Hilton et al., 2008).

En outre, la protéine DARPP-32 (Dopamine and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein, molecular mass 32 kDa) agit comme un inhibiteur de phosphatase lorsqu'elle est phosphorylée sur sa thréonine T34 par la PKA (Protein kinase A) et agit comme un inhibiteur de kinase lorsqu'elle est phosphorylée sur sa thréonine T75 par la Cdk1 ou 5 (Cyclin dependent kinase 1/5). Cette protéine est constitutivement liée à la région JM de DDR1 et cette liaison est affaiblie en présence de collagène. L'expression de cette protéine s'est avérée très faible à inexiste dans différentes lignées cellulaires tumorales dérivées de cancers du sein, et la surexpression artificielle de cette protéine induit une diminution de la migration cellulaire dépendante de DDR1. Ces résultats indiquent que la perte de l'expression de DARPP-32 pourrait jouer un rôle dans le caractère invasive et migratoire des cellules cancéreuses (Hansen et al., 2006).

Enfin, une interaction entre l'extrémité C-terminale de DDR1 et les protéines Par3 et Par6 (protease activated receptors -3/-6) qui régulent la polarisation des cellules a été montrée au niveau des jonctions cellule-cellule promouvant la migration collective des cellules de la lignée A431. De manière intéressante, cette interaction est indépendante de la liaison de DDR1 au collagène ainsi que de son activité tyrosine kinase (Fig. 5) (Hidalgo-Carcedo et al., 2011). Cette localisation de DDR1 au niveau des jonctions cellule-cellule a aussi été observée dans d'autres types cellulaires et requiert la présence de l'E-cadhérine (Wang et al., 2009 ; Yeh et al., 2011). En effet, l'inhibition de cette protéine induit une redistribution de l'expression de DDR1 au niveau apical et basal (Wang et al., 2009). Ces travaux suggèrent une implication de DDR1 dans la différenciation des cellules épithéliales.

3. Les voies de signalisation

Les voies de signalisation induites par DDR1 sont incomplètement connues et très divergentes selon le contexte cellulaire. Par exemple, la voie ERK1/2 MAPK est activée par DDR1 dans

les CML, les cellules épithéliales mammaires, les HEK ainsi que les mégacaryocytes (Ongusaha et al., 2003 ; Hilton et al., 2008 ; Lu et al., 2011 ; Abbonante et al., 2013). En revanche, DDR1 inhibe cette voie ERK1/2 MAPK dans les cellules mésangiales (Curat et al., 2002). Différentes équipes ont démontré que DDR1 active aussi les autres voies MAPK telles que p38 et JNK (c-Jun N-terminal kinase), ainsi que la voie NF κ B dans différents types cellulaires (Matsuyama et al., 2004 ; Avivi-Green et al., 2006 ; Seo et al., 2008). A l'inverse, plusieurs études ont montré que l'activation de DDR1 n'activait pas, voire inhibait, les voies p38 et ERK1/2 MAPK (Curat et al., 2002 ; L'Hote et al., 2002 ; Lund et al., 2009). Enfin, Ongusaha et al. ont également montré que DDR1 peut activer la voie RAS/RAF/MAPK induisant l'expression de p53 et ses gènes cibles (Ongusaha et al., 2003). Ces différents travaux montrent les différences majeures entre les effets de DDR1 selon le contexte cellulaire. Il est probable que l'une des explications à ces divergences soit la mise en jeu des différentes isoformes et collagènes.

4. Les « crosstalks » avec les autres récepteurs

Peu d'informations existent concernant la coopération de DDR1 avec les autres membres de la famille des RTK (Leitinger, 2014). Cependant, des « crosstalks » avec d'autres types de récepteurs ont été identifiés.

a) La protéine Wnt5a

Wnt5a est un gène répresseur de tumeur qui appartient à la famille Wnt (Wingless-related). Des études dans des cellules épithéliales mammaires ont démontré que l'activation de Wnt5 améliore l'adhésion cellulaire et induit l'activation de DDR1 (Jonsson et al., 2001). Plusieurs travaux ont été effectués sur les voies reliant Wnt5a et DDR1 mettant ainsi en évidence

l'implication de la voie non canonique- Ca^{2+} et d'une petite protéine G hétérotrimérique (Jonsson et al., 2001 ; Dejmek et al., 2003). De plus, Roarty et Serra ont démontré l'importance du TGF- β (Transforming growth factor β) dans l'activation de la voie Wnt5a/DDR1 régulant le développement de la glande mammaire (Roarty et Serra, 2007). Ces observations permettent de suggérer que la perte de l'expression de Wnt5a dans certains cancers du sein s'accompagne de la diminution de l'activation de DDR1 et de l'adhésion cellulaire, promouvant ainsi la métastase (Dejmek et al., 2005).

b) Les intégrines

Il a été clairement démontré que l'activation de DDR1 se fait de manière indépendante des intégrines $\beta 1$ (Vogel et al., 2000). Cependant, DDR1 peut collaborer avec les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ via la convergence de leur voies de signalisation (Fig. 6) (Xu et al., 2012 ; Staudinger et al., 2013). Par exemple, il a été montré dans des cellules dérivées d'un cancer du pancréas (BxPC3) que leur traitement au collagène de type I induit l'activation de DDR1 et de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ conduisant à la surexpression de la N-cadherine, une protéine impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse et dans la métastase (Shintani et al., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la protéine p130CAS sert de point de convergence des deux récepteurs et que DDR1 interagit avec la protéine tyrosine kinase 2 (Pyk2) tandis que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ active la voie FAK (focal adhesion kinase). La formation de ce complexe conduit alors à l'activation de la voie JNK MAPK via la Rap1 GTPase et résulte en la surexpression de la N-cadherine. Dans une autre étude, l'activation par le collagène de type I de DDR1 et de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ permettait le maintien de l'état non-différencié de cellules souches embryonnaires murines (mESC, Mouse embryonic stem cells). Dans ce système, les auteurs ont montré que DDR1 active les voies AKT et ERK1/2 et que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ induit la phosphorylation de l'ILK (integrin-linked kinase) conduisant à l'expression de Gli-1.

L'activation de la voie ERK1/2 par DDR1 et l'expression de Gli-1 par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ conduisent toutes deux à l'expression du gène BMI-1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homologue), nécessaire au renouvellement des mESC (Suh et al., 2011).

A l'inverse, plusieurs études menées dans les cellules MDCK (Madin-darby canine kidney epithelial cells) ont démontré une régulation négative de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ par DDR1. En effet, le traitement des MDCK au collagène de type I inhibe leur migration via l'activation de DDR1 qui inhibe l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Wang et al., 2005 ; Wang et al., 2006). Cet effet est dû à l'activation de SHP2 par DDR1 qui inhibe l'activation des facteurs de transcription STAT1/3 induits par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Wang et al., 2006). DDR1 inhibe également l'étalement cellulaire induit par l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans les MDCK via la suppression de l'activité de la protéine Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) (Yeh et al., 2009).

Cependant, contrairement aux effets de DDR1 démontrés dans les MDCK et bien que les mécanismes moléculaires ne soient que très peu décrits, l'activation de ce récepteur peut aussi induire la migration de différents types cellulaires incluant des leucocytes et des cellules cancéreuses. Par exemple, dans les mégacaryocytes, l'effet anti-migratoire de la protéine Syk est inhibé par la phosphatase SHP1 activée par DDR1 après phosphorylation par le collagène (Abbonante et al., 2013). Un effet similaire a été décrit dans les cellules épithéliales mammaire dans une autre étude (Neuhaus et al., 2011).

En conclusion, DDR1 peut réguler positivement ou négativement l'activité des intégrines via la convergence activatrice ou inhibitrice de leurs voies de signalisation (Fig. 6).

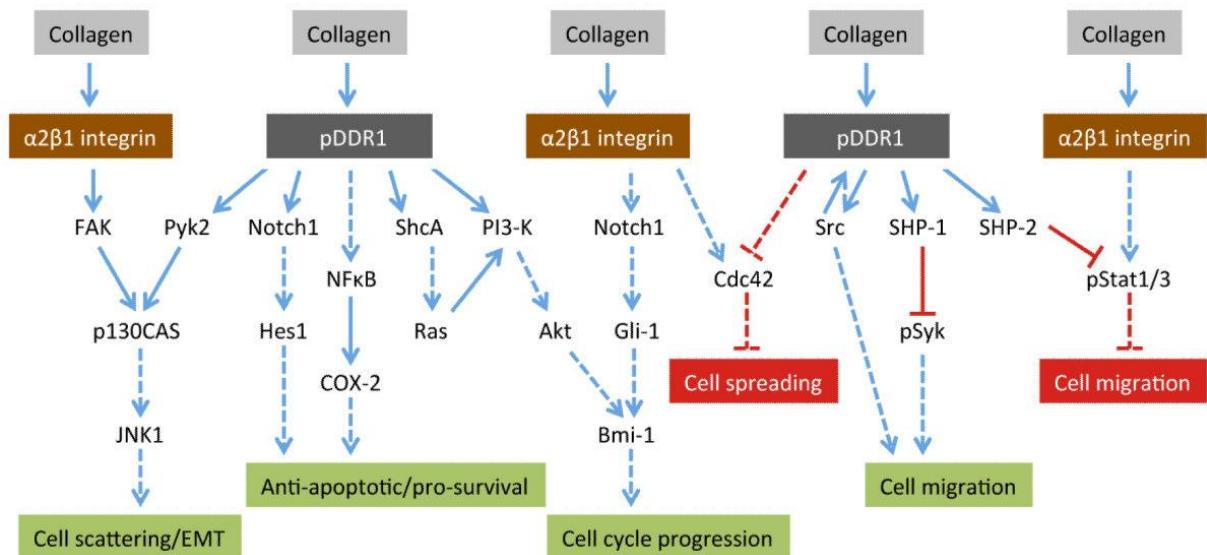


Figure 6 : Représentation schématique de certains « crosstalks » entre les voies induites par DDR1 et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, et leurs effets cellulaires (Leitinger, 2014).

c) Les récepteurs Notch

Une étude a montré que la phosphorylation de DDR1 peut induire l'activation de Notch1, sa translocation vers le noyau et ainsi, l'expression de ses gènes cibles. Cette activation de Notch1 serait le médiateur du rôle de DDR1 dans la survie cellulaire en réponse au stress génotoxique des cellules tumorales (Kim et al., 2011). Très récemment, il a été montré que l'inhibition combinée de DDR1 et des récepteurs Notch a un effet thérapeutique sur des souris atteintes d'hyperplasie pulmonaire, un modèle mimant l'adénocarcinome pulmonaire dépendant de K-Ras chez le patient (Ambrogio et al., 2016). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de γ -sécrétase en guise d'inhibiteurs de la voie Notch n'a pas permis de mettre en évidence le type de récepteur Notch précisément impliqué.

5. Quel(s) collagène(s) pour quelle(s) voie(s) ?

La position des résidus tyrosines phosphorylés et les voies de signalisation en découlant diffèrent selon le type cellulaire mais aussi probablement selon le type de collagène se liant à

DDR1 et l'isoforme impliquée. Par exemple, le traitement de mESC avec du collagène de type IV conduit à la phosphorylation de DDR1b induisant l'activation des voies MAPK. En revanche, le traitement par le collagène de type I n'induit pas cette activation (Ongusaha et al., 2003). De plus, le collagène de type I induit la phosphorylation de la Pyk2 via l'activation de DDR1 dans des cellules pancréatiques tumorales (Shintani et al., 2008) mais le traitement de ces mêmes cellules par le collagène de type XV semble inhiber la phosphorylation de la Pyk2 via DDR1 (Clementz et al., 2013). Beaucoup d'autres travaux seront nécessaires afin de caractériser la régulation fine de l'activation des isoformes de DDR1 par les différents types de collagènes.

V. Inhibiteurs pharmacologiques de DDR1

La plupart des stratégies inhibitrices de RTK impliquent des anticorps interférant avec la fonction du domaine extracellulaire du récepteur ou des petites molécules qui inhibent leur domaine kinase. Dans le cas des anticorps, ceux-ci vont se lier sur le domaine extracellulaire du récepteur et inhiber soit, la liaison du ligand au récepteur soit, le changement conformationnel induit par cette liaison permettant la transduction du signal (dimérisation, repliement...). Les petites molécules tels que les inhibiteurs de tyrosine kinase sont principalement des inhibiteurs compétitifs de l'ATP qui interfèrent avec le transfert du phosphate terminal de l'ATP sur les protéines présentant un résidu tyrosine. Ils sont classés en deux groupes. Les inhibiteurs de type I sont les plus répandus et reconnaissent la conformation active de la kinase, tandis que les inhibiteurs de type II reconnaissent sa conformation inactive (Zhang et al., 2009). Cependant, la structure des domaines kinases étant très conservée parmi les différents RTK, il est particulièrement difficile de créer des inhibiteurs sélectifs de ce domaine. C'est pourquoi de nombreux inhibiteurs utilisés en clinique ciblent plusieurs RTK, incluant les DDR (Rix et al., 2007 ; Broekman et al., 2011).

Un domaine peu conservé entre les différents RTK qui joue souvent un rôle inhibiteur de leur phosphorylation est la région JM intracellulaire (Hubbard, 2004). De ce fait, cette région est considérée comme une cible intéressante pour la création de nouveaux composés inhibiteurs. Enfin, différentes équipes ont démontré que les domaines extracellulaires de DDR1 et DDR2 jouaient un rôle important dans la modulation de l'activation et de la fonction de ces récepteurs (Agarwal et al., 2007 ; Flynn et al., 2010 ; Hachehouche et al., 2010). C'est pourquoi, l'une des stratégies envisagées pour créer un inhibiteur spécifique des DDR est de cibler ce domaine (Fig. 7).

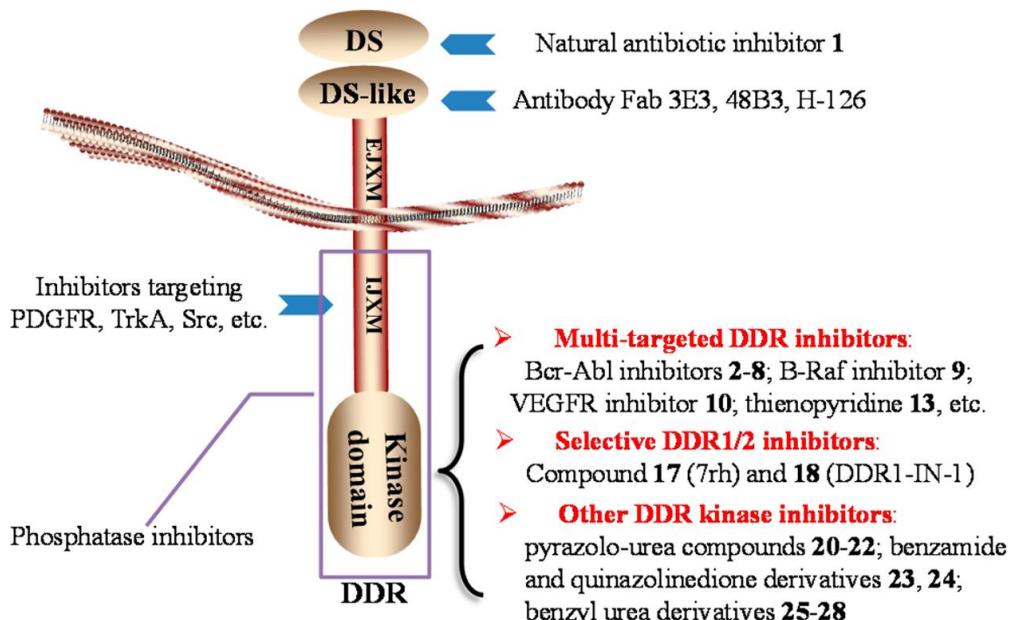


Figure 7 : Stratégies pour le développement de nouveaux inhibiteurs des DDR (Li et al., 2015).

1. Inhibiteurs de RTK utilisés en clinique

Afin d'identifier des inhibiteurs pharmacologiques ayant un effet sur DDR1, plusieurs groupes ont effectué des tests avec des molécules déjà utilisées en clinique. Ainsi, il a été démontré que les inhibiteurs de RTK dasatinib, nilotinib, imatinib et bosutinib sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP pouvant se lier au domaine kinase des DDR (Bantscheff et

al., 2007 ; Rix et al., 2007 ; Rix et al., 2010). Ces composés peuvent inhiber la phosphorylation des DDR induite par leur liaison au collagène dans des HEK mais aussi inhiber la production de MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) par des monocytes (Day et al., 2008).

D'autres travaux ont également pu montrer l'efficacité inhibitrice des composés bafetinib (Rix et al., 2010) et ponatinib (Canning et al., 2014) sur les deux DDR.

Malgré l'effet inhibiteur notable de ces composés, leur sélectivité est relativement faible, ce qui en fait des outils moins fiables pour étudier les effets de l'inhibition des DDR *in vitro* et *in vivo*. C'est pourquoi, d'autres études ont été menées afin de créer de nouveaux composés inhibiteurs ayant une meilleure spécificité pour DDR1, principalement.

2. Inhibiteurs spécifiques des DDR

a) Les composés DDR1-IN-1 et DDR1-IN-2

Kim et al. ont créé deux inhibiteurs spécifiques des DDR, DDR1-IN-1 et DDR1-IN-2. Ils sont tous les deux des inhibiteurs de type II et leurs structures moléculaires sont dérivées du nilotinib et de l'imatinib respectivement.

DDR1-IN-1 possède une meilleure sélectivité *in vitro* que DDR1-IN-2 mais induit de ce fait un effet anti-prolifératif moins marqué que DDR1-IN-2 dans différentes lignées de cellules cancéreuses (Kim et al., 2013).

b) Le composé 7rh

Une autre étude menée par Gao et al. a permis d'identifier un composé inhibant sélectivement DDR1, le composé 7rh, dont la structure moléculaire dérive de celle du ponatinib. Ce composé montre une sélectivité pour DDR1 20 fois supérieure à DDR2 et 60 supérieure à la protéine chimérique Bcr-Abl (Breakpoint cluster region-abelson kinase). Le criblage d'une

large sélection de kinases a montré un effet inhibiteur du composé 7rh de plus de 35% chez seulement 1% des protéines testées. De plus, ce composé peut inhiber la signalisation de DDR1 dans des cellules dérivées de cancer du poumon non à petites cellules induisant ainsi une diminution de leur caractère invasif (Gao et al., 2013). Enfin, ce composé a été utilisé *in vitro* et *in vivo* dans l'étude d'Ambrogio et al. démontrant une fois de plus l'efficacité de cet inhibiteur (Ambrogio et al., 2016).

B. Le DDR1 dans les pathologies

Comme beaucoup de RTK, le récepteur DDR1 joue un rôle majeur dans de nombreuses pathologies. Son implication a été mise en évidence plus particulièrement dans plusieurs types de cancer ainsi que dans des processus inflammatoires et fibrosants dans différents organes. Son large spectre d'implication dans les pathologies et ses fonctions physiologiques principalement limitées au développement (Fig. 8) font de lui une cible thérapeutique très attractive expliquant l'émergence récente de composés inhibiteurs de son activité (Bantscheff et al., 2007 ; Rix et al., 2007 ; Rix et al., 2010 ; Gao et al., 2013 ; Kim et al., 2013 ; Canning et al., 2014, Murray et al., 2015).

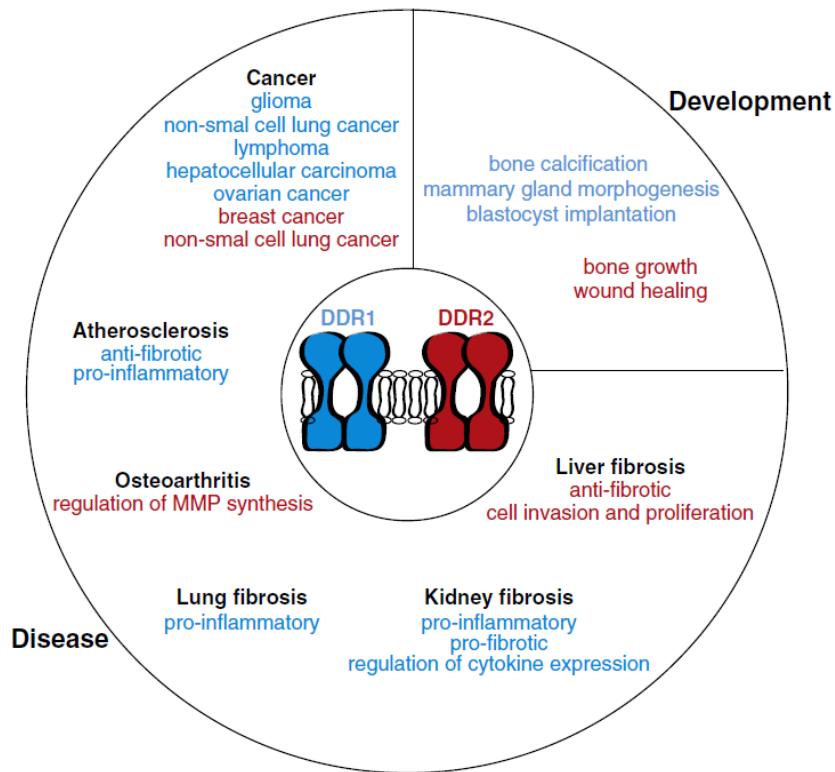


Figure 8 : Role des DDR dans les processus physiologiques (e.g., développement) et pathologiques (e.g., cancer, inflammation, fibrose) (Borza et Pozzi, 2014).

I. Cancers

La surexpression de DDR1 a été largement décrite dans différentes lignées cellulaires tumorales aussi bien que chez des patients atteints de cancers. En effet, son expression a été impliquée dans des cancers du sein (Johnson et al., 1993 ; Alves et al., 1995 ; Perez et al., 1994 ; Barker et al., 1995 ; Djemek et al., 2005), des ovaires (Heinzelmann-Schwarz et al., 2004), du cerveau (Weiner et al., 2000), de l'œsophage (Nemoto et al., 1997), des poumons (Alves et al., 1995, Ford et al., 2007 ; Yang et al., 2010 ; Valencia et al., 2012 ; Miao et al., 2013), et dans la leucémie lymphocytaire aigüe (Chiaretti et al., 2005). Cette observation suggère une forte implication de DDR1 dans le développement et la progression des cancers qui peut toutefois être nuancée en fonction du type et du stade de cancer (Borza et Pozzi, 2014).

Plusieurs études ont démontré que la surexpression de DDR1 augmente la tumorigénèse et est corrélée avec un pronostic défavorable pour le patient (Valiathan et al., 2012). Par exemple, différents travaux effectués chez des patients atteints de cancer du poumon non à petite cellules ont montré une augmentation importante de l'expression et de la phosphorylation de DDR1 promouvant ainsi l'invasion cellulaire, la survenue de métastases et diminuant le pronostic vital (Ford et al., 2007 ; Yang et al., 2010 ; Valencia et al., 2012 ; Miao et al., 2013).

Une étude récente a démontré que DDR1 est un biomarqueur intéressant dans le cancer du rein et participe à la transition épithélio-mésenchymateuse dans ces cellules (Song et al., 2016). DDR1 est également surexprimé dans les phases précoces de l'adénocarcinome pulmonaire dépendant de K-Ras et son inhibition dans un modèle murin mimant ce cancer permet une protection des souris (Ambrogio et al., 2016).

De plus, dans certains cas, DDR1 peut conférer aux cellules cancéreuses une résistance à la chimiothérapie et induire des signaux de survie cellulaire (Ongusaha et al., 2003 ; Cader et al., 2013). En effet, il a été démontré que le gène répresseur de tumeur p53 active l'expression de DDR1 et que l'inhibition de ce dernier conduit à l'apoptose des cellules cancéreuses (Ongusaha et al., 2003). En outre, ce récepteur pourrait également être impliqué dans la récidive de certains types de cancer (Jian et al., 2012).

Cependant, les mécanismes moléculaires induits par l'activation de DDR1 dans les processus tumoraux restent majoritairement inconnus.

Etant donné que DDR1 est impliqué dans des tumeurs particulièrement agressives pour lesquels aucun traitement ciblé n'existe, des inhibiteurs spécifiques de DDR1 utilisés en combinaison avec d'autres traitements pourraient représenter une voie thérapeutique prometteuse. Toutefois, Hidalgo-Carcedo et al. ont démontré des effets kinase-indépendants de DDR1 conduisant à la migration collective des cellules cancéreuses (Hidalgo-Carcedo et

al., 2011). Ces résultats suggèrent que des composés inhibiteurs de DDR1 ne seraient pas efficaces contre tous les types de cancer dans lesquels ce récepteur est activé.

II. Inflammation et fibrose

Dès le début des années 2000, plusieurs études ont proposé un lien entre DDR1 et l'inflammation. Par exemple, Kamohara et al. ont montré que le traitement de monocytes et de neutrophiles humains avec des lipopolysaccharides ou de l'interleukine-1 beta (IL-1 β) induisait l'expression de DDR1a et DDR1b (Kamohara et al., 2001). De plus, l'activation de DDR1b dans des macrophages humains induit l'activation des voies p38 MAPK et NF κ B conduisant ainsi à l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-8 (IL-8) ou MCP-1 (Matsuyama et al., 2004). Cependant, la validité de ces résultats dans des conditions *in vivo* n'était pas démontrée. C'est lorsque Vogel et al. créèrent les souris KO DDR1 que les premiers modèles murins de pathologie (Vogel et al., 2001) tels que l'athérosclérose (Hou et al., 2001), la fibrose pulmonaire (Avivi-Green et al., 2006) et ou encore la fibrose rénale (Flamant et al., 2006) furent testés.

1. Athérosclérose

Il a été démontré que les CML vasculaires et les macrophages, présents au niveau de la capsule fibreuse vasculaire formée chez des primates non-humains sous régime hypercholestérolémique, surexpriment les DDR (Ferri et al., 2004). Dans la même étude, la surexpression de DDR1 dans des CML humaines induit l'expression de MMP1. De plus, dans un modèle d'athérosclérose induit par lésion endovasculaire carotidienne mécanique, les souris KO DDR1 présentent une diminution de l'aire occupée par la néointima dans des sections transversales vasculaires par rapport aux souris WT. Ceci est notamment lié à une

moindre accumulation de collagène chez les souris invalidées pour DDR1 (Hou et al., 2001). De même, la prolifération, la migration et la production de MMP2 par les CML vasculaires isolées des souris KO DDR1 sont diminuées par rapport aux souris WT (Hou et al., 2001 ; Hou et al., 2002). Le rôle de DDR1 dans l'athérosclérose a également été confirmé chez des souris déficientes pour le Ldlr (Low-density lipoprotein receptor), un modèle bien connu d'athérosclérose. En effet, les souris doubles KO Ldlr/DDR1 présentent une aire de lésion d'athérosclérose significativement moins importante que les simples KO Ldlr. Cependant, à l'inverse des résultats obtenus dans le modèle mécanique, les souris KO Ldlr/DDR1 ont plus de dépôts de collagènes fibrillaires dans les plaques athéromateuses aux stades précoce de la pathologie (Franco et al., 2008). Ce résultat est renforcé par l'augmentation de l'expression transcriptionnelle des collagènes fibrillaires de types I et III dans les plaques d'athéromes et dans les CML isolées de souris KO DDR1/Ldlr (Franco et al., 2008, 2010). Les auteurs ont alors proposé une hypothèse selon laquelle la diminution avérée de l'accumulation de lipides au sein de la plaque d'athérome associée à l'augmentation de la production de MEC chez les souris KO Ldlr/DDR1 rendrait la plaque moins susceptible à la rupture (Franco et al., 2010). De plus, les travaux d'Ahmad et al. ont démontré que les souris KO Ldlr/DDR1 développent moins de calcifications d'athérosclérose diminuant ainsi l'instabilité de la plaque athéromateuse (Ahmad et al., 2009). Enfin, Franco et al. ont également démontré un effet pro-inflammatoire important de DDR1 participant à l'athérosclérose. En effet, les plaques d'athérome des souris KO Ldlr/DDR1 contiennent moins d'infiltrat de macrophages. De plus, la délétion de DDR1 induite spécifiquement dans les cellules de la moelle osseuse diminue significativement le développement de l'athérosclérose et les macrophages KO DDR1 adhèrent moins au collagène de type IV à l'état basal et expriment moins de MCP-1 (Franco et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent l'intérêt de l'inhibition de DDR1 dans l'athérosclérose.

2. Fibrose pulmonaire

Une étude a démontré que, dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, DDR1 est exprimé par les cellules épithéliales des voies aériennes et régule les processus d'inflammation et de fibrose. En effet, la souris KO DDR1 présente une diminution des infiltrats inflammatoires macrophagiques et lymphocytaires associée à la diminution de la fibrose pulmonaire et à une inhibition de la voie p38 MAPK par rapport à la souris WT (Avivi-Green et al., 2006). Ces résultats sont cohérents avec des travaux antérieurs démontrant qu'un inhibiteur de la voie p38 MAPK peut diminuer l'inflammation et la fibrose pulmonaire induite dans le modèle bléomycine (Underwood et al., 2000). Il est donc cohérent de proposer que les effets pro-inflammatoires et pro-fibrosants de DDR1 soient médiés par la voie p38 MAPK dans ce modèle. De plus, DDR1 est exprimé dans l'épithélium bronchique humain et des expériences *in vitro* indiquent un rôle de DDR1 dans la réparation de cet épithélium (Roberts et al., 2011 ; Chen et al., 2016). Ces données indiquent que DDR1 pourrait jouer un rôle important dans la modulation de la fibrose pulmonaire idiopathique caractérisée par des lésions permanentes de l'épithélium pulmonaire.

3. Fibrose de la peau

Il a également été montré que DDR1 est surexprimé dans les fibroblastes de la peau pendant le processus de réparation n'induisant pas de formation de cicatrice keloïde, durant les phases précoces du développement chez le rat. Cependant, le niveau d'expression de DDR1 est réduit

durant les phases plus tardives (Chin et al., 2001). Ces travaux suggèrent une implication de DDR1 dans la réparation indépendante de la régulation de la MEC.

4. Ischémie-reperfusion

Quelques études récentes ont montré une implication de DDR1 dans différents modèles d'ischémie-reperfusion (I/R). Zhu et al. ont démontré une augmentation de l'expression de DDR1 après l'I/R cérébrale chez le rat et son rôle dans la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Zhu et al., 2015). La surexpression de DDR1 par les cellules ischémiques situées dans la zone nécrotique lésée a aussi été montrée dans un modèle d'I/R cardiaque chez le rat (Ouyang et al., 2016).

III. Inflammation et fibrose : les pathologies rénales

La fibrose rénale est la conséquence d'une accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le parenchyme rénal. Il s'agit d'un processus pathologique altérant la fonction rénale, source de morbidité importante pouvant nécessiter le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale. Quelle que soit l'origine de l'agression tissulaire initiale, les lésions de fibrose rénale s'aggravent de façon monomorphe, suggérant la mise en jeu d'un processus inflammatoire et pro-fibrosant commun responsable de la progression de la maladie.

En 2004, Lee et al. ont démontré que DDR1 est surexprimé dans le glomérule de rein de rat après réduction néphronique (Lee et al., 2004). Mais ce n'est que deux ans plus tard que des travaux effectués chez la souris KO DDR1 permettent d'identifier un rôle de DDR1 dans les pathologies rénales. En effet, notre équipe a étudié la fonction de DDR1 dans trois modèles différents de néphropathie expérimentale. La première étude a porté sur un modèle de fibrose rénale induite par une hypertension artérielle systémique secondaire à l'administration

d'angiotensine II (Ang II) chez des souris KO DDR1 (Flamant et al., 2006). En réponse à l'hypertension, l'expression vasculaire et mésangiale de DDR1 est accrue chez les souris témoins, qui présentent une inflammation périvasculaire, une artériosclérose et une glomérulosclérose. Les souris transgéniques, exposées à une hypertension de même degré, apparaissent être comparativement protégées des lésions d'inflammation (réduction de la présence périvasculaire de lymphocytes T) et de fibrose rénale (accumulation de collagène I et IV moins importante) (Flamant et al., 2006). Une deuxième étude a été effectuée, chez ces mêmes souris KO DDR1, sur un modèle d'obstruction urétérale unilatérale (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO) qui induit une fibrose rénale secondaire à une ligature urétérale sur l'un des deux reins. À une phase inflammatoire précoce succède l'accumulation de MEC dans le rein ligaturé (Chevalier, 2006). Dans ce modèle, DDR1 est surexprimé par les cellules tubulaires, interstitielles résidentes et par des macrophages envahissant ce compartiment. Les souris invalidées pour le gène DDR1 présentent une inflammation périvasculaire moins importante ainsi qu'une moindre fibrose interstitielle. Cette protection partielle des souris KO DDR1 a été expliquée au moins en partie par une diminution des capacités migratoires des macrophages n'exprimant pas ce récepteur (Guerrot et al., 2011). Le troisième modèle étudié a été celui de la glomérulonéphrite induite par injection de sérum néphrotoxique (SNT). Dans ce modèle, la surexpression de DDR1 chez les souris de souche sauvage rendues néphropathes, est essentiellement podocytaire. Les souris invalidées pour DDR1 sont protégées de la glomérulonéphrite à croissants comparativement aux souris de type sauvage, cliniquement avec de moindres protéinuries et urémies et histologiquement avec une réduction du nombre de croissants, des dépôts de fibrine, de la réaction inflammatoire macrophagique et de la fibrose périglomérulaire et tubulo-interstitielle. De plus, le taux de survie des souris KO est nettement amélioré par rapport à celui des souris de type sauvage (Kerroch et al., 2012). Une étude complémentaire d'inhibition pharmaco-génétique par

administration préventive d'oligodésoxynucléotides anti-sens (ODN AS) dirigés contre DDR1 a permis d'obtenir des résultats protecteurs identiques à ceux observés chez la souris KO DDR1 (Kerroch et al., 2012). En outre, une étude menée par une autre équipe a démontré un rôle physiopathologique similaire de DDR1 dans des souris déficientes pour la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV (Col4a3), un modèle mimant le syndrome d'Alport (Gross et al., 2010). En effet, les souris doubles KO Col4a3/DDR1 ont une courbe de survie améliorée ainsi qu'une fonction rénale préservée. D'après les auteurs, cette protection s'explique notamment par la diminution de l'inflammation et de la fibrose rénale via l'inhibition de l'expression de l'interleukine-6 (IL-6) et de la voie du TGF β (Gross et al., 2010).

Enfin, Kerroch et al. ont démontré une expression accrue de DDR1 dans différents types de néphropathies glomérulaires chez les patients (Kerroch et al., 2012) et une autre étude a montré une association entre certains polymorphismes de DDR1 et la progression de la néphropathie à IgA chez l'enfant (Hahn et al., 2010). Ces résultats suggèrent que DDR1 pourrait jouer un rôle dans l'inflammation et la fibrose rénale chez l'homme.

Ces travaux démontrent le rôle majeur de DDR1 dans la réponse inflammatoire et la fibrogenèse induites dans quatre modèles différents de néphropathies. Ils mettent en exergue de manière cohérente avec ceux de la littérature, le phénomène de surexpression cellulaire ciblée de DDR1, en réponse à une agression mécanique ou immuno-inflammatoires. DDR1 dans le rein comme dans les vaisseaux favorise la réponse inflammatoire, puis la fibrose, de même que la migration des cellules qui le surexpriment. L'absence de fonction de DDR1 dans le rein adulte sain en fait une cible thérapeutique potentielle de la pathologie rénale chronique.

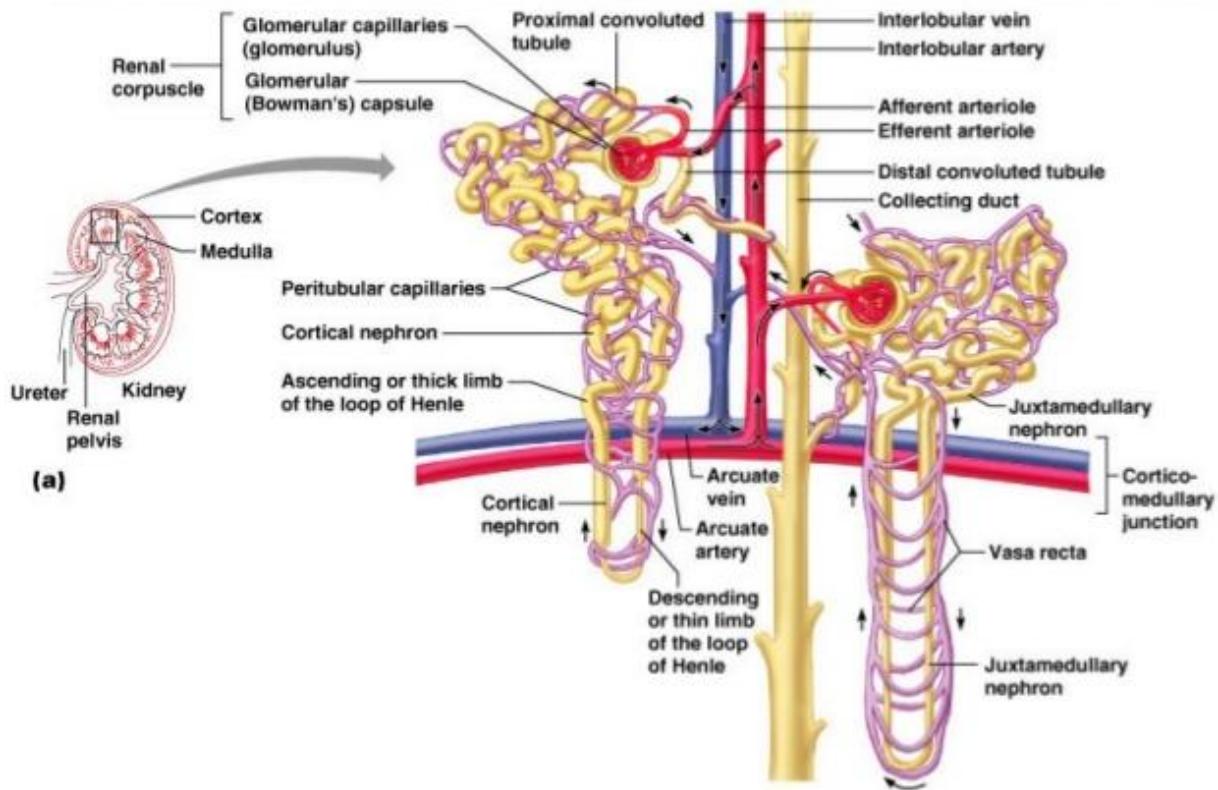
C. Les pathologies rénales : MRC et MRA

I. Le rein : structure et fonction

Les reins sont des organes vitaux qui ne constituent qu'environ 0,4% de la masse corporelle totale mais qui filtrent en moyenne 170 à 180 litres d'eau par jour chez l'Homme. Les principales fonctions rénales sont le contrôle de la composition et du volume du milieu extracellulaire, l'excrétion des produits du métabolisme et de toxines, et la synthèse d'hormones telles que l'érythropoïétine ou la rénine. Le contrôle de ces fonctions implique des mécanismes hautement régulés et très complexes.

1. Structure du néphron

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein et il en existe environ 1 million par rein humain. Il se compose de deux parties que sont le corpuscule rénal, contenant le corpuscule de Bowman et le flocculus glomérulaire, siège de la filtration sanguine, et un long tubule rénal segmenté où se fait la maturation de l'urine primitive. Le sang arrive au glomérule via des ramifications des artères interlobulaires, les artéries afférentes, puis est filtré au niveau des capillaires glomérulaires avant de ressortir via les artéries efférentes (Fig. 9).



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Figure 9 : Schéma représentatif du néphron.

a) Le glomérule rénal

Le glomérule se compose de quatre types cellulaires différents dont deux sont des constituants de la barrière de filtration glomérulaire. Ainsi, à l'intérieur des capillaires glomérulaires, on trouve les cellules endothéliales glomérulaires qui forment un endothélium fenestré. Autour de l'endothélium se situe la couche viscérale constituée des corps cellulaires des podocytes et de leurs prolongements cytoplasmiques, ou pédicelles, reposant sur la membrane basale glomérulaire (Fig. 10B). Enfin, le glomérule contient des cellules mésangiales ayant des capacités contractiles et sécrétaires et des cellules épithéliales pariétales qui tapissent la capsule de Bowman (Fig. 10A).

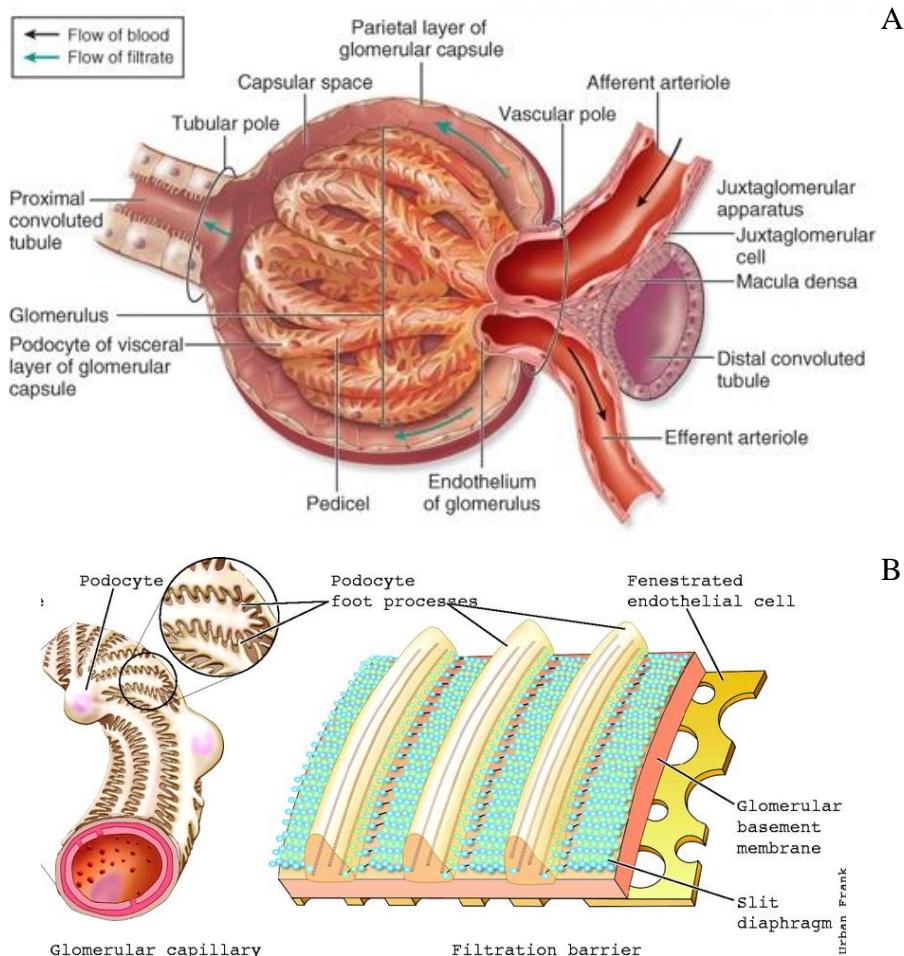


Figure 10 : Représentation schématique du corpuscule rénal et détail du capillaire et de la barrière de filtration glomérulaire (d'après The McGraw-Hill Companies © et Tryggvason et Wartiovaara, 2005).

b) Le tubule rénal

Le tubule rénal est composé d'un tubule proximal, suivi d'une anse de Henle, puis du tube contourné distal se terminant en un tubule connecteur et un canal collecteur. Les tubules proximaux, contournés distaux et la première partie du canal collecteur se trouvent dans le cortex rénal tandis que les autres segments du tubule rénal sont dans la médullaire (Fig. 9). Les cellules du tubule proximal ont la particularité de posséder une bordure en brosse formée par des microvillosités au niveau de la membrane apicale de ces cellules. Chaque portion du

tubule rénal contient un type cellulaire sauf le canal collecteur qui en contient plusieurs ayant des fonctions différentes, les cellules principales et les cellules intercalaires.

c) L'appareil juxtaglomérulaire

L'appareil juxtaglomérulaire est une structure anatomique qui se compose des cellules de la macula densa, contenues dans la branche ascendante large de l'anse de Henle, des cellules mésangiales extra-glomérulaires, des cellules granulaires productrices de rénine et enfin de la portion terminale de l'artériole afférente et de la portion proximale de l'artériole efférente (Fig. 10A).

2. Filtration glomérulaire et maturation de l'urine

Chez l'Homme, le flux sanguin rénal (FSR) est d'environ 1000 ml/min, ce qui représente environ 20% du flux sanguin total. Le débit de filtration glomérulaire (DFG) oscille entre 120 et 130 ml/min par $1,73\text{ m}^2$ de surface corporelle mais seul 0,8% environ du volume de l'ultrafiltrat glomérulaire est excréte. La filtration glomérulaire est rendue possible par la différence importante de pression hydrostatique entre le capillaire et la chambre urinaire dans le glomérule rénal. Ainsi, l'urine primitive, résultat d'une ultrafiltration, possède la même composition que le plasma sanguin à l'exception de la concentration de protéines qui passe de 70 g/l dans le plasma à 40 mg/l dans l'ultrafiltrat glomérulaire. L'urine primitive est ensuite maturée le long du néphron via des processus de réabsorption et de sécrétion tubulaires finement régulés pour maintenir l'homéostasie hydro-électrolytique. Les protéines résiduelles sont réabsorbées dans le tubule proximal et l'urine est ensuite concentrée dans la médullaire (Fig. 11).

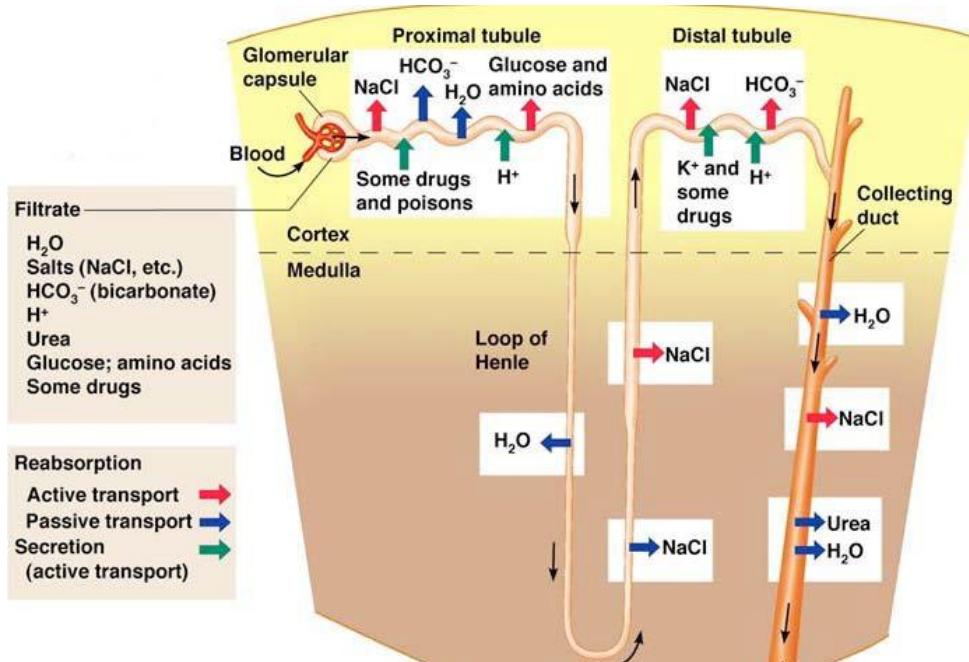


Figure 11 : Schéma représentatif de la maturation de l'urine le long du tubule rénal.

3. Régulation du FSR et du DFG

Le FSR dépend directement de la pression artérielle moyenne et de la résistance des artéries afférentes et efférentes. Or ces résistances régulent le DFG via le contrôle de la pression intracapillaire. C'est pourquoi, il existe trois mécanismes de régulation, le réflexe myogénique, le rétro-contrôle tubulo-glomérulaire et une régulation à plus long terme impliquant de multiples facteurs hormonaux ou paracrines.

Le réflexe myogénique est un mécanisme d'autorégulation local qui conduit à une contraction des artéries afférentes en réponse à une petite et courte augmentation de la pression artérielle détectée par les CML artériolaires.

Le rétro-contrôle tubulo-glomérulaire contrôlé par l'appareil juxta-glomérulaire sert à maintenir le FSR et le DFG stables en cas de variation spontanée et transitoire de la pression artérielle (Fig. 10A). En effet, une augmentation de la pression artérielle entraîne une augmentation du DFG conduisant à une augmentation du débit dans le fluide luminal au niveau de la branche ascendante large de l'anse de Henle. Il y a alors la transmission d'un

signal au glomérule grâce à la macula densa qui induit une augmentation de la résistance de l'artériole afférente ramenant le DFG à la normale.

A plus long terme, une diminution de la pression artérielle et de la volémie induit une diminution du débit de NaCl en regard de la macula densa, en même temps qu'une stimulation du système sympathique et une baisse de pression de perfusion dans l'artériole afférente du glomérule. Ces stimuli de la sécrétion de la rénine activent alors le système rénine-angiotensine (SRA) conduisant notamment à l'augmentation de la résistance de l'artériole efférente, augmentant ainsi la pression intra-capillaire et ramenant le DFG à la normale.

Enfin, d'autres facteurs tels que le facteur atrial natriurétique ou encore les prostaglandines et le monoxyde d'azote régulent le DFG au long terme.

II. Les maladies rénales chroniques (MRC)

1. Définition et prévalence

Les maladies rénales chroniques (MRC) sont un problème de santé publique d'ampleur mondiale responsable de millions de morts chaque année (Lozano et al., 2012 ; Murray et al., 2012 ; Murray Lopez, 2013 ; Ortiz et al., 2014). Environ 500 millions de personnes sont atteintes de MRC dans le monde et l'incidence du stade terminal de l'insuffisance rénale chronique (end-stage renal disease, ESRD) a doublé en Europe et aux Etats-Unis ces 25 dernières années, principalement à cause du vieillissement des populations (Valderrabano et Berthoux, 1996 ; Anonymous, 1998).

Il s'agit d'un groupe de pathologies dans lequel la fonction rénale est chroniquement diminuée en raison d'une altération des structures rénales telle qu'une réduction néphronique due à la perte de cellules glomérulaires ou tubulaires, une fibrose affectant le glomérule et le tubule ou des lésions vasculaires rénales (López-Novoa et al., 2011). Les MRC peuvent

nécessiter le recours à la dialyse ou à la transplantation rénale. Chaque année, environ 3,2 millions de personnes atteignent l'ESRD sans avoir eu accès à une quelconque thérapie de remplacement, et 440 000 en ayant eu accès à ces thérapies (Anand et al., 2013). Cependant, les stratégies thérapeutiques pour prévenir l'aggravation des MRC sont insuffisantes et se limitent souvent à inhiber le SRA contre lequel les premiers médicaments antagonistes ont commencé à être commercialisés il y a environ 40 ans (KDIGO, 2012).

2. Classification et étiologie

Aux Etats-Unis, la fondation nationale du rein (National kidney foundation, NFK) a classé la progression des MRC en cinq stades basés sur la dysfonction rénale, les lésions structurelles, la symptomatologie et les stratégies thérapeutiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Les différents stades des MRC tels que définis par la NKF basés sur le DFG exprimé en ml/min par 1,73 m² de surface corporelle et la symptomatologie (López-Novoa et al., 2011).

Stage	GFR	Common symptoms
1	≥ 90*	-
2	60-90*	↑ Parathyroid hormone, ↓ renal calcium reabsorption
3	30-59	Left ventricular hypertrophy, anemia secondary to erythropoietin deficiency
4	15-29	↑ Serum triglycerides, hyperphosphatemia, hyperkalemia, metabolic acidosis, fatigue, nausea, anorexia, bone pain
5	< 15	Renal failure: severe uremic symptoms

*CKD is defined as either GFR < 60 mL/min/1.73 m² for 3 months or a GFR above those values in the presence of evidence of kidney damage such as abnormalities in blood or urine (e.g proteinuria) tests or imaging studies. ↑: increase; ↓: decrease.

Les origines des MRC sont très diverses et comprennent des pathologies telles que l'hypertension, les diabètes ou les maladies immuno-inflammatoires mais sont aussi influencées par des facteurs génétiques, environnementaux et socio-économiques (López-Novoa et al., 2011 ; Martín-Cleary et Ortiz, 2014).

3. Physiopathologie de la fibrose rénale

Que l'origine de l'agression tissulaire initiale soit glomérulaire, tubulaire ou réno-vasculaire, les lésions de fibrose rénale s'aggravent de façon monomorphe, suggérant la mise en jeu d'un processus inflammatoire et pro-fibrosant commun responsable de la progression de la maladie. Une fois débutée, la progression de la fibrose rénale se poursuit indépendamment de l'étiologie initiale de la néphropathie (Fig. 12). Les lésions observées au cours de la fibrose rénale installée sont, de fait, relativement stéréotypées : il s'agit d'une atteinte des trois compartiments, vasculaire et glomérulaire ainsi que tubulo-interstitiel, avec une raréfaction capillaire, une artério- et une glomérulo-sclérose, une dédifférenciation podocytaire, avec une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire. Les mécanismes cellulaires à l'origine de ces lésions restent cependant imparfaitement connus.

De nombreuses études *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'implication d'un type cellulaire, d'un récepteur ou d'un médiateur spécifiques, mais seule l'action coordonnée d'un ensemble de mécanismes distincts est capable d'initier et de maintenir un processus de fibrose rénale complète (Chatziantoniou et Dussaule, 2005 ; Liu, 2006 ; Dussaule et al., 2011 ; López-Novoa et al., 2011 ; Kramann et al., 2013 ; Eddy, 2014).

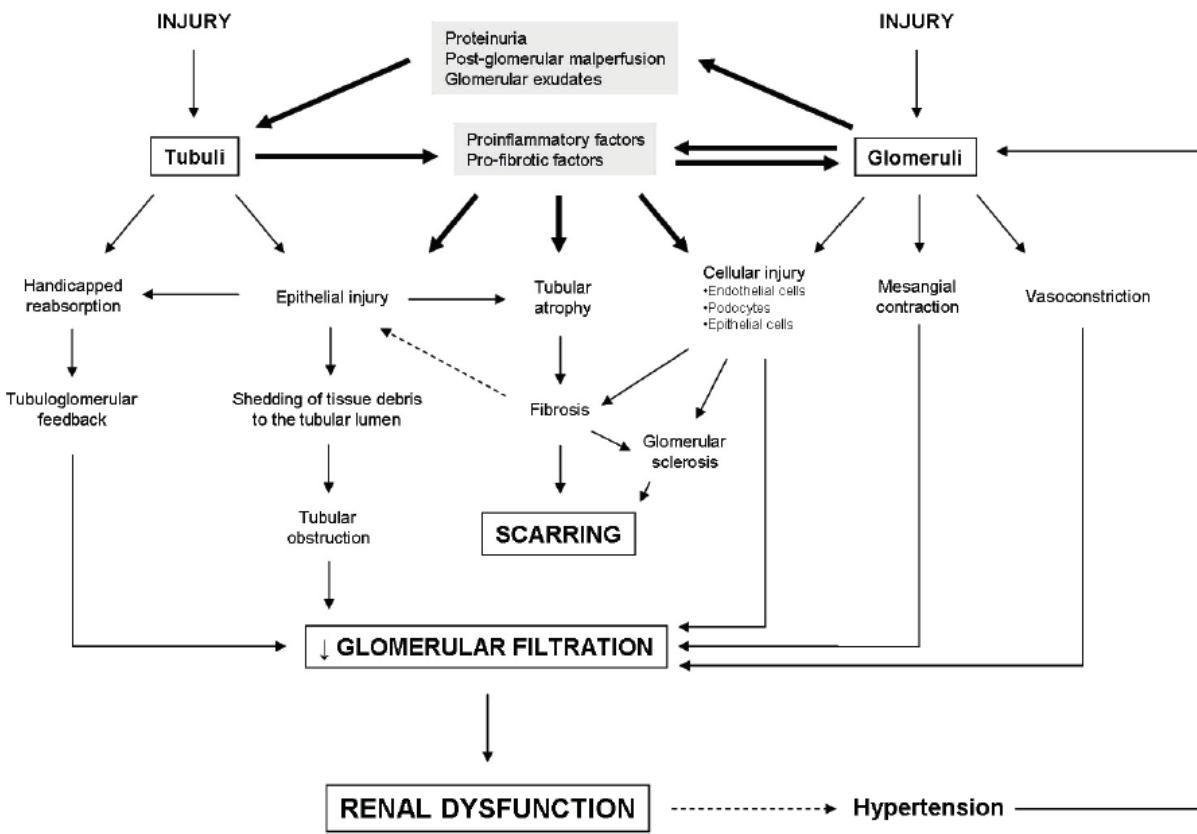


Figure 12 : Evènements pathologiques reliant les atteintes glomérulaire et tubulaire conduisant progressivement à un phénotype commun de MRC (López-Novoa et al., 2011).

a) Inflammation fibrosante

Initialement fonction de l'origine de l'atteinte rénale, l'infiltrat cellulaire inflammatoire glomérulaire, vasculaire ou péritubulaire néoformé est impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires et/ou pro-fibrosantes (Boffa et al., 2004 ; Liu, 2006 ; Dussaule et al., 2011 ; López-Novoa et al., 2011).

Les cellules mises en jeu sont des lymphocytes, des monocytes/macrophages, des cellules dendritiques et des mastocytes. Bien que l'inflammation soit partie intégrante des mécanismes de réponse à l'agression, une inflammation non-résolue devient une source importante de fibrose (Nathan et Ding, 2010 ; Schroder et Tschopp, 2010). Les cellules inflammatoires activées vont alors sécréter des molécules participant à l'altération des tissus telles que les dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive oxygen species, ROS) et induire l'expression de

cytokines fibrogéniques et de facteurs de croissance (Ricardo et al., 2008 ; Duffield, 2010 ; Vernon et al., 2010 ; Vielhauer et al., 2010). Ces évènements ont pour conséquence la création d'un environnement pro-fibrotique initiant l'activation des fibroblastes résidents ou une dédifférenciation de certaines cellules vers un phénotype fibroblastique. Enfin, le rôle primordial de l'inflammation dans les pathologies rénales a été largement démontré chez le rongeur par l'efficacité de stratégies thérapeutiques dirigées contre ce processus telles que l'administration d'antagonistes de CCR1 ou CCR2 (C-C chemokine receptor type 1/2) (Anders et al., 2002 ; Sayyed et al., 2011), d'anticorps bloquant du TNF α (Khan et al., 2005) ou encore d'antagonistes du récepteur à l'IL-1 (Jones et al., 2009).

b) Accumulation de MEC

L'activation et les modifications phénotypiques de fibroblastes, préexistant dans l'interstitium rénal, attirés depuis la circulation ou dérivés de péricytes, de cellules endothéliales ou de cellules épithéliales tubulaires, conduisent à la synthèse des éléments de la MEC (Fig. 13) (Barnes et Gorin, 2011). Les MMP jouent à ce titre un rôle important dans l'initiation de la fibrose en permettant la dégradation de la MEC préexistante et la migration des fibroblastes résidents. Dans une conception volontairement simplifiée de la fibrogenèse, on considère qu'intervient ensuite une perte de l'équilibre physiologique entre la production et la destruction de la MEC, dont la résultante est favorable à son accumulation (Dussaule et al., 2011 ; Liu, 2015).

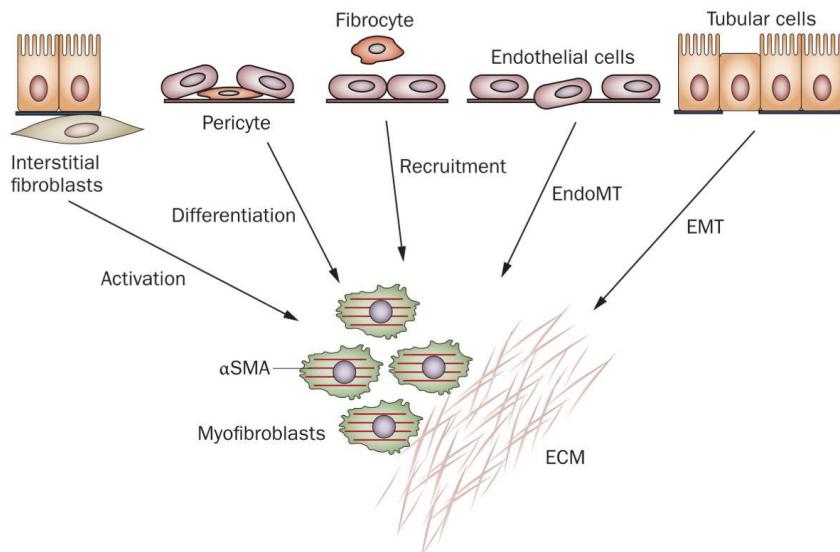


Figure 13 : Schéma représentatif des différentes origines connues des myofibroblastes producteurs de MEC (d'après Liu, 2015)

Outre la perte de l'organisation de la structure rénale en raison de l'installation d'un réseau fibreux excessif, la production excessive de MEC induit également une souffrance des tubules induisant leur atrophie. Cet effet est associé à une raréfaction des capillaires péri-tubulaires et à l'installation d'une hypoxie chronique en partie responsable de la perte de fonction des reins (Liu, 2015).

c) Principaux médiateurs et approches thérapeutiques potentielles

Les principaux médiateurs dont le rôle pro-fibrosant a été établi expérimentalement dans le rein sont l'Ang II, l'endothéline-1 (ET-1), le TGF β , le PDGF (Platelet-derived growth factor), l'EGF (Epidermal growth factor) et PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1). On leur oppose des facteurs anti-fibrosants dont la famille des BMP (Bone Morphogenic Proteins), antagonistes du TGF- β , le tPA (Tissue plasminogen activator), antagoniste du PAI-1 et l'HGF (Hepatocyte growth factor) (Boffa et al., 2003 ; Boffa et al., 2004 ; Liu, 2004 ; Chevalier, 2006 ; Dussaule et al., 2011 ; López-Novoa et al., 2011).

En se basant sur ces observations, plusieurs équipes ont tenté de mettre au point des stratégies thérapeutiques ciblant ces principaux médiateurs (Fig. 14). Les stratégies les plus prometteuses pour une translation chez le patient étaient l'inhibition et/ou le blocage de TGF β , l'activation de BMP-7, le blocage du CTGF (Connective tissue growth factor), de CCR2, de l'ET-1 et l'inhibition des phosphodiésterases et des NADPH oxidases 1 et 4 (NOX1/4) (Fig. 14). Plusieurs essais cliniques ont été réalisés et ont donné des résultats probants notamment concernant l'inhibition de TGF β , le blocage du CTGF, de CCR2 et des phosphodiésterases. Les essais cliniques pour des agonistes de BMP-7 et des inhibiteurs de NOX1/4 sont encore en cours et ceux concernant le blocage de l'ET-1 ont été arrêtés en raison d'effets secondaires importants (Tampe et Zeisberg, 2014). Malgré ces différents résultats, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour les MRC est toujours nécessaire afin de couvrir un maximum de pathologies différentes et de pouvoir envisager des thérapies combinatoires.

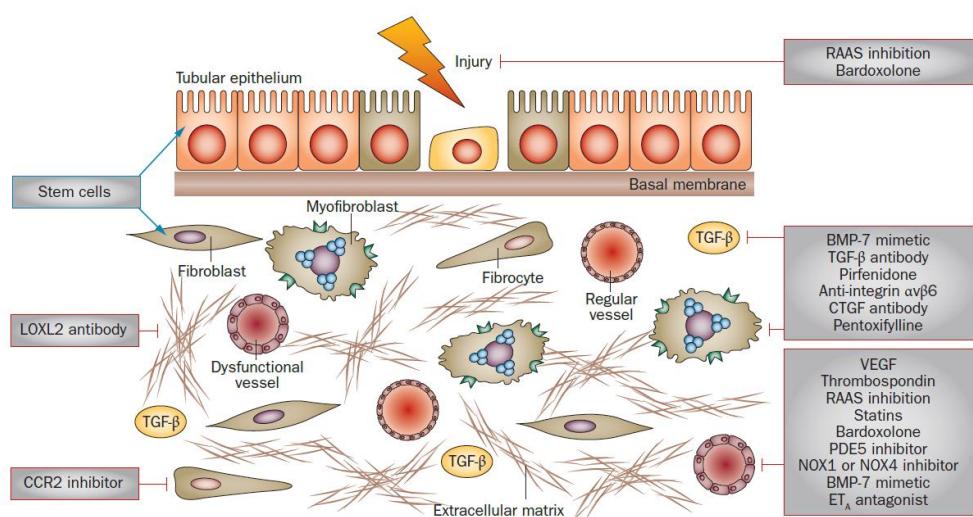


Figure 14 : Schéma représentatif de différentes stratégies antifibrotiques potentielles (Tampe et Zeisberg, 2014).

L'hypothèse selon laquelle les interrelations entre des composants moléculaires de la MEC synthétisée en excès, tels que le collagène de type I ou III ou la fibronectine, et les cellules

productrices de cette matrice mettent en jeu des récepteurs transmembranaires a été émise il y a quelques années. Les fonctions de ces récepteurs ne se limiteraient alors pas à l'ancrage au tissu environnant mais ils seraient également impliqués dans des processus cellulaires physiopathologiques.

Parmi ces récepteurs, outre la famille des intégrines largement étudiées, l'intérêt s'est porté sur des récepteurs d'un autre type, les récepteurs à domaine discoïdine et plus particulièrement le type 1, DDR1 (Curat et al., 2001 ; Hou et al., 2001 ; Chatziantoniou et Dussaule, 2005 ; Avivi-Green et al., 2006 ; Flamant et al., 2006 ; Guerrot et al., 2011 ; Kerroch et al., 2012).

III. Les maladies rénales aigües (MRA)

1. Définition et prévalence

Les maladie rénales aigües (MRA) se définissent par une diminution brutale de la fonction rénale se traduisant par une élévation de la créatininémie (Serum creatinine, SCr) et une diminution de l'excrétion urinaire.

La prévalence et l'incidence de la MRA ne cesse d'augmenter dans les pays en développement et les pays développés. On estime aujourd'hui que dans le monde, un adulte sur cinq et un enfant sur trois subit un épisode de MRA durant un séjour à l'hôpital (Susantitaphong et al., 2013). De plus, environ 2 millions de personnes meurent de MRA chaque année et ceux qui survivent ont un risque augmenté de développer une MRC dans le futur (Kam Tao Li et al., 2013). L'existence et la nature du traitement des MRA varie en fonction de leurs étiologies de même que les possibles complications en découlant.

2. Classification et étiologie

En se basant sur la SCr et l'excrétion urinaire, les MRA sont classées en trois ou cinq stades de sévérité. Il existe actuellement deux classifications différentes, RIFLE et AKIN (Tableau 2).

Tableau 2 : Comparaison des critères des classifications AKIN et RIFLE pour les MRA (KDIGO, 2013)

AKI staging	Urine output (common to both)	Class	RIFLE
Serum creatinine			Serum creatinine or GFR
Stage 1 Increase of more than or equal to 0.3 mg/dl ($\geq 26.5 \mu\text{mol/l}$) or increase to more than or equal to 150% to 200% (1.5- to 2-fold) from baseline	Less than 0.5 ml/kg/h for more than 6 hours	Risk	Increase in serum creatinine $\times 1.5$ or GFR decrease $> 25\%$
Stage 2 Increased to more than 200% to 300% (> 2 - to 3-fold) from baseline	Less than 0.5 ml/kg per hour for more than 12 hours	Injury	Serum creatinine $\times 2$ or GFR decreased $> 50\%$
Stage 3 Increased to more than 300% (> 3 -fold) from baseline, or more than or equal to 4.0 mg/dl ($\geq 354 \mu\text{mol/l}$) with an acute increase of at least 0.5 mg/dl (44 $\mu\text{mol/l}$) or on RRT	Less than 0.3 ml/kg/h for 24 hours or anuria for 12 hours	Failure	Serum creatinine $\times 3$, or serum creatinine $> 4 \text{ mg/dl} (> 354 \mu\text{mol/l})$ with an acute rise $> 0.5 \text{ mg/dl} (> 44 \mu\text{mol/l})$ or GFR decreased $> 75\%$
		Loss	Persistent acute renal failure=complete loss of kidney function > 4 weeks
		End-stage kidney disease	ESRD > 3 months

Les origines des MRA sont très diverses et peuvent être liées à des atteintes pré-rénales (Azotémie pré-rénale), rénales intrinsèques (néphrite interstitielle aigüe, glomérulonéphrite aigüe, pathologie rénovasculaire aigüe, microangiopathie thrombotique) ou non spécifiques (ischémie, toxicité médicamenteuse, infection) et post-rénales (néphropathie obstructive aigüe post-rénale) (Thadhani et al., 1996). De plus, plusieurs facteurs induisant une MRA peuvent coexister ce qui augmente le risque de complications, telles qu'une MRC ou une pathologie cardiovasculaire, et celui de mortalité (KDIGO, 2012).

3. Physiopathologie l'agression rénale aigüe

Les MRA sont associées à une inflammation intra-rénale et/ou systémique importante qui est donc un des mécanismes central. Les autres évènements physiopathologiques sont souvent plus spécifiques de l'étiologie de la MRA (Rabb et al., 2016).

a) Inflammation

La phase initiale des MRA correspond à la phase d'agression rénale et conduit à des lésions plus ou moins étendues des cellules du parenchyme rénal ainsi qu'à leur mort par nécrose ou apoptose (Fig. 15). Cette phase peut s'étendre sur plusieurs minutes ou plusieurs heures et implique des types cellulaires divers tels que les cellules épithéliales et endothéliales. Leur souffrance conduit à la production de nombreux facteurs impliqués dans l'initiation de l'inflammation aigüe tels que des DAMP (Damage-associated molecular patterns) et des molécules d'adhésion (Chen et Nuñez, 2010 ; Ratliff et al., 2013 ; Anders et Schaefer, 2014 ; Linkermann et al., 2014, Jang et Rabb, 2015). En effet, il a été démontré que les cellules en nécrose relarguent des molécules telles que des histones, des protéines chaperones ou encore de la fibronectine dans l'espace extracellulaire induisant alors l'activation et/ou l'expression de protéines activatrices de l'inflammation tels que les TLR (Toll-like receptors), NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), ou des cytokines pro-inflammatoires par les cellules résidentes et recrutées (Kim et al., 2013 ; Kurts et al., 2013, Anders et Schaefer, 2014 ; Vallés et al., 2014). Les cellules épithéliales, endothéliales et dendritiques activées sécrètent alors des chémokines incluant CXCL1/8 (Chemokine C-X-C ligand 1/8), MCP-1 et RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) qui favorisent le recrutement des cellules de l'inflammation innée telles que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages (Bolisetty et Agarwal, 2009 ; Kurts et al., 2013),

mais aussi des lymphocytes T (Linfert et al., 2009) et d'autres effecteurs myéloïdes et lymphoïdes moins fréquents tels que les cellules B ou NK (Rabb et al., 2016). De plus, le recrutement de ces cellules pro-inflammatoires est facilité par l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium puis de l'épithélium activé (Ratliff et al., 2013). On est alors dans une phase secondaire d'inflammation aigüe qui peut durer plusieurs jours (Fig. 15). La production de cytokines pro-inflammatoires, telles que $\text{TNF}\alpha$, IL-6 ou IL-1 β , mais aussi des chémokines, enzymes, radicaux libres et médiateurs lipidiques par les cellules du parenchyme rénal activées et par les cellules recrutées, amplifie les lésions et la mort cellulaire (Kurts et al., 2013 ; Ratliff et al., 2013). Cette phase d'inflammation aigüe pourrait donc être considérée comme une phase aussi délétère que la phase initiale, mais la production d'agents cytotoxiques pro-inflammatoires est aussi contrebalancée par une production de cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, TGF β , IL-10, les resolvines et la protectine D1 (Kurts et al., 2013), et le recrutement de cellules régulatrices de l'infiammation telles que les Tregs (Gandolfo et al., 2009 ; Kinsey et al., 2009 ; Kim et al., 2013). La fine régulation de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-inflammatoires conduit à la réparation du tissu et à sa régénération, ce qui constitue la dernière phase de la physiopathologie des MRA (Fig. 15). Plusieurs facteurs impliqués dans la souffrance cellulaire durant la phase initiale sont également impliqués lors de la réparation (Zhang et al., 2012 ; Anders et al., 2014 ; Kulkarni et al., 2014). De plus, le changement phénotypique des cellules telles que les macrophages (transition M1/M2) joue également un rôle important (Lee et al., 2011 ; Nelson et al., 2012 ; Kurts et al., 2013). Cependant, le processus de réparation des MRA peut devenir incontrôlé notamment dans le cas d'une hypoxie prolongée ou d'un maintien de la production de cytokines à la fois anti-inflammatoires et pro-fibrosantes telles que IL-13 et TGF β . Ce phénomène aboutit alors au développement d'une fibrose post-MRA pouvant aller jusqu'à l'installation d'une MRC (Kurts et al., 2013 ; Anders et al., 2014).

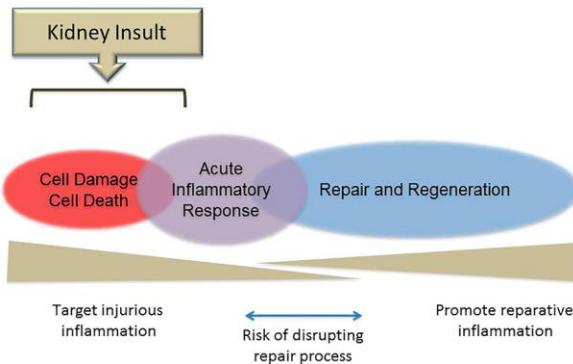


Figure 15 : Modélisation des phases inflammatoires intervenant dans un rein sain après un épisode de MRA (Rabb et al., 2015)

b) Spécificités des MRA selon leur étiologie

L'étiologie des MRA est très diverses mais certaines origines telles que l'ischémie-reperfusion (I/R) principalement lors de la transplantation rénale, le choc septique et les agents néphrotoxiques prédominent (Glodowski et Wagener, 2015).

L'I/R rénale induit une cascade d'évènements qui sont responsables de la perte de l'intégrité cellulaire rénale tels que le stress oxydatif ou le stress du réticulum endoplasmique (RE). Ces évènements conduisent souvent à la nécrose ou l'apoptose de ces cellules. Les dommages causés se traduisent au niveau histologique par une perte des bordures en brosses des tubules proximaux, une dilatation des tubules distaux et la formation d'agglomérats de débris cellulaires et de protéines appelés cylindres intra-tubulaires (Brezis et Rosen, 1995 ; Devarajan, 2006). Cela a pour effet une obstruction tubulaire conduisant à une augmentation de la pression hydrostatique dans la chambre urinaire glomérulaire, diminuant ainsi la filtration, et induisant une fuite de l'ultrafiltrat vers l'interstitium au travers des membranes basales dénudées (Fig. 16) (Abuelo, 2007). De plus, la nécrose des cellules tubulaires proximales, particulièrement sensibles à l'I/R, induit une diminution de la réabsorption de NaCl qui serait responsable d'une déshydratation mortelle si la macula densa n'activait pas le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire avec pour conséquence une augmentation de la résistance

des artéries afférentes et la diminution du DFG (Glodowski et Wagener, 2015). Enfin, la dysfonction endothéiale secondaire à l'I/R induit une raréfaction capillaire ainsi qu'une activation du complément et de la coagulation responsables d'une ischémie prolongée de certaines zones des reins (Hoffman et al., 2005).

Les lésions tissulaires induisent ensuite l'initiation d'une phase d'inflammation aigüe exacerbée par la reperfusion telle que décrite précédemment.

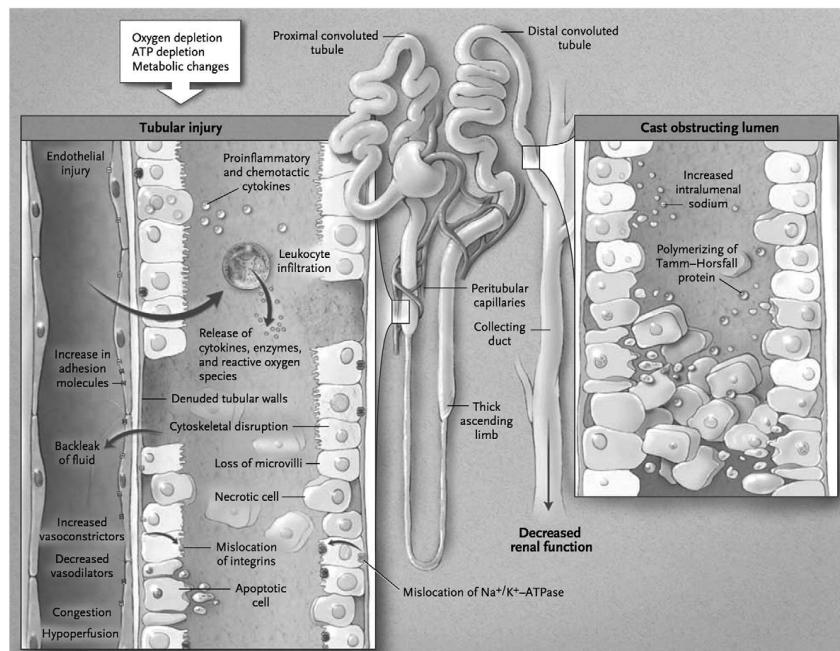


Figure 16 : Mécanisme physiopathologique de la nécrose tubulaire induite par l'I/R (Glodowski et Wagener, 2015)

Le mécanisme physiopathologique conduisant à une MRA causée par un choc septique ou sepsis est encore mal connu. L'hypothèse prédominante mais probablement incomplète est que le sepsis induit une vasodilatation massive responsable d'une hypoperfusion généralisée et de lésions ischémiques rénales semblables à l'I/R (Lerolle et al., 2010 ; Takasu et al., 2013).

Les agents néphrotoxiques classiquement utilisés en clinique incluent des antibiotiques, en particulier les aminoglycosides, les inhibiteurs de calcineurines, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les produits de contraste (Glodowski et Wagener, 2015). Ils médient principalement leur effets néphrotoxiques par une action sur le tonus vasculaire se répercutant sur le DFG et une cytotoxicité tubulaire conduisant au développement d'une MRA.

c) Biomarqueurs et stratégies thérapeutiques

Le meilleur moyen de limiter les complications et de diminuer le risque de mortalité associé aux MRA est la prise en charge rapide de ces pathologies. Cependant, la variation de la SCr ne permet pas la détection précoce des MRA. La recherche s'est donc orientée vers l'identification de biomarqueurs permettant de déterminer le stade des MRA et de prédire leurs évolutions. La difficulté réside dans le fait que les MRA ne sont pas une seule entité pathologique. Elles ont plusieurs étiologies possibles et peuvent être multifactorielles conduisant ainsi à une physiopathologie complexe. De ce fait, à la différence des biomarqueurs classiques, les biomarqueurs des MRA se devaient d'être impliqués dans les processus physiologiques et pathologiques conduisant à l'altération des tissus.

Ces travaux de recherche ont permis l'identification de protéines telles que NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin), Kim-1 (Kidney injury molecule 1), la Cystatine C, l'IL-18 et L-FABP (Liver-type fatty acid-binding protein), l'Angiotensinogène (Agt), TIMP-2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 2) et IGFBP7 (Insulin growth factor-binding protein 7) (Fig. 17) (Waikar et al., 2008 ; Alge et Arthur, 2014 ; Charleton et al., 2014 ; Koza, 2016).

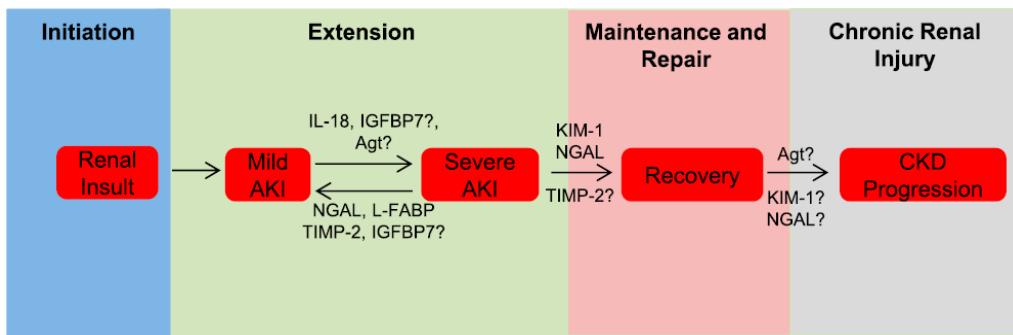


Figure 17 : Modélisation de l'évolution des MRA intégrant les nouveaux biomarqueurs identifiés (Alge et Arthur, 2015)

La confirmation de la fiabilité de ces biomarqueurs chez des patients atteints de MRA ayant différentes étiologies et leur utilisation pour les diagnostiquer permettraient d'adapter la prise en charge des patients. Cependant, malgré l'existence de traitements pour certaines causes précises de MRA, les traitements ciblant les conséquences de ces pathologies sont limités. Certains inhibiteurs de l'apoptose ont montré un effet protecteur dans des modèles animaux de MRA (Sanz et al., 2008 ; Ucero et al., 2013). De plus, étant donné les importantes lésions occasionnées par le processus inflammatoire aigu dans les MRA, on peut supposer que l'inhibition de l'expression et/ou de l'activation de facteurs pro-inflammatoires peut représenter des stratégies thérapeutiques intéressantes. Toutefois, l'inhibition de certains médiateurs pro-inflammatoires devenant anti-inflammatoires dans la phase de réparation pourrait jouer un rôle délétère à long terme (Zhang et al., 2012). Le choix des cibles thérapeutiques doit donc se faire en tenant compte des différentes phases physiopathologiques des MRA.

IV. La boucle MRA-MRC

L'idée d'un lien de causalité entre les MRA et les MRC est de plus en plus évoquée depuis ces dix dernières années. Cette observation a été facilitée par la révision des critères définissant la MRA, permettant ainsi l'analyse de cas plus modérés et de l'évolution de leurs fonctions rénales au long-terme (Belayev et Palevsky, 2015). Ainsi, le dogme selon lequel la majorité des patients qui survivent à un épisode de MRA ont une rémission presque complète de leur fonction rénale et un excellent pronostique vital (Finn, 1983) est remis en question. Toutefois, il est vrai que les critères de risques des MRA sont pour certains identiques à ceux des MRC pouvant expliquer une partie des complications (Rifkin et al., 2012). Cependant, plusieurs études épidémiologiques ont montré une forte association entre des épisodes de MRA et le développement et la progression de MRC en découlant (Chawla et Kimmel, 2012 ; Coca et al., 2012 ; Jones et al., 2012 ; Kam Tao Li et al., 2013 ; Venkatachalam et al., 2015). De plus, il est fréquent d'observer des épisodes de MRA chez des patients atteints de MRC. Cela aggrave alors de façon considérable le phénotype chronique et l'altération de la fonction rénale (Venkatachalam et al., 2015).

L'un des mécanismes hypothétiques selon lequel une MRA favorisera la survenue d'une MRC est la présence de l'hypoxie (Tanaka et al., 2014). En effet, à la suite d'une MRA, la plupart des tubules se régèrèrent mais certains ne se différencient pas, deviennent atrophiques et s'entourent de fibrose interstitielle (Venkatachalam et al., 2010, Lan et al., 2012). L'association de ce phénotype à la raréfaction capillaire, secondaire à des lésions vasculaires non résolues (Basile, 2007 ; Basile et al., 2012), suivant une MRA conduirait alors au développement d'une MRC (Fig. 18) (Venkatachalam et al., 2015).

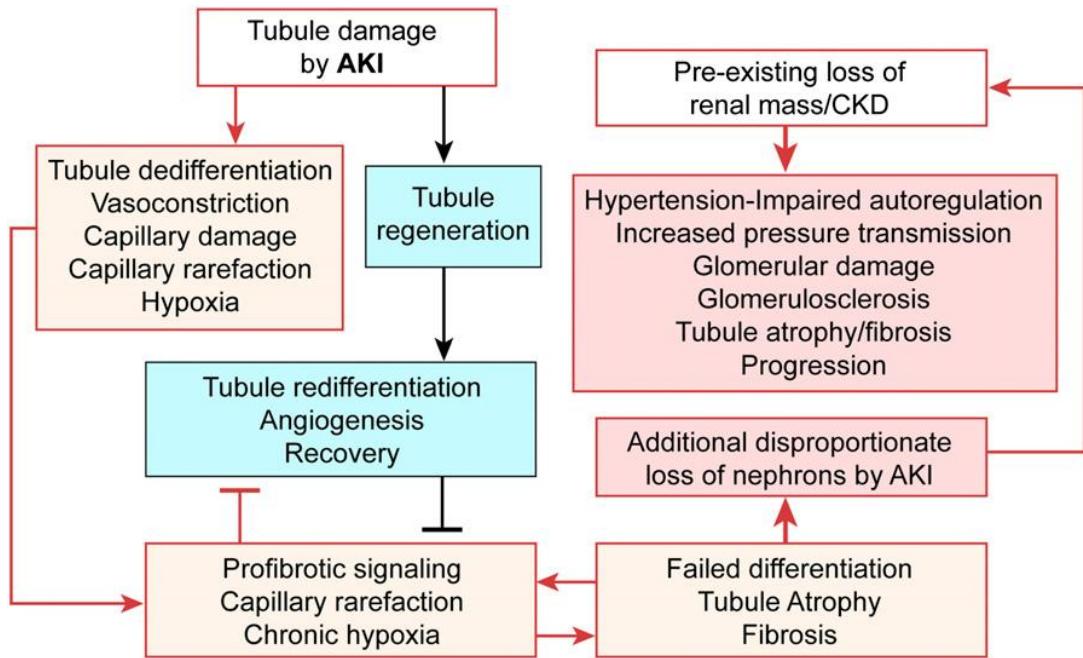


Figure 18 : Schéma de synthèse représentant les évènements secondaires à une MRA conduisant au développement ou à l'aggravation d'une MRC (Venkatachalam et al., 2015).

D. Les modèles de néphropathies expérimentales

L'étude des mécanismes impliqués dans les différentes pathologies rénales et surtout les tests pré-cliniques de molécules validées *in vitro* dans un but thérapeutique, nécessitent l'utilisation de modèles animaux. Pour cela, de nombreux modèles murins de MRC et de MRA ont été mis au point et sont largement utilisés. Parmi eux, on compte des modèles de MRC tels que la souris KO Col4a3 induisant une néphropathie glomérulaire mimant le syndrome d'Alport, la néphrectomie 5/6, la glomérulonéphrite induite par injection de SNT, la néphroangiosclérose hyperstensive induite par perfusion d'Ang II, la fibrose induite par MRA ou l'UUO. On compte également des modèles de MRA tels que l'I/R rénale uni- ou bilatérale, ou l'injection de molécules néphrotoxiques (cisplatine, acide folique, acide aristolochique) (Eddy et al., 2012 ; Ortiz et al., 2015).

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les trois modèles utilisés dans les deux articles présentés dans ce travail de thèse.

I. Glomérulonéphrite induite par injection de sérum néphrotoxique

1. Description du modèle

La glomérulonéphrite induite par injection de SNT ou néphrite de Masugi est un modèle expérimental de MRC se rapprochant de la glomérulonéphrite à croissants chez l'Homme. Ce modèle expérimental a été d'abord appliqué chez le chien en 1920 (Wilson et Olivier, 1920) puis développé chez le lapin par Matazo Masugi dans les années 1930 (Masugi, 1932). Il consiste en plusieurs injections intra-veineuses d'un sérum hétérologue ou SNT, au préalable décomplémenté, provenant d'un mouton immunisé avec des protéines issues de broyat de cortex ou de glomérules isolés de souris. Le rapide dépôt des anticorps contenus dans ce SNT au niveau des glomérules induit un recrutement des polynucléaires neutrophiles impliqués dans l'immunité innée. C'est la phase hétérologue de la pathologie (Unanue et al., 1967 ; Assmann et al., 1985). Quelques jours suivant la première injection de SNT, la phase autologue débute. Elle met en jeu les acteurs de l'immunité adaptative et conduit à la production d'immunoglobulines anti-anticorps de mouton (Wheeler et al. 1990). Etant donné la nature même de l'immunogène injecté au mouton, la spécificité d'un SNT à l'autre est très variable, de même que la sévérité de la néphrite induite (Ortiz et al., 2015). Cependant, la symptomatologie développée est relativement similaire et comprend une importante protéinurie associée à une augmentation de la SCr et de l'urémie reflétant l'altération de la fonction rénale, la formation de pseudo-croissants glomérulaires et de glomérulosclérose, un infiltrat de cellules pro-inflammatoires important dans le parenchyme rénal et le développement d'une dilatation tubulaire associée à une fibrose interstitielle (Lelongt et al., 2001 ; Hertig et al., 2003 ; Mesnard et al., 2009 ; Kerroch et al., 2012).

2. Physiopathologie du modèle

Le développement de ces lésions met en jeu différents acteurs incluant des cellules recrutées et des cellules résidentes. Parmi les cellules recrutées, il a été démontré que les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T jouent un rôle important dans la physiopathologie de ce modèle (Naish et al., 1975 ; Tipping et al., 1998 ; D'Souza et al., 1999 ; Duffield et al., 2005). D'autres cellules de l'immunité jouent un rôle moins prépondérant mais notable telles que les cellules dendritiques et les cellules NK (Natural killer) (Scholz et al., 2008 ; Mesnard et al., 2009). De plus, les lésions glomérulaires induites par la réaction inflammatoire secondaire à l'injection du SNT conduisent à une dédifférenciation et une activation des cellules épithéliales pariétales ainsi que des podocytes vicéraux associées à l'effacement des pédicelles et à une dysfonction endothéiale (Fig. 19). Ces évènements pathologiques combinés à la prolifération extra-capillaire des cellules épithéliales pariétales et vicérales, formant un pseudo-croissant dans la chambre urinaire, sont principalement responsables du syndrome néphrotique et de l'altération de la fonction rénale (Shirato et al., 1996 ; Le Hir et al., 2001 ; Shirato, 2002 ; Yuan et al., 2002 ; Besse-Eschmann et al., 2004 ; Moeller et al., 2004 ; Smeets et al., 2006 ; Thorner et al., 2008 ; Appel et al., 2009). Enfin les lésions retrouvées au niveau des cellules tubulaires peuvent être expliquées par la protéinurie massive induite par l'altération de la barrière de filtration glomérulaire ainsi que par l'ischémie liée à l'atteinte glomérulaire (Kriz et al., 1999 ; Wong et al., 2008 ; El Karoui et al., 2016). Le développement de la glomérulosclérose et de la fibrose interstitielle est secondaire à l'inflammation importante et à la destruction tissulaire induite dans ce modèle.

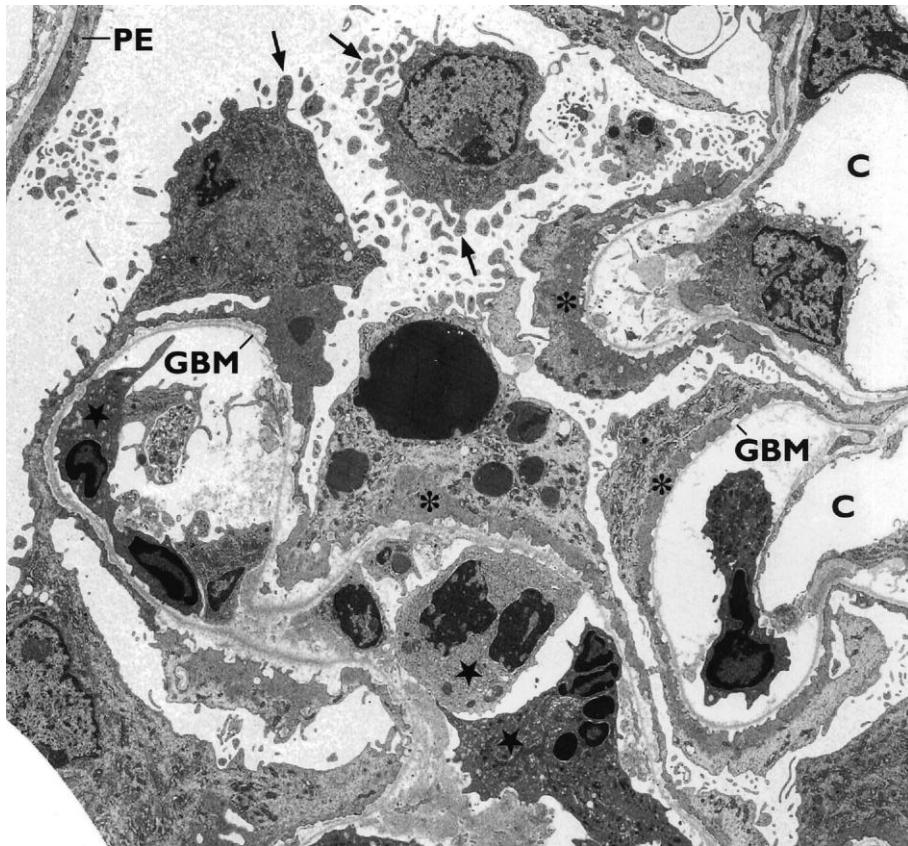


Figure 19 : Image représentative d'un glomérule observé par microscopie électronique à transmission 10 jours après l'injection de SNT. Dans les deux anses capillaires de droite, l'endothélium se détache de la membrane basale (Glomerular basement membrane, GBM) et une cellule inflammatoire est visible dans l'espace subendothélial. La troisième anse capillaire est nécrotique et remplie de cellules inflammatoires (étoiles). Les pédicelles sont aplatis et destructurés (*), et le corps cellulaire des podocytes présente des microvillosités anormales (flèches). C, Lumière des capillaires. PE, Epithélium pariétal (Le Hir et al., 2001).

II. Obstruction Urétérale Unilatérale

1. Description du modèle

Malgré son nom, l'UUO est plus utilisé comme modèle de transition MRA-MRC que comme modèle de néphropathie obstructive aigüe. En effet, il peut être classé dans les deux catégories de pathologie, MRC et MRA selon la durée et la persistance de l'obstruction se faisant par ligature ou clampage. Dans les années 1970, il a été démontré que l'UUO chez le lapin résultait en une prolifération des fibroblastes rénaux et en leur différenciation en myofibroblastes (Nagle et al., 1973). D'autres études chez le lapin ont notamment démontré

une accumulation des dépôts de collagènes fibrillaires dans l’interstitium rénal (Sharma et al., 1993). Dès lors, le modèle UUO a été adapté à d’autres rongeurs et son utilisation, pour étudier les mécanismes de la fibrose rénale et de la néphropathie obstructive, s’est répandue (Fig. 20) (Klahr et Morrissey, 2002 ; Vaughan et al., 2004 ; Ucero et al., 2014). La ligature de l’uretère en deux points induit une augmentation de la pression hydrostatique conduisant à une ischémie et une hypoxie responsables de la destruction du néphron par apoptose, nécrose et autophagie (Li et al., 2010). L’altération de l’épithélium tubulaire conduit alors au développement d’une inflammation qui, avec le stress mécanique, est responsable du développement d’une fibrose rénale (Fig. 20) (Ortiz et al., 2015).

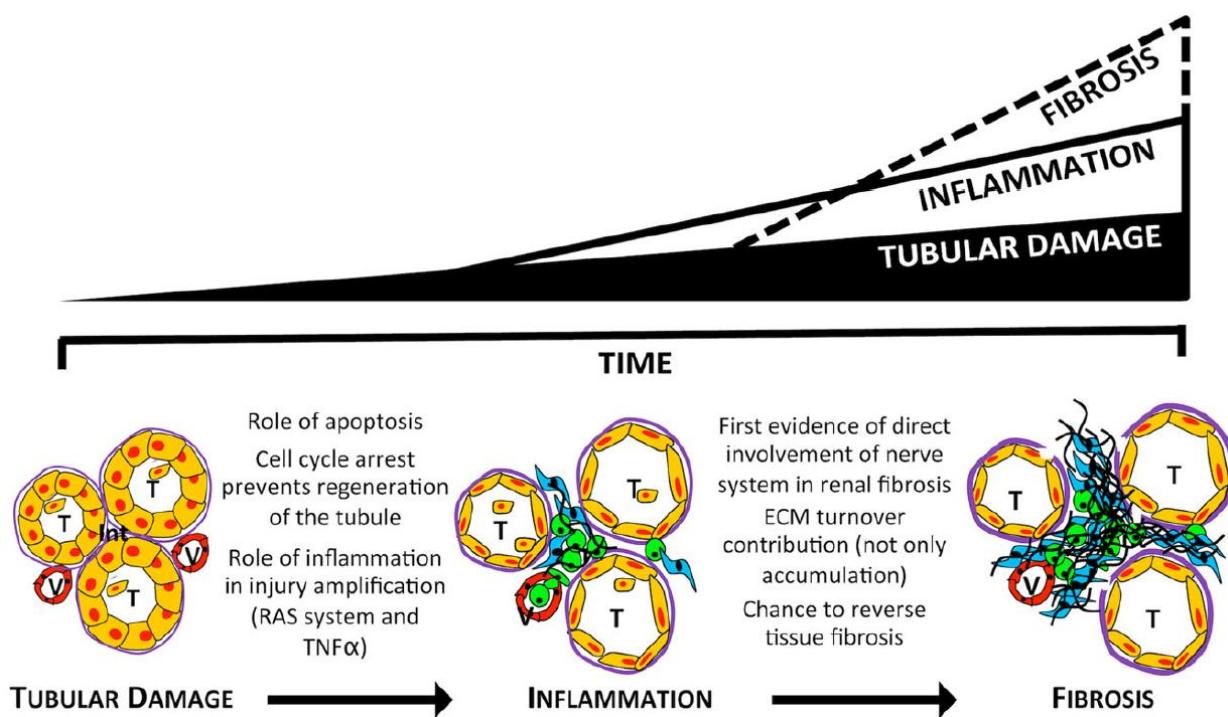


Figure 20 : Schéma représentant la contribution directe du modèle UUO à la compréhension des mécanismes d’inflammation et de fibrose rénaux et la transition MRA-MRC (Ucero et al., 2014).

2. Physiopathologie du modèle

La physiopathologie du modèle UUO met en jeu des mécanismes hémodynamiques et implique des cellules résidentes et recrutées dans une réponse fibrogénique typique.

Ainsi, l'augmentation de la pression intratubulaire induit une augmentation transitoire du flux sanguin rénal et une hyperfiltration glomérulaire en raison de la production de monoxyde d'azote via l'expression de eNOS et iNOS (endothelial/inducible Nitric oxide synthase) (Miyajima et al., 2001). Cet effet est ensuite rapidement supprimé par l'activation du SRA qui diminue la filtration glomérulaire au prix d'une réduction de la vascularisation du parenchyme rénal, induisant ainsi une hypoxie. De plus, l'Ang II peut avoir des effets pro-inflammatoires via l'activation de la voie NF κ B dans les macrophages et induire un stress oxydant via l'activation de la production de ROS par les cellules tubulaires (Esteban et al., 2004 ; Chevalier et al., 2009).

L'augmentation de la pression intratubulaire induit un aplatissement des cellules épithéliales tubulaires et une dilatation des tubules (Kida et Sato, 2007). Ce phénomène est suivi d'une perte des cellules tubulaires, notamment par apoptose, induisant le recrutement de cellules inflammatoires. Ces cellules, principalement des macrophages, s'infiltrent grâce à l'augmentation de la perméabilité des capillaires péri-tubulaires et à l'activation des cellules endothéliales (Eddy et al., 2012).

Dans ce modèle, l'agression tubulaire est continue étant donné le maintien de la ligature et la raréfaction capillaire associée, induisant hypoxie et stress oxydant (Mimura et Nangaku, 2010). Les cellules résidentes en souffrance ainsi que les cellules inflammatoires recrutées vont donc synthétiser des facteurs pro-fibrosants tels que le TGF β (Eddy et Neilson, 2006 ; Chevalier et al., 2009). Il y a alors l'apparition de myofibroblastes, producteurs de MEC en excès, de différentes origines telles que la différenciation des péricytes, la transition épithélio-mésenchymateuse ou la transition endothélio-mésenchymateuse (Kalluri et Neilson, 2003 ; Eddy et Neilson, 2006 ; Chevalier et al., 2009). Ce phénomène associé à l'inhibition de l'activité des MMP conduit au développement d'une fibrose tubulo-interstitielle (Fig. 21).

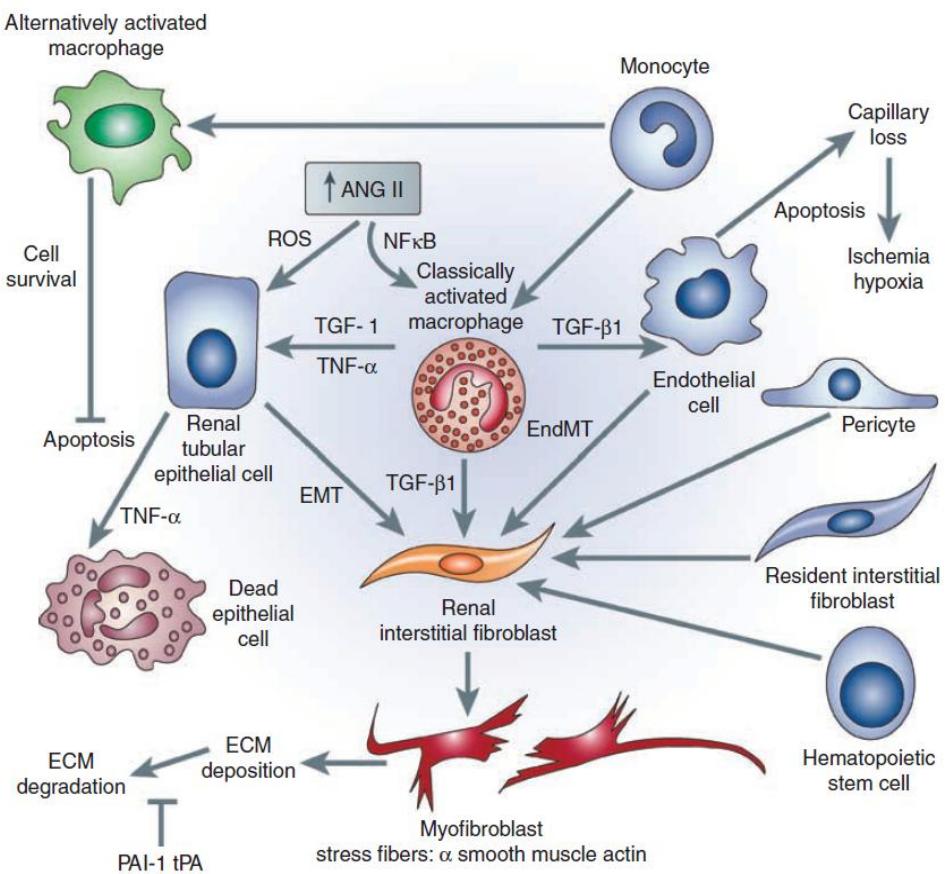


Figure 21 : Schéma représentatif des interactions entre les cellules récrutées et résidentes dans un rein de rongeur soumis à l'UUO (Chevalier et al., 2009).

III. Ischémie-reperfusion rénale

1. Description du modèle

Le modèle d'I/R est un modèle de MRA mimant l'I/R rénale survenant dans les cas de transplantation ou de toute autre évènement induisant une diminution ou un arrêt de la perfusion rénale. Il est réalisé par clampage artério-veineux au niveau du hile rénal avec un clamp atraumatique. L'I/R peut être unilatérale, bilatérale ou unilatérale associée à une nephrectomie controlatérale. Dans ces deux derniers cas, on observe une altération importante de la fonction rénale assortie à des lésions histologiques massives dans les 24 heures suivant la chirurgie. Le temps d'ischémie est l'élément principal faisant varier la sévérité du modèle et est en général compris entre 25 et 50 minutes chez les rongeurs. Cependant, d'autres

facteurs entrent en compte tels que l'espèce, le fond génétique, le sexe, l'âge mais aussi l'anesthésique et la température corporelle de l'animal durant l'ischémie (Singh et al., 2012 ; Ortiz et al., 2015 ; Le Clef et al., 2016).

2. Physiopathologie du modèle

Les principaux types cellulaires affectés dans l'I/R sont les cellules tubulaires proximales du segment S3, en raison de leur plus forte intolérance à l'hypoxie, et les cellules endothéliales (Ortiz et al., 2015). L'activation des cellules endothéliales associée à la mort par apoptose et nécrose des cellules épithéliales conduit au recrutement de cellules inflammatoires amplifiant les lésions rénales. Selon la sévérité de l'agression initiale, une réparation et une régénération des tissus est possible via la dédifférenciation et la prolifération des cellules survivantes (Bonventre et Yang, 2011). La contribution des cellules résidentes et des cellules extra-rénales dans ce processus de réparation est encore débattue (Bagul et al., 2013). Si la destruction tissulaire initiale est trop massive, l'I/R aigüe peut conduire à la mise en place d'une fibrose rénale (Fig. 22) (Le Clef et al., 2016 ; Jang et Rabb, 2015).

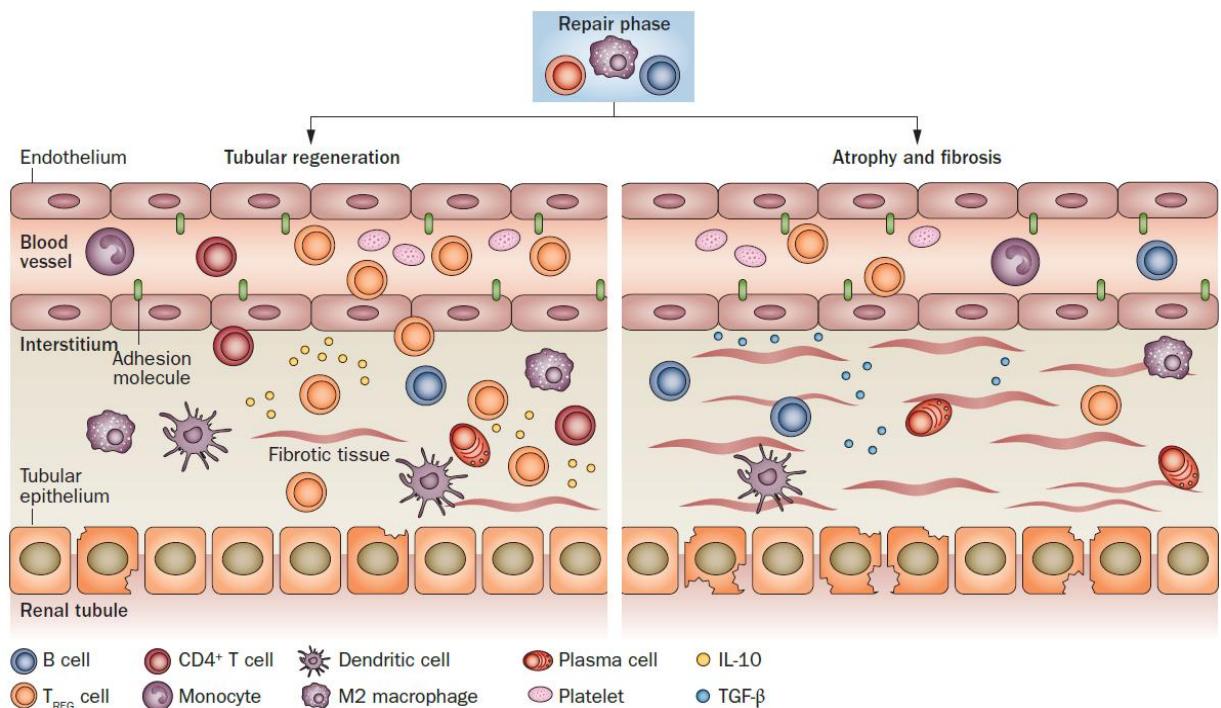


Figure 22 : Schéma représentatif de la modulation de la phase de réparation déterminant l'issu de l'I/R rénale (Jang et Rabb, 2015).

Le mécanisme physiopathologique du modèle étant très semblable à celui décrit pour l'I/R rénale chez l'Homme dans la partie « Les maladies rénales aigües », nous nous concentrerons dans cette partie sur les évènements intracellulaires conduisant à la mort des cellules tubulaires.

Parmi ces évènements intracellulaires, l'altération du cytosquelette d'actine a été décrit (Molitoris, 2004). Ces changements ont lieu très rapidement dans la cellule et sont notamment responsables de la perte de polarité des cellules et de la perturbation de leurs interactions entre elles et avec la MEC, ayant ainsi des répercussions sur la fonction des tubules.

De plus, les cellules épithéliales tubulaires, et principalement celles du tubule proximal, sont très riches en mitochondries permettant ainsi la réabsorption active du sodium et des autres solutés. En réponse à l'hypoxie, la dysfonction mitochondriale conduit à la fois à une forte production de ROS, et à l'élévation du calcium intracellulaire combinée au relargage du cytochrome C dans le cytoplasme via l'ouverture du MPT (Mitochondrial permeability

transition). L'ouverture de ce pore et les effets associés conduisent à l'apoptose des cellules (Fig. 23) (Zamzami et Kroemer, 2001 ; Agarwal et al., 2016).

Enfin, en réponse à l'I/R, des protéines mal repliées s'accumulent dans le RE des cellules épithéliales et endothéliales et déclenche ainsi la réponse UPR (Unfolded protein response). Il s'agit d'un mécanisme adaptatif visant à restaurer l'homéostasie cellulaire via l'activation des voies PERK (Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), ATF6 (Activating transcription factor 6) et IRE1 (Inositol-requiring kinase 1) (Fig. 23) résultant en une inhibition de la synthèse protéique, une surexpression des protéines chaperonnes et une dégradation de l'excès de protéines mal conformées (Zhang et Kaufman, 2008 ; Inagi, 2009 ; Hertz, 2012 ; Senft et Ronai, 2015). Lorsque le stress est intense ou prolongé, l'activation des voies PERK et ATF6 conduit à l'expression d'un facteur de transcription, CHOP (CCAAT/enhancer bonding protein-homologous protein), qui a pour principal rôle de promouvoir l'apoptose cellulaire mais peut aussi être relié à l'inflammation. Les souris invalidées pour le gène CHOP sont d'ailleurs protégée de l'infiltration des cellules inflammatoires et des lésions induites par l'I/R rénale (Endo et al., 2006 ; DeZwaan-McCabe et al., 2013 ; Dong et al., 2014 ; Noh et al., 2015 ; Liu et al., 2016). De plus, plusieurs travaux ont démontré un lien entre le stress du RE et l'inflammation, ainsi qu'entre un stress prolongé et non contrôlé du RE et le développement d'une fibrose rénale (Chiang et al., 2011).

Ainsi, les évènement intracellulaires induits par l'hypoxie et ayant lieu dans les cellules tubulaires proximales et endothéliales conduisent à une dédifférenciation et une mort cellulaire, et à l'activation de voies favorisant l'inflammation.

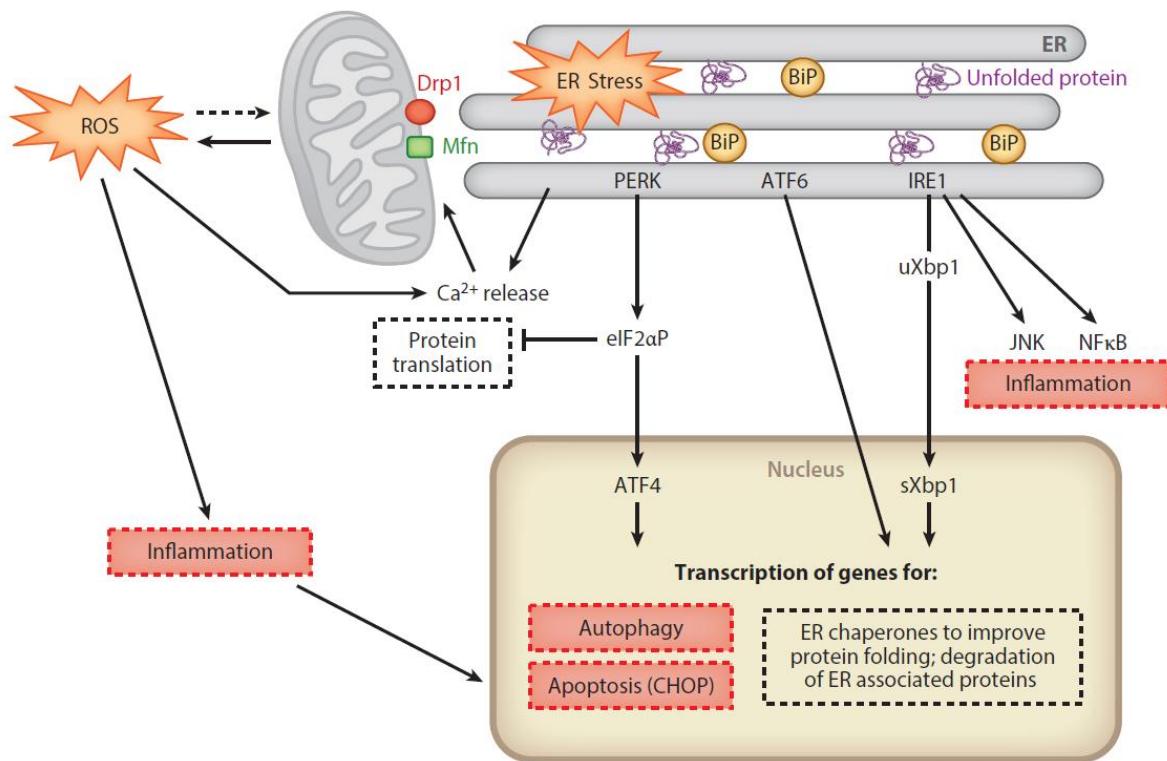


Figure 23 : Représentation schématique des « crosstalk » entre la réponse UPR, la dysfonction mitochondriale, l'autophagie, l'inflammation et la mort cellulaire dans l'I/R (Zuk et Bonventre, 2016).

E. Objectifs de la thèse

Notre équipe a précédemment démontré le rôle délétère de DDR1 dans trois modèles de néphropathies chroniques expérimentales : La néphroangiosclérose hypertensive par perfusion d'Ang II, l'UUO et la glomérulonéphrite induite par injection de SNT. A partir des données de la littérature et plus particulièrement de celles fournies dans les modèles de MRC, plusieurs questions se sont posées, les unes thérapeutiques et les autres mécanistiques.

C'est pourquoi, le premier objectif de cette thèse est la démonstration que l'inhibition pharmaco-génétique de DDR1 a un effet curatif, et non pas seulement préventif, dans deux modèles de MRC touchant différents compartiments rénaux : la glomérulonéphrite induite par injection de SNT et l'UUO. Ce travail représente une preuve de concept indispensable à l'utilisation des antagonistes de DDR1 *in vivo*.

Le deuxième objectif de ce projet est de déterminer si DDR1 est induit et joue un rôle dans un modèle de MRA, l'I/R, comme il a été prouvé dans les modèles de MRC.

Le troisième objectif de cette étude consiste en l'identification de mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression *de novo* de DDR1 qui a fréquemment lieu dans les types cellulaires les plus ciblés dans les différents modèles de néphropathies expérimentales.

Enfin, le quatrième objectif de ce travail est de décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par l'expression pathologique de DDR1 *in vivo* et *in vitro*.

Le premier article, publié dans le journal « *Scientific Reports* », présenté dans cette thèse répond à la première problématique.

Dans le deuxième article, actuellement soumis au « *Journal of Clinical Investigation* », nous répondons aux deuxième et troisième objectifs exposés ci-dessus.

Enfin, pour répondre à la quatrième problématique, nous avons créé des souris triples transgéniques permettant une expression inductible et tissu spécifique de DDR1. La méthodologie et les résultats préliminaires obtenus sont présentés dans le chapitre 4 de cette thèse. De plus, les résultats de ces études ont éveillé l'intérêt de différents groupes pharmaceutiques dont deux avec qui nous avons collaboré. Quelques résultats issus de ces collaborations sont également présentés dans le chapitre 4.

Chapitre 2

Inhibition thérapeutique de DDR1 dans la MRC expérimentale

OPEN

Protective effects of genetic inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 in experimental renal disease

Received: 16 October 2015

Accepted: 20 January 2016

Published: 16 February 2016

Monique Kerroch^{1,2,*}, Carlo Alfieri^{1,3,*}, Aude Dorison^{1,2,*}, Jean-Jacques Boffa^{1,2,4}, Christos Chatziantoniou^{1,2} & Jean-Claude Dussaule^{1,2,5}

Chronic kidney disease is a progressive incurable pathology affecting millions of people. Intensive investigations aim to identify targets for therapy. We have previously demonstrated that abnormal expression of the Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) is a key factor of renal disease by promoting inflammation and fibrosis. The present study investigates whether blocking the expression of DDR1 after the initiation of renal disease can delay or arrest the progression of this pathology. Severe renal disease was induced by either injecting nephrotoxic serum (NTS) or performing unilateral ureteral obstruction in mice, and the expression of DDR1 was inhibited by administering antisense oligodeoxynucleotides either at 4 or 8 days after NTS (corresponding to early or more established phases of disease, respectively), or at day 2 after ligation. DDR1 antisense administration at day 4 stopped the increase of proteinuria and protected animals against the progression of glomerulonephritis, as evidenced by functional, structural and cellular indexes. Antisense administration at day 8 delayed progression –but to a smaller degree– of renal disease. Similar beneficial effects on renal structure and inflammation were observed with the antisense administration of DDR1 after ureteral ligation. Thus, targeting DDR1 can be a promising strategy in the treatment of chronic kidney disease.

Renal fibrosis is the consequence of the accumulation of extracellular matrix in the renal parenchyma. This pathological process affects glomerular filtration rate and may lead to dialysis or kidney transplantation. Regardless of the origin of renal injury, all the compartments are implied in the degradation of renal function, which suggests the involvement of common mechanisms in the progression of renal disease.

Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) is present in a variety of tissues such as brain, lung, kidney, spleen, and placenta, predominantly in epithelial cells. DDR1 are also expressed in the nervous system and in cells of the immune system, but a systematic analysis of the precise cellular distribution of DDR1 in different tissues has not yet been performed. DDR1 specifically bind a number of different native collagen types. This binding leads to phosphorylation of tyrosine kinases located in the intracellular part of the receptor, dimerization and activation of signaling pathways involved to cell migration, adhesion and inflammation such as ERK1/2, p38, PI3K, Src, Stat1/3. Interestingly, DDR1 is the only known member of tyrosine kinase receptor family to be directly activated upon binding to components of the extracellular matrix. DDR1 overexpression and/or activation has been reported in various pathologies such as fibrosis, inflammation, arthritis or cancer^{1,2}. Deletion of the DDR1 gene prevented renal inflammation and fibrosis in three models of renal disease, hypertensive nephroangiosclerosis, unilateral ureteral obstruction (UUO) and nephrotoxic serum (NTS)-induced glomerulonephritis^{3–5}. In the glomerular model of renal disease, we showed that preventive administration of oligodeoxynucleotides (ODNs) to inhibit DDR1 expression protected kidneys with an efficiency close to that of gene deletion.

¹INSERM UMR S 1155, Hôpital Tenon, 75020 Paris, France. ²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France.

³Department of Medicine and Medical Specialties, Unit of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplant, Fondazione Istituto di Ricerca e Cura a Carattere Scientifico Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy. ⁴Service de Néphrologie et Dialyses, Hôpital Tenon, AP-HP, Paris, France. ⁵Department of Physiology, Saint-Antoine Hospital, AP-HP, Paris, France. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.C. (email: christos.chatziantoniou@upmc.fr)

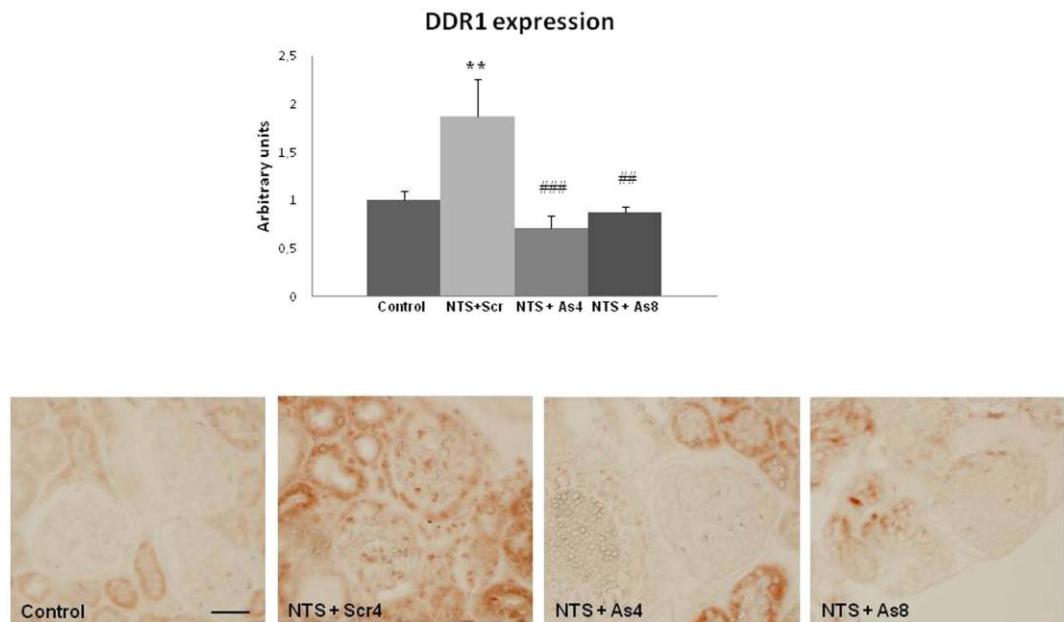


Figure 1. DDR1 antisense administration inhibited the NTS-induced increase of renal expression of DDR1. Upper: DDR1 mRNA expression at day 15 in control and NTS mice receiving DDR1 antisense treatment since 4th (NTS + As4) or 8th (NTS + As8) day. n = 5–10. **p < 0.01 vs Control; ##p < 0.01, and ###p < 0.001 vs NTS + Scr. Lower: Representative examples of DDR1 immunostaining at day 15 in the cortex of mice treated or not with DDR1 antisense from day 4 or 8 (scale bar = 20 μm).

In the previous studies mentioned above, we did not address the question of a therapeutic use of DDR1 inhibition. The aim of the present study was to investigate if in experimental models of renal disease such as the NTS-induced glomerulonephritis and the UUO, the inhibition of DDR1 expression obtained by injecting specific antisense ODNs after the initiation of renal injury would affect the final outcome of renal disease progression, validating thus the concept that DDR1 can be a target for therapy. Our second objective was to evaluate the kinetics of DDR1 involvement in the progression of renal failure in this model by studying the beneficial effects of ODNs administered at an early phase compared to a more advanced stage of the disease.

Results

DDR1 expression is inhibited by DDR1 antisense administration. In agreement with previous studies⁵), DDR1 expression was induced in the renal cortex following NTS administration (Fig. 1, upper). In previous studies we have shown that this *de novo* expression of DDR1 was induced within glomeruli and particularly in podocytes, because it co-localized with nephrin⁵). DDR1 antisense treatment blocked the increase of DDR1 mRNA expression and inhibited the glomerular expression of DDR1 at day 15 (Fig. 1, lower panel).

Inhibition of DDR1 arrested the progression of renal disease. As expected, NTS administration progressively degraded renal function as evidenced by the values of proteinuria, body weight increase and uremia (Fig. 2). Administration of DDR1 antisense at day 4- or 8- stabilized proteinuria, body weight intake and uremia (Fig. 2), thus indicating an arrest of the progression of renal disease. At the end of the treatment (day 15) renal function of animals treated with DDR1 antisense was clearly preserved compared to NTS- or NTS + scrambled treated animals in which renal disease continued to progress (Fig. 2).

Administration of DDR1 antisense protected against the deterioration of renal structure. NTS-induced renal disease was associated with severe histological alterations as 45% of glomeruli at day 15 presented crescent-like formations, tubular dilation increased to 2.5 (in a scale from 0–4), and 15% of glomeruli were sclerotic (Fig. 3). Administration of scrambled ODNs did not have any effect on these parameters renal structure and function. In contrast, administration of antisense ODNs targeting DDR1 at day 4 or 8 stopped the deterioration of the renal structure and resulted in a significant protection of renal tissues at day 15 (Fig. 3). The protection of the antisense treatment started at day 8 was less efficient compared to antisense treatment started at day 4 (Fig. 3).

Fibrosis, evaluated by Sirius Red positive areas (Fig. 4) and collagen 1- α 2 or collagen 3- α 1 mRNA expressions increased 4–8 fold in NTS or NTS + scrambled mice (Fig. 4 middle and lower panels). DDR1 antisense administration at day 4 blocked the fibrotic response (middle and lower panels). When the antisense treatment started at day 8, the anti-fibrotic protection measured by Sirius red staining at day 15 was significant (Fig. 4, middle), but less efficient for collagen 1- α 2 and collagen 3- α 1 mRNA expressions (Fig. 4, lower).

Inhibition of DDR1 stopped the renal inflammatory influx. Inflammatory infiltration was studied by immunostaining of macrophages and dendritic cells with a F4/80 antibody and of T lymphocytes with a CD3 ε

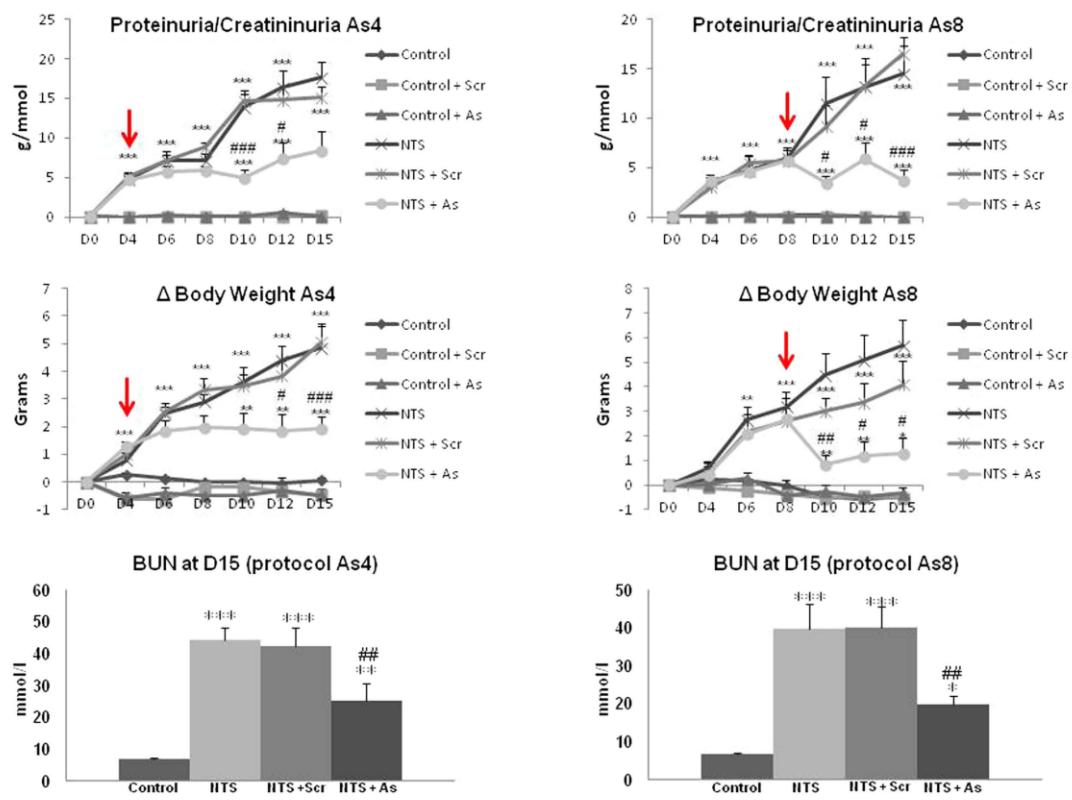


Figure 2. DDR1 antisense treatment stopped increases of proteinuria, body weight and blood urea nitrogen (BUN) that are induced by NTS administration. Red arrows indicate the beginning of ODNs treatment. $n = 5-10$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs Control ; * $p < 0.05$, # $p < 0.01$ and ## $p < 0.001$ vs NTS + Scrambled.

antibody. Again, starting antisense treatment at day 4 provided an almost complete protection against inflammatory influx at the end of the protocol (day 15, Fig. 5B,D,E). Starting antisense treatment at day 8 was less efficient: it provided a relative protection against macrophages at day 15 (Fig. 5E lower left), but had limited effect on lymphocyte infiltration (Fig. 5E lower right).

DDR1 antisense treatment inhibited the synthesis of pro-fibrotic and pro-inflammatory mediators. As shown in Fig 6 (upper left panel) DDR1 antisense administration blocked the NTS-induced increase of TGF β 1 expression. This inhibition affected the profibrotic pathway of TGF β as evidenced by the negligible expression of p-Smad3 in the glomeruli of antisense-treated mice (Fig. 6, upper right panels). To confirm the protection induced by the blockade of DDR1 synthesis against inflammation we measured mRNA expression of several inflammatory mediators. As expected from previous studies, NTS administration increased mRNA expression of TNF α , MCP-1 and IL1- β , (Fig. 6 lower panels). Antisense treatment stopped the induction of TNF α after day 4 as well as its further activation after day 8 (Fig. 6, lower left panel). A similar observation is made with MCP-1 and IL1- β , (Fig. 6, lower panels).

Administration of DDR1 antisense inhibited the UUO-induced increase of renal expression of DDR1. DDR1 expression was strongly induced in the damaged renal cortex following ureteral ligation (Fig. 7, upper panel). As was the case with the NTS model, DDR1 antisense treatment inhibited the tubulointerstitial expression of DDR1 at day 7. The overexpression of DDR1 and the efficiency of antisense treatment was confirmed by WB quantification of DDR1 protein expression (Fig. 7, lower panel).

DDR1 antisense treatment alleviated renal histological damages and inflammation induced by UUO. Tubular dilation, renal fibrogenesis and inflammatory influx are typical major histological events following UUO. Compared to the kidneys receiving scrambled sequences, administration of antisense ODNs targeting DDR1 at day 2 after the ligation resulted in a significant protection of renal cortex as evidenced by the lesser degree of tubular dilation (Fig. 8A), the decreased formation of fibrillar collagens (Fig. 8B) and the reduced infiltration of monocytes/macrophages (Fig. 8C).

Discussion

DDR1 is a tyrosine kinase transmembrane receptor of collagens and is expressed in several cell types and organs^{1,2,6-8}. The interesting feature of DDR1 is that after the binding of collagens, this receptor is dimerized leading to phosphorylation of tyrosine-kinase and depending on the cellular context, can trigger various signaling pathways such as P38 kinase, MAP ER1/2 kinase, PI3 kinase or JNK pathways^{6,7}. Since DDR1 has this

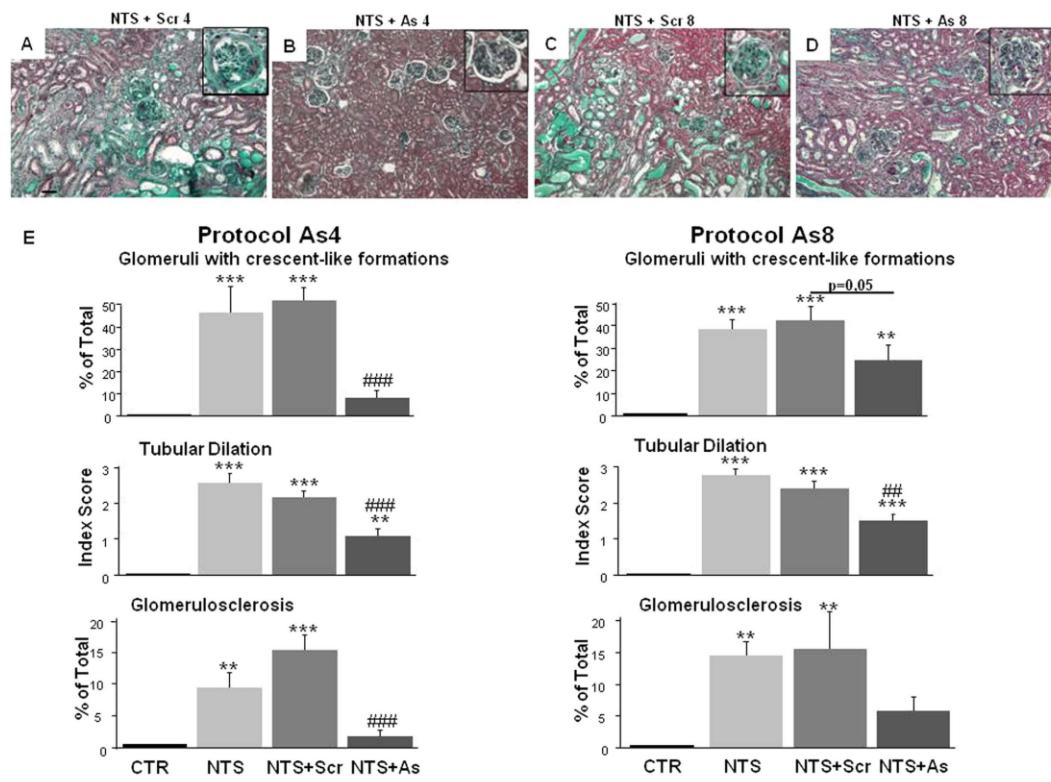


Figure 3. DDR1 antisense treatment alleviated renal histological damages induced by NTS administration. (A–D) Representative views of Masson's trichrome coloration on renal sections at day 15 in NTS + Scr4, NTS + As4, NTS + Scr8 and NTS + As8 mice (scale bar = 50 μ m). (E) Estimation of glomeruli containing crescents (upper), tubular dilation (middle) and glomerulosclerosis (lower panels) at day 15. n = 10–15. **p < 0.01, and ***p < 0.001 vs Control; *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 vs NTS + Scr.

dual function, a collage receptor which can activate inflammatory signaling pathways, we have investigated the involvement of DDR1 activation in mechanisms promoting renal fibrosis and inflammation.

In these previous works, we have demonstrated that mice lacking expression of DDR1 are preserved against the development of renal injuries in several models of kidney disease^{3–5}. Thus, in a model of angiotensin II-induced hypertensive nephropathy, DDR1 null mice were protected against proteinuria, perivascular and periglomerular inflammation, glomerulosclerosis and interstitial fibrosis³. Data from studies in the UUO model indicated that DDR1 promotes renal disease through activation of the inflammatory response since macrophages from DDR1-deleted animals displayed impaired migration in response to MCP1⁴. Other investigators observed that in a model mimicking the Alport's syndrome (COL4A3^{-/-} mice), deletion of DDR1 delays renal fibrosis via inhibition of NF- κ B, IL-6 and TGF- β signaling⁹. Subsequent studies showed that in the NTS model, DDR1 expression is induced and progressively increased in podocytes. DDR1 null mice were protected against renal disease as evidenced by decreased proteinuria, glomerular inflammation and fibrosis, and increased survival⁵. Interestingly, it appears that DDR1 can be expressed and activated in infiltrating or resident cells, depending on the experimental model i.e. in macrophages and tubular epithelial cells in the UUO model⁴, in smooth muscle cells in hypertensive nephropathy³ and in podocytes in glomerulonephritis⁵. In the NTS model, a prevention was also observed in wild type mice treated with specific antisense ODNs blocking the expression of DDR1⁵. Use of a general knockout mice or administration of antisense before the induction of the disease are preventive approaches because the expression of DDR1 is either null or inhibited before the beginning of the disease. In pathologies like renal disease preventive treatments are not applicable, and although several experimental studies have shown that shutting down the expression of a gene before the initiation of the disease can prevent the decline of renal function, only in a few cases blockade of this gene after the initiation of the disease was efficient in protecting the kidney. For this reason, in the present study a major objective was to investigate the effects of the pharmaco-genetic inhibition of DDR1 as a therapy approach after the beginning of the disease. Such an approach has been successfully realized in the past, for instance with the delayed blockade of bradykinin receptors¹⁰, the inhibition of growth factors¹¹ or the activation of IL-10¹².

In the NTS protocol, the DDR1 antisense administration started either at day 4, or later at day 8. Classically investigators are considering days 2–4 as an 'early' phase of glomerulonephritis, and days 7–9 as more advanced phases. Based on our experience and previous studies, proteinuria and body weight intake are significantly increased at day 4 with no severe alterations of renal structure, whereas at day 8, in addition to proteinuria and body weight intake, several parameters of renal structure are altered such as appearance of tubular dilation and crescent-like formations. Thus, although the differences in renal function can appear minimal between day 4 and

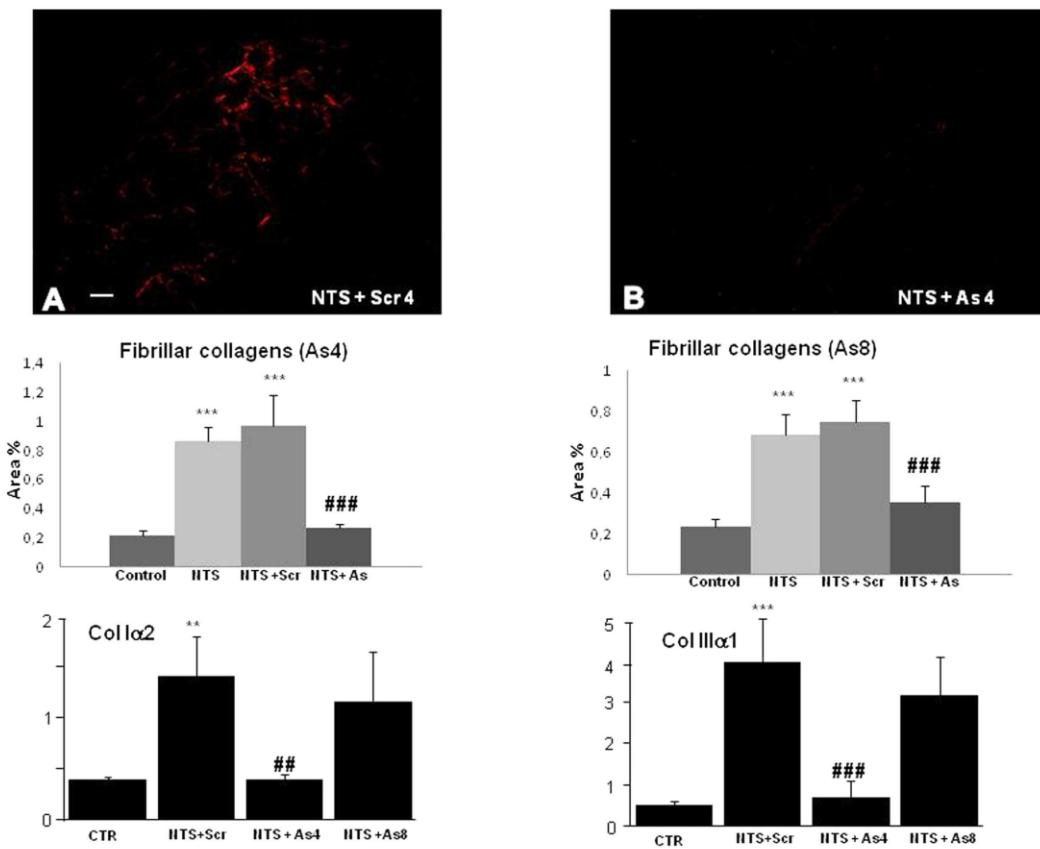


Figure 4. Accumulation of fibrillar interstitial collagen induced by NTS was arrested in mice treated with DDR1 antisense. Upper: Representative views (scale bar = 50 μ m) of Sirius Red coloration on renal sections at day 15 in NTS + Scr4 (A) and NTS + As4 (B) mice showing accumulation of interstitial fibrillar collagen. Middle: Quantification of fibrillar collagen at day 15 in As4 and As8 protocols. n = 10–15. ***p < 0.001 vs Control; ###p < 0.001 vs NTS + Scrambled. Lower: mRNA expressions of collagen I α 2 and collagen III α 1 in mice treated either with As or with Scr from day 4 or 8 and sacrificed at day 15. n = 4–10; **p < 0.01, and ***p < 0.001 vs Control; ##p < 0.01, and ###p < 0.001 vs NTS + Scr.

day 8, still important differences exist between these time points regarding the histological alterations. In both timings of treatment, DDR1 antisense administration stopped the progression of renal disease and the indexes of renal function did not decline furthermore. As result, at the end of the protocol at day 15, the groups of animals receiving antisense treatment were protected compared to those receiving NTS either alone or combined with scrambled ODNS in all measured functional or histological parameters. However, the antisense treatment was not able to induce a complete regression to all renal lesions. Proteinuria, uremia and renal histology were not normalized even when the treatment was started at day 4. This finding indicates that DDR1 most likely behaves as an essential amplifier of the fibrotic and inflammatory injury, but not as an initiator of these pathological processes¹³.

Urteral obstruction is characterized by an immediate arrest of filtration followed by inflammatory response and activation of fibrogenesis. Based on our previous experience, the DDR1 antisense treatment started at day 2 corresponding to an early phase in which tubular dilation, inflammatory influx and abnormal deposition of extracellular matrix are clearly observed¹⁴. As was the case with the NTS model, antisense treatment efficiently decreased DDR1 expression and protected kidneys from the UUO-induced alterations of renal structure and inflammation.

We identified several actors of the inflammatory process to be associated with DDR1 expression such as MCP-1, IL1 β , and TNF α ^{15–20}. As was the case with mice lacking DDR1 gene expression^{3–5}, we observed that antisense treatment was associated with decreased inflammatory influx. This interaction between DDR1 expression and inflammation could be due either to an activation of DDR1 in inflammatory circulating cells and/or to the local tissue expression of DDR1 inducing cytokines and driving inflammation. In an *in vitro* setting, DDR1 was an important mediator in the migration of T cells through collagen^{21,22}. However, the observed staining of DDR1 in the kidney following NTS administration or urteral obstruction does not appear to be in T lymphocytes (Figs 1 and 7). Similarly, we did not observe DDR1 expression on T-lymphocytes in our previous studies with the other models of renal injury^{3–5}. In addition, the data in Fig. 6 show that DDR1 activation was accompanied by increased expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF α , MCP-1 and IL1 β . The observation that the antisense-induced decrease of DDR1 expression reduced the expression of these cytokines suggest a link between

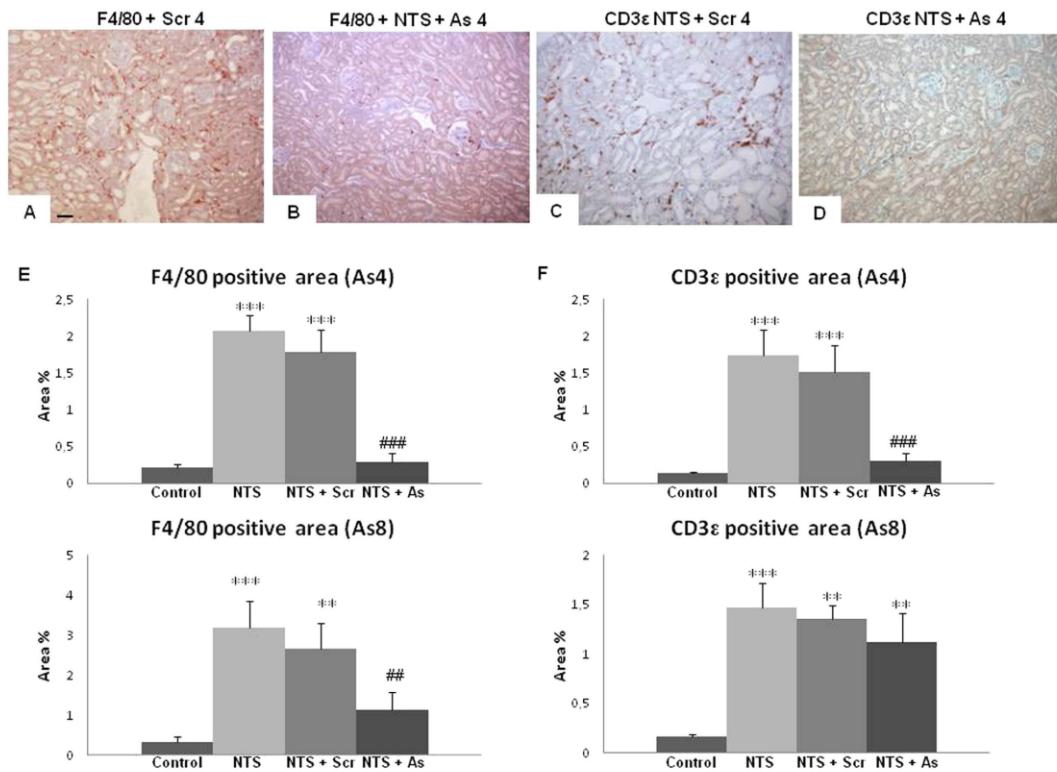


Figure 5. Infiltration of inflammatory cells was reduced in mice treated with DDR1 antisense.

Representative examples of F4/80 (A,B) and CD3ε (C,D) immunostaining on renal sections in NTS + Scr4 and NTS + As4 mice showing the presence of macrophages and T-lymphocytes in renal parenchyma (scale bar = 50 μ m). (E) Evaluation of the percentage of positive area for F4/80 (left) and CD3ε (right) staining at day 15 in As4 and As8 protocols. n = 10–15. **p < 0.01, and ***p < 0.001 vs Control; #p < 0.01, and ##p < 0.001 vs NTS + Scrambled.

DDR1 and these signaling pathways. A similar result was previously observed where *in vitro* transfection of podocytes with DDR1 was accompanied by the induction of pro-inflammatory cytokine IL1- β ⁵. It appears thus that in response to an aggression, renal cells start expressing DDR1 which is activated by collagens to induce production of cytokines and amplify the detrimental interaction between renal inflammation-and fibrosis^{23,24}. Decreasing DDR1 expression interrupts this deleterious loop and preserves tissue from further inflammation.

Overexpression of TGF- β 1 and of fibrillar collagens were indexes of the development of renal fibrosis²⁵ in parallel with the remaining inflammation at the time of sacrifice. Although a direct link between DDR1 activation and TGF- β 1 production has not been demonstrated *in vitro*, several *in vivo* studies have observed that genetic deletion of expression of DDR1 is accompanied by downregulation of TGF- β and CTGF in various models of renal disease^{2–5,26,27}. In the present study, antisense ODNs administration was accompanied by an inhibition of the expression of TGF- β 1 and the subsequent activation of Smad3, even when the treatment by antisense was delayed (Fig. 6). The lack of a direct TGF β response to DDR1 activation in cultured cells *in vitro* can be due to the fact that *in vitro* systems lack the complexity of *in vivo* integrated organs and cell systems. It is also possible that the activation of TGF β -Smad3 signaling observed *in vivo* is subsequent to the DDR1-mediated inflammatory response. This interaction between DDR1 and TGF β 1-Smad3 signaling can explain, at least partly, the decreased progression of renal fibrosis after the inhibition of DDR1 expression in the antisense groups.

In conclusion, DDR1 appears as an interesting target for therapy of renal disease. Here, we have shown that in severe models of renal disease, pharmaco-genetic inhibition of DDR1 expression by antisense administration can arrest the progression of nephropathy, providing thus for the first time a proof of concept of a treatment based on DDR1 blockade. The development of agents specifically antagonizing the effects of DDR1, such as blocking antibodies and/or DDR1-tyrosine kinase inhibitors^{28,29}, will offer the possibility to test in experimental models and subsequently in human studies the safety and the efficiency of this approach.

Methods

Animal treatment and protocols. All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to water and pellet food. Animal procedures and protocols were in accordance with the European Guidelines for the Care and use of Laboratory Animals and have been approved by the Inserm and UPMC ethical committees.

NTS protocol. Glomerulonephritis was induced by retro-orbital injection of decomplemented nephrotoxic serum (NTS) prepared as previously described⁴. A total of 90 female mice 129/SV aged 3–6 months and weighting

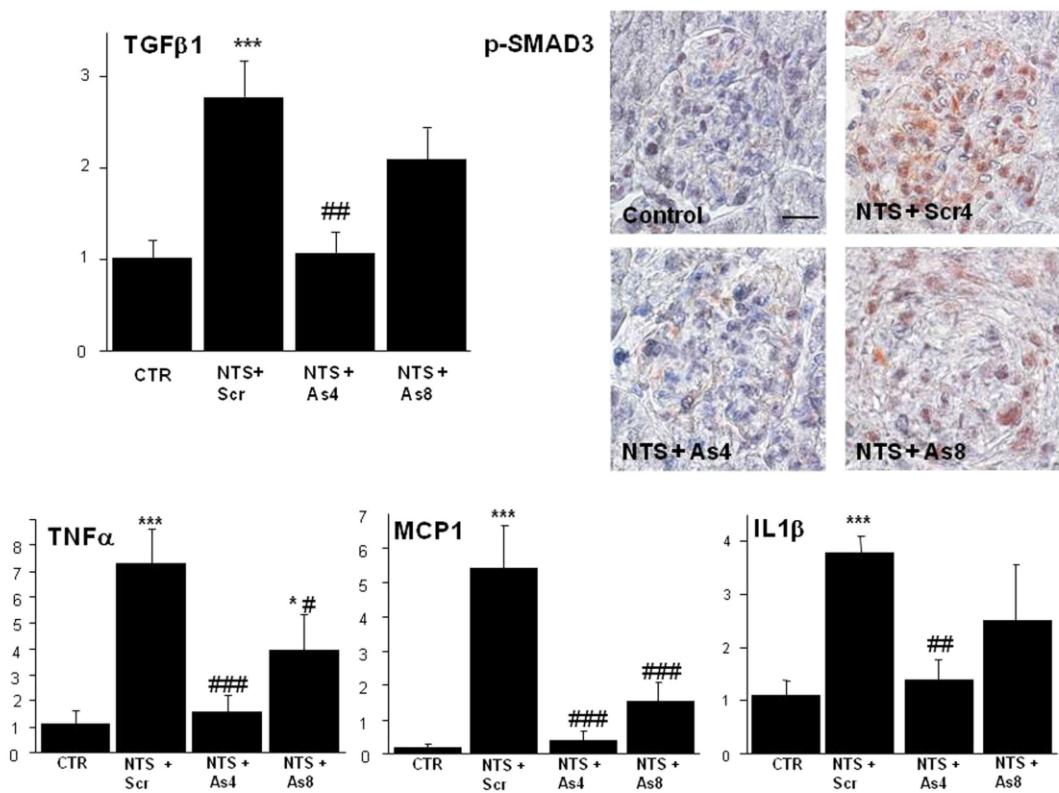


Figure 6. Treatment with DDR1 antisense inhibited the synthesis of pro-fibrotic and pro-inflammatory mediators. Upper left: Expression of TGF β in mice treated either with As or with Scr from day 4 or 8 and sacrificed at day 15. n = 4–10; ***p < 0.001 vs Control; ##p < 0.01 vs NTS + Scrambled. Upper right: Representative examples of p-Smad3 staining at day 15 in the cortex of mice treated or not with DDR1 antisense from day 4 or 8 (scale bar = 10 μ m). Lower panels: Expressions of TNF α , MCP-1 and IL1 β in mice treated with As or Scr from day 4 or 8 and sacrificed at day 15. n = 4–10; *p < 0.05, and ***p < 0.001 vs Control; #p < 0.05, ##p < 0.01 and ###p < 0.001 vs NTS + Scrambled.

18–25 g were used (Janvier, Le Genest-St-Isle, France). NTS was injected in 60 mice (23 μ l/gBW/day) during three consecutive days. After NTS injections, mice were divided into six groups of 10 mice each. Two groups consisted of mice receiving antisense ODNs directed against DDR1 treatment started 4 or 8 days after NTS (respectively groups As4 and As8). Two groups received scrambled sequences at day 4 or 8 after NTS (groups Scr4 and Scr8) and two received physiological serum at day 4 or 8 (PS4 and PS8).

The remaining 30 mice were divided to 6 groups of 5 animals each receiving antisense or scrambled ODNS or physiological serum (NaCl 0.9%) either at day 4 or at day 8, but without NTS. Since no difference was observed in the values of different parameters of these groups, they were pooled and are presented as one control group in results.

UUO protocol. Surgery was performed under general anesthesia (intraperitoneal injection of ketamin 100 mg/kg/Xylazin 20 mg/kg) on 20 129/Sv mice aged 3 month-old (Janvier, Le Genest-St-Isle, France). The left ureter was ligated at two separate points through a left flank incision as previously described⁴. Non-obstructed sham kidneys were used as controls. After the surgery, mice were divided into four groups. Two groups received antisense ODNs directed against DDR1 (UUO + As n = 12, Sham As n = 2), and two other groups received non-specific scrambled ODNs (UUO + Scr n = 8, Sham Scr n = 2). Since Sham As did not differ from Sham Scr, the data of these two groups were pooled. Antisense injections started at day 2 post surgery. All animals were sacrificed at day 7.

A cocktail of 3 specific antisense ODNs was designed as previously described⁴ (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) to block DDR1 expression. Scrambled sequences consisted on same nucleotide composition, but in a random sequence. The sequences used were as follows:

mDDR1 AS 1 Flc: C*A*C*TCCCAAGCCATCCA*C*C*T Flc
 mDDR1 AS 6 Flc: C*T*A*TTGCTCCCTCTGTT*C*C*C Flc
 mDDR1 AS 8 Flc: G*T*C*CTTCCAGTCCATCC*A*G*C Flc
 mDDR1 SCR 1 Flc: A*C*C*CACACACCGACTCC*T*T*C Flc
 mDDR1 SCR 6 Flc: C*G*T*CCTCTTACTCGTCC*T*T*C Flc
 mDDR1 SCR 8 Flc: C*G*T*CCTCTTACTCGTCC*T*T*C Flc

Antisense and scrambled ODNs were diluted in physiological serum and injected intra peritonealy every 48 h (100 pmol/ODN/injection).

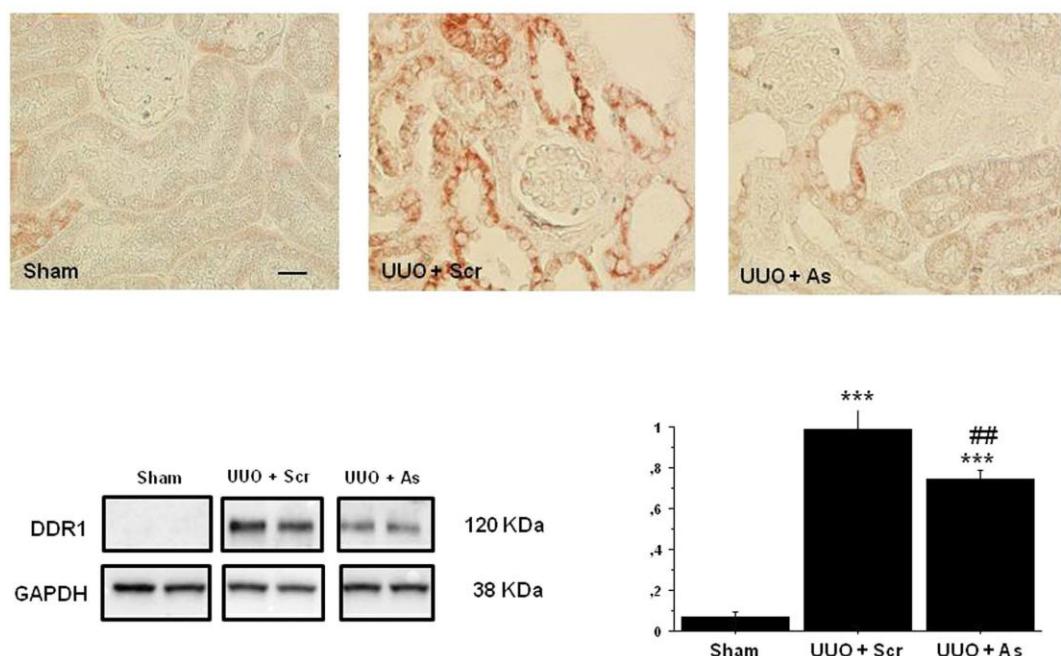


Figure 7. DDR1 antisense administration inhibited the UUO-induced increase of renal expression of DDR1. Upper: Representative examples of DDR1 immunostaining at day 7 in the cortex of mice treated or not with DDR1 antisense from day 2 (scale bar = 20 μ m). Lower left: Representative examples of Western blotting of DDR1 expression at day 7 in sham and UUO mice receiving DDR1 scrambled or antisense treatment since day 2. All gels have been run under the same experimental conditions. Lower right: Quantification of protein expression, $n = 4-12$. *** $p < 0.001$ vs Control; ## $p < 0.01$ vs UUO + Scrambled.

Proteinuria and BUN. All mice were acclimated in metabolic cages with free access to food and tap water for 24-hour urine collection. Proteinuria, expressed as protein g/mmol of creatininuria, was assessed every 48 h using the Pyrogallol Red method and utilizing a KONELAB automate (Thermo Scientific, Waltman, MA). BUN were assessed in blood plasma obtained on the day of sacrifice. BUN was measured using an enzymatic spectrophotometric method and was expressed as mmol/L.

Masson's trichrome staining. Kidneys were fixed in alcohol-formalin-acetic acid, embedded in paraffin, cut into 4- μ m sections, and stained with Masson's trichrome solution. At least twenty photos (ten at $\times 10$ magnification and ten at $\times 20$ magnification) were taken for each mouse, taking care to have a representative view of the total parenchyma. Crescent formation was defined as glomeruli exhibiting two or more layers of cells in Bowman's space, with or without podocyte injury. The proportion affected of glomeruli was determined by examining photos with $\times 20$ magnification, evaluating a minimum of 50 glomeruli per mouse, and a score based on the percentage of glomeruli presenting crescents was calculated for each mouse. Tubular dilation was evaluated in a scale score form 0–4, and glomerulosclerosis as percentage of sclerotic glomeruli. Crescent-like lesions were defined as glomeruli containing one or two layers of cells in Bowman's space and/or have filled the Bowman's space by extra-capillary cells. Histological analysis was performed by two investigators independently.

Sirius red morphometric analysis. Interstitial fibrosis was analyzed on 5 μ m-thick Sirius red-stained paraffin sections at 40 \times magnification, under polarized light. Interstitial fibrosis was quantified using computer-based morphometric analysis software (Axioplan, Axiophot2, Zeiss, Germany). Measurements were independently performed in a blinded manner on coded slides by two renal pathologists. Data were expressed as the mean value of the percentage of positive area examined.

Immunohistochemistry and immunofluorescence. Immunohistochemistry was performed on 4 μ m thick paraffin embedded sections. Antigens were unmasked with citrate buffer (pH = 6) and sections were treated with peroxidase blocking (Maxvision Bioscience INC) followed by BSA 2%. Samples were stained with primary antibodies: rat anti-F4/80 (AbD Serotec, Paris, France), rabbit anti-CD3 ε (DakoFrance, Trappes, France), rabbit anti-DDR1 (Cell signaling, Yvelines, France) and rabbit anti-p-SMAD3 (Abcam, Paris, France) all diluted 1:200 in overnight at 4 °C. AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Dako) was used as substrate. Tissues were then stained with hematoxylin QS (Vector, Burlingame, CA) and mounted. Staining of F4/80 and CD3 ε cells was quantified using computer-based morphometric analysis software (Axioplan, Axiophot2, Zeiss, Germany). Measurements were independently performed in a blinded manner on coded slides. Data were expressed as the mean value of the percentage of positive area examined. Immunofluorescence was performed on 4 μ m thick paraffin sections. Rabbit anti-DDR1 (Cell Signaling, Yvelines, France – diluted 1:200 in overnight at 4 °C) and rabbit anti-CD3 ε (DakoFrance, Trappes, France, diluted 1:200 in overnight at 4 °C) antibodies were used as primary. Both

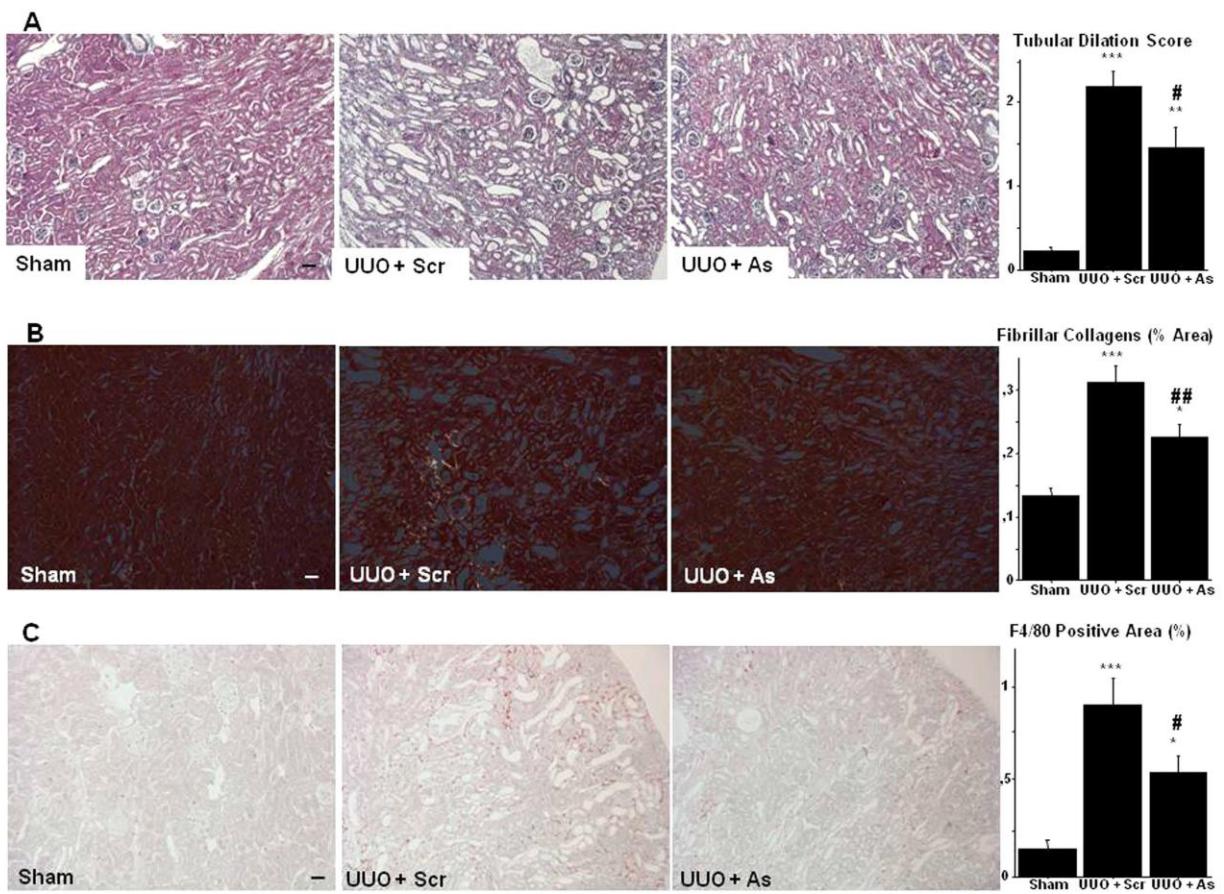


Figure 8. DDR1 antisense treatment alleviated renal histological damages and inflammation induced by UUO. (A) Representative views of Masson's trichrome coloration on renal sections at day 7 in Sham, UUO + Scr and UUO + As mice (scale bar = 50 μ m). **Right:** Estimation of tubular dilation at day 7. n = 4–12. **p < 0.01, and ***p < 0.001 vs Control; #p < 0.05, vs UUO + Scr. (B) Representative views of Sirius Red coloration on renal sections at day 7 in Sham, UUO + Scr and UUO + As mice showing accumulation of interstitial fibrillar collagen (scale bar = 50 μ m). **Right:** Quantification of fibrillar collagen. n = 4–12. *p < 0.05 and ***p < 0.001 vs Control; ##p < 0.01 vs UUO + Scr. (C) Representative examples of F4/80 immunostaining on renal sections in Sham, UUO + Scr and UUO + As mice showing the presence of macrophages in renal interstitium (scale bar = 50 μ m). **Right:** Evaluation of the percentage of positive area for F4/80 staining. n = 4–12. *p < 0.05, and ***p < 0.001 vs Control; #p < 0.05 vs UUO + Scr.

secondary antibodies were diluted 1:1000 (Invitrogen Alexa, Saint Aubin, France) and incubated for 1h at room temperature. Images were taken in the same area in the two serial sections.

Western Blot. Proteins were extracted from total kidney using RIPA lysis buffer supplemented with sodium orthovanadate, PMSF, a protease inhibitor cocktail (Tebu bio, Le Perray en Yvelines, France) and sodium fluorure 10mM. Concentrations were determined using the Bradford assay and 25 μ g of protein were run on NuPAGE 4/12% electrophoresis gels (Invitrogen), then transferred on a PVDF membrane (Immobilon-p, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). Immunoblotting was performed using rabbit specific primary antibodies anti-DDR1 (Cell signaling, Yvelines, France, diluted 1:1000 in overnight at 4 °C) and anti-GAPDH (Sigma-aldrich, Lyon, France diluted 1:50000 in overnight at 4 °C) for loading control. Then, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-linked donkey secondary antibody (GE Healthcare Life Sciences, Saclay, France). The revelation was performed with ECL plus kit (GE Healthcare). Densitometric analysis on Image J was then performed for quantification.

qRT-PCR on renal tissue. RNA was extracted from renal tissue at the sacrifice using TRI Reagent (Euromedex, Mundolsheim, France). After digestion with DNase I, RNA was reverse transcribed with the Maxima RT Kit (Fermentas). The cDNA obtained was then amplified by PCR in a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) with SYBR Green (Fast Start DNA Master SYBR Green I; Roche Diagnostics) and specific primers for target mRNAs designed using the Universal Probe Library Roche website under the following conditions: 95 °C for 5 min, 45 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s. PCR was also carried out for β -actin or Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), as housekeeping genes. Results are expressed as $2^{-\Delta Ct}$, where Ct is the cycle threshold number normalized to the mean for each corresponding

control group. Dissociation curves were analyzed after each run for each amplicon in order to determine the specificity of quantification when using SYBR Green. The sequences (sense and antisense) of the primers used were the following:

β-actin: 5'-AAGAGCTATGAGCTGCCTGA-3' and 5'-ACGGATGTCAACGTACACT-3'
 HPRT: 5'-GGAGCGGTAGCACCTCCT-3' and 5'-CTGGTTCATCATCGCTAAC-3'
 DDR1: 5'-CTCCACCCATTCTGCAC-3' and 5'-CAGAAGGAGGCGGTAGGC-3'
 TGF-β1: 5'-TGGAGCAACATGTGGAAC-3' and 5'-GTCAGCAGCCGGTTACCA-3'
 IL-1β: 5'-TGTAAATGAAAGACGGCACACC-3' and 5'-TCTTCTTGTTGGTATTGCTGG-3'
 MCP-1: 5'-CATCCACGTGTTGGCTCA-3' and 5'-GATCATCTGCTGGTGAATGAGT-3'
 Coll1α2: 5'-GCAGGTTCACCTACTCTGCCT-3' and 5'-CTGCCCCATTATGCTCT-3'
 Coll3α1: 5'-TCCCCTGGAATCTGTGAATC-3' and 5'-TGAGTCGAATTGGGGAGAAT-3'
 TNF-α: 5'-TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG-3' and 5'-ATGAGAGGGAGGCCATTG-3'.

Statistical Analysis. Statistics were realized using the program Logiciel Statview (SAS Institute). Results were expressed as mean ± standard error (SE), and were considered as significant for $p < 0.05$. For the comparison between groups, ANOVA, Fisher test and Wilcoxon-Mann-Whitney test were used when necessary.

References

1. Curat, C. A. & Vogel, W. F. Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **13**, 2648–2656 (2002).
2. Leitinger, B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int Rev Cell Mol Biol* **310**, 39–87 (2014).
3. Flamant, M. *et al.* Discoidin domain receptor 1 null mice are protected against hypertension-induced renal disease. *J Am Soc Nephrol* **17**, 3374–3381 (2006).
4. Guerrot, D. *et al.* Domain Receptor 1 Is a Major Mediator of Inflammation and Fibrosis in Obstructive Nephropathy. *Am J Pathol* **179**, 83–91 (2011).
5. Kerroch, M. *et al.* Genetic inhibition of discoidin domain receptor 1 protects mice against crescentic glomerulonephritis. *Faseb J* **26**, 4079–4091 (2012).
6. Vogel, W., Gish, G. D., Alves, F. & Pawson, T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* **1**, 13–23 (1997).
7. Hou, G., Vogel, W. F. & Bendeck, M. P. Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression. *Circ Res* **90**, 1147–1149 (2002).
8. Agarwal, G., Mihai, C. & Iscru, D. F. Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1. *J Mol Biol* **367**, 443–455 (2007).
9. Gross, O. *et al.* Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease. *Matrix Biol* **29**, 346–356 (2010).
10. Klein, J. *et al.* Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *Faseb J* **23**, 134–142 (2009).
11. Shin, G. T., Kim, S. J., Ma, K. A., Kim, S. H. & Kim, D. ACE inhibitors attenuate expression of renal transforming growth factor-beta1 in humans. *Am J Kidney Dis* **36**, 894–902 (2000).
12. El-Shemi, A. G. *et al.* Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by interleukin-10 gene transfer. *Kidney Int* **65**, 1280–1289 (2004).
13. Ronco, P. & Chatziantoniou, C. Matrix-Metalloproteinases and Matrix Receptors in Progression and Reversal of Kidney Disease: Therapeutic Perspectives. *Kidney Int* **74**, 873–878 (2008).
14. Mael-Ainin, M., Abed, A., Conway, S., Dussaule, J. C. & Chatziantoniou, C. Inhibition of Periostin expression protects against the development of renal inflammation and fibrosis. *J Am Soc Nephrol* **25**, 1724–1736 (2014).
15. Franco, C. *et al.* Discoidin Domain Receptor 1 Deletion Decreases Atherosclerosis by Accelerating Cell Matrix Accumulation and Reducing Inflammation in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circ Res* **102**, 1202–1211 (2008).
16. Mesnard, L. *et al.* Invariant natural killer T cells and TGF-beta attenuate anti-GBM glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1282–1292 (2009).
17. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Leukoc Biol* **75**, 163–189 (2004).
18. Lloyd, C. M. *et al.* RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* **185**, 1371–1380 (1997).
19. Timoshanko, J. R., Kitching, A. R., Iwakura, Y., Holdsworth, S. R. & Tipping, P. G. Leukocyte derived interleukin-1beta interacts with renal interleukin-1 receptor 1 to promote renal tumor necrosis factor and glomerular injury in murine crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* **164**, 1967–1977 (2004).
20. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* **214**, 149–160 (2008).
21. Chetoui, N., El Azreq, M. A., Boisvert, M. E. & Aoudjiti, F. Discoidin domain receptor 1 expression in activated T cells is regulated by the ERK MAP kinase signaling pathway. *J Cell Biochem* **112**, 3666–3674 (2011).
22. Hachehouche, L. N., Chetoui, N. & Aoudjiti, F. Implication of discoidin domain receptor 1 in T cell migration in three-dimensional collagen. *Mol Immunol* **47**, 1866–1869 (2010).
23. Seo, M. C. *et al.* Discoidin domain receptor 1 mediates collagen-induced inflammatory activation of microglia in culture. *J Neurosci Res* **86**, 1087–1095 (2008).
24. Matsuyama, W., Wang, L., Farrar, W. L., Faure, M. & Yoshimura, T. Activation of discoidin domain receptor 1 isoform b with collagen up-regulates chemokine production in human macrophages: role of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-κappa B. *J Immunol* **172**, 2332–2340 (2004).
25. Shweke, N. *et al.* Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. *Am J Pathol* **173**, 631–642 (2008).
26. Girgert, R. *et al.* Integrin α2-deficient mice provide insights into specific functions of collagen receptors in the kidney. *Fibrogenesis Tissue Repair* **3**, 19, doi: 10.1186/1755-1536-3-19 (2010).
27. Rubel, D. *et al.* Collagen receptors integrin α2β1 and discoidin domain receptor 1 regulate maturation of the glomerular basement membrane and loss of integrin α2β1 delays kidney fibrosis in COL4A3 knockout mice. *Matrix Biol* **34**, 13–21 (2014).
28. Gao, M. *et al.* Discovery and Optimization of 3-(2-(Pyrazolo[1,5-A]pyrimidin-6-Yl)ethynyl)benzamides as Novel Selective and Orally Bioavailable Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Inhibitors. *J Med Chem* **56**, 3281–3295 (2013).
29. Kim, H. G., Tan, L. & Weiberg *et al.* Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor. *ACS Chem Biol* **8**, 2145–2150 (2013).

Acknowledgements

We thank Chantal Jouanneau for technical advice. M.K., C.A. and A.D. were recipients of fellowships from the French Society of Nephrology, the Faculty of Medicine of Milano University, and the Doctoral School 'Physiology and Physiopathology' of University Pierre et Marie Curie, respectively.

Author Contributions

M.K., C.A. and A.D. carried out experiments, collected data and analyzed some of the data. J.J.B. interpreted data, J.C.D. and C.C. designed the study, interpreted data and wrote the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Kerroch, M. *et al.* Protective effects of genetic inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 in experimental renal disease. *Sci. Rep.* **6**, 21262; doi: 10.1038/srep21262 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Chapitre 3

Rôle de DDR1 dans la MRA expérimentale, Ischémie-Reperfusion rénale

DDR1 Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Drives Ischemia/Reperfusion Renal Injury

Aude Dorison_{1,2}, Christos E. Chadjichristos₁, Sandrine Placier₁, Aurélien Bataille_{1,2}, Emmanuel Letavernier_{1,2}, Yi-chun Dubois_{1,2}, Eric Rondeau_{1,2,3}, Christos Chatziantoniou_{1,2}, Jean-Claude Dussaule_{1,2,4}

Affiliations:

- (1) INSERM UMR S 1155, Tenon Hospital, 75020 Paris, France
- (2) Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France
- (3) Department of Nephrology, Tenon Hospital, AP-HP, Paris, France
- (4) Department of Physiology, Saint-Antoine Hospital, AP-HP, Paris, France

Corresponding author:

Dr. Christos Chatziantoniou, PhD

Address: INSERM UMR S 1155, Hôpital Tenon, 75020 Paris, France

Tel: +33 1 56 01 66 53

Fax: +33 1 56 01 66 59

Email: christos.chatziantoniou@upmc.fr

Conflict of interest statement:

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Article soumis pour publication dans "Journal of Clinical Investigation"

Abstract

Ischemia-Reperfusion (I/R) leads to long-term complications of kidney function. Herein, we examined whether the Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) is involved in renal I/R injury, we investigated the molecular mechanism(s) leading to abnormal expression of DDR1 and we evaluated if pharmaco-genetic inhibition of DDR1 protects kidneys.

I/R induced a rapid eight-fold overexpression of DDR1 in proximal tubules, that was accompanied by renal dysfunction, tubular damage and inflammatory influx. Inhibition of DDR1 expression blunted the increase of these parameters and protected kidneys from the I/R-induced injuries. Freshly isolated proximal epithelial tubular cells (PETCs) from DDR1 heterozygous mice did not acquire the pro-inflammatory phenotype displayed by PETCs from WT mice. Hypoxia increased DDR1 expression through endoplasmic reticulum (ER) stress, as well as transfection with the ER stress-induced transcription factor CHOP. Deficient mice for CHOP displayed lower DDR1 expression and were protected against I/R. Finally, biopsies of transplant patients with prolonged ischemia during transplantation had a similar expression profile of DDR1 as in experimental I/R.

Our data suggest that DDR1 is induced in PETCs during I/R through an ER stress-CHOP mediated mechanism to promote cell phenotype alterations towards inflammation and fibrosis. DDR1 can be a novel target against the complications of renal I/R.

Introduction

Ischemia-Reperfusion (I/R) is one of the main causes of Acute Kidney Injury (AKI) that leads to short and long-term complications including delayed graft function, Chronic Kidney Disease (CKD), end-stage renal disease and dialysis. AKI progressing to CKD represents a major socioeconomic burden which requires the development of new therapeutic strategies (1).

Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) is a non-integrin collagen receptor that displays tyrosine-kinase activity. It is expressed by a wide variety of tissues including brain, lung, liver, mammary gland, and kidney (2). There are 5 different isoforms of DDR1 derived from alternative splicing, isoforms a and b being the most abundant (3). DDR1 activity is well described during development, but is "silenced" during adulthood under physiological conditions (4). In contrast, DDR1 over- or *de novo* expression have been described in a variety of inflammatory pathologies, fibrogenesis and cancers (4). The upstream signals regulating DDR1 expression under pathological conditions remain poorly understood.

Mice lacking DDR1 expression were protected against renal inflammation and fibrosis in three different experimental models of CKD: Angiotensin II-induced hypertensive nephropathy, Unilateral Ureteral Obstruction (UUO) and Nephrotoxic serum (NTS)-induced nephropathy (5, 6, 7). More recently, we have shown the curative efficiency of pharmacogenetic inhibition of DDR1 in the UUO and NTS models of renal injury by administering antisense oligodeoxinucleotides (ODNs) directed against DDR1 after the onset of the disease (8).

Although the role of DDR1 as a pro-inflammatory and pro-fibrotic mediator is well described in CKD models, little is known about its involvement in AKI. The aim of the present study was to investigate whether DDR1 mediates I/R injury, to characterize the mechanism(s)

leading to DDR1 *de novo* expression during I/R, and to evaluate if antisense ODNs administration protects renal function and structure in AKI.

Results

DDR1 is highly induced in proximal epithelial tubular cells after I/R kidney injury.

DDR1 protein expression was markedly increased after 6 hours of reperfusion, reached its maximum after 24h and was maintained after 48h (Figure 1A-B). Under normal conditions DDR1 is not expressed in renal proximal tubular epithelial cells (PETCs) (Figure 1C-E). In contrast, a marked staining of DDR1 was observed in brush border-presenting cells after 24h of reperfusion. Co-staining with megalin, a specific marker of proximal tubular cells, demonstrated that this *de novo* expression of DDR1 occurred mainly in PETCs (Figure 1F-H). This DDR1 overexpression was suppressed by the administration of specific AS ODNs, as shown in western blotting (Figure 2A-B) and immunohistochemical (Figure 2C-E) experiments.

DDR1 inhibition preserved renal function and structure, and decreased inflammation 24h after reperfusion.

In order to test if the above-described overexpression of DDR1 is involved in the mechanisms of renal injury following I/R, several parameters were analyzed. As expected, mice subjected to I/R and treated with scrambled sequences displayed a markedly increased uremia, reflecting highly impaired renal function (Figure 3A). This increase was accompanied by important tubular lesions such as tubular vacuolisation, necrosis, and cast formation (Figure 3B-E). In contrast, the I/R-induced increase of BUN was lowered and the renal structure was preserved when mice were treated with DDR1 AS (Figure 3A-E). SCR N+IR24h mice exhibited high mRNA and protein expressions of Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) (Figure 4A-C) associated with increased mRNA expressions of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Vimentin, whereas E-cadherin protein expression was decreased. AS

treatment resulted in significantly decreased expressions of these tubular injury markers, and preserved E-cadherin expression (Figure 4). In parallel with the protection of resident tubular cells, administration of DDR1 AS ODNs reduced inflammation (Figure 5). Macrophage infiltration was blunted in mice treated with AS compared with mice receiving SCR ODNs (Figure 5A-D). The T Lymphocyte index was elevated in SCR N+IR24h (4.74 ± 1.30 vs. 1 ± 0.33 in CTL; $p < 0.01$) but significantly decreased in AS N+IR24h mice (1.85 ± 0.59 ; $p < 0.05$ vs SCR N+IR24h). Moreover, mRNA expression of the measured pro-inflammatory mediators Tumor Necrosis Factor α (TNF α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Interleukin-6 (IL-6), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) and Cluster of Differentiation 44 (CD44) were normalized in the AS N+IR24h group of animals (Figure 5E-J).

DDR1 antisense ODN administration decreased the I/R-induced DDR1 expression and protected kidneys against I/R-induced tubular injury and inflammation after 48h of reperfusion.

To test if decreased inflammation during the acute phase of the disease is not detrimental to the beginning of repair, we injected mice with AS ODNs and sacrificed them 48h after the reperfusion. In agreement with the results obtained from the I/R time-course (Figure 1), DDR1 protein expression was up-regulated after 48h of reperfusion (Figure 6A-B). This expression was localized in injured PETCs as shown on DDR1 immunohistochemistry in the SCR N+IR48h group (Figure 6C-E). As was the case with the 24h protocol, AS administration inhibited DDR1 expression (Figure 6A-B), even in slightly injured tubules (Figure 6C-E). Uremia was returned to almost normal levels after 48h (Sham = 12.95 ± 0.988 and SCR N+IR48h = 15.44 ± 1.805 mmol/l). This normalization should correspond to the initiation of the repair process at this time of the study (9). However, the indexes of structural

alterations and the markers of renal inflammation continued to be elevated as shown in Figure 7. As was the case with the group studied after 24h, antisense administration alleviated the renal structural damage and blunted the increase of peri-tubular inflammation (Figure 7). Finally, we also observed a decreased T lymphocyte infiltration index in AS N+IR48h mice (0.99 ± 0.28 ; $p < 0.05$ vs SCR N+IR48h) compared to SCR N+IR48h (6.73 ± 2.57 ; $p < 0.05$ vs CTL), which was similar to the value observed in CTL (1 ± 0.36).

DDR1 genetic inhibition decreased tubular damage and inflammation mimicking the effect of DDR1 antisense 24h and 48h after reperfusion.

In order to corroborate the protective effect of inhibiting DDR1 expression during I/R, separate experiments were performed using DDR1 HE mice. We preferred to use HE instead of complete knock-out in an effort to mimick conditions of pharmacological inhibition in which complete blockade of DDR1 cannot be achieved.

As with the previous protocols, DDR1 protein expression was induced after renal I/R in WT mice at both 24h and 48h, while it was significantly lowered in HE N+IR24h and HE N+IR48h mice at levels comparable to AS-treated mice (Figure 8). HE mice were protected compared to WT littermates at 24h and 48h after reperfusion as shown by the parameters of tubular damage (Figure 9A-E, K-N). This structural protection was accompanied by reduced macrophage infiltration (Figure 9F-J, O-P).

Proximal epithelial tubular cells, isolated from DDR1 HE mice do not acquire an inflammatory phenotype following I/R

To further understand the link between DDR1 and the phenotypic modifications occurring in PETCs after I/R injury, we isolated this cell type in control and I/R kidneys of HE or WT littermates. DDR1 expression was highly induced in isolated PETCs after 24h of I/R (Figure

10A), confirming the capacity of PETCs to express DDR1 after I/R (Figure 1C-H). The expression of several genes involved in inflammation such as TNF α , IL-1 β , MCP-1 and CD44 were markedly elevated, suggesting that PETCs acquired an inflammatory phenotype following I/R. Nevertheless, these pro-inflammatory mediators were barely induced in PETCs isolated from DDR1 HE mice (Figure 10B-E).

Endoplasmic reticulum (ER) stress mediates hypoxia-induced DDR1 expression through CHOP activation.

To investigate the mechanism(s) promoting DDR1 expression in PETCs, a human PETC line, HKC-8, was exposed to hypoxia for various periods of time. As early as 4 hours, the hypoxia-induced DDR1 expression *in vitro* reached levels similar to those induced by I/R *in vivo* (Figure 11A). Since ER stress is a key mechanism altering cell phenotype during hypoxia and I/R (10), normoxic HKC-8 cells were treated with inducers of ER stress. As shown in Figure 11B-C, thapsigargin treatment and Bovin Serum Albumin overload for 24h were able to significantly increase DDR1 protein expression. In addition, HKC-8 cells were treated with tunicamycin (TM), another ER stress inducer, with or without Sodium 4-PhenylButyrate (PBA), an inhibitor of ER stress. TM treatment increased DDR1 expression which was blunted in the presence of PBA (Figure 11D).

To identify possible candidate transcription factors susceptible to participate in triggering both DDR1 expression and ER stress, an *in silico* analysis of DDR1 promoter was performed using PROMO software. This analysis revealed almost a hundred responsive elements to the C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor. Therefore, we transfected HKC-8 cells with a plasmid coding for CHOP, and we observed an enhancement of DDR1 mRNA expression (Figure 12A).

In order to test this hypothesis *in vivo*, I/R was applied in CHOP deficient mice. As observed in previous protocols, DDR1 protein expression was increased in WT mice after I/R. Interestingly, this expression was significantly decreased in CHOP deficient mice (Figure 12B-C) and was accompanied by decreased levels of uremia (Figure 12D). This functional protection was associated with decreased expressions of markers of tubular damage (Kim-1 and NGAL) and of renal inflammation (TNF α , IL-1 β and MCP-1) (Figure 12E-I).

Biopsies from transplant patients suffering from altered graft function display an expression profile of DDR1 similar to that of experimental I/R

DDR1 expression was localized in the distal tubule of a healthy graft performed 3 months after transplantation (Figure 13A-B). In contrast, DDR1 staining was present in injured PETCs in patients presenting graft dysfunction (Figure 13C-D) or acute tubular necrosis (Figure 13E-F). The striking similarity of this expression pattern with that observed before and after experimental I/R (Figure 13G-I) introduces the hypothesis of a detrimental role for DDR1 in humans under I/R conditions.

Proposed mechanism for I/R-induced DDR1 activation

Based on the above results we propose the following mechanism: Following I/R conditions, ER stress induces *de novo* expression of DDR1 in PETCs through the action of the CHOP transcription factor. Activation of DDR1 promotes pro-inflammatory phenotype changes of PETCs leading to increased macrophage infiltration and inflammation. Inhibition of DDR1 expression and/or activation preserves kidneys from the I/R-induced alterations of renal function and structure (Figure 14).

Discussion

In the present study we demonstrate that DDR1 is a key mediator of renal inflammation following I/R injury. DDR1 is expressed early after I/R in the proximal tubules and this expression promotes a pro-inflammatory phenotype leading to increased inflammatory influx and to deterioration of renal function. Using pharmaco-genetic and genetic approaches to inhibit the overexpression of DDR1 (*in vivo* treatment with AS ODNs or DDR1 HE mice) we show that targeting DDR1 can be beneficial against the detrimental effects of I/R. Another major finding is the identification of molecular mechanism(s) driving DDR1 neo-expression. Using a combination of an *ex vivo* approach of freshly isolated PETCs with *in vitro* transfected lines and with *in vivo* experiments in transgenic animals, we show that ischemia promotes DDR1 gene transcription through the transcription factor CHOP. Finally, the observation of the similarity of DDR1 expression pattern in proximal tubules between experimental I/R and in malfunctioning grafts after prolonged ischemia lead us to introduce the hypothesis that a part of the inflammatory complications observed after renal transplantation can be attributed to DDR1.

Following I/R, DDR1 expression is observed as early as 6h, increases at 24h and is sustained for at least 48h. This *de novo* expression occurs in the most affected cell type in this kind of injury, the PETCs. These data suggest that the regulation of DDR1 expression is driven by a rapid mechanism directly linked to cell damage. The observation that emerged from our previous studies is that DDR1 expression is induced in the most injured and/or activated cell type i.e. in macrophages and tubular epithelial cells in the UUO model (6,8), in smooth muscle cells in hypertensive nephropathy (5) and in podocytes in glomerulonephritis (7,8). Here again, DDR1 expression is activated in hypoxic-PETCs, the target cells of renal I/R

injury. Indeed, as shown in Figure 11A, hypoxia induces DDR1 expression in HKC-8 cells, a human PETC line, as it is the case with other cell types such as bone marrow-derived mesenchymal stem cells, optic nerve lamina cribrosa cells and pituitary adenomas cells (11-13). Since ER is considered to be as one of the major events in kidney diseases and particularly the complications associated to I/R injury (10, 14, 15), we treated HKC-8 cells with three different ER stress inducing agents, TG (16), BSA overload (15) and TM (14, 16). All three induced DDR1 expression while the addition of PBA, an ER stress inhibitor (10), blunted DDR1 expression, thus demonstrating the role of ER stress in DDR1 transcriptional regulation.

In silico analysis of the DDR1 promoter suggested CHOP as a possible candidate transcription factor(s) capable to participate in both activation of DDR1 transcription and ER stress. The role of this transcription factor is well-characterized in the maladaptive response to ER stress and leads to apoptosis through the activation of PERK and ATF6 pathways (10, 14). In addition, several studies have described a pro-inflammatory effect of this transcription factor. Indeed, CHOP deficiency protected mice from neutrophil and macrophage infiltration in UUO (17) and decreased IL-1 β and Ly6G expression in renal I/R injury (18). Moreover, CHOP was shown to drive inflammatory gene expression, fibrosis and oncogenesis in a murine model of hepatocellular carcinoma (19). Other studies demonstrated that CHOP regulates caspase-11 expression which is responsible for activating cleavage of pro-caspase-1 to caspase-1, an enzyme that transforms pro-IL-1 β to IL-1 β (20). In our study, DDR1 expression was induced in HKC-8 cells transfected with a plasmid coding for CHOP. To check the CHOP-DDR1 interaction hypothesis, we performed I/R in CHOP-deficient mice and we show that suppression of CHOP led to a lowered DDR1 induction (Figure 12B). To our knowledge, this is the first time a transcription factor involved in DDR1 transcriptional regulation has been identified in an *in vivo* setting. Interestingly, CHOP KO mice, as DDR1

AS-treated or DDR1 HE mice, showed improved renal function and displayed less expression of pro-inflammatory mediators after I/R, suggesting that the protection of CHOP KO mice can be explained by DDR1 down-regulation, at least partially. Given that ER stress is rather common as cell adaptation in several models of renal disease such as UUO, and podocyte injury models (14, 15, 21, 22), we propose that an ER stress-CHOP-DDR1 interaction is a common mechanism of renal injury and could explain why different renal cell types express DDR1 depending the cell origin of aggression.

Scrambled-treated mice exhibited the classical indexes of renal dysfunction 24 hours after I/R: impaired renal function and important tubular damage, such as brush border alteration, tubular vacuolization and necrosis, cell sloughing and cast formation (10, 23). Kim-1, NGAL and Vimentin expressions were increased while E-cadherin was decreased, in agreement with previous results (24-26). In addition, important inflammatory infiltration (mainly macrophages) was observed and associated with increased expressions of several pro-inflammatory mediators (TNF α , IL-1 β , MCP-1, IL-6, VCAM-1 and CD44, Figure 3-5 and ref 27-31). The results with the DDR1 AS ODNs treatment imply that DDR1 is involved in pro-inflammatory mechanisms. Inflammation is a significant component of I/R kidney injury and is partly responsible for tubular cell death (32). The inhibition of pro-inflammatory cytokine production and adhesion molecule expression following DDR1 inhibition can explain the decreased macrophage and lymphocyte infiltration observed and may be one of the reasons why tubular structure and renal function were partially preserved. Such a protection has already been observed with the pharmacological blockade of C-X-C chemokine receptor type 4, a molecule displaying potent chemotactic activity for leukocytes (33).

Because our objective was to obtain a similar degree of inhibition of DDR1 expression which is usually obtained in an AS ODNs protocol *in vivo* (roughly 50%), we used HE DDR1 mice instead homozygous DDR1 knock-out mice. Thus DDR1 HE mice and mice treated with

DDR1 antisense after 24 or 48 hours of I/R displayed comparable down regulation of DDR1 expression, and the obtained results regarding protection against structural and inflammatory lesions were similar. In addition, the downregulation of DDR1 was accompanied by decreased inflammation in the CHOP KO mice (Figure 12G-I). The pro-inflammatory role of DDR1 was further confirmed with the experiments using PETCs from WT and DDR1 HE mice isolated before and after I/R (Figure 10). PETCs after I/R acquired an inflammatory phenotype in WT animals. In contrast, the down regulation of DDR1 in PETCs from DDR1 HE mice was accompanied by decreased expressions of TNF α , IL-1 β , MCP-1 and CD44, suggesting a link between DDR1 activation and the expression of these molecules. Several studies associate DDR1 with inflammation. For example, DDR1 interacts with TRAF6 to induce p38 MAPK and NF κ B in human macrophages (2, 34). TRAF6 is described to be activated in PETCs after I/R kidney injury and to lead to SAPK/JNK and p38 MAPK phosphorylation, which in turn stimulated IL-8 and MCP-1 production (35). DDR1 can also trigger the JNK pathway to induce pro-inflammatory cytokine production, such as TNF α and IL-1 β in I/R injury (10, 32). Thus, we propose that DDR1 participates to the induction of the pro-inflammatory phenotype acquired by PETCs after I/R, which in turn leads to tubular injury since cytokines such as TNF α and IL-1 β can induce loss of PETCs by disrupting the cell-matrix adhesion (33, 34).

Interestingly, DDR1 is highly expressed in proximal tubules of grafts displaying inflammation and tubular damage. The similarity of this staining to that observed in experimental I/R suggests that DDR1 can also be induced in humans with delayed graft function and contribute to subsequent inflammatory complications. If this observation and hypothesis are confirmed, treatments targeting DDR1 could provide a valuable tool to treat patients displaying tubular necrosis associated with impaired renal function. Pharmacological blockers of DDR1 have

been recently synthesized (36, 37) and showed a good efficiency to inhibit tumor initiation and progression in preclinical models (38).

In conclusion, following I/R, ER stress drives DDR1 expression in proximal tubular cells through CHOP. The expression of DDR1 favors an inflammatory phenotype of PETCs which participates in the damage of renal structure function. Targeting DDR1 can provide a promising approach to treat complications associated to acute renal injury.

Methods

Animal treatment and protocols

All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to water and pellet food. Animal procedures and protocols were in accordance with the European Guidelines for the Care and use of Laboratory Animals and have been approved by national ethical committees.

All mice were randomly assigned to experimental groups.

Surgery was performed under general anesthesia (intraperitoneal injection of ketamine 100 mg/kg / Xylazine 20 mg/kg) on male mice aged 8 to 10 weeks-old. The body temperature was monitored and maintained at $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ on a warming mat with a blanket. All mice were sacrificed after different times of reperfusion, and blood and kidneys were collected for further analysis.

- Unilateral I/R time-course

Twelve mice bred in our own facility onto a 129/Sv background were separated into two groups, sham-operated mice (Sham, n = 3) and I/R mice (IR, n = 9). To induce the unilateral I/R model, an atraumatic clamp (Fine Science Tools) was placed on the left renal pedicle for 35 minutes and then released to allow reperfusion. Sham-operated mice were dissected as described, but without occlusion of the renal pedicle. Thereafter, the I/R mice were separated into 3 groups of 3 mice each and sacrificed after 6h, 24h and 48h of reperfusion. A schematic representation summarizing the above protocol is provided in Supplemental Figure 1.

- Nephrectomy and I/R 24h and 48h with ODN injections

Thirty-six mice bred in our own facility onto a 129/Sv background were separated into two equal groups and injected either with antisense ODNs (AS) directed against DDR1 or with scrambled sequences (SCR) 20 minutes prior to the surgery. Two mice from each group were

sham-operated (Sham) and the others underwent a right nephrectomy and a left I/R as described above. Finally, each ODNs group was divided into two groups and sacrificed either after 24h of reperfusion (SCR N+IR24h, n = 8; AS N+IR24h, n = 8) or after 48h (SCR N+IR48h, n = 8; AS N+IR48h, n = 8). In those two groups sacrificed after 48h, a supplementary injection of ODNs was performed at 24h. Nephrectomized kidneys were used as controls (SCR CTL, n = 16; AS CTL, n = 16). A schematic representation summarizing the above protocol is provided in Supplemental Figure 2.

A cocktail of 3 specific antisense ODNs was designed as previously described (6) (Integrated DNA Technologies) to block DDR1 expression. Scrambled sequences consisted of the same nucleotide composition, but in a random sequence. The sequences used are cited in Table 1. Antisense and scrambled ODNs were diluted in physiological serum and injected intraperitoneally (100 pmol/ODN/injection).

- Nephrectomy and I/R 24h and 48h in DDR1 deficient mice

Male transgenic mice and their wild-type (WT) littermates were used in these experiments. WT and DDR1 heterozygous (HE) mice were bred in our own facility onto a 129/Sv background (5). These mice had been backcrossed 10 times to 129/Sv. We performed I/R as described above on 24 WT and 24 HE mice and used 3 mice per strain as sham. Then, 12 mice per strain were sacrificed 24h after reperfusion (WT N+IR24h, n = 8; HE N+IR24h, n = 8) or 48h (WT N+IR48h, n = 8; HE N+IR48h, n = 8) and nephrectomized kidneys were used as controls (WT CTL, n = 16; HE CTL, n = 16). In order to isolate proximal epithelial tubular cells (PETCs) (39), the 8 remaining mice per strain were sacrificed after 24h of reperfusion (WT N+IR24h PETCs, n = 4; HE N+IR24h PETCs, n = 4) or 48h (WT N+IR48h PETCs, n = 4; HE N+IR48h PETCs, n = 4) and nephrectomized kidneys were used as controls (WT CTL PETCs, n = 8; HE CTL PETCs, n = 8). A schematic representation summarizing the above protocol is provided in Supplemental Figure 3.

- Nephrectomy and I/R 6h and 24h in mice lacking CHOP

Male transgenic mice and their wild-type (WT) littermates were used in this experiments. WT and CHOP knock-out (KO) mice were bred in our own facility onto a C57/B6 background (40). We performed I/R as described above with only 25 minutes of ischemia on 10 WT and 10 KO mice and used 2 mice per strain as sham. Then, 5 mice per strain were sacrificed 6h after the reperfusion (WT CHOP N+IR6h, n = 5; KO CHOP N+IR6h, n = 5) or 24h (WT CHOP N+IR24h, n = 5; KO CHOP N+IR24h, n = 5) and nephrectomized kidneys were used as controls (WT CHOP CTL, n = 10; KO CHOP CTL, n = 10). A schematic representation summarizing the above protocol is provided in Supplemental Figure 4.

Proximal epithelial tubular cell sorting and quality control with flow cytometry

PETCs were sorted as previously described (3). Briefly, kidney cells were mechanically dissociated and incubated with two antibodies directed against the mouse prominin-1, a glycoprotein specific of the brush border. The first antibody was conjugated to magnetic microbeads and allowed cell isolation thanks to a strong magnetic field. The second anti-prominin-1 antibody was conjugated to allophycocyanin (APC) in order to check the quality of the magnetic separation by flow cytometry. Data showing the percentage of APC-positive cells in the prominin-1⁺ fraction are presented in Supplemental Figure 5. mRNA was extracted from isolated PETCs using Qiagen columns and APC⁺ cell % was used to normalize all the qPCR results.

Cell culture and treatment

Human proximal epithelial tubular HKC cells (clone 8) (a kind gift from Dr Marco Prunotto) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/ F12 medium supplemented with 2.5% fetal bovin serum (Gibco BRL) as described previously (41).

- Hypoxia

After starving cells in overnight, hypoxia was induced by adding 1ml of mineral oil (Sigma Aldrich) on a thin layer of medium on top of the cells for 1, 2 or 4 hours (n=3 per group) (42). Cells were then washed, harvested and mRNAs were extracted using Qiagen columns.

- Endoplasmic reticulum stress

HKC-8 cells were starved overnight and treated with thapsigargin 100nM (TG, Sigma Aldrich) or Bovine Serum Albumin 40mg/ml (BSA, Euromedex) for 24h (n=3 per group). Therefore, cells were harvested and total proteins were extracted using RIPA lysis buffer supplemented with sodium orthovanadate, PMSF, a protease inhibitor cocktail (Tebu bio) and sodium fluoride 10mM.

Starved HKC-8 cells were also stimulated with tunicamycin 100ng/ml (TM, Sigma Aldrich) with or without Sodium 4-PhenylButyrate 1mM (PBA, Calbiochem) for 24h (n=3 per group).

After harvesting, mRNAs were extracted using Qiagen columns.

- Transient transfection

The HKC-8 cells were seeded on twelve-well culture plates to approximately 70% to 90% confluence in complete medium 24h before transfection. We used the X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics) using a 1:1 ratio with appropriated controls to transfect cells either with a plasmid coding for the murine CHOP (pCHOP, Addgene) or with a control plasmid coding for a mutated form of β -galactosidase (pUC19, Invitrogen) (n=3 per group). mRNA was extracted 24h after the transfection using Qiagen columns.

Blood Urea Nitrogen (BUN) measurement

BUN was assessed in plasma obtained on the day of sacrifice and measured using an enzymatic spectrophotometric method with a KONELAB analyzer (Thermo Scientific) and was expressed as mmol/l.

Periodic Acid Schiff (PAS) coloration

Kidneys were fixed in alcohol-formalin-acetic acid, embedded in paraffin, cut into 4- μ m sections, and stained with PAS solution. Ten photos per kidney were taken in the outer stripe of outer medulla in order to evaluate renal structure alteration (magnification 20x) on coded slides. Tubular damage were evaluated in a blinded manner on a scale score from 0-4 described in a previous study, considering brush border alterations, tubular vacuolization and necrosis, cell sloughing, tubular dilation and cast formation (43).

Immunofluorescence and Immunohistochemistry

- Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed on 4 μ m thick cryo-sections. Primary antibodies included rabbit anti-DDR1 (Cell Signaling, #5583S, diluted 1:200 overnight at 4°C) and goat anti-megalin (a kind gift from Pr Pierre Verroust (44), diluted 1:5000 overnight 4°C) . Secondary antibodies were diluted 1:1000 (Invitrogen Alexa) and incubated for 1h at room temperature. Images were taken using an inverted microscope (Olympus).

- Immunohistochemistry in mice

Immunohistochemistry was performed on 4 μ m thick paraffin embedded sections. Antigens were unmasked with citrate buffer (pH = 6) and sections were treated with peroxidase blocking solution (Macvision Bioscience INC) followed by a 2% BSA incubation. Samples were stained with primary antibodies: rat anti-F4/80 (BioRad, #MCA497G, diluted 1:200 overnight at 4°C), rabbit anti-CD3 ϵ (Dako France, #A045229, diluted 1:200 overnight at 4°C), rabbit anti-DDR1 (Cell Signaling, #5583S, diluted 1:200 overnight at 4°C) and rabbit anti-Kim-1 (Abcam, #ab47635, diluted 1:100 overnight at 4°C). AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Dako) was used as the substrate. Tissues were then stained or not with hematoxylin QS (Vector) and mounted. F4/80 and CD3 ϵ stainings were quantified in the

outer strip of outer medulla using computer-based morphometric analysis software (Image J). Measurements were independently performed in a blinded manner on coded slides. Data were expressed as the percentage of F4/80 and CD3ε positive area and normalized for a control equal to 1.

- Immunohistochemistry in patient biopsies

Renal biopsies from patients were analyzed retrospectively. Two biopsies from transplant patients with delayed graft function were examined. The control consisted of the normal portion of the kidney removed during surgery for renal carcinoma. Immunohistochemistry for DDR1 was performed in paraffin sections as described above.

Western Blot analysis

Proteins were extracted from total kidney or cells using RIPA lysis buffer supplemented with sodium orthovanadate, PMSF, a protease inhibitor cocktail (Tebu bio) and sodium fluoride 10mM. Concentrations were determined using the Bradford assay and 25µg of protein were run on NuPAGE 4/12% electrophoresis gels (Invitrogen), then transferred on a PVDF membrane (Immobilon-p, Millipore). Immunoblotting was performed using rabbit specific primary antibodies anti-DDR1 (Cell Signaling, #5583S, diluted 1:1000 overnight at 4°C), anti-E-cadherin (Santa Cruz Biotechnology, #sc-7870, diluted 1:500 overnight at 4°C) and anti-GAPDH (Sigma Aldrich, #G9545, diluted 1:50000 overnight at 4°C) for the loading control. Then, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-linked donkey secondary antibody (GE Healthcare Life Sciences). The revelation was performed with ECL plus kit (GE Healthcare). Densitometric analysis on Image J was then performed for quantification.

qRT-PCR on renal tissue and cells

mRNA was extracted from renal tissue using TRI Reagent (Euromedex) or from isolated PETCs or HKC-8 using Qiagen columns. After digestion with DNase I, mRNA was reverse transcribed with the Maxima RT Kit (Fermentas). cDNA obtained was then amplified by qPCR in a LightCycler 480 (Roche Diagnostics) with SYBR Green (Fast Start DNA Master SYBR Green I; Roche Diagnostics) and specific primers for target mRNAs designed using the Universal Probe Library Roche website under the following conditions: 95°C for 5 min, 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 15 s, and 72°C for 15 s. qPCR was also carried out for different housekeeping genes depending on the experiment. qPCR for total kidney was normalized with 18S and 14-3-3 protein zeta/delta (YWHAZ) expressions and qPCR for HKC-8 cells was normalized with 18S and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expressions. Results are expressed as $2^{-\Delta Ct}$, where Ct is the cycle threshold number normalized to the mean for each corresponding control group. Dissociation curves were analyzed after each run for each amplicon in order to determine the specificity of quantification when using SYBR Green. The sequences (sense and antisense) of the primers used are cited in Table 2 and 3.

***In silico* analysis of DDR1 promoter**

We used the online software PROMO to map transcription factors that could potentially bind to DDR1 promoter based on their responsive element sequences.

Statistics

Statistics were realized using the program Logiciel Statview (SAS Institute). Results were expressed as mean \pm standard error (SE), and were considered as significant for $p < 0.05$. For the comparison between groups, ANOVA, Fisher test and t test were used when necessary.

Study Approval

Animal studies were approved by the French Ministry of National Education and Research after revision by an ethical committee (authorization #00525.03).

Informed consent was given by patients for use of part of the biopsy for scientific purposes. All procedures and use of tissues were performed according to the French national ethical guidelines and were in accordance with the Declaration of Helsinki.

Author contributions

AD designed the study, carried out experiments, collected and analyzed data, and wrote the first version of the manuscript. SP, AD, CEC and EL performed renal I/R surgery and sacrificed mice from different protocols. AB acquired and analyzed most of the flow cytometry data. YD and ER provided the access to patient biopsies and analyzed the data. CC and JCD interpreted data, revised the manuscript and wrote the final version.

Acknowledgments

We thank Pr Emmanuelle Plaisier and Tiffany Migeon for giving us the CHOP knock-out mice and Dr Marco Prunotto for sending us the HKC-8 cell line. We also thank Pr Pierre Verroust for providing us the anti-megalin antibody. We thank Dr Zela Keuylian for english revision, Dr Dominique Cathelin for flow cytometry expertise and Dr Niki Prakoura for technical advices. AD was recipients of fellowships from the Doctoral School 'Physiology and Physiopathology" of University Pierre et Marie Curie.

References

1. Lameire NH, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet*. 2013;382(9887):170–179.
2. Vogel W, et al. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal*. 2006;18:1108–1116.
3. Alves F, et al. Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer. *Oncogene*. 1995;10:609–618.
4. Leitinger B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2014;310:39-87.
5. Flamant M, et al. Discoidin domain receptor 1 null mice are protected against hypertension induced renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:3374–3381.
6. Guerrot D, et al. Domain Receptor 1 Is a Major Mediator of Inflammation and Fibrosis in Obstructive Nephropathy. *Am J Pathol*. 2011;179:83–91.
7. Kerroch M, et al. Genetic inhibition of discoidin domain receptor 1 protects mice against crescentic glomerulonephritis. *Faseb J*. 2012;26:4079–4091.
8. Kerroch M, et al. Protective effects of genetic inhibition of Discoidin Domain Receptor 1 in experimental renal disease. *Sci Rep*. 2016;6:21262.
9. Rabb H, et al ; Acute Dialysis Quality Initiative Consensus XIII Work Group. Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(2):371–379.
10. Zuk A, Bonventre JV. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med*. 2016;67:293–307.

11. Sheng Li, Xue Bao. [Effect of hypoxia on the gene profile of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells]. [Article in Chinese] Wu EH, et al. 2007;59(2):227–232.
12. Kirwan RP, et al. Hypoxia regulated gene transcription in human optic nerve lamina cribrosa cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(4):2243–2255.
13. Li S, et al. Effect of hypoxia on DDR1 expression in pituitary adenomas. *Med Sci Monit.* 2015;21:2433–2438.
14. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(2):156–165.
15. El Karoui K, et al. Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat Commun.* 2016;7:10330.
16. Kim H, et al. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits ER stress and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;308(3):F226–236.
17. Liu SH, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) deficiency ameliorates renal fibrosis in unilateral ureteral obstructive kidney disease [published online ahead of print March 3, 2016]. *Oncotarget.* doi: 10.18632/oncotarget.7870.
18. Noh MR, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(9):1895–1901.
19. DeZwaan-McCabe D, et al. The stress-regulated transcription factor CHOP promotes hepatic inflammatory gene expression fibrosis, andoncogenesis. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003937.
20. Endo M, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation. *J Immunol.* 2006;176(10):6245–6253.

21. Chevalier RL, et al. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009;75(11):1145–1152.
22. Nagata M. Podocyte injury and its consequences [published online ahead of print March 19, 2016]. *Kidney Int.* doi:10.1016/j.kint.2016.01.012
23. Arai S, et al. Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nat Med.* 2016;22(2):183–193.
24. Charlton JR, et al. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(7):1301–1311.
25. Witzgall R, et al. Localisation of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest.* 1994;93(5):2175–2188.
26. Bush KT, et al. Selective degradation of E-cadherin and dissolution of E-cadherin-catenin complexes in epithelial ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278(5):F847–852.
27. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4210–4221.
28. Jang HR, Rabb H. Immune cells in experimental acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(2):88–101.
29. Ysebaert DK, et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(10):1562–1574.
30. Munshi R, et al. MCP-1 gene activation marks acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(1):165–175.
31. Declèves AE, et al. Dynamics of hyaluronan, CD44, and inflammatory cells in the rat kidney after ischemia/reperfusion injury. *Int J Mol Med.* 2006;18(1):83–94.

32. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004;66(2):480–485.
33. Zuk A, et al. CXCR₄ antagonism as a therapeutic approach to prevent acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307(7):F783–797.
34. Matsuyama W, et al. Activation of discoidin domain receptor 1 isoform b with collagen up-regulates chemokine production in human macrophages: role of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B. *J Immunol.* 2004;172(4):2332–2340.
35. Li H, Nord EP. CD40 ligation stimulates MCP-1 and IL-8 production, TRAF6 recruitment, and MAPK activation in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282(6):F1020–1033.
36. Kim HG, et al. Discovery of a Potent and Selective DDR1 Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *ACS chemical biology.* 2013;8(10):2145–2150.
37. Gao M, et al. Discovery and optimization of 3-(2-(Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)ethynyl)benzamides as novel selective and orally bioavailable discoidin domain receptor 1 (DDR1) inhibitors. *J Med Chem.* 2013;56(8):3281–3295.
38. Ambrogio C, et al. Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2016;22(3):270–277.
39. Legouis D, et al. Ex vivo analysis of renal proximal tubular cells. *BMC Cell Biol.* 2015;16:12.
40. Zinszner H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998;12(7):982–995.
41. Racusen LC, et al. Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines. *J Lab Clin Med.* 1997;129(3):318–329.

42. Balasubramanian S, et al. Orphan Nuclear Receptor Nur77 Promotes Acute Kidney Injury and Renal Epithelial Apoptosis. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(4):674–686.
43. Melnikov VY, et al. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1083–1091.
44. Christensen EI, et al. Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubulin in kidney proximal tubules. *Proc Natl Acad U S A*. 2003;100(14):8472–8477.

Figure Legends

Figure 1. DDR1 is highly overexpressed in proximal epithelial tubular cells after I/R kidney injury. A-B: DDR1 protein expression in total kidney in sham-operated animals (Sham) or after 35 minutes of ischemia and 6h (IR 6h), 24h (IR 24h) or 48h (IR 48h) of reperfusion. n = 3. * p<0.05 and ** p<0.01 vs Sham by ANOVA. (A) Western blot. (B) Western blot quantification. **C-H:** Immunofluorescence showing a *de novo* expression of DDR1 in proximal epithelial tubular cells after I/R (N+IR24h) since DDR1 expression (green 60x, C and F) is localized in cells presenting a brush border stained with megalin (red 60x, D and G), as shown in merged image (60x, E and H). Scale bar: 20 μ m.

Figure 2. DDR1 antisense administration blunted the I/R-induced DDR1 expression after 24h of reperfusion. A-B: DDR1 protein expression in total kidney in sham-operated animals (Sham) or in nephrectomized contralateral kidney (CTL) or 24h after the reperfusion (N+IR24h) in mice treated either with ODN SCR or AS. n = 5-7. * p<0.05 vs Sham by ANOVA; # p<0.05, ## p<0.01 vs SCR N+IR24h by ANOVA. (A) Representative western blot. (B) Western blot quantification. **C-E:** Representative examples of DDR1 immunostaining 24h after the reperfusion in the outer stripe of outer medulla of mice treated or not with DDR1 antisense. n = 3. Scale bar: 50 μ m.

Figure 3. DDR1 inhibition preserved renal function and structure 24h after the reperfusion. A: Blood urea nitrogen (BUN) assessment. n = 4-5. * p<0.05 vs Sham by ANOVA; # p <0.05 vs SCR N+IR24h by ANOVA. **B-E:** Evaluation of tubular damage in the outer stripe of outer medulla of mice treated or not with DDR1 antisense after 24h of reperfusion. (B) Tubular damage score. n = 5-8. * p<0.05 and *** p<0.001 vs CTL by

ANOVA; # p<0.05 vs SCR N+IR24h by ANOVA. (C-E) Representative views of periodic acid Schiff coloration on renal sections 24h after the reperfusion. Scale bar: 100 μ m.

Figure 4. Treatment with DDR1 antisense preserved renal tubular integrity after 24h of reperfusion. **A-C:** Representative examples of immunostaining 24h after reperfusion in the outer stripe of outer medulla of mice injected or not with DDR1 antisense. n = 3. Scale bar: 100 μ m. **D-F:** mRNA expressions of Kim-1 (D), NGAL (E) and Vimentin (F) normalized with housekeeping genes, in mice treated either with AS or with SCR after 24h of reperfusion. n = 6-10. ** p<0.01 and *** p<0.001 vs CTL by ANOVA; # p<0.05 and ## p<0.01 vs SCR N+IR24h by ANOVA. **G-H:** E-cadherin protein expression in total kidney in mice treated or not with DDR1 antisense 24h after the reperfusion. n = 3-6. * p<0.05 vs CTL by ANOVA; # p<0.05 vs SCR N+IR24h by ANOVA. (G) Representative western blot. (H) Western blot quantification.

Figure 5. Inflammation was reduced in mice treated with DDR1 antisense after 24h of reperfusion. **A-C:** Representative views of F4/80 immunostaining 24h after reperfusion in the outer stripe of outer medulla of mice injected or not with DDR1 antisense. Scale bar: 100 μ m. **D:** Evaluation of the F4/80 positive cells infiltration. n = 5-8. *** p<0.001 vs CTL by ANOVA; ## p<0.01 vs SCR N+IR24h by ANOVA. **E-J:** mRNA expressions of TNF α (E), IL-1 β (F), MCP-1 (G), IL-6 (H), VCAM-1 (I) and CD44 (J) normalized with housekeeping genes, in mice treated either with AS or with SCR after 24h of reperfusion. n = 6-10. * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001 vs CTL by ANOVA; # p<0.05 and ## p<0.01 vs SCR N+IR24h by ANOVA.

Figure 6. DDR1 antisense administration decreased the I/R-induced DDR1 expression after 48h of reperfusion. **A-B:** DDR1 protein expression in total kidney in sham-operated animals (Sham) or in nephrectomized contralateral kidney (CTL) or 48h after the reperfusion (N+IR48h) in mice treated either with ODN SCR or AS. n = 5-8. * p<0.05 vs Sham by ANOVA; # p<0.05 vs SCR N+IR48h by ANOVA. (A) Representative western blot. (B) Western blot quantification. **C-E:** Representative examples of DDR1 immunostaining 48h after the reperfusion in the outer stripe of outer medulla of mice treated or not with DDR1 antisense. n = 3. Scale bar: 50 μ m.

Figure 7. Inhibiting DDR1 protected kidneys against I/R-induced tubular injury and inflammation after 48h of reperfusion. **A-C:** Representative views of periodic acid Schiff coloration on renal sections in the outer stripe of outer medulla of mice treated or not with DDR1 antisense after 48h after the reperfusion. Scale bar: 100 μ m. **D-F:** Representative examples of F4/80 immunostaining 48h after reperfusion in the outer stripe of outer medulla of mice injected or not with DDR1 antisense. Scale bar: 100 μ m. **G:** Scoring of tubular damage. n = 5-8. * p<0.05 and *** p<0.001 vs CTL by ANOVA; # p<0,05 vs SCR N+IR48h by ANOVA. **H:** Evaluation of the F4/80 positive cells infiltration. n = 6-8. * p<0.05 vs CTL by ANOVA; # p<0.05 vs SCR N+IR48h by ANOVA.

Figure 8. DDR1 expression was comparable between antisense treated mice and DDR1 heterozygous mice after 24 and 48h of reperfusion. **A-C:** DDR1 protein expression in total kidney in sham-operated animals (Sham) or in nephrectomized contralateral kidney (CTL) or after the reperfusion (N+IR24h, N+IR48h) in wild type or heterozygous mice for DDR1. n = 3-8. * p<0.05 and *** p<0.001 vs Sham WT by ANOVA; ### p<0.001 vs WT N+IR by ANOVA. (A) Representative western blot. (B-C) Western blot quantifications.

Figure 9. DDR1 genetic inhibition decreased tubular damage and inflammation mimicking the effect of DDR1 antisense 24h and 48h after reperfusion. A-E: Representative examples of periodic acid Schiff coloration on renal sections in the outer stripe of outer medulla of wild type and DDR1 heterozygous mice after 24h (A-C) and 48h (D-E) of reperfusion. Scale bar: 120 μ m. **F-J:** Representative views of F4/80 immunostaining 24h (F-H) or 48h (I-J) after reperfusion in the outer stripe of outer medulla of wild type and DDR1 heterozygous mice. Scale bar: 120 μ m. **K-L:** Tubular damage score after 24h (K) and 48h (L) of reperfusion. n = 5-8. *** p<0.001 vs CTL by ANOVA; # p<0,05 and ### p<0.001 vs WT N+IR by ANOVA. **M-N:** mRNA expression of Kim-1 normalized with housekeeping genes, in wild type mice compared to heterozygous mice for DDR1 after 24h (M) or 48h (N) of reperfusion. n = 5-13. * p<0.05 and *** p<0.001 vs CTL by ANOVA; # p<0.05 vs WT N+IR by ANOVA. **O-P:** Evaluation of the F4/80 positive cells infiltration. n = 5-11. ** p<0.01 and *** p<0.001 vs CTL by ANOVA; # p<0.05 and ## p<0.01 vs WT N+IR by ANOVA.

Figure 10. The expression of pro-inflammatory mediators was significantly decreased in proximal epithelial tubular cells of DDR1 heterozygous mice compared to wild type after 24h of reperfusion. A: mRNA expression of DDR1 normalized with housekeeping genes in proximal epithelial tubular cells isolated from wild type mice after 24h and 48h of reperfusion. n = 4-8. *** p<0.001 vs WT CTL PETCs by ANOVA. **B-E:** mRNA expressions of TNF α (B), IL-1 β (C), MCP-1 (D) and CD44 (E) normalized with housekeeping genes and APC $^+$ % in proximal epithelial tubular cells isolated from wild type or DDR1 heterozygous mice 24h after the reperfusion. n = 4-8. * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001 vs WT CTL PETCs by ANOVA; # p<0.05 and ### p<0.001 vs WT N+IR24h PETCs by ANOVA.

Figure 11. Endoplasmic reticulum stress is responsible for hypoxia-induced DDR1 expression in proximal epithelial tubular cells in vitro. **A:** DDR1 mRNA expression normalized with housekeeping genes in control HKC-8 cells (CTR) and after 1, 2 and 4 hours of hypoxia (respectively H 1h, H 2h and H 4h). n = 3. ** p<0.01 vs CTL by ANOVA. **B-C:** DDR1 protein expression in control HKC-8 cells (CTL 24h) and after Thapsigargin 100nM (TG 100nM 24h) treatment and Bovin Serum Albumin overload (BSA 40mg/ml 24h) for 24h. n = 3. * p<0.05 and *** p<0.001 vs CTL 24h by ANOVA. (B) Representative western blot. (C) Western blot quantification. **D:** DDR1 mRNA expression normalized with housekeeping genes in control HKC-8 cells (CTL DMSO) and after Tunicamycine 100ng/ml treatment (TM 100ng/ml) with or without Sodium 4-PhenylButyrate (PBA). n = 3. ** p<0.01 vs CTL DMSO by ANOVA. ## p<0.01 vs TM 100ng/ml by ANOVA.

Figure 12. Endoplasmic reticulum stress induces DDR1 expression through CHOP activation in proximal epithelial tubular cells in vitro. **A:** DDR1 mRNA expression normalized with housekeeping genes in HKC-8 cells transiently transfected with a control plasmid (pUC19) or a CHOP plasmid (pCHOP) for 24. n = 3. * p<0.05 vs pUC19 by one-sided t test. **B-C:** DDR1 protein expression in total kidney in sham-operated mice (Sham) or 6h after the reperfusion (N+IR6h) in wild type (WT CHOP) or knock-out (KO CHOP) mice for CHOP. n = 3-8. * p<0.05 and *** p<0.001 vs Sham by ANOVA; # p<0.05 vs WT CHOP N+IR6h by ANOVA. (B) Representative western blot. (C) Western blot quantification. **D:** Blood urea nitrogen (BUN) assessment. n = 4-11. *** p<0.001 vs Sham by ANOVA; ## p <0.01 vs WT CHOP N+IR6h by ANOVA. **E-I:** mRNA expressions of Kim-1 (E), NGAL (F), TNF α (G), IL-1 β (H) and MCP-1 (I) normalized with housekeeping genes in wild type (WT CHOP) or CHOP knock-out (KO CHOP) mice 24h after the reperfusion. n = 3-8. * p<0.05,

** p<0.01 and *** p<0.001 vs CTL by ANOVA; # p<0.05 and ## p<0.01 vs WT CHOP N+IR24h by ANOVA.

Figure 13. DDR1 expression profile was similar in I/R mice and in transplant patients suffering from altered graft function.

A-B: DDR1 immunostaining in a biopsy taken at 3 months post-transplant for graft surveillance with normal graft function and morphology. (A) Original magnification 10x. Scale bar: 250 μ m. (B) Zoomed image. **C-D:** DDR1 immunostaining in a biopsy taken at 11 months post-transplant for graft surveillance showing 20% of interstitial fibrosis and tubular atrophy. (C) Original magnification 10x. Scale bar: 250 μ m. (D) Zoomed image. **E-F:** DDR1 immunostaining in a biopsy taken for graft dysfunction at 10 days post-transplant showing important tubular necrosis and edema. (E) Original magnification 10x. Scale bar: 250 μ m. (F) Zoomed image. **G-I:** Representative examples of DDR1 immunostaining in the outer stripe of outer medulla of control mice or 24h after the reperfusion. n = 3. Scale bar: 25 μ m.

Figure 14. Proposed mechanism

Supplementary Figure Legends

Figure 1. Schematic representation of the I/R time-course protocol..

Figure 2. Schematic representation of the I/R 24h and 48h ODN SCR vs AS protocol.

Figure 3. Schematic representation of the I/R 24h and 48h WT vs DDR1 HE protocol.

Figure 4. Schematic representation of the I/R 6h and 24h WT vs CHOP KO protocol.

Figure 5. Efficiency of proximal tubular cells isolation before and after I/R at 24h and 48h in WT vs DDR1 HE mice quantified by FACS.

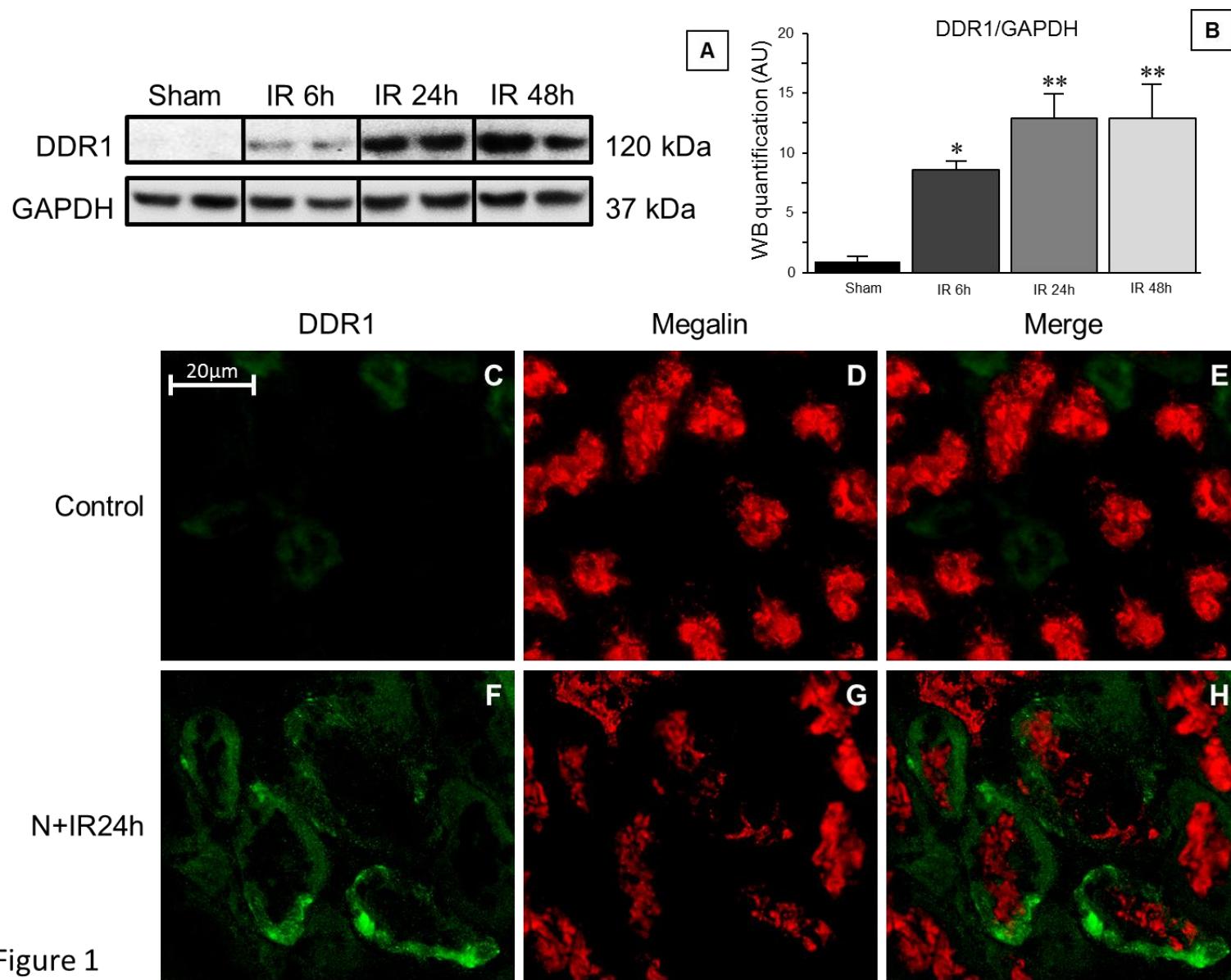


Figure 1

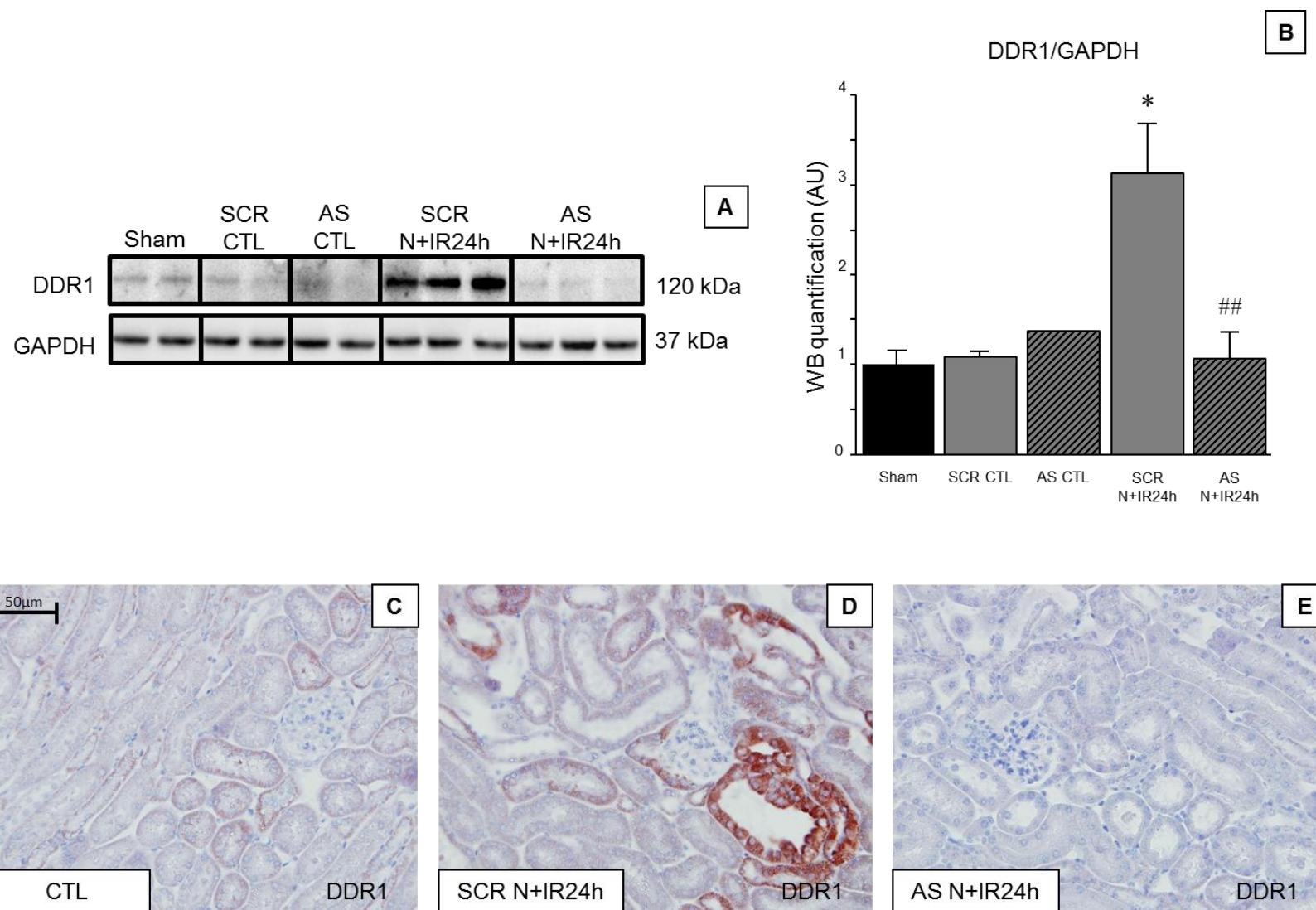


Figure 2

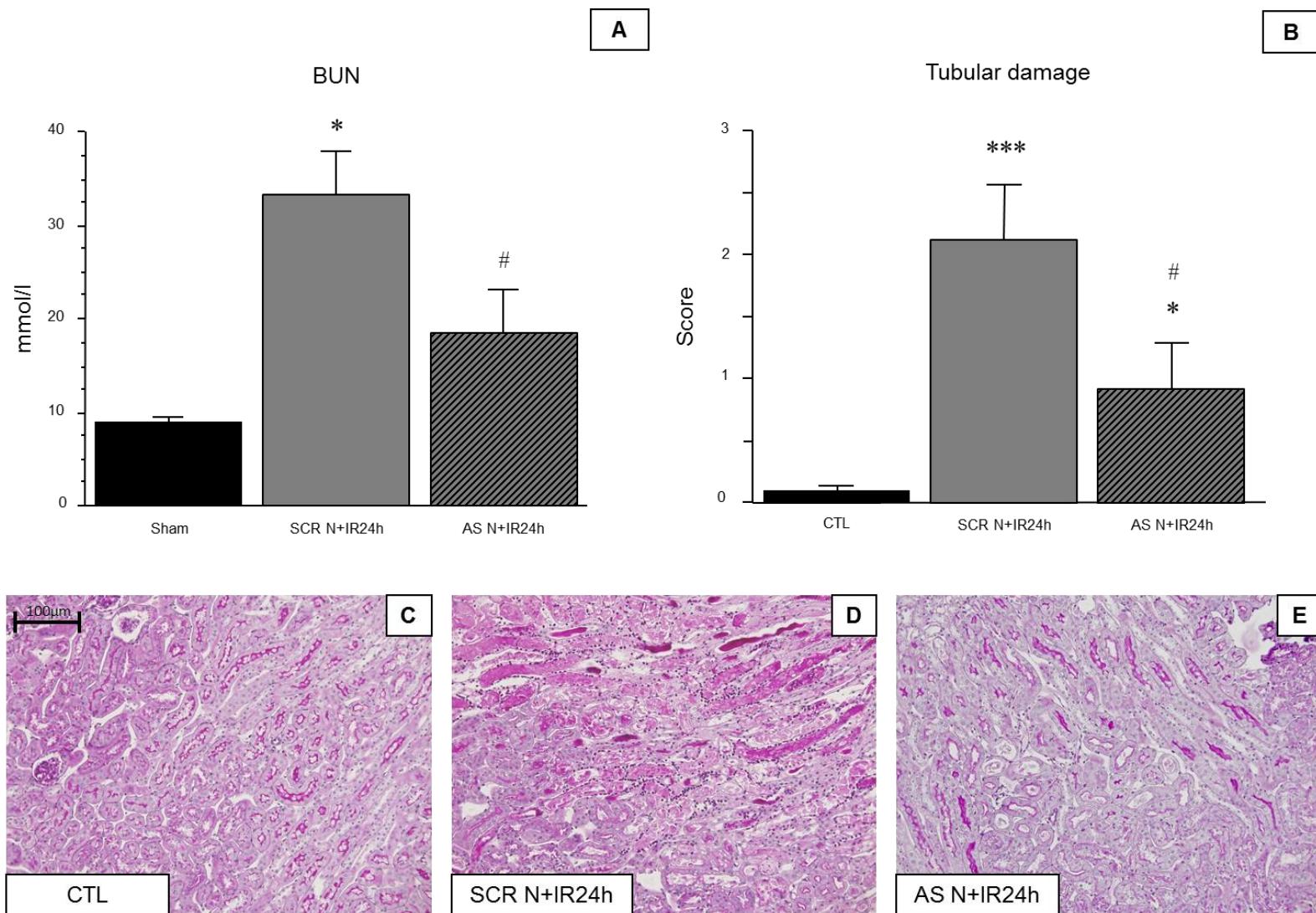


Figure 3

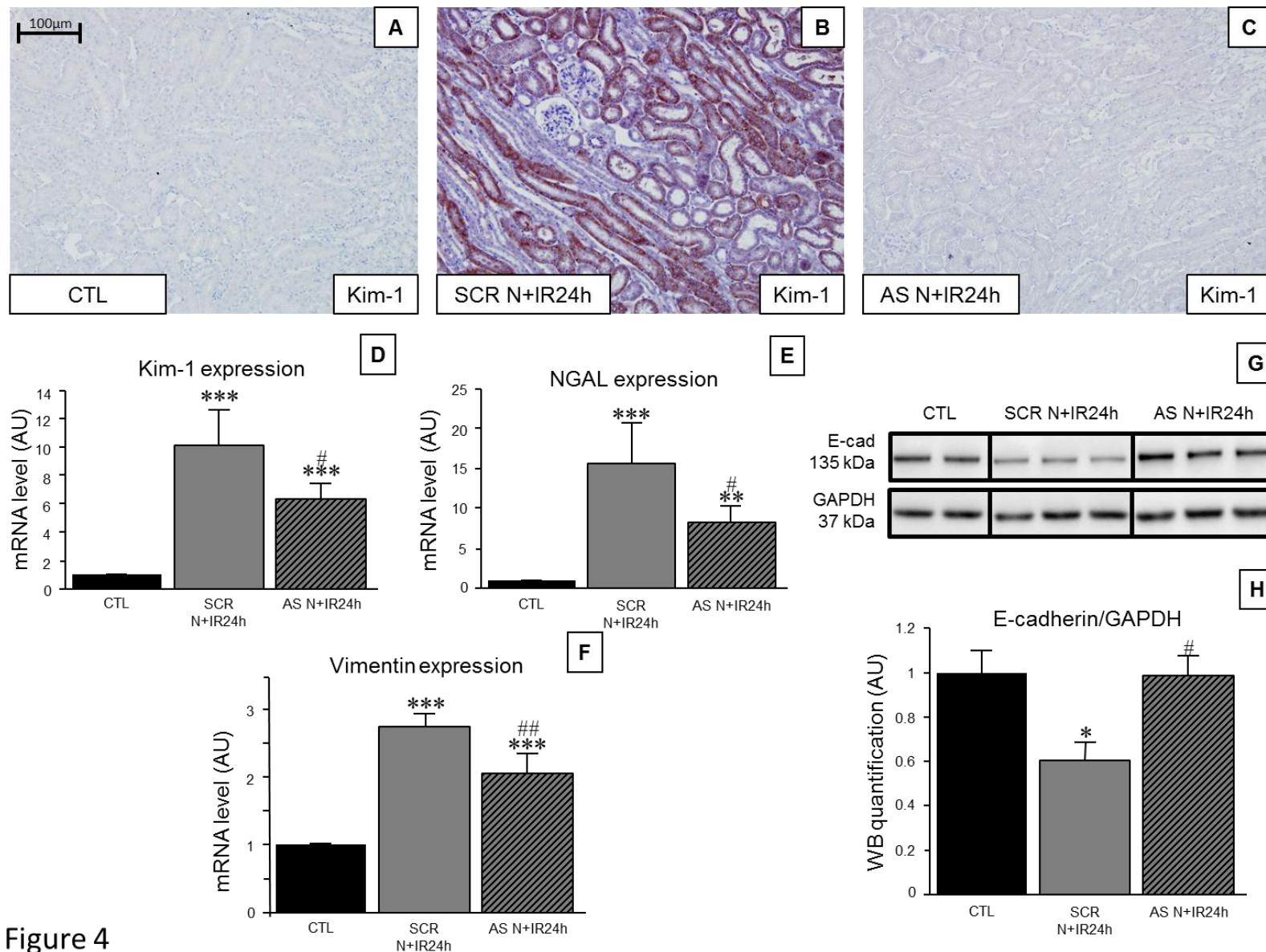


Figure 4

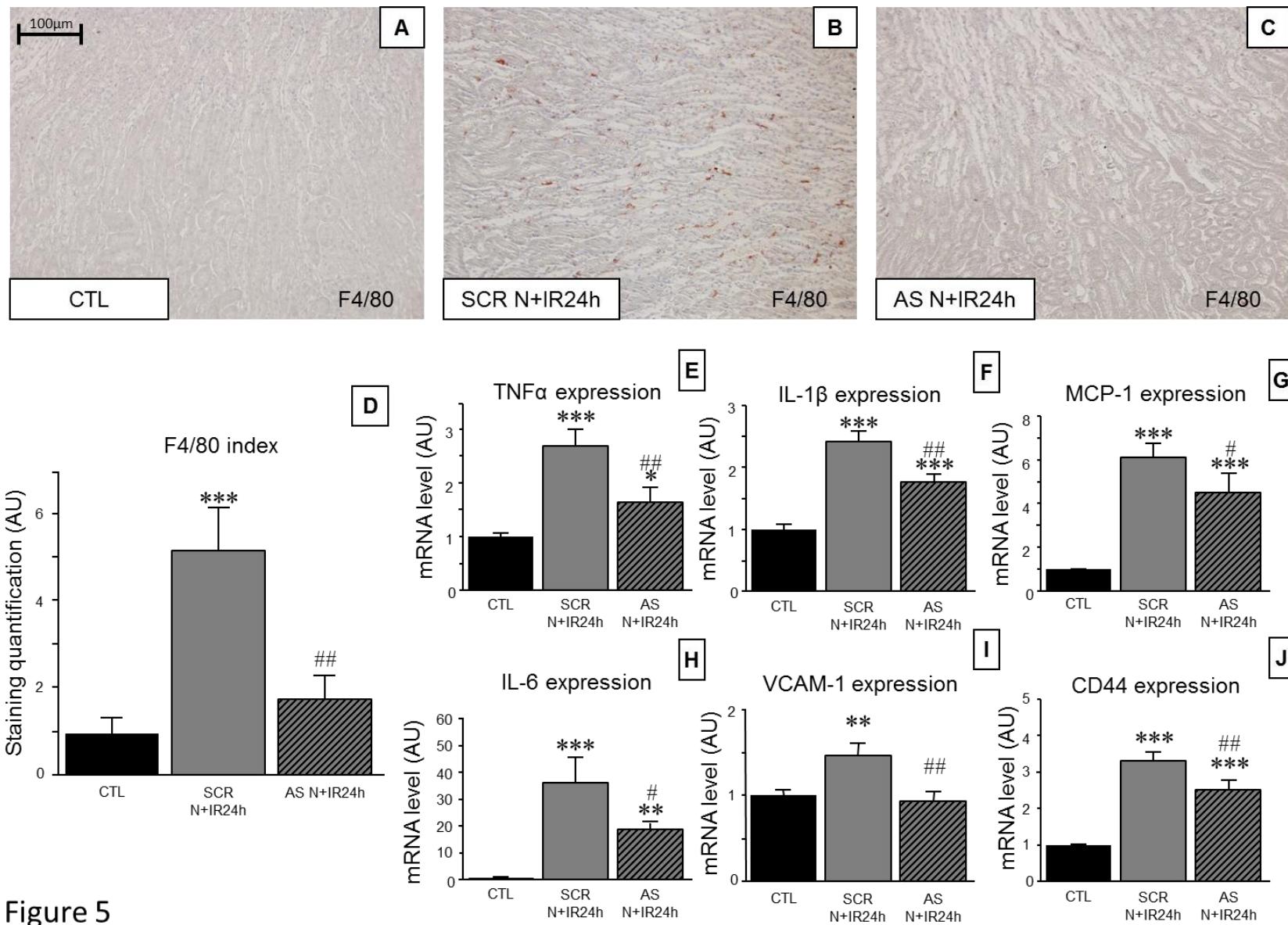


Figure 5

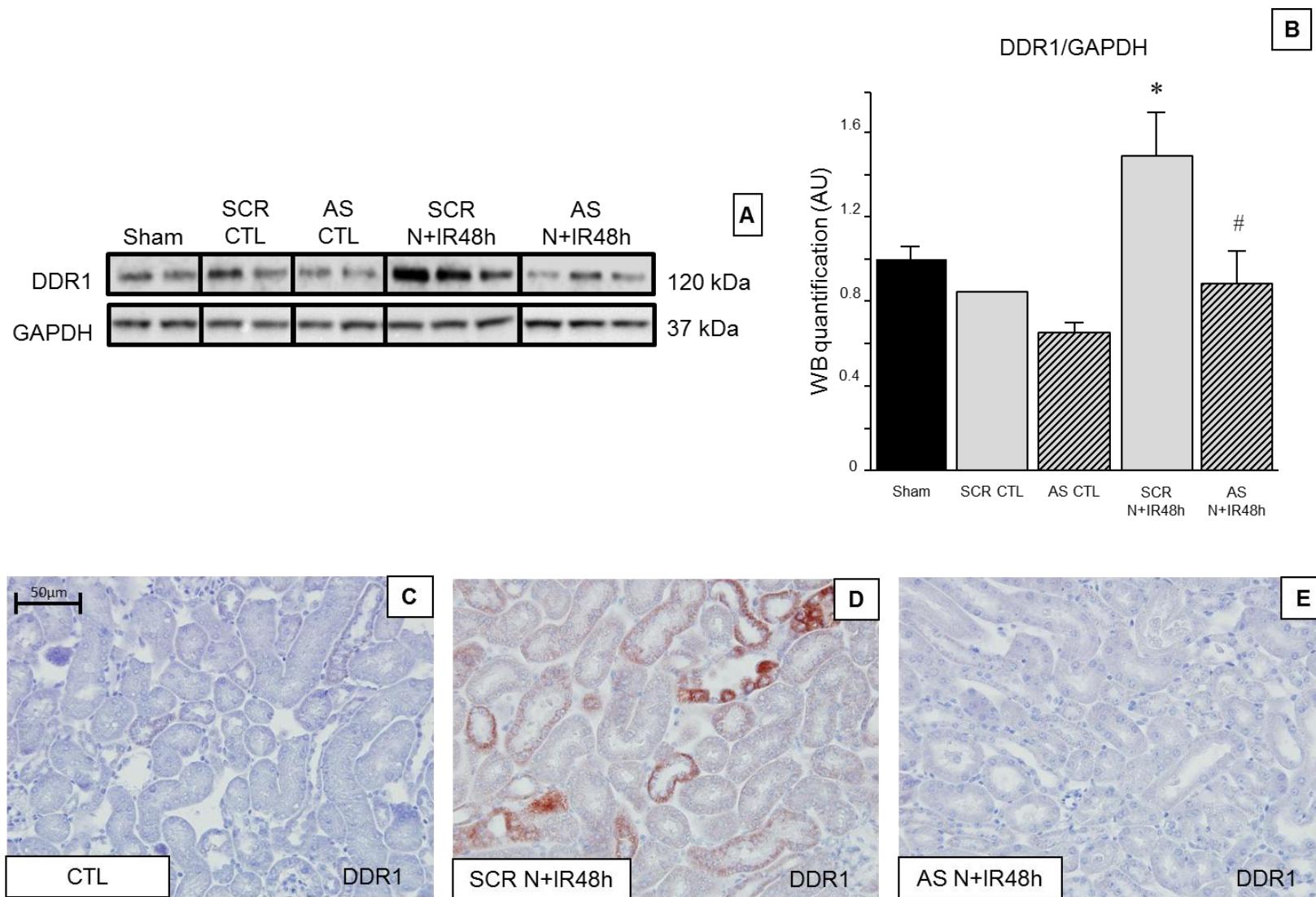


Figure 6

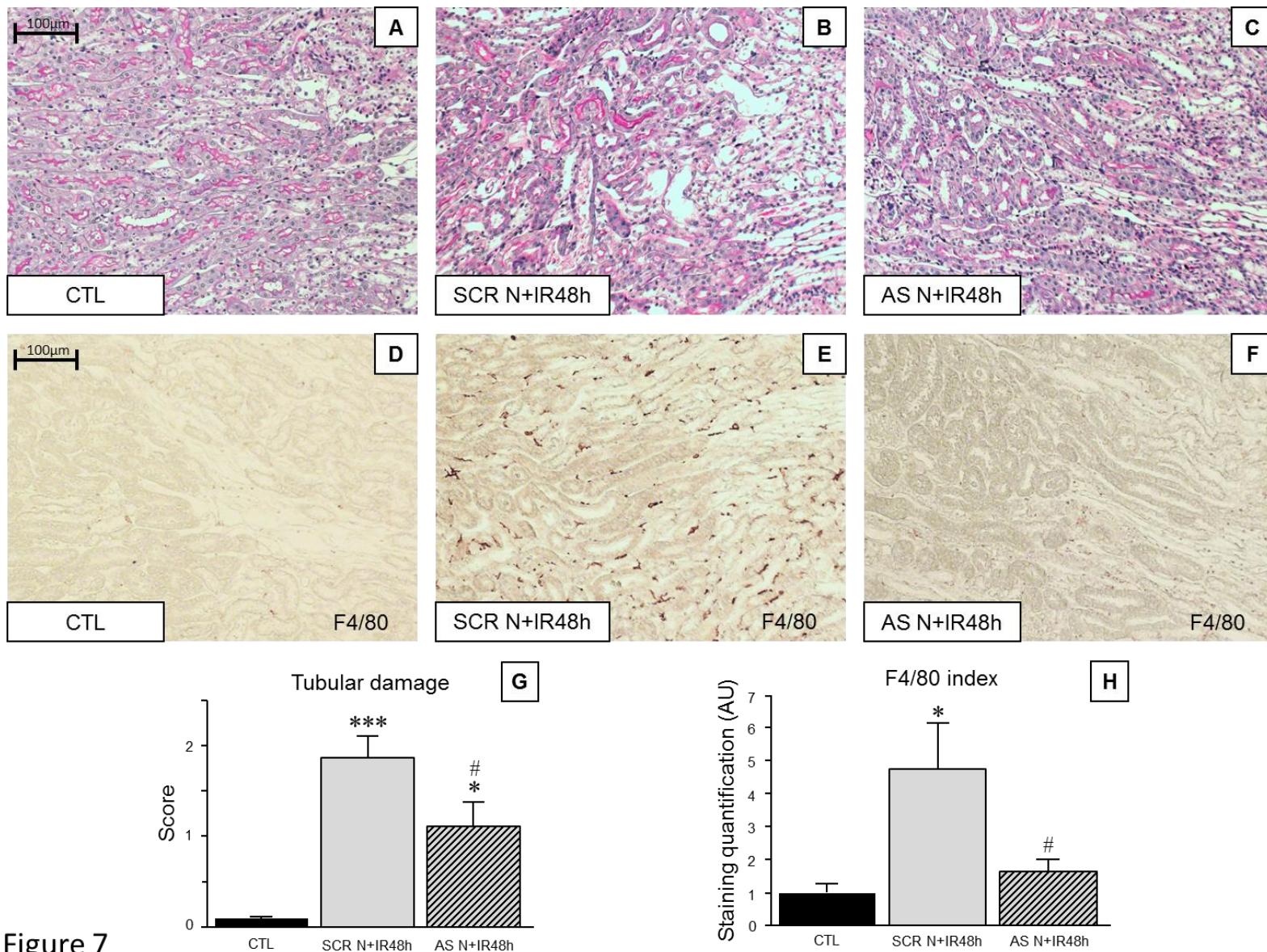


Figure 7

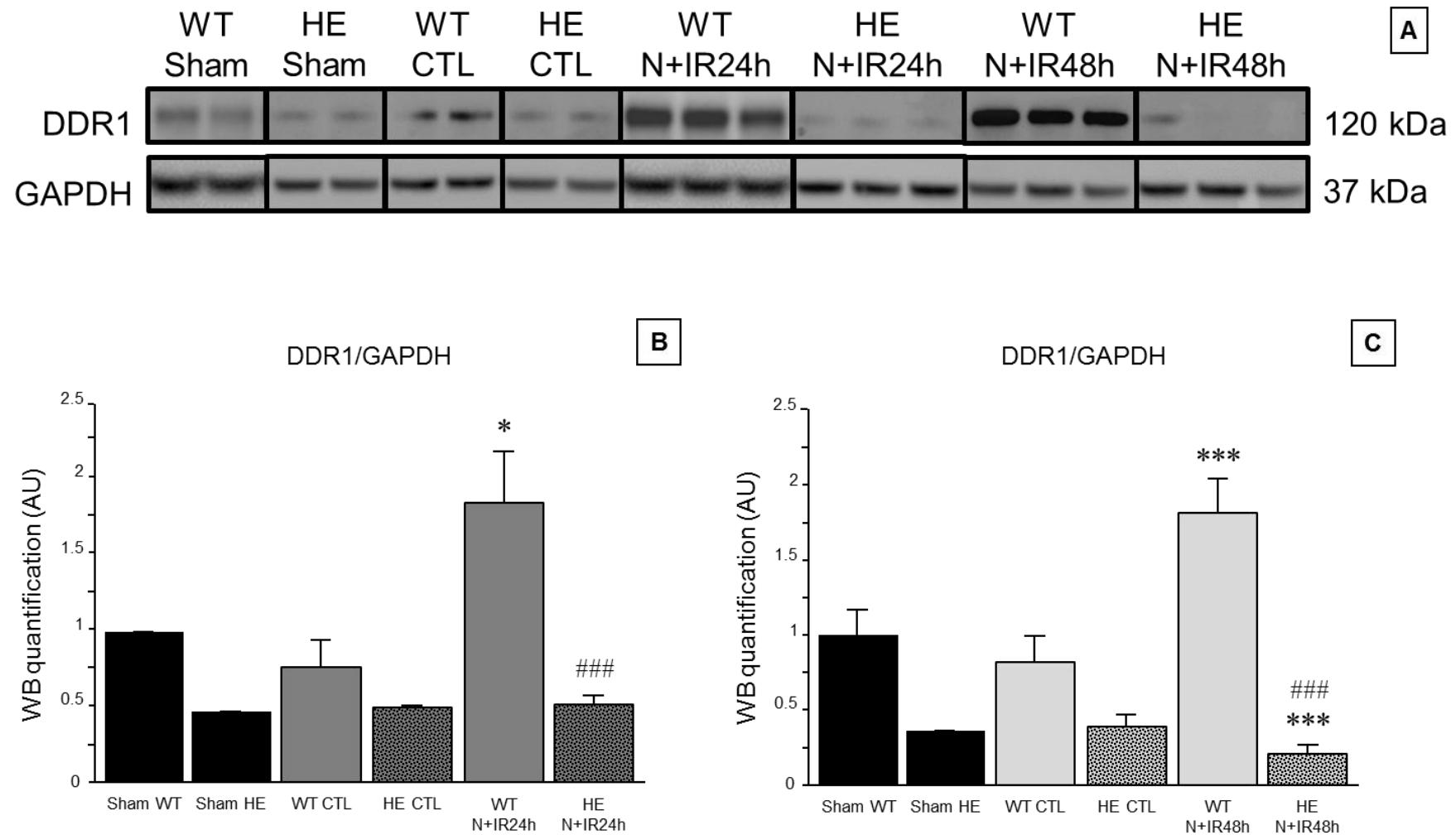


Figure 8

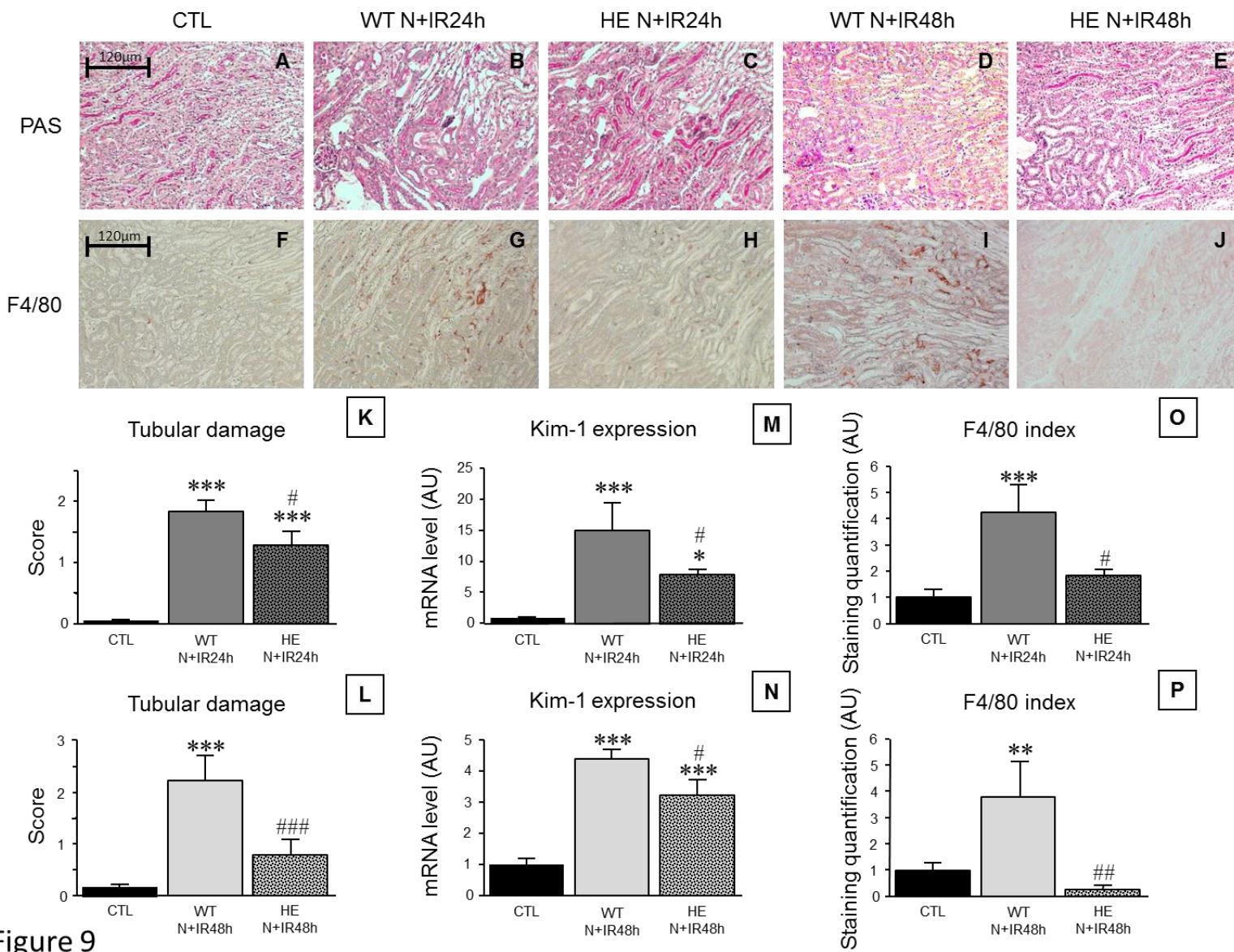


Figure 9

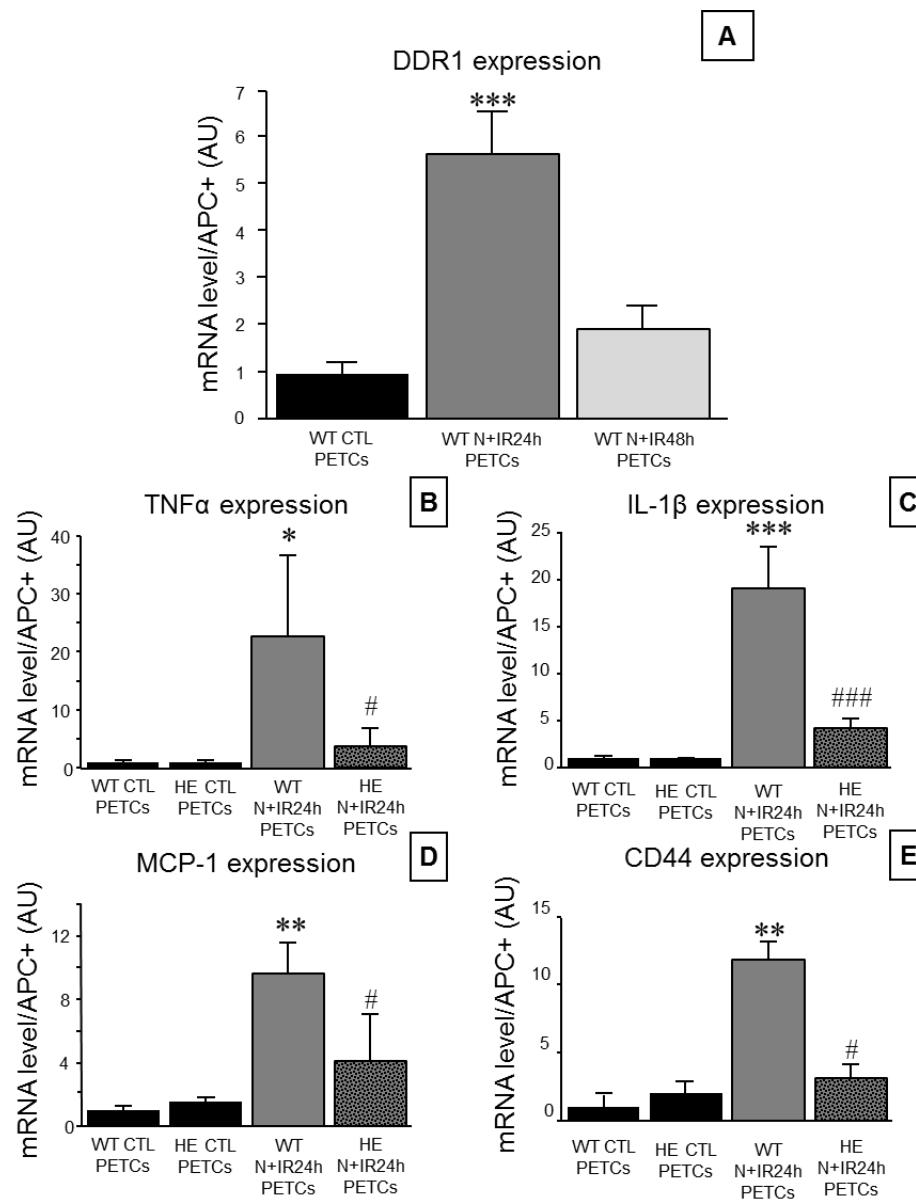


Figure 10

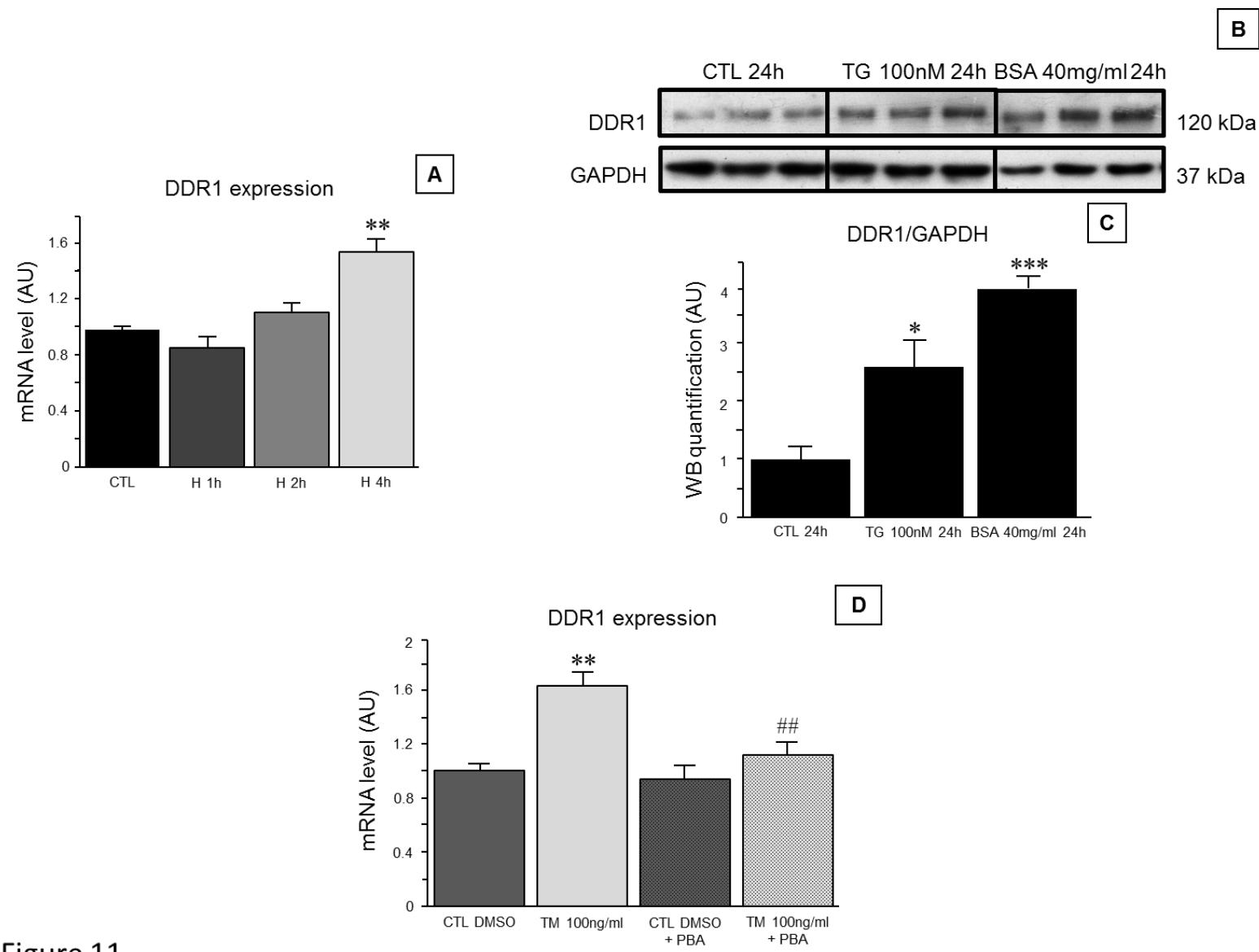


Figure 11

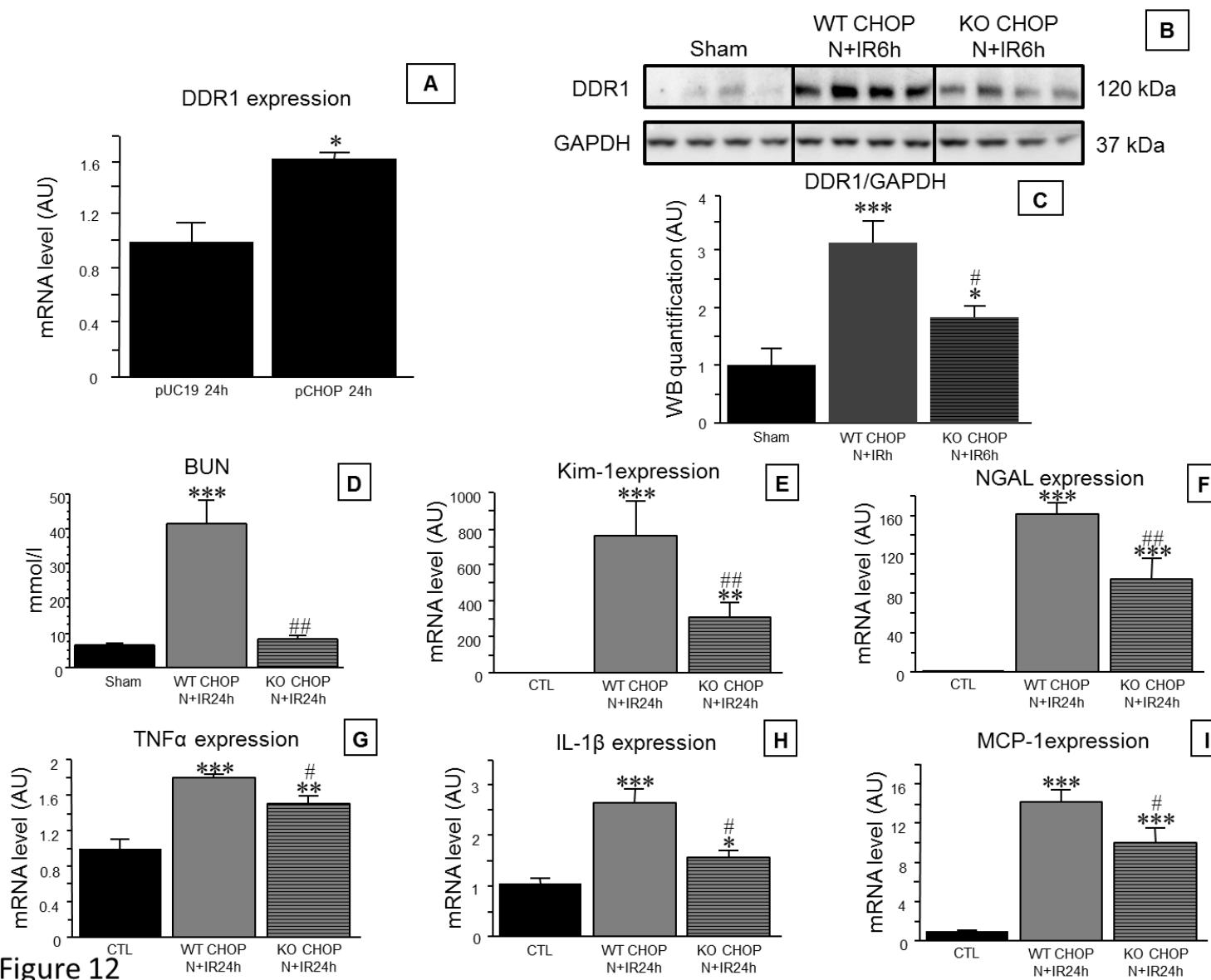


Figure 12

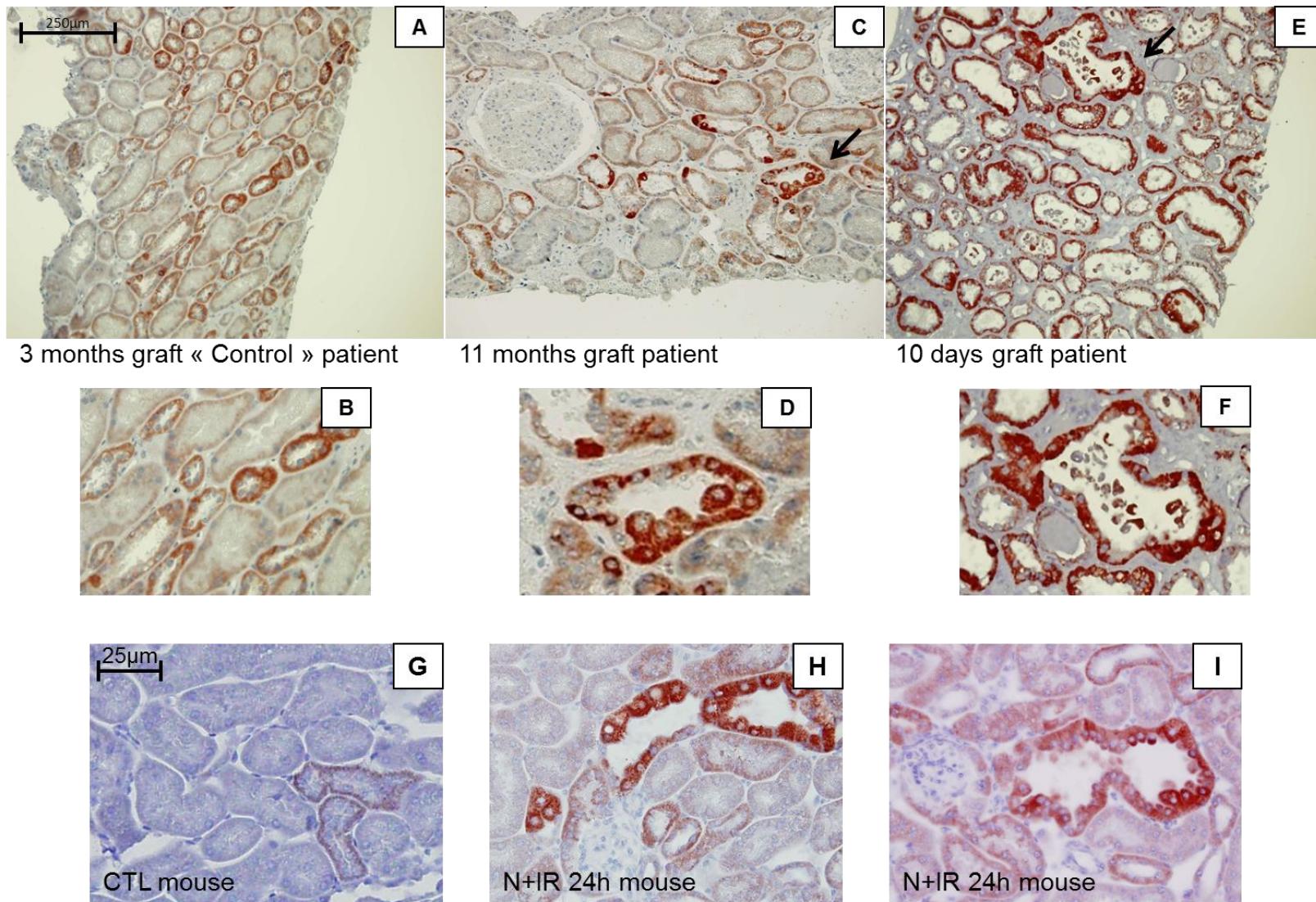


Figure 13

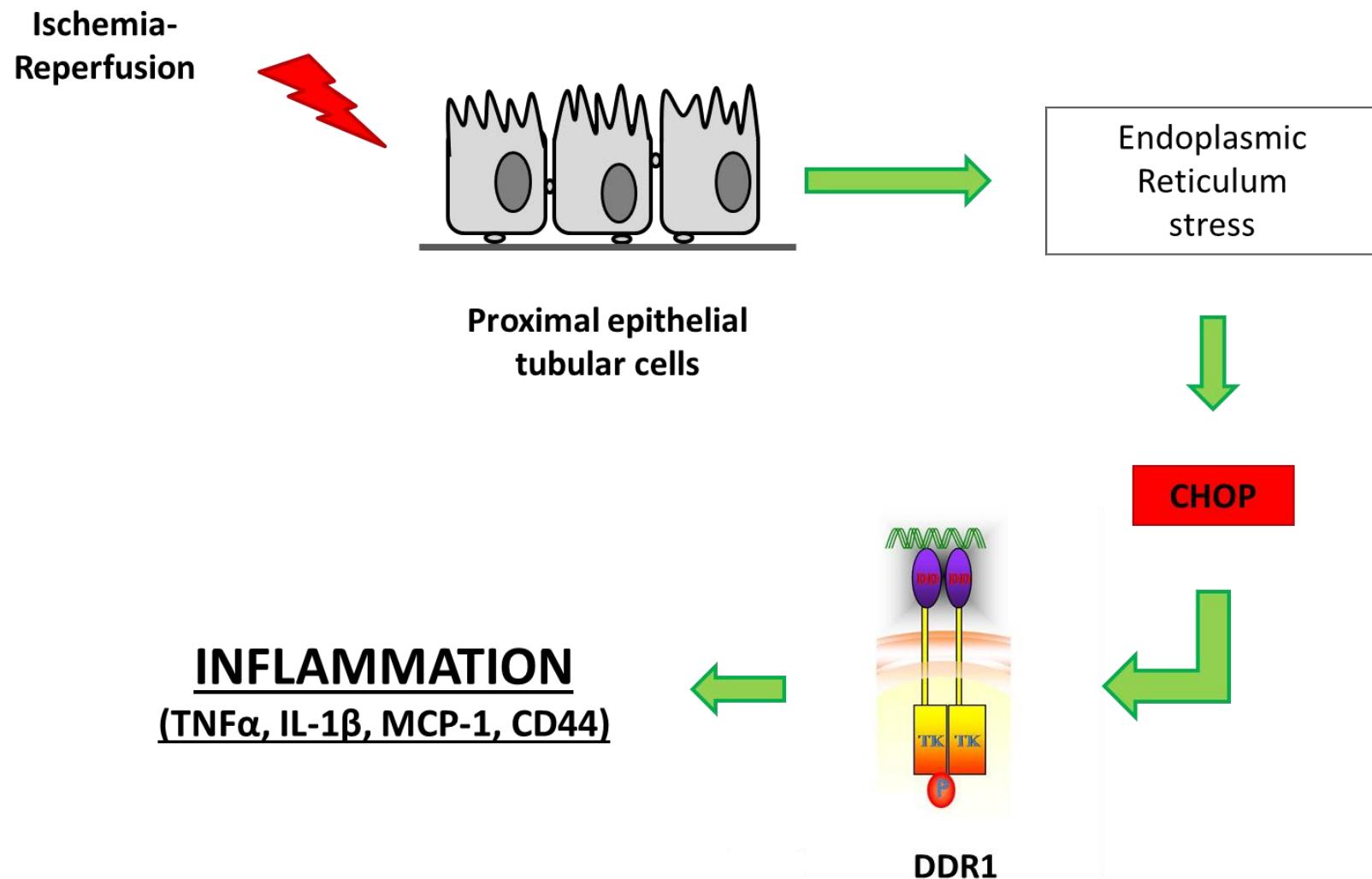
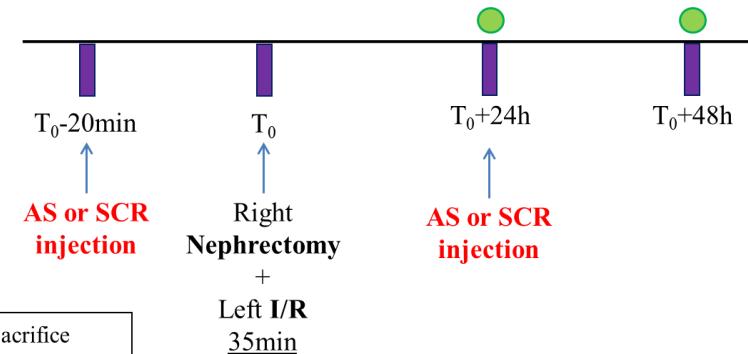
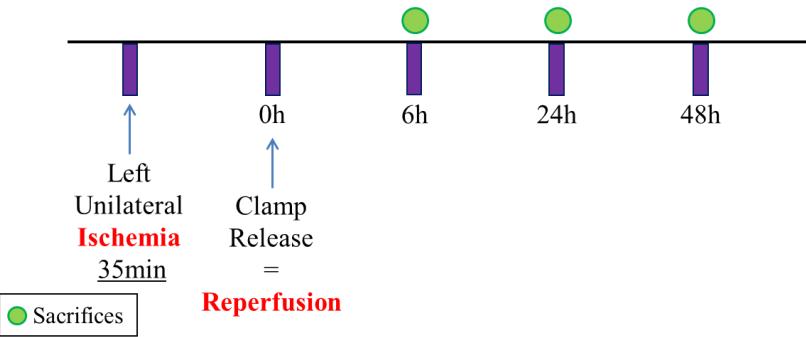
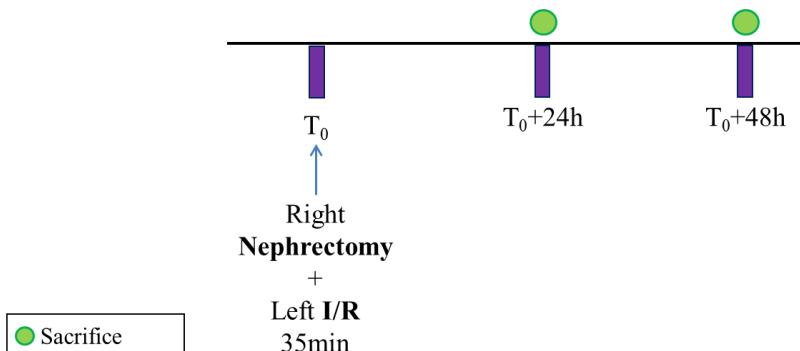


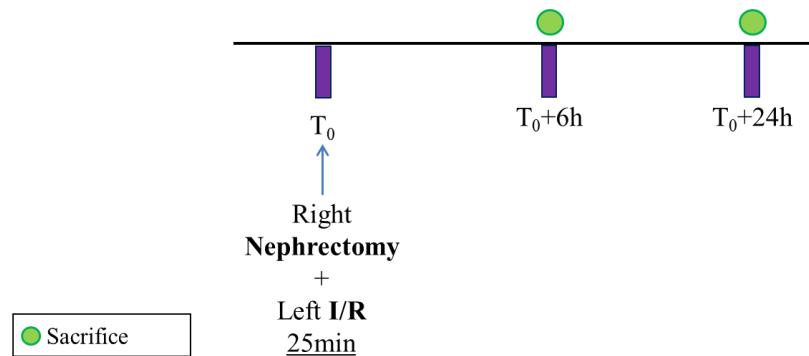
Figure 14



Supp. Figure 1

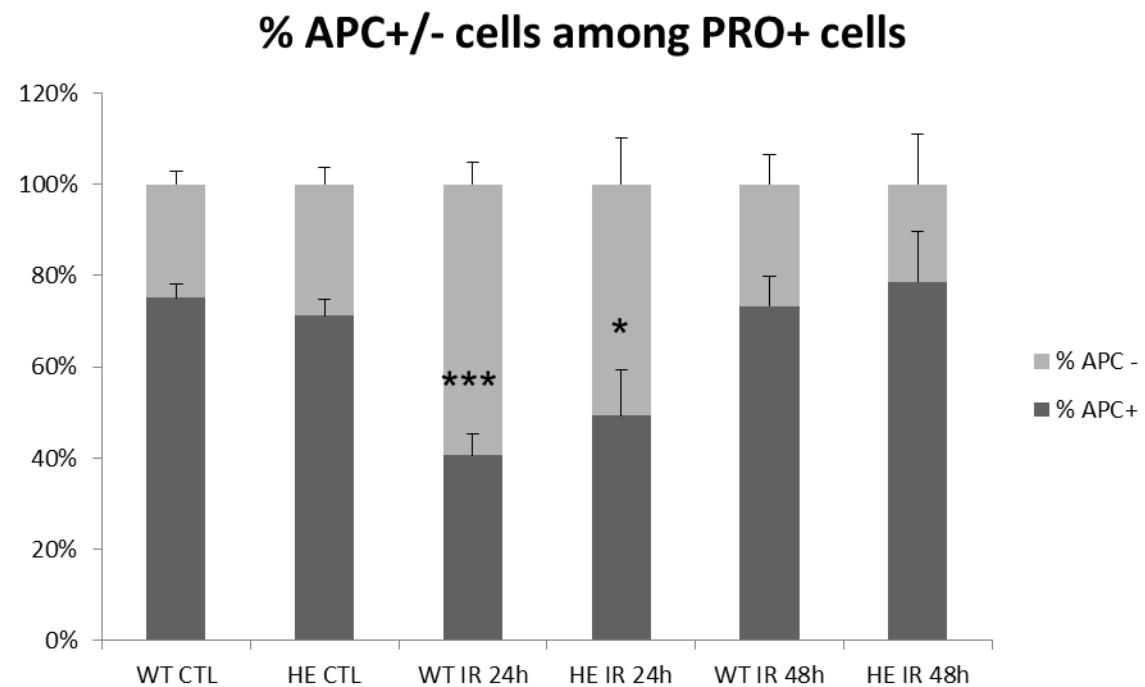


Supp. Figure 2



Supp. Figure 3

Supp. Figure 4



Supp. Figure 5

Tables

ODNs	Sequences
mDDR1 AS 1 Flc	C*A*C*TCCCAAGCCATCCA*C*C*T Flc
mDDR1 AS 6 Flc	C*T*A*TTGCTCCCTCTGTT*C*C*C Flc
mDDR1 AS 8 Flc	G*T*C*CTTCCAGTCCATCC*A*G*C Flc
mDDR1 SCR 1 Flc	A*C*C*CACACACCGACTCC*T*T*C Flc
mDDR1 SCR 6 Flc	C*G*T*CCTCTTACTCGTCC*T*T*C Flc
mDDR1 SCR 8 Flc	T*C*C*TCCGTACCTACGCG*T*C*A Flc

TABLE 1. *Design of AS and SCR ODNs*

Tested genes	Primers' sequences	
	Sense	Antisense
18S	5'-GAGCGAAAGCATTTGCCAAG-3'	5'-GGCATCGTTATGGTCGGAA-3'
YWHAZ	5'-CTTCCTGCAGGCCAGAAGC-3'	5'-GGGTTTCCTCCAATCACTAGC-3'
DDR1	5'-CTCCACCCATTCTGCAC-3'	5'-CAGAAGGAGGGCGGTAGGC-3'
Kim-1	5'-CCAACATCAACCAGAGTCTCTACC-3'	5'-TGTCTCATGGGACAAAATG-3'
NGAL	5'-CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAT-3'	5'-TCTGATCCAGTAGCGACAGC-3'
Vimentin	5'-CCAACCTTTCTCCCTGAA-3'	5'-TTGAGTGGGTGTCAACCAGA-3'
TNF- α	5'-TCTCTCATTCCCTGCTTGTGG-3'	5'-ATGAGAGGGAGGCCATTG-3'
IL-1 β	5'-TGTAATGAAAGACGGCACACC-3'	5'-TCTCTTTGGGTATTGCTTGG-3'
MCP-1	5'-CATCCACGTGTTGGCTCA-3'	5'-GATCATCTGCTGGTGAATGAGT-3'
IL-6	5'-GCTACCAAACGGATATAATCAGGA-3'	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
VCAM-1	5'-TGGTGAATGGAATCTGAACC-3'	5'-CCCAGATGGTGGTTCCCTT-3'
CD44	5'-ACTCAAGTGGGAACCAGGAC-3'	5'-GCCAAGATGATGAGGCCATT-3'

TABLE 2. *Primers used for qRT-PCR in mouse samples (mRNA strand sequences)*

Tested genes	Primers' sequences	
	Sense	Antisense
18S	5'-GAGCGAAAGCATTTGCCAAG-3'	5'-GGCATCGTTATGGTCGGAA-3'
GAPDH	5'-TCCACTGGCGTCTTCACC-3'	5'-GGCAGAGATGATGACCCTTT-3'
DDR1	5'-TCATTCGGCTGCTGGCGTG-3'	5'-CGGCTGCCCTGTCCCTCCAGC-3'

TABLE 3. *Primers used for qRT-PCR in human samples (mRNA strand sequences)*

Chapitre 4

*Etude de la
surexpression et/ou de
l'activation de DDR1
in vivo et in vitro*

A. Introduction

Les mécanismes moléculaires et cellulaires induits à la suite de la surexpression et de l'activation de DDR1 sont encore incomplètement connus et semblent être dépendants du contexte pathologique dans lequel on se place. En effet, la littérature prête à DDR1 des rôles dans la prolifération et la migration cellulaire, dans le remodelage de la MEC et dans l'inflammation et la fibrose.

Afin de mieux comprendre l'implication de DDR1 dans la pathogénèse rénale, nous avons créé un nouveau modèle de souris triples transgéniques permettant la surexpression inducible de DDR1 dans les cellules épithéliales tubulaires, le long du néphron. Nous présenterons dans ce chapitre la méthodologie employée et les résultats préliminaires obtenus dans ce modèle.

De plus, dans le cadre de notre collaboration avec un groupe pharmaceutique, nous avons effectué une étude comparative de l'efficacité de différents inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase de DDR1 dans un système *in vitro*. Certains résultats obtenus avec des inhibiteurs commerciaux et d'autres avec des inhibiteurs encore non publiés sont présentés dans ce chapitre.

B. Matériaux et Méthodes

Création de la lignée de souris triples transgéniques

La lignée de souris triples transgéniques contient les constructions : Pax8-rtTA, LC-1 et Tet-o/LacZ/DDR1 (Fig. 24) et les souris transgéniques Pax8-rtTA et LC-1 nous ont été fournies par le Dr Robert Koesters.

La lignée Pax8-rtTA (fond génétique mixte C57B6/DBA) est une lignée de souris exprimant le facteur de transcription rtTA (reverse tetracycline-dependent transactivator) sous le contrôle d'un fragment de 4,3 kb du promoteur murin Paxiline-8 (Pax8) conduisant à son

expression dans les cellules épithéliales tubulaires, le long du néphron (Fig. 24) (Traykova-Brauch et al., 2008 ; Koesters et al., 2010).

La lignée LC-1 (fond génétique mixte C57B6/Balbc) est une lignée de souris exprimant la luciférase et la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur bidirectionnel Tet-o constitué d'un enchaînement de séquences TRE (Tet responsive element) (Fig. 24) (Schonig et al., 2002 ; Traykova-Brauch et al., 2008 ; Koesters et al., 2010).

La lignée Tet-o/LacZ/DDR1 (fond génétique FVB) est une lignée de souris exprimant la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur bidirectionnel Tet-o en absence de cre-recombinase (souris double transgénique Pax8-rtTA x Tet-o/LacZ/DDR1). Le gène LacZ codant pour cette enzyme est floxé et suivi du gène codant pour le DDR1a murin (Fig. 24).

Cette lignée a été créée en utilisant une technique de transgénèse classique. Le transgène est injecté dans des pronuclei de cellules oeufs de souris FVB à très forte concentration induisant ainsi une possibilité d'insertion aléatoire de la construction dans le génome de la cellule. Une fois leur première division effectuée dans une étuve à 37°C, les embryons viables sont réimplantés dans une femelle pseudo-gestante. Par ce procédé, nous avons obtenu un fondateur transgénique sur 18 naissances qui a pu transmettre le transgène à sa descendance. Ce fondateur a ensuite été croisé avec des souris doubles transgéniques Pax8-rtTA x LC-1 pour créer les souris triples transgéniques.

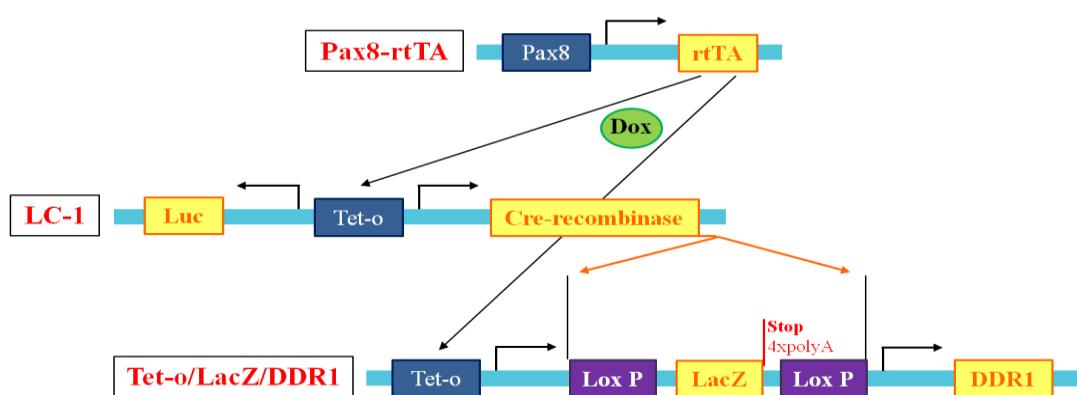


Figure 24 : Représentation schématique des trois constructions insérées dans le génome des souris triples transgéniques permettant la surexpression inductible de DDR1 dans les cellules tubulaires rénales, le long du néphron.

Chez la souris triple transgénique, en absence de doxycycline (dox) le facteur de transcription rtTA est exprimé dans les cellules épithéliales tubulaires rénales mais est inactif. En présence de dox, rtTA va lier cette molécule et prendre une conformation active lui permettant de reconnaître les séquences TRE constituant le promoteur Tet-o. Ainsi, la cre-recombinase va s'exprimer dans les cellules épithéliales tubulaires et exciser la séquence LacZ floxée de la troisième construction. La suppression de cette portion de la séquence du transgène permet ainsi le rapprochement du promoteur Tet-o et du gène DDR1, et enfin son expression.

Génotypage

L'ADN génomique des souris a été extrait et purifié à partir de prélèvements de queues en utilisant des colonnes « Dneasy Blood and Tissue Kit » (Qiagen). Le génotypage a ensuite été effectué par PCR dans les conditions suivantes : 1 cycle de 5 minutes à 95°C, 40 cycles de 1 minute à 95°C, puis 1 minute à 55°C, puis 1 minute à 72°C, et un cycle de 10 minutes à 72°C. Les séquences des amorces utilisées sont listées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour les génotypages des souris triples transgéniques.

Amorces	5' --> 3'	5' <-- 3'
Pax8-rtTA	CCATGTCTAGACTGGACAAGA	CTCCAGGCCACATATGATTAG
LC-1	TCGCTGCATTACCGGTCGATGC	CCATGAGTGAACGAACCTGGTCG
Tet-o/LacZ/DDR1	GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG	CATCACTGCTTCAGCCTGC

Protocoles d'induction de l'expression de DDR1

La dox a été administrée via l'eau de boisson des animaux à une concentration de 0,2 mg/ml avec 5% de sucre, à l'abri de la lumière sur une période de 10 jours ou 4 semaines (Traykova-Brauch et al., 2008 ; Koesters et al., 2010). Les animaux ne recevant pas de dox étaient sous sucre et les biberons étaient tous changés une fois par semaine.

- Test du modèle

Une souris double transgénique (Pax8-rtTA x Tet-o/LacZ/DDR1) et une souris triple transgénique mâles âgées de 3 mois ont été traitées pendant 10 jours avec de la dox. Au moment du sacrifice, les reins de la souris double transgénique ont été incubés dans une solution de fixation dans le but de faire une coloration à la β -galactosidase et les reins de la souris triple transgénique ont été fixés puis inclus en paraffine afin d'effectuer une immunohistochimie pour DDR1.

- Induction de l'expression de DDR1 pendant 4 semaines

Douze souris mâles âgées de 3 à 4 mois ont été traitées ou non à la dox pendant 4 semaines. Six d'entre elles étaient triples transgéniques, les six autres étaient double transgéniques et la moitié de chaque groupe a reçu de la dox ($n = 3$ par groupe). Les souris ont été pesées une fois par semaine et leurs urines ont été prélevées. A la fin des 4 semaines, au moment du sacrifice, les reins et le sang ont été prélevés afin d'analyser différents paramètres. Les trois groupes contrôles, triples transgéniques sans dox, doubles transgéniques sans dox et doubles transgéniques avec dox ont donné des résultats comparables et ont donc été regroupés sous le nom de groupe « CTL » pour contrôle, opposé au groupe de souris triples transgéniques traitées à la dox nommé « Triple Tg ».

Coloration à la β -galactosidase

La coloration à la β -galactosidase a été effectuée grâce au kit « LacZ tissue staining kit » (InvivoGen). Brièvement, les reins ont été prélevés, coupés transversalement en deux moitiés égales et fixés à 4°C pendant une heure dans la solution de fixation du kit. Les reins ont ensuite été congelés dans l'azote liquide puis coupés au cryostat à une épaisseur de 10 μm . Après lavage, les coupes ont été incubées sur la nuit à 37°C dans une solution de coloration contenant la molécule X-Gal dont le clivage par la β -galactosidase est responsable de la

coloration bleue. Enfin, les lames ont été lavées puis montées avant d'être observées au microscope optique.

Dosage de la protéinurie et de l'urémie, Immunohistochimie pour DDR1, pour F4/80 et pour CD3ε, et Coloration au Trichrome de Masson et au Rouge Sirius

Ces techniques ont été réalisées telle que décrites dans le premier et le deuxième article.

Culture cellulaire et traitements

La lignée cellulaire humaine U2-OS, dérivée d'un sarcome modérément différencié du tibia d'une jeune fille de 15 ans, a été cultivée dans du milieu Mc Coy's 5A (Gibco BRL) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et de 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco BRL) tel que précédemment décrit (Kim et al., 2013). Ces cellules expriment spontanément DDR1 et ce dernier peut être phosphorylé en présence de collagène de type I (Kim et al., 2013).

- Induction de la phosphorylation de DDR1

Afin d'induire la phosphorylation de DDR1, des cellules U2-OS entre 80 et 90% de confluence ont été traitées avec du collagène de type I en solution à une concentration de 1 µg/ml pendant 3, 6, 9 ou 14h. Par la suite, les protéines ou les ARNm ont été extraits, ou les cellules ont été marquées en immunofluorescence pour DDR1.

- Evaluation de l'efficacité d'inhibiteurs pharmacologiques, commerciaux ou non

Dans le but de tester et de comparer l'efficacité d'inhibiteurs pharmacologiques commerciaux ou non, les cellules U2-OS ont été pré-incubées pendant une heure avec différents composés tels que Dasatinib, Imatinib, Bosutinib, Nilotinib, Ponatinib et des composés non-commerciaux que nous appellerons composés A et B. Ensuite, le collagène de type I en

solution a été ajouté à la concentration de 1 µg/ml pendant 14h. Les protéines ont ensuite été extraites afin de tester la phosphorylation de DDR1 en western blot.

Extraction de protéines et western blot, extraction d'ARNm et qRT-PCR et immunofluorescence pour DDR1

Ces techniques ont été réalisées telle que décrites dans le deuxième article.

Pour le western blot anti-phospho-DDR1, un anticorps de lapin anti-phosphoY792-DDR1 dilué au 1000^{ème} et incubé sur la nuit à 4°C (Cell Signaling) a été utilisé. Après révélation, la membrane a été déshybridee puis incubée avec l'anticorps anti-DDR1.

Pour le western blot anti-Hsc70, un anticorps de rat dilué au 10000^{ème} et incubé sur la nuit à 4°C (Abcam) a été utilisé.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA suivi d'un test de Fisher (Logiciel Statview, SAS Institute). Les résultats sont présentés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne et sont considérés comme étant statistiquement significatifs pour une valeur de $p \leq 0,05$.

C. Résultats

L'expression de DDR1 était hétérogène et principalement induite dans les tubules distaux.

La coloration à la β-galactosidase effectuée sur la souris double transgénique Pax8-rtTA x Tet-o/LacZ/DDR1 après 10 jours de traitement à la dox a montré une hétérogénéité importante de l'activité de cette enzyme. Celle-ci était principalement détectée au niveau des tubules distaux mais on pouvait tout de même noter un marquage de quelques tubules

proximaux (Fig. 25). Comme attendu, aucun marquage n'était détecté chez la souris contrôle WT (Traykova-Brauch et al., 2008). De la même manière, l'expression protéique de DDR1, chez la souris triple transgénique, était hétérogène et principalement distale. Cependant, elle était beaucoup plus marquée et étendue que la coloration à la β -galactosidase (Fig. 26). Tandis que l'expression physiologique de DDR1 est décrite dans les CML vasculaires et les cellules épithéliales du tubule distal (Vogel et al., 2006), le marquage de DDR1 était à peine perceptible chez la souris WT. La souris triple transgénique surexprimant fortement DDR1, il est probable qu'à temps d'exposition égale au révélateur, on ne distinguait pas le marquage chez la WT qui était alors beaucoup plus faible (Fig. 26).

Malgré l'hétérogénéité des résultats, l'obtention d'un marquage démontre que le transgène Tet-o/LacZ/DDR1 s'est inséré dans l'euchromatine de la cellule oeuf, rendant ainsi possible sa transcription.

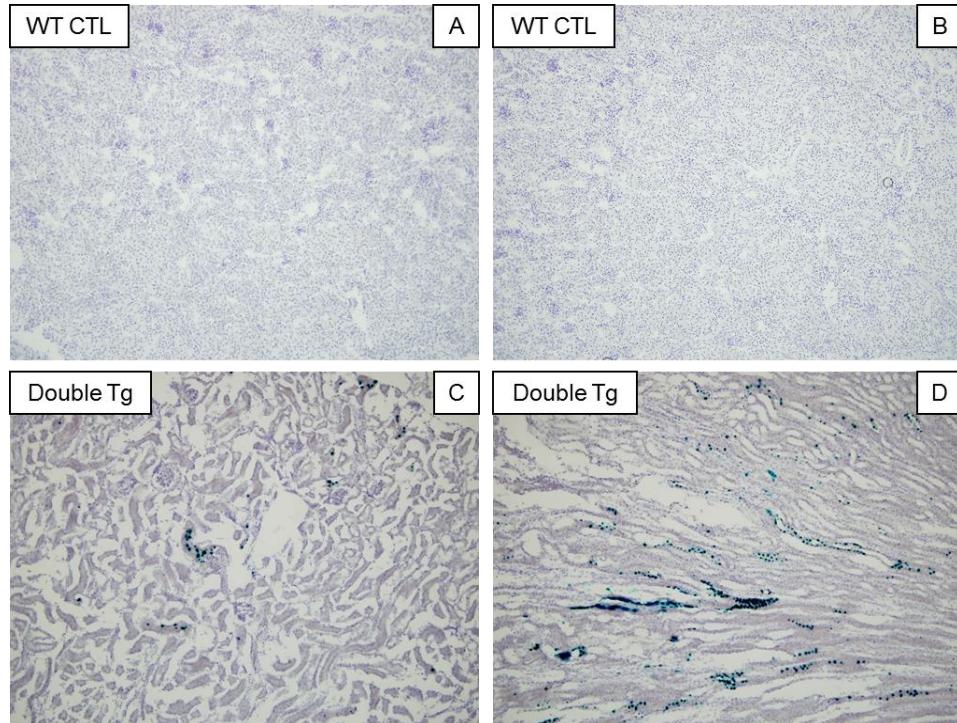


Figure 25 : Images représentatives d'une coloration à la β -galactosidase effectuée sur des coupes congelées de reins de souris de type sauvage (A-B) ou double transgénique Pax8-rtTA x Tet-o/LacZ/DDR1 (C-D) traitées à la dox pendant 10 jours, dans le cortex (A, C) ou dans la médullaire (B, D) observées au microscope optique au grossissement X100.

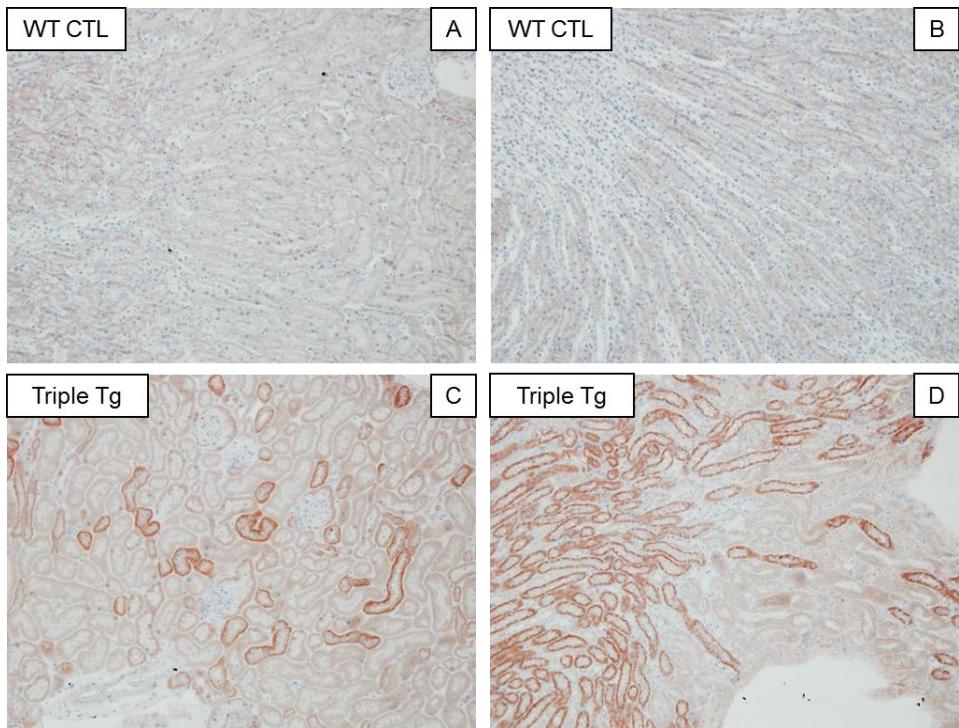


Figure 26 : Images représentatives d'une immunohistochimie pour DDR1 effectuée sur des coupes en paraffine de reins de souris de type sauvage (A-B) ou triple transgénique (C-D) traitées à la dox pendant 10 jours, dans le cortex (A, C) ou dans la médullaire (B, D) observées au microscope optique au grossissement X100.

L'expression prolongée de DDR1 induisait une inflammation et une fibrose rénale.

Afin de déterminer les éventuels effets qu'aurait la surexpression de DDR1 sur une période plus prolongée, nous avons traité nos souris à la dox pendant 4 semaines. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'urémie, la protéinurie et la variation du poids corporel au cours du protocole mais aucun de ces trois paramètres n'était augmenté chez les souris Triple Tg par rapport aux souris CTL (résultats non montrés). L'analyse de l'histologie rénale des animaux n'a pas montré d'effet majeur sur les tubules eux-mêmes, à part une vacuolisation ponctuelle retrouvée dans les deux groupes. Nous avons également noté une dilatation apparente des capillaires péri-tubulaires qui semblait un peu plus marquée chez les souris Triple Tg que chez les souris du groupe CTL. Toutefois, l'effet le plus évident était la présence de foyers de fibrose interstitielle, chez les souris Triple Tg, qui étaient beaucoup moins développés et en

moins grand nombre chez les souris CTL (Fig. 27). C'est pourquoi, nous avons effectué une coloration au rouge Sirius afin de marquer les dépôts de collagènes fibrillaires et de les quantifier.

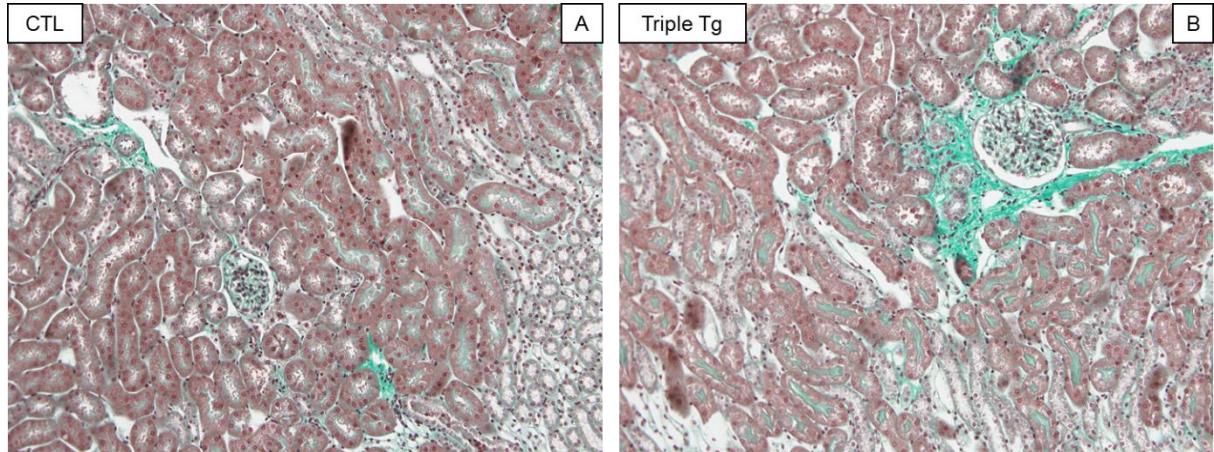


Figure 27 : Images représentatives d'une coloration au Trichrome de Masson effectuée sur des coupes en paraffine de reins de souris triples transgéniques traitées (B) ou non (A) à la dox pendant 4 semaines, dans la zone de transition cortico-médullaire, observées au microscope optique au grossissement X200.

La quantification de l'accumulation des collagènes fibrillaires a montré le développement d'une fibrose interstitielle plus importante chez les animaux Triple Tg par rapport aux animaux CTL dans la zone de transition cortico-médullaire (Fig. 28). Cette fibrose était accompagnée d'un infiltrat de macrophages significativement augmenté chez les souris Triple Tg (Fig. 29). Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence d'infiltration des lymphocytes dans le parenchyme rénal (résultats non montrés).

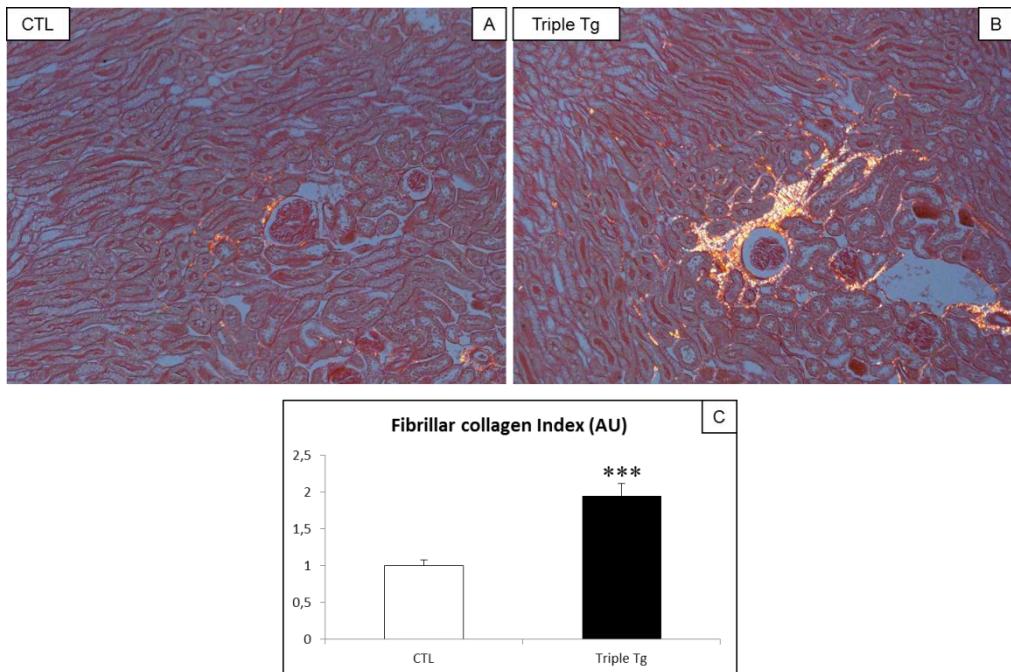


Figure 28 : Evaluation des dépôts de collagènes fibrillaires interstitiels. (A-B) Images représentatives d'une coloration au Rouge Sirius effectuée sur des coupes en paraffine de reins de souris triples transgéniques traitées (B) ou non (A) à la dox pendant 4 semaines, dans la zone de transition cortico-médullaire, observées au microscope polarisé au grossissement X100. (C) Quantification des dépôts de collagènes fibrillaires interstitiels. N = 3-9. *** p<0.001 vs CTL.

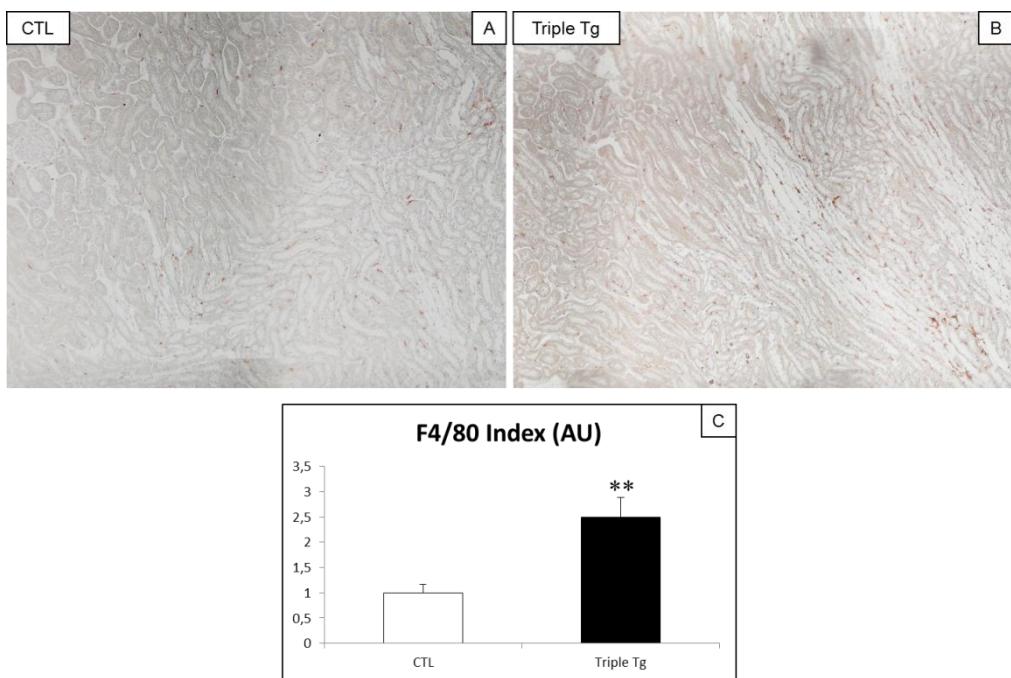


Figure 29 : Evaluation de l'infiltrat macrophagique dans l'interstitium rénal. (A-B) Images représentatives d'une immunohistochimie pour F4/80 effectuée sur des coupes en paraffine de reins de souris triples transgéniques traitées (B) ou non (A) à la dox pendant 4 semaines, dans la zone de transition cortico-médullaire, observées au microscope polarisé au grossissement X100. (C) Quantification du marquage F4/80. n = 3-9. ** p<0.01 vs CTL.

La surexpression artificielle de DDR1 au niveau tubulaire, même hétérogène, semble conduire au développement d'une inflammation et d'une fibrose rénale. Cependant, l'étude du phénotype induit doit être complétée par d'autres expérimentations dont certaines *in vitro* afin d'étudier les mécanismes moléculaires plus en détails.

Le collagène de type I soluble induisait la phosphorylation de DDR1 dans la lignée cellulaire U2-OS.

Le traitement des cellules U2-OS au collagène de type I pendant uniquement 3h ne conduisait pas à une phosphorylation détectable de DDR1 (résultats non montrés). Ce résultat était cohérent avec la lente activation de ce RTK décrite dans la littérature (Shrivastava et al., 1997 ; Vogel et al., 1997). En revanche, une incubation de 6h était suffisante pour induire la phosphorylation de DDR1 (Fig. 30A, B, D). En accord avec la littérature, cette activation du récepteur était accompagnée de son clivage, conduisant à une diminution significative de la détection de sa forme totale (Fig. 30A, C) (Vogel et al., 2002). Cependant, il est peu probable que ce clivage menait à la dégradation immédiate du fragment intracellulaire car le marquage de DDR1 ne semblait pas diminué après le traitement au collagène I (Fig. 31). De plus, il semblait y avoir une localisation nucléaire de DDR1 lorsque sa phosphorylation était induite dans cette lignée cellulaire. Ce phénomène était bien moins marqué dans les cellules CTL (Fig. 31). Enfin, en parallèle de ce marquage nucléaire, on pouvait remarquer un marquage cytoplasmique ponctuel ainsi qu'un marquage membranaire plus ou moins défini (Fig. 31).

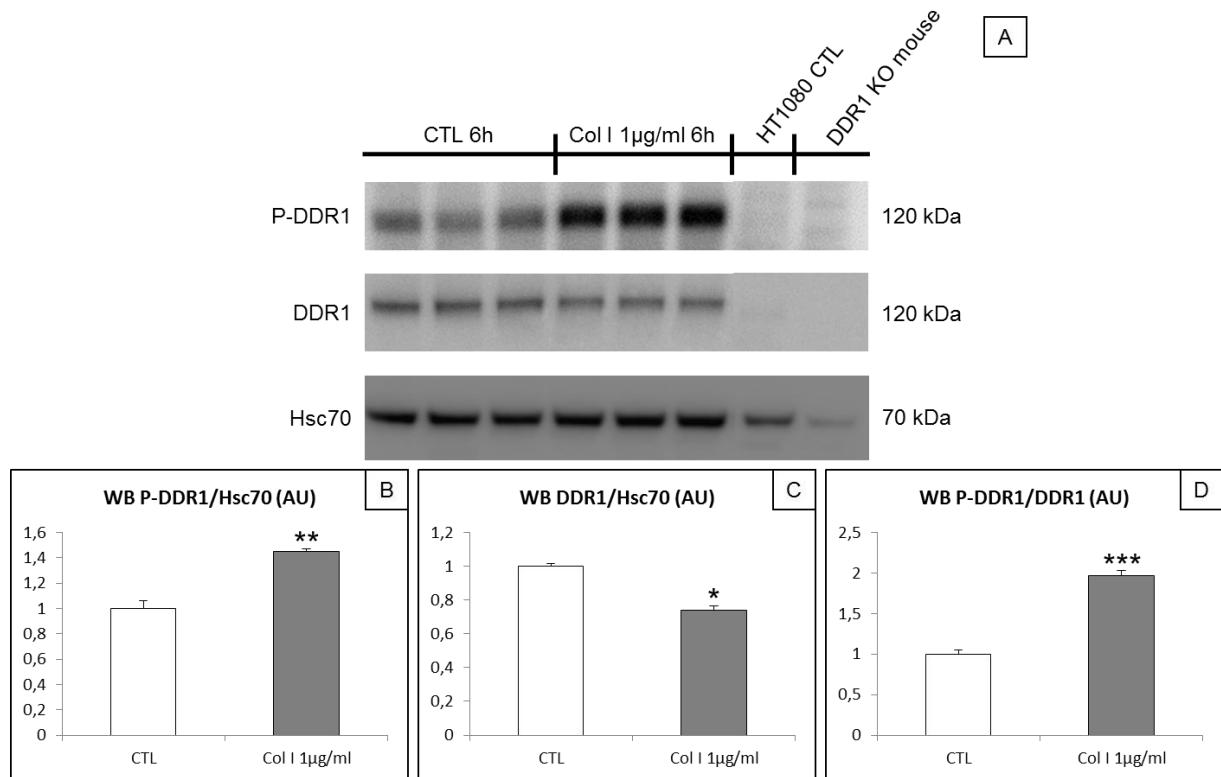


Figure 30 : Détection de la phosphorylation de DDR1 dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement ou non au collagène de type I à 1µg/ml pendant 6h, et dans deux contrôles négatifs : une lignée de cellules épithéliales humaines n'exprimant pas DDR1 à l'état basal, "HT1080 CTL", et un extrait protéique de rein d'une souris KO DDR1, "DDR1 KO mouse". (A) Western blot pour P-DDR1, DDR1 et une protéine de référence, Hsc70. (B-D) Quantifications des western blot. n = 3. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs CTL.

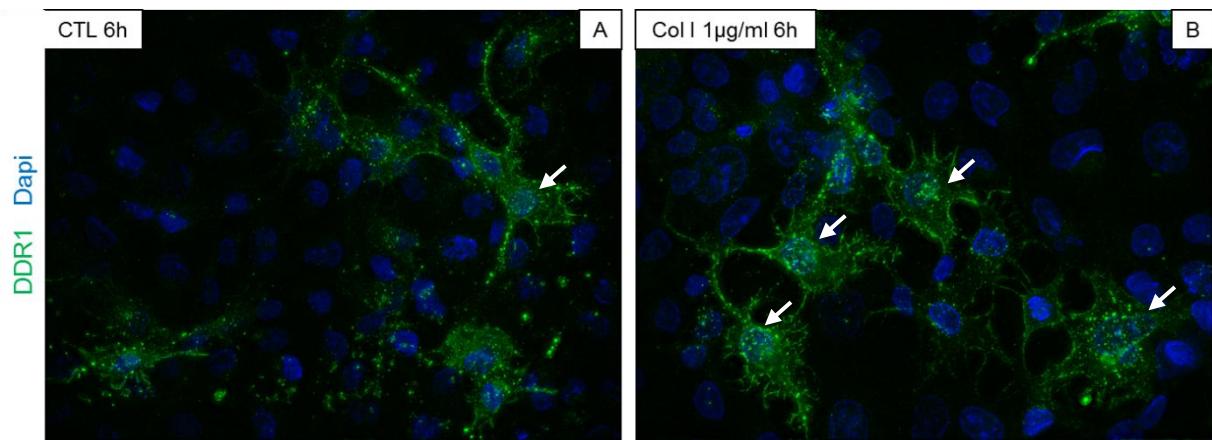


Figure 31 : Profil d'expression de DDR1 en immunofluorescence dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement (B) ou non (A) au collagène de type I à 1µg/ml pendant 6h, observée au microscope inversé à fluorescence au grossissement X400. Les flèches blanches indiquent la localisation nucléaire de DDR1.

Le traitement au collagène I des cellules U2-OS durant 6 à 9h, mais pas 3h, conduisait à l'augmentation de l'expression des gènes CD44 et Vimentine qui sont impliqués dans l'inflammation, la transition épithélio-mésenchymateuse et la tumorigenèse (Fig. 32) (Puré et Cuff, 2001 ; Fabregat et al., 2016). Etant donné les temps d'induction de l'expression de ces gènes, il est possible qu'ils soient induits par l'activation de DDR1. Cependant, d'autres expérimentations telles que l'inhibition spécifique de DDR1 dans ces conditions, sont nécessaires afin de le confirmer.

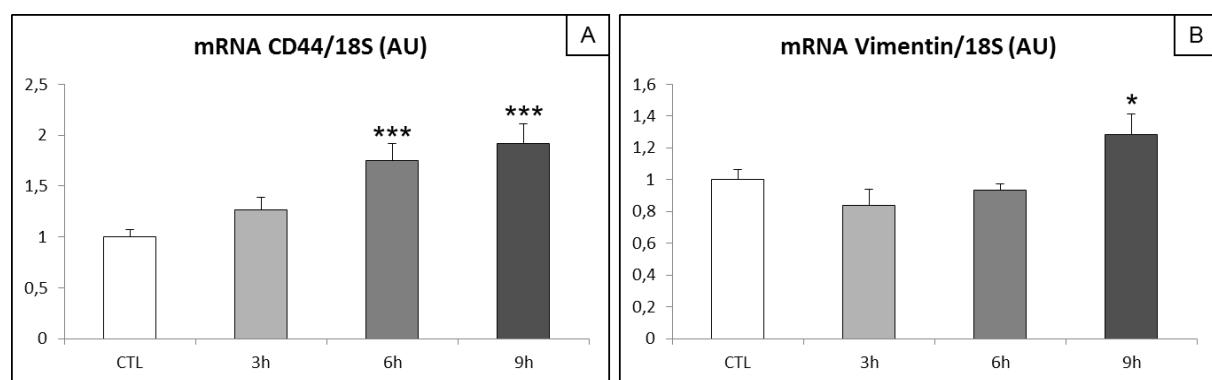


Figure 32 : Expressions des gènes CD44 (A) et Vimentine (B), mesurées en qPCR et normalisées par l'expression du gène de référence 18S, dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement ou non au collagène de type I à 1 μ g/ml pendant 3, 6 et 9h. n = 3. * p<0.05, *** p<0.001 vs CTL.

L'efficacité sur DDR1 des différents inhibiteurs pharmacologiques était variable dans la lignée cellulaire U2-OS.

Dans le cadre de notre collaboration avec un laboratoire pharmaceutique, et afin d'identifier des inhibiteurs pharmacologiques efficaces contre la phosphorylation de DDR1, nous avons comparé l'efficacité de plusieurs composés inhibiteurs de tyrosine-kinase ayant un effet sur DDR1 d'après la littérature, ainsi que de plusieurs composés non-commerciaux. Une partie des résultats obtenus sont présentés dans cette partie (Fig. 33 et 34).

L'induction de la phosphorylation de DDR1 était maintenue jusqu'à 14h de traitement au collagène I (Fig. 30, 33 et 34). En revanche, l'ajout de certains composés commerciaux tels

que le dasatinib, l’imatinib, le bosutinib, et des composés non commerciaux A et B, diminuait significativement cette activation. De plus, le dasatinib, le composé A et le composé B diminuaient également significativement l’autophosphorylation basale détectée.

Le dasatinib et l’imatinib, à la différence des autres composés testés, avaient aussi un effet sur le clivage de la forme totale de DDR1 dont la détection était partiellement ou totalement restaurée selon la dose utilisée. La dose nécessaire pour obtenir un effet inhibiteur significatif était plus faible pour les composés commerciaux que pour les composés non-commerciaux (Fig. 33 et 34). Cependant, la spécificité de ces différentes molécules n’était probablement pas la même.

Enfin, le nilotinib et le ponatinib, pourtant décrits parmi les inhibiteurs pharmacologiques efficaces contre DDR1 dans la littérature (Bantscheff et al., 2007 ; Rix et al., 2007 ; Canning et al., 2014), n’ont pas eu d’effet sur la phosphorylation de celui-ci dans cette lignée cellulaire (Fig. 33). Il en était de même pour plusieurs autres composés, commerciaux ou non, testés (résultats non montrés).

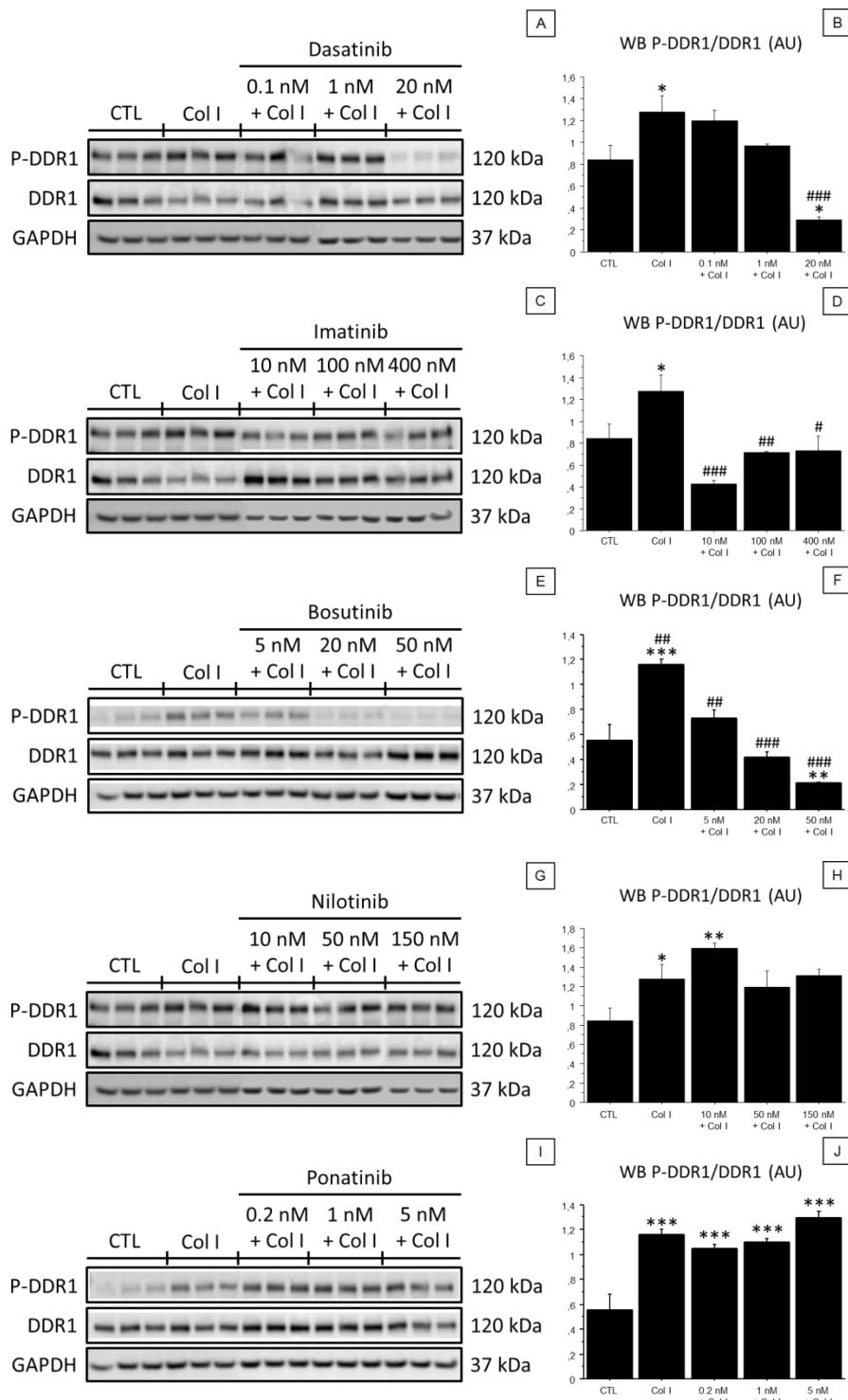


Figure 33 : Détection de la phosphorylation de DDR1 dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement ou non au collagène de type I à 1 μ g/ml pendant 14h en présence ou non d'un inhibiteur commercial de tyrosine kinase : Dasatinib (A, B), Imatinib (C, D), Bosutinib (E, F), Nilotinib (G, H), Ponatinib (I, J). (A, C, E, G, I) Western blot pour P-DDR1, DDR1 et une protéine de référence, GAPDH. (B, D, E, H, J) Quantifications des western blot. n = 3. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs CTL ; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Col I.

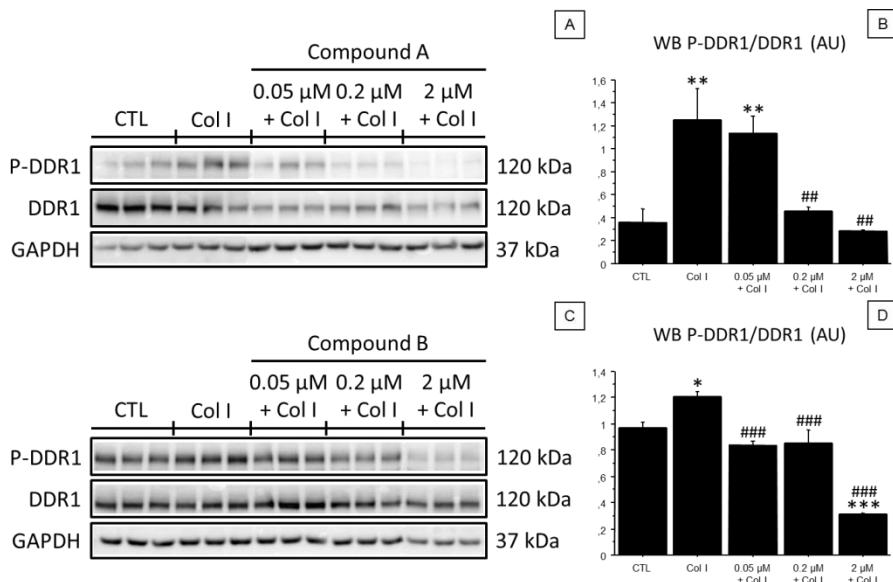


Figure 34 : Détection de la phosphorylation de DDR1 dans la lignée cellulaire U2-OS après traitement ou non au collagène de type I à 1µg/ml pendant 14h en présence ou non d'un inhibiteur non-commercial de tyrosine kinase : Composé A (A, B), Composé B (C, D). (A, C) Western blot pour P-DDR1, DDR1 et une protéine de référence, GAPDH. (B, D) Quantifications des western blot. n = 3. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs CTL ; ## p<0.01, ### p<0.001 vs Col I.

D. Discussion

Le nouveau modèle de souris triples transgéniques que nous avons créé permet d'obtenir la surexpression de DDR1 de manière inductible dans les cellules épithéliales tubulaires. Cependant, nous avons observé une hétérogénéité de l'expression du transgène. Ceci est probablement lié à la construction Pax8-rtTA car cette hétérogénéité a été rapportée dans d'autres publications utilisant la même lignée de souris (Traykova-Brauch et al., 2008 ; Hakroush et al., 2009 ; Koesters et al., 2010). Toutefois, l'utilisation de ce système a fait ses preuves dans plusieurs modèles tels que la surexpression tubulaire de c-MYC induisant une polykystose rénale massive, celle de TGF β conduisant à une fibrose rénale importante, ou celle de VEGFa (Vascular endothelial growth factor A) favorisant principalement la prolifération des fibroblastes, des capillaires péri-tubulaires et glomérulaires, et des cellules mésangiales (Traykova-Brauch et al., 2008 ; Hakroush et al., 2009 ; Koesters et al., 2010).

La surexpression de DDR1, même hétérogène, durant 4 semaines conduit au développement d'une inflammation et d'une fibrose rénales. Malgré l'absence d'altération de la fonction rénale et de syndrome néphrotique, ce phénotype est cohérent avec la littérature et avec les travaux exposés dans cette thèse (Hou et al., 2001 ; Avivi-Green et al., 2006 ; Flamant et al., 2006 ; Gross et al., 2010 ; Guerrot et al., 2011 ; Kerroch et al., 2012). Bien qu'implicite, il apparaît important de souligner que l'étendue des lésions de fibrose et de l'infiltrat inflammatoire est inférieure à celle observée dans les différents modèles de néphropathies expérimentales étudiés précédemment. Cela démontre, une fois de plus, le rôle prédominant de DDR1 dans l'amplification de ces lésions plutôt que dans leur initiation. Toutefois, ces résultats sont préliminaires et ont été obtenus sur un effectif limité d'animaux. D'autres expérimentations sont nécessaires pour comprendre les mécanismes pathologiques induits par DDR1 dans ce nouveau modèle et pour mieux caractériser le phénotype associé. Les stratégies envisagées pour répondre à ces problématiques seront développées dans le chapitre 5.

L'étude des mécanismes associés à l'activation de DDR1 nécessite également des outils *in vitro*. Dans ce chapitre, nous avons caractérisé la lente cinétique de phosphorylation de DDR1 dans une lignée cellulaire humaine, les U2-OS, et validé un outil de détection de cette phosphorylation (Shrivastava et al., 1997 ; Vogel et al., 1997). De plus, nous avons montré une diminution de la forme totale de DDR1 suivant sa liaison au collagène, allant dans le sens de la possibilité d'un clivage de DDR1 (Vogel et al., 2002). L'immunofluorescence pour DDR1 effectuée sur ces cellules avant et après un traitement de 6h au collagène I a montré une localisation membranaire mais surtout une localisation ponctuelle cytoplasmique et une translocation nucléaire de DDR1. La localisation cytoplasmique ponctuelle de DDR1 n'est pas sans rappeler celle mise en avant par Mihai et al., dans leur article montrant une

endocytose, dépendante du collagène, des dimères de DDR1-YFP/CFP. Dans cette étude, les auteurs montrent plusieurs images dans lesquelles on peut observer une localisation cytoplasmique et nucléaire des dimères de DDR1-YFP/CFP par FRET (Fluorescence resonance energy transfer) (Mihai et al., 2009). De plus, il existe d'autres récepteurs tels que les récepteurs transmembranaires de la famille Notch qui effectuent une translocation nucléaire suivant leur clivage extra- puis intracellulaire et activent l'expression de gènes cibles (Ables et al., 2011). DDR1 partage d'ailleurs une voie de signalisation avec l'un des membres de cette famille, le récepteur Notch1, conduisant alors à l'activation de voies anti-apoptotiques et de survie cellulaire (Leitinger, 2014). Enfin, DDR1, anciennement appelé TrkE, présente une homologie de séquence avec le récepteur transmembranaire TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) au niveau de son domaine kinase (Vogel et al., 1999). Or, la translocation nucléaire du domaine intracellulaire phosphorylé de ce récepteur a été démontré dans le foie par Bonacchi et al., régulant ainsi la migration des cellules hépatiques (Bonacchi et al., 2008 ; Song et al. 2013). Etant donné ces arguments, bien que l'idée d'une translocation nucléaire de DDR1 n'ait été suggérée que par des résultats *in vitro*, il serait intéressant d'explorer cette voie parmi les possibles mécanismes moléculaires induits par l'activation de ce récepteur.

Ces travaux nous ont également permis d'identifier deux gènes dont l'expression pourrait être induite par DDR1, CD44 et Vimentine. En effet, la cinétique d'activation de leur expression est compatible avec celle de la phosphorylation de DDR1 et les rôles qui leurs sont attribués dans la littérature sont cohérents avec ceux de ce récepteur (Puré et Cuff, 2001 ; Declèves et al., 2006 ; Fabregat et al., 2016). Toutefois, nous ne pouvons conclure sur le réel lien entre l'activation de DDR1 et l'expression de ces gènes sans inhiber spécifiquement ce récepteur. C'est notamment dans cette optique que nous avons testé l'efficacité de différents inhibiteurs pharmacologiques. Dans la plupart des expériences, les résultats obtenus pour les composés

commerciaux étaient en accord avec la littérature, mais ce n'était pas toujours le cas. En effet, le dasatinib, l'imatinib et le bosutinib ont eu un effet inhibiteur sur l'activation de DDR1 comme attendu, et contrairement au nilotinib et ponatinib qui étaient inefficaces (Bantscheff et al., 2007 ; Rix et al., 2007 ; Rix et al., 2010 ; Canning et al., 2014). De plus, le dasatinib et l'imatinib avaient également un effet sur le clivage de la forme totale de DDR1, ce qui n'était pas le cas de tous les composés efficaces. Les différences entre les résultats obtenus et ceux attendus peuvent être liées à la nature du système dans lequel l'efficacité de ces composés est testée, ainsi qu'à la méthode de détection de la phosphorylation. De plus, la variation de la présence de la forme totale de DDR1 liée à l'action de certains composés sur son clivage peut être responsable d'importantes variations du rapport P-DDR1 sur DDR1. Pour ces différentes raisons, la validation de l'efficacité d'un inhibiteur pharmacologique sur la phosphorylation de DDR1 est complexe. Toutefois, l'étude que nous avons menée nous a permis de retenir certains composés candidats afin d'effectuer très prochainement une étude préclinique *in vivo* dans un modèle de néphropathie expérimentale.

Chapitre 5

Discussion générale et Perspectives

L'expression pathologique et le rôle délétère de DDR1 ont été démontrés dans plusieurs modèles de pathologies inflammatoires et fibrosantes, et notamment dans des modèles de MRC. Dans ces différentes pathologies, l'inhibition génétique ou pharmaco-génétique préventive permettait de protéger les animaux des différentes lésions induites dans les modèles (Hou et al., 2001 ; Avivi-Green et al., 2006 ; Flamant et al., 2006 ; Gross et al., 2010 ; Guerrot et al., 2011 ; Kerroch et al., 2012).

L'un des premiers objectifs de ce travail était de démontrer un effet curatif de l'inhibition de DDR1 après l'initiation de la pathologie, étape indispensable à l'utilisation thérapeutique des antagonistes de DDR1. Cette problématique a fait l'objet d'un premier article dans lequel des ODN AS ont été injectés à des souris à partir du 4^{ème} ou du 8^{ème} jour suivant la dernière injection de SNT, ou à partir du 2^{ème} jour suivant la ligature de l'uretère. Le sacrifice des animaux à 15 et 7 jours, respectivement, a permis d'analyser différents paramètres de la fonction et de la structure rénale, ainsi que des médiateurs de l'inflammation et de la fibrose. Ainsi, nous avons démontré un effet curatif de l'inhibition de DDR1 dans les deux modèles de néphropathies utilisés. Cependant, cet effet positif était potentialisé par une intervention plus précoce dans le modèle de glomérulonéphrite (Article 1).

La protection liée à l'inhibition de DDR1 dans le modèle UUO (Guerrot et al., 2011 ; Article 1), un modèle de tubulopathie ayant à la fois des caractéristiques des MRA et des MRC, nous a fait nous questionner sur le possible rôle de DDR1 dans la MRA. De plus, quelques récentes études ont démontré une surexpression et une implication de DDR1 dans des modèles d'I/R cérébrale et cardiaque chez le rat (Zhu et al., 2015 ; Ouyang et al., 2016). Ces différents arguments viennent appuyer l'intérêt de l'étude du rôle de DDR1 dans l'I/R rénale qui est développée dans le deuxième article de cette thèse. Ainsi, nous avons montré une

surexpression précoce et massive de DDR1 suivant l'I/R rénale jouant un rôle dans le développement de l'inflammation aigüe, des lésions tubulaires associées et de l'altération de la fonction rénale. En effet, l'inhibition génétique et pharmaco-génétique de DDR1, précédant la chirurgie, permettait une préservation de la fonction et des structures rénales après 24 et 48h de reperfusion (Article 2). Les résultats présentés dans ces deux articles démontrent l'intérêt du développement de stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement DDR1 dans les MRA et les MRC chez l'Homme. Ces résultats ont d'ailleurs éveillé l'intérêt de plusieurs groupes pharmaceutiques avec lesquels nous avons collaboré et avec qui nous effectuerons prochainement une étude préclinique dans le but de tester des inhibiteurs pharmacologiques de DDR1 *in vivo*.

Au-delà de la question thérapeutique soulevée par les précédentes études de notre équipe, plusieurs questions mécanistiques se sont posées, notamment concernant le ou les mécanismes conduisant à l'expression *de novo* ou à la surexpression de DDR1 dans les différents modèles de néphropathies testés. En effet, l'induction de l'expression de DDR1 s'observait toujours dans le ou les types cellulaires cibles des MRC, comme dans l'UUO où DDR1 était présent dans les macrophages activés, l'interstitium et les cellules épithéliales tubulaires (Guerrot et al., 2011 ; Article 1). Dans un modèle de néphropathie hypertensive, DDR1 était surexprimé par les CML vasculaires et les cellules mésangiales (Flamant et al., 2006) et dans le modèle de glomérulonéphrite par injection de SNT, il était *de novo* exprimé par les podocytes et les cellules tubulaires en souffrance (Kerroch et al., 2012 ; Article 1). De manière cohérente avec ces données, dans le modèle d'I/R rénal, DDR1 était *de novo* exprimé dans les cellules épithéliales tubulaires proximales (CETP) ischémiques (Article 2). Ces observations nous ont conduit à proposer l'hypothèse que l'expression de DDR1 est liée à des mécanismes de stress cellulaire. Cette proposition était soutenue par plusieurs études montrant

une induction de l'expression de DDR1 suite à un stress génotoxique dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines (Sakuma et al., 1996 ; Ongusaha et al., 2003 ; Das et al., 2006 ; Martinez-Merignac et al., 2011).

Afin de tester notre hypothèse, nous avons soumis une lignée de CETP humaines à différents agents inducteurs du stress du RE. Ces expériences ont conduit à une augmentation de l'expression de DDR1, tandis que l'ajout d'un inhibiteur de ce stress diminuait cette induction. Par une approche *in silico*, nous avons ensuite pu identifier le facteur de transcription CHOP comme candidat potentiel se liant au promoteur de DDR1. Nous avons alors confirmé cette hypothèse par la transfection transitoire d'un plasmide codant pour CHOP dans la lignée de CETP qui a entraîné une induction de l'expression de DDR1 (Article 2). Ainsi, nos travaux ont démontré que le stress du RE était responsable de l'activation de l'expression de DDR1, dans une lignée de CETP humaine, via la mise en jeu du facteur de transcription CHOP. Ce résultat a ensuite été confirmé *in vivo*, puisque l'induction de l'expression de DDR1 dans des souris KO CHOP soumises à une I/R rénale était significativement moins importante que chez leurs WT. De plus, l'amélioration de la fonction rénale et la diminution de l'inflammation aigüe étaient comparables entre les souris KO CHOP et les souris traitées avec les ODN AS dirigés contre DDR1 (Article 2), ce qui suggère que de DDR1 est impliquée dans l'action délétère de CHOP dans ce modèle. Le stress du RE, induit notamment via l'hypoxie et la production de ROS, est un phénomène récurrent dans les cellules cibles des différents modèles de néphropathies utilisés par notre équipe (Chevalier et al., 2009 ; Nagata, 2016 ; Zuk et Bonventre, 2016). Nous proposons donc que l'axe : stress du RE-CHOP-DDR1 est l'un des mécanismes conduisant à l'induction de l'expression de DDR1 dans les pathologies rénales *in vivo*.

Les mécanismes induits par DDR1, dépendant ou non de sa liaison au collagène, ou de sa phosphorylation, sont très divers et mettent en jeu différents partenaires. Cependant, aucun mécanisme n'a encore été validé dans le cadre des pathologies rénales. Au cours de ce travail de thèse, nous avons créé et validé de nouveaux outils permettant de répondre à cette dernière problématique. De plus, quelques pistes mécanistiques ont été évoquées dans les deux articles et le chapitre 4 de ce travail. Dans cette dernière partie, nous nous consacrerons à la discussion des voies de signalisation pouvant dépendre en partie de DDR1 dans le cadre des pathologies rénales, compte tenu des résultats obtenus et de la littérature.

Les principaux évènements pathologiques ayant lieu au cours des néphropathies sont la dédifférenciation, la prolifération et la migration cellulaire mais surtout l'inflammation et la fibrose impliquant le remodelage de la MEC (Fig. 35). Dans la littérature, il a été montré que DDR1 pouvait induire des voies de signalisation aboutissant à l'initiation de l'ensemble de ces phénomènes. Cependant, les principales répercussions de l'inhibition de DDR1 dans les différentes études menées sur les néphropathies ont été la diminution de l'inflammation et de la fibrose rénales (Flamant et al., 2006 ; Gross et al., 2010 ; Guerrot et al., 2011 ; Kerroch et al., 2012, Article 1 ; Article 2). De plus, les résultats préliminaires obtenus chez la souris triple transgénique surexprimant DDR1 tendent vers la même conclusion concernant le rôle de ce récepteur. Nous considérerons donc que le rôle de DDR1 dans la mise en place des autres phénomènes pathologiques est secondaire au cours des néphropathies expérimentales.

Les voies de signalisation connues pour relier potentiellement DDR1 à l'inflammation sont les voies p38 et JNK MAPK, et la voie NF κ B (Fig. 35) (Matsuyama et al., 2004 ; Aviv-Green et al., 2006 ; Vogel et al., 2006 ; Seo et al., 2008 ; Leitinger, 2014). L'activation de ces différentes voies de transduction aboutit à l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion, et donc au recrutement des cellules pro-inflammatoires (López-Novoa et al., 2011 ; Rabb et al., 2015).

L’implication de DDR1 à la fois dans des modèles de MRA et de MRC donne à penser qu’il pourrait jouer un rôle dans la boucle reliant ces deux types de pathologies. Or, les voies de signalisation activées dans les cellules tubulaires atrophiées suite à une MRA et participant à la transition vers une MRC, sont les voies PI3K-Akt-mTOR (Mammalian target of rapamycin), ERK1/2 et JNK MAPK, et TGF β (Venkatachalam et al., 2015). Excepté pour cette dernière, toutes ces voies ont été décrites en aval de l’activation de DDR1 (Fig. 35) (L’Hote et al., 2002 ; Ongusaha et al., 2003 ; Hilton et al., 2008 ; Lu et al., 2011 ; Abbonante et al., 2013 ; Leitinger, 2014). De plus, la surexpression épithéliale de DDR1 *in vivo* est associée à une perte de l’expression de l’E-cadhérine et à l’augmentation de celle de la vimentine et de CD44 (Article 2, Fig. 32), caractérisant l’acquisition du caractère pro-fibrosant de la cellule tubulaire (Kalluri et al., 2003 ; Kokkinos et al., 2007 ; Cho et al., 2012 ; Fabregat et al., 2016). Ces arguments, associés au rôle de DDR1 dans le remodelage de la MEC, via la régulation de l’activité de plusieurs MMP (Leitinger, 2014), et surtout à l’effet pro-fibrosant d’une inflammation prolongée via la synthèse de TGF β , peuvent expliquer l’implication de DDR1 dans le développement de la fibrose rénale (Fig. 35).

En conclusion, nos résultats suggèrent que DDR1 est *de novo* ou surexprimé dans les cellules cibles des différentes néphropathies expérimentales chroniques et aiguës secondairement à l’induction du stress du RE, et via le facteur de transcription CHOP. La surexpression de DDR1 au cours de ces pathologies favorise le développement de l’inflammation et de la fibrose rénales conduisant au déclin de la fonction rénale. L’inhibition génétique et pharmacogénétique de DDR1 permettent d’arrêter la progression de néphropathies chroniques et de préserver la structure et la fonction rénales suite à une agression rénale aigüe chez la souris. Ces résultats renforcent l’intérêt du développement d’inhibiteurs de tyrosine-kinases capables de bloquer spécifiquement la fonction de ce récepteur.

Les souris triples transgéniques surexprimant DDR1 dans les cellules épithéliales tubulaires seront un outil clef pour déterminer le phénotype et les voies de signalisation induites en aval de DDR1, en situation basale ou pathologique *in vivo*. Ces mécanismes pourront ensuite être confirmés et affinés *in vitro*, dans les cellules U2-OS, puis dans des cultures primaires.

Afin de compléter les résultats préliminaires obtenus, il est nécessaire d'augmenter les effectifs des différents groupes à 4 semaines de traitement à la dox. De plus, il serait intéressant d'effectuer un protocole similaire avec une induction plus prolongée de l'expression de DDR1.

Nous analyserons ensuite chez ces souris :

- La fonction rénale : urémie, composition de l'urine
- L'histologie rénale : Inflammation (polynucléaires neutrophiles, macrophages, lymphocytes), dépôts de collagènes fibrillaires, prolifération/apoptose
- Le profil d'expression protéique de DDR1 : localisation tissulaire (expression restreinte aux cellules épithéliales tubulaires ou secondairement activée dans d'autres types cellulaires tels que les cellules inflammatoires, par exemple), localisation subcellulaire (membranaire, cytoplasmique, nucléaire)
- L'expression des médiateurs de l'inflammation et de la fibrose rénale (qRT-PCR)
- L'activation des différentes voies de signalisation proposées ci-dessus (Western blot)

Il serait également intéressant de soumettre ces souris, une fois l'expression de DDR1 activée, à différents modèles de tubulopathies tels que l'UUO ou l'I/R, ou à des modèles induisant une agression tubulaire secondaire, tels que la glomérulonéphrite induite par SNT.

Par ailleurs, le rôle physiologique du domaine extracellulaire clivé de DDR1 est encore inconnu. La surexpression de DDR1 dans les souris triples transgéniques nous permettrait de mettre au point des méthodes de détection de ce fragment protéique *in vivo*, telles qu'un

ELISA. Ainsi, nous pourrions déterminer si le domaine extracellulaire de DDR1 est localisé *in situ* une fois clivé et s'il a des effets paracrines, ou s'il circule dans l'urine ou le plasma. Dans ce cas, il serait intéressant de déterminer si les concentrations plasmatique ou urinaire de DDR1 clivé sont corrélées avec, ou précède, les lésions histologiques rénales. DDR1 deviendrait alors un biomarqueur de la progression de la néphropathie, en plus d'être une cible thérapeutique prometteuse.

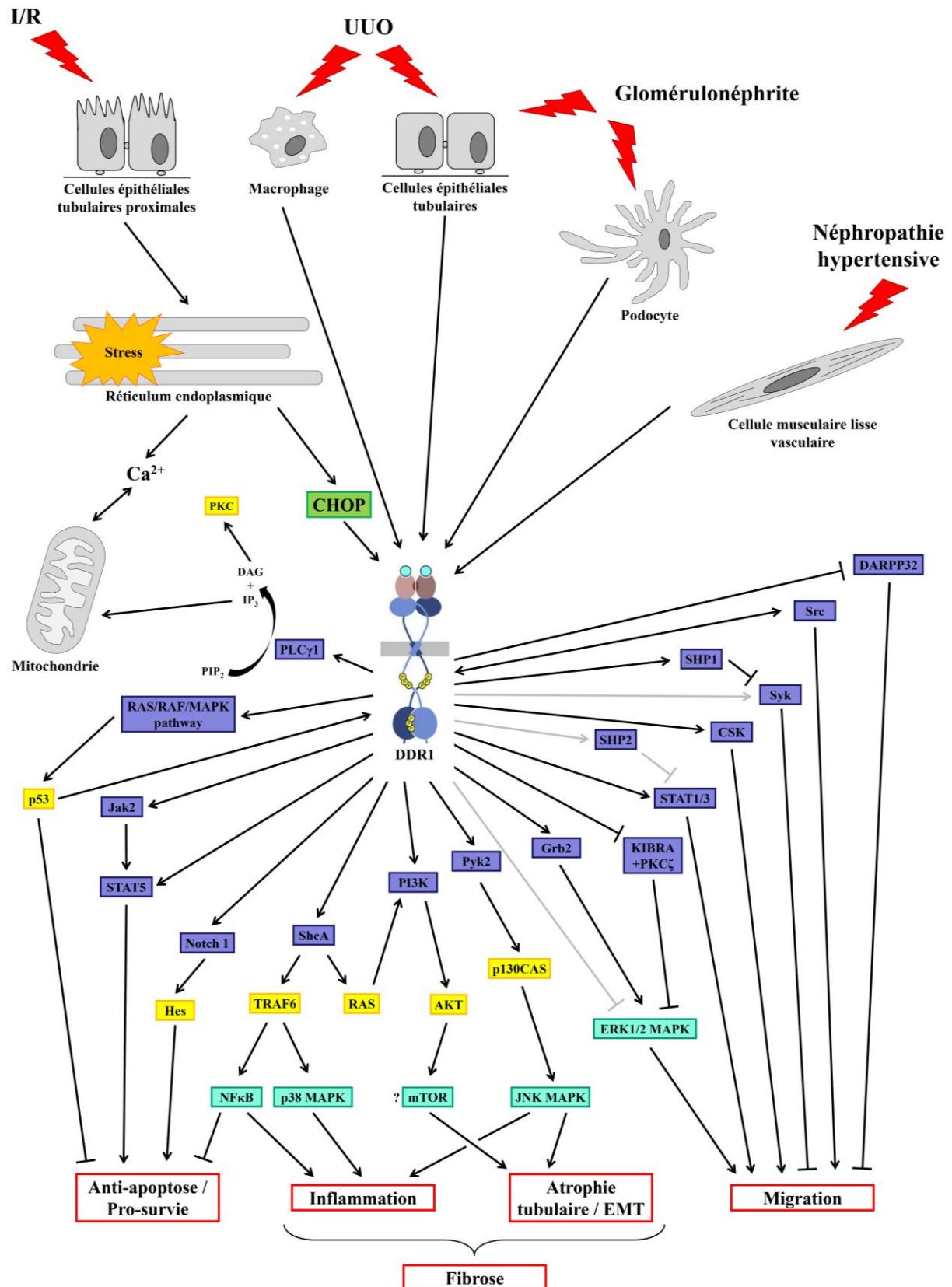


Figure 35 : Schéma conclusif des voies de signalisation démontrées ou vraisemblables de DDR1, intégrant les résultats de la thèse et les données de la littérature.

Références Bibliographiques

Abbonante V, Gruppi C, Rubel D, Gross O, Moratti R, Balduini A. *Discoidin domain receptor 1 protein is a novel modulator of megakaryocyte-collagen interactions*. J Biol Chem, 2013. **288**: p. 16738–16746.

Abdulhussein R, McFadden C, Fuentes-Prior P, Vogel WF. *Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**: p. 31462–31470.

Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, Rakic P. *Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(5): p. 269-83.

Abuelo JG. *Normotensive ischemic acute renal failure*. N Engl J Med, 2007. **357**: p. 797-805.

Agarwal G, Mihai C, Iscrum DF. *Interaction of discoidin domain receptor 1 with collagen type 1*. J Mol Biol, 2007. **367**: p. 443–455.

Agarwal A, Dong Z, Harris R, Murray P, Parikh SM, Rosner MH, Kellum JA, Ronco C; Acute Dialysis Quality Initiative XIII Working Group. *Cellular and Molecular Mechanisms of AKI*. J Am Soc Nephrol, 2016. [Epub ahead of print].

Ahmad PJ, Trcka D, Xue S, Franco C, Speer MY, Giachelli CM, Bendeck MP. *Discoidin domain receptor-1 deficiency attenuates atherosclerotic calcification and smooth muscle cell-mediated mineralization*. Am J Pathol, 2009. **175**: p. 2686–2696.

Alge JL, Arthur JM. *Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(1): p. 147-55.

Ali BR, Xu H, Akawi NA, John A, Karuvantevida NS, Langer R, Al-Gazali L, Leitinger B. *Trafficking defects and loss of ligand binding are the underlying causes of all reported DDR2 missense mutations found in SMED-SL patients*. Hum Mol Genet, 2010. **19**: p. 2239–2250.

Alves F, Vogel W, Mossie K, Millauer B, Höfler H, Ullrich A. *Distinct structural characteristics of discoidin I subfamily receptor tyrosine kinases and complementary expression in human cancer*. Oncogene, 1995. **10**(3): p. 609-18.

Alves F, Saupe S, Ledwon M, Schaub F, Hiddemann W, Vogel WF. *Identification of two novel, kinase-deficient variants of discoidin domain receptor 1: differential expression in human colon cancer cell lines*. Faseb J, 2001. **15**: p. 1321–1323.

Ambrogio C, Gómez-López G, Falcone M, et al. *Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma*. Nat Med, 2016. **22**(3): p. 270-7.

Anand S, Bitton A, Gaziano T. *The gap between estimated incidence of end-stage renal disease and use of therapy*. PloS One, 2013. **8**: e72860.

Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Gröne HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlöndorff D. *A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation*. J Clin Invest, 2002. **109**: p. 251–259.

Anders HJ, Schaefer L. *Beyond tissue injury damage-associated molecular patterns, tolllike receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**: p. 1387–1400.

Anonymous. *Incidence and prevalence of ESRD – United States Renal Data System*. Am J Kidney Dis, 1998. **32**(Suppl. 1): S38–S49.

Appel D, Kershaw DB, Smeets B, Yuan G, Fuss A, Frye B, Elger M, Kriz W, Floege J, Moeller MJ. *Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 333-43.

Arribas J, Borroto A. *Protein ectodomain shedding*. Chem Rev, 2002. **102**: p. 4627–4638.

Assmann KJ, Tangelder MM, Lange WP, Schrijver G, Koene RA. *Anti-GBM nephritis in the mouse: severe proteinuria in the heterologous phase*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1985. **406**(3): p. 285-99.

Avivi-Green C, Singal M, Vogel WF. *Discoidin domain receptor 1-deficient mice are resistant to bleomycin-induced lung fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(4): p. 420-7.

Bagul A, Frost JH, Drage M. *Stem cells and their role in renal ischaemia reperfusion injury*. Am J Nephrol, 2013. **37**(1): p. 16-29.

Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, Bastuck S, Boesche M, Hobson S, Mathieson T, Perrin J, Raida M, Rau C, Reader V, Sweetman G, Bauer A, Bouwmeester T, Hopf C, Kruse U, Neubauer G, Ramsden N, Rick J, Kuster B, Drewes G. *Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors*. Nature biotechnology, 2007. **25**(9): p. 1035-1044.

Barker KT, Martindale JE, Mitchell PJ, Kamalati T, Page MJ, Phippard DJ, Dale TC, Gusterson BA, Crompton MR. *Expression patterns of the novel receptor-like tyrosine kinase, DDR, in human breast tumours*. Oncogene, 1995. **10**: p. 569–575.

Barnes JL, Gorin Y. *Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases*. Kidney Int, 2011. **79**: p. 944–956.

Basile DP. *The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: Implications for acute and chronic function*. Kidney Int, 2007. **72**: p. 151– 156.

Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. *Pathophysiology of acute kidney injury*. Compr Physiol, 2012. **2**: p. 1303–1353.

Baumgartner S, Hofmann K, Chiquet-Ehrismann R, Bucher P. *The discoidin domain family revisited: new members from prokaryotes and a homology-based fold prediction*. Protein Sci, 1998. **7**: p. 1626–1631.

Belayev LY, Palevsky PM. *The link between acute kidney injury and chronic kidney disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(2): p. 149-54.

Besse-Eschmann V, Le Hir M, Endlich N, Endlich K. *Alteration of Podocytes in a Murine Model of Crescentic Glomerulonephritis*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(2): p. 139-49.

Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefanski A, Dussaule JC, Chatziantoniou C. *Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1132-1144.

Boffa JJ, Chatziantoniou C, Dussaule JC. *Progression et régression de la fibrose rénale*. in Actualités Néphrologiques 2004, Flammarion-Médecine-Sciences, Editor. 2004. p. 67-78.

Bolisetty S, Agarwal A. *Neutrophils in acute kidney injury: Not neutral any more*. Kidney Int, 2009. **75**: p. 674–676.

Bonacchi A, Taddei ML, Petrai I, Efsen E, Defranco R, Nosi D, Torcia M, Rosini P, Formigli L, Rombouts K, Zecchi S, Milani S, Pinzani M, Laffi G, Marra F. *Nuclear localization of TRK-A in liver cells*. Histol Histopathol, 2008. **23**: p. 327–340.

Bonventre JV, Yang L. *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. J Clin Investig, 2011. **121**: p. 4210–4221.

Borza CM, Pozzi A. *Discoidin domain receptors in disease*. Matrix Biol, 2014. **34**: p. 185-92.

Brezis M, Rosen S. *Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease*. N Engl J Med, 1995. **332**: p. 647-55.

Broekman F, Giovannetti E, Peters GJ. *Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single targeted ?*. World journal of clinical oncology, 2011. **2**(2): p. 80-93.

Cader FZ, Vockerodt M, Bose S, Nagy E, Brundler MA, Kearns P, Murray PG. *The EBV oncogene LMP1 protects lymphoma cells from cell death through the collagen-mediated activation of DDR1*. Blood, 2013. **122**: p. 4237-4245.

Canning P, Tan L, Chu K, Lee SW, Gray NS, Bullock AN. *Structural mechanisms determining inhibition of the collagen receptor DDR1 by selective and multi-targeted type II kinase inhibitors*. J Mol Biol, 2014. **426**(13): p. 2457-70.

Carafoli F, Bihan D, Stathopoulos S, Konitsiotis AD, Kvansakul M, Farndale RW, Leitinger B, Hohenester E. *Crystallographic insight into collagen recognition by discoidin domain receptor 2*. Structure, 2009. **17**: p. 1573-1581.

Carafoli F, Hohenester E. *Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1834**: p. 2187-2194.

Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. *A basic science view of acute kidney injury biomarkers*. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(7): p. 1301-11.

Chatziantoniou C, Dussaule JC. *Insights into the mechanisms of renal fibrosis: is it possible to achieve regression ?*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(2): F227-234.

Chawla LS, Kimmel PL. *Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated syndrome*. Kidney Int, 2012. **82**: p. 516-524. A review article summarizing the clinical and experimental data supporting a causal association between acute kidney injury and chronic kidney disease.

Chen C, Deng J, Yu X, Wu F, Men K, Yang Q, Zhu Y, Liu X, Jiang Q. *Identification of novel inhibitors of DDR1 against idiopathic pulmonary fibrosis by integrative transcriptome meta-analysis, computational and experimental screening*. Mol Biosyst, 2016. [Epub ahead of print].

Chen GY, Nuñez G. *Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**: p. 826-837.

Chetoui N, El Azreq MA, Boisvert M, Bergeron ME, Aoudjit F. *Discoidin domain receptor 1 expression in activated T cells is regulated by the ERK MAP kinase signaling pathway*. J Cell Biochem, 2011. **112**: p. 3666–3674.

Chevalier RL. *Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy*. Nat Clin Pract Nephrol, 2006. **2**(3): p. 157-168.

Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. *Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy*. Kidney Int, 2009. **75**(11): p. 1145-52.

Chiang CK, Hsu SP, Wu CT, Huang JW, Cheng HT, Chang YW, Hung KY, Wu KD, Liu SH. *Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis*. Mol Med, 2011. **17**: p. 1295–305.

Chiaretti S, Li X, Gentleman R, Vitale A, Wang KS, Mandelli F, Foà R, Ritz J. *Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7209-19.

Chin GS, Lee S, Hsu M, Liu W, Kim WJ, Levinson H, Longaker MT. *Discoidin domain receptors and their ligand, collagen, are temporally regulated in fetal rat fibroblasts in vitro*. Plast Reconstr Surg, 2001. **107**(3): p. 769-76.

Cho SH, Park YS, Kim HJ, Kim CH, Lim SW, Huh JW, Lee JH, Kim HR. *CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion*. Int J Oncol, 2012. **41**(1): p. 211-8.

Clementz AG, Mutolo MJ, Leir SH, Morris KJ, Kucybala K, Harris H, Harris A. *Collagen XV inhibits epithelial to mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma cells*. PLoS ONE, 2013. **8**: e72250.

Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. *Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis*. Kidney Int, 2012. **81**: p. 442–448. A meta-analysis of published studies demonstrating a strong epidemiologic association between acute kidney injury and subsequent chronic kidney disease.

Curat CA, Eck M, Dervillez X, Vogel WF. *Mapping of epitopes in discoidin domain receptor 1 critical for collagen binding*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 45952–45958

Curat CA, Vogel WF. *Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(11): p. 2648-56.

Das S, Ongusaha PP, Yang YS, Park JM, Aaronson SA, Lee SW. *Discoidin Domain Receptor 1 Receptor Tyrosine Kinase Induces Cyclooxygenase-2 and Promotes Chemoresistance through Nuclear Factor- κ B Pathway Activation*. Cancer Res, 2006. **66**: p. 8123–8130.

Day E, Waters B, Spiegel K, Alnadaf T, Manley PW, Buchdunger E, Walker C, Jarai G. *Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib*. Eur J Pharmacol, 2008. **599**(1-3): p. 44-53.

Declèves AE, Caron N, Nonclercq D, Legrand A, Toubeau G, Kramp R, Flamion B. *Dynamics of hyaluronan, CD44, and inflammatory cells in the rat kidney after ischemia/reperfusion injury*. Int J Mol Med, 2006. **18**(1): p. 83-94.

Dejmek J, Dib K, Jonsson M, Andersson T. *Wnt-5a and G-protein signaling are required for collagen-induced DDR1 receptor activation and normal mammary cell adhesion*. Int J Cancer, 2003. **103**: p. 344–351.

Dejmek J, Leandersson K, Manjer J, Bjartell A, Emdin SO, Vogel WF, Landberg G, Andersson T. *Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 520-8.

Devarajan P. *Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**: p. 1503-20.

DeZwaan-McCabe D, Riordan JD, Arensdorf AM, Icardi MS, Dupuy AJ, Rutkowski DT. *The stress-regulated transcription factor CHOP promotes hepatic inflammatory gene expression, fibrosis, and oncogenesis*. PLoS Genet, 2013. **9**(12): e1003937.

Di Marco E, Cutuli N, Guerra L, Cancedda R, De Luca M. *Molecular cloning of trkE, a novel trk-related putative tyrosine kinase receptor isolated from normal human keratinocytes and widely expressed by normal human tissues*. J Biol Chem, 1993. **268**: p. 24290–24295.

Dong B, Zhou H, Han C, Yao J, Xu L, Zhang M, Fu Y, Xia Q. *Ischemia/reperfusion-induced CHOP expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: the role of acidosis and GPR4*. PLoS ONE, 2014. **9**: e110944.

D'Souza MJ, Oettinger CW, Shah A, Tipping PG, Huang XR, Milton GV. *Macrophage depletion by albumin microencapsulated clodronate: attenuation of cytokine release in macrophage-dependent glomerulonephritis*. Drug Dev Ind Pharm, 1999. **25**(5): p. 591-6.

Duffield JS. *Macrophages and immunologic inflammation of the kidney*. Semin Nephrol, 2010. **30**: p. 234–254.

Duffield J S, Tipping PG, Kipari T, Cailhier JF, Clay S, Lang R, Bonventre JV, Hughes J. *Conditional Ablation of Macrophages Halts Progression of Crescentic Glomerulonephritis*. Am J Pathol Vol, 2005. **167**(5): p. 1207-19.

Dussaule JC, Guerrot D, Huby AC, Chadjichristos C, Shweke N, Boffa JJ, Chatziantoniou C. *The role of cell plasticity in progression and reversal of renal fibrosis*. Int J Exp Pathol, 2001. **92**: p. 151-7.

Eddy AA, Neilson EG. *Chronic kidney disease progression*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**: p. 2964-2966.

Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I. *Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(8): p. 1233-47.

Eddy AA. *Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. **4**(1): p. 2-8.

Edelhoff S, Sweetser DA, Disteche CM. *Mapping of the NEP receptor tyrosine kinase gene to human chromosome 6p21.3 and mouse chromosome 17C*. Genomics, 1995. **25**: p. 309-311.

Endo M, Mori M, Akira S, Gotoh T. *C/EBP homologous protein (CHOP) is crucial for the induction of caspase-11 and the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced inflammation*. J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6245-53.

Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. *Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF- κ B pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(6): p. 1514-29.

Fabregat I, Malfettone A, Soukupova J. *New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer*. J Clin Med, 2016. **5**(3): pii: E37.

Faraci-Orf E, McFadden C, Vogel WF. *DDR1 signaling is essential to sustain Stat5 function during lactogenesis*. J Cell Biochem, 2006. **97**: p. 109-121.

Favreau AJ, Cross EL, Sathyanarayana P. *miR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p correlate with elevated expressions of PODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia*. Am J Hematol, 2012. **87**: p. 442-446.

Ferri N, Carragher NO, Raines EW. *Role of discoidin domain receptors 1 and 2 in human smooth muscle cell-mediated collagen remodeling: potential implications in atherosclerosis and lymphangioleiomyomatosis*. Am J Pathol, 2004. **164**(5): p. 1575-85.

Finn WF. *Recovery from acute renal failure*. In: Brenner BM, Lazerus JM, editors. *Acute Renal Failure*. Saunders WB. Philadelphia, 1983.

Flamant M, Placier S, Rodenas A, Curat CA, Vogel WF, Chatziantoniou C, Dussaule JC. *Discoidin domain receptor 1 null mice are protected against hypertensioninduced renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**: p. 3374–3381.

Flynn LA, Blissett AR, Calomeni EP, Agarwal G. *Inhibition of collagen fibrillogenesis by cells expressing soluble extracellular domains of DDR1 and DDR2*. J Mol Biol, 2010. **395**: p. 533–543.

Foehr ED, Tatavos A, Tanabe E, Raffioni S, Goetz S, Dimarco E, De Luca M, Bradshaw RA. *Discoidin domain receptor 1 (DDR1) signaling in PC12 cells: activation of juxtamembrane domains in PDGFR/DDR/TrkA chimeric receptors*. FASEB J, 2000. **14**(7): p. 973-81.

Ford CE, Lau SK, Zhu CQ, Andersson T, Tsao MS, Vogel WF. *Expression and mutation analysis of the discoidin domain receptors 1 and 2 in non-small cell lung carcinoma*. Br J Cancer, 2007. **96**: p. 808–814.

Franco C, Hou G, Ahmad PJ, Fu EY, Koh L, VogelWF, Bendeck MP. *Discoidin domain receptor 1 (ddr1) deletion decreases atherosclerosis by accelerating matrix accumulation and reducing inflammation in low-density lipoprotein receptordeficient mice*. Circ Res, 2008. **102**: p. 1202–1211.

Franco C, Britto K, Wong E, Hou G, Zhu SN, Chen M, Cybulsky MI, Bendeck MP. *Discoidin domain receptor 1 on bone marrow-derived cells promotes macrophage accumulation during atherogenesis*. Circ Res, 2009. **105**: p. 1141–1148.

Franco C, Ahmad PJ, Hou G, Wong E, Bendeck MP. *Increased cell and matrix accumulation during atherogenesis in mice with vessel wall-specific deletion of discoidin domain receptor 1*. Circ Res, 2010. **106**: p. 1775–1783.

Fu HL, Sohail A, Valiathan RR, Wasinski BD, Kumarasiri M, Mahasenan KV, Bernardo MM, Tokmina-Roszyk D, Fields GB, Mobashery S, Fridman R. *Shedding of discoidin domain receptor 1 by membrane-type matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 2013. **288**: p. 12114–12129.

Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, Ko GJ, Agreda P, Satpute SR, CrowMT, King LS, Rabb H. *Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury*. Kidney Int, 2009. **76**: p. 717–729.

Gao M, Duan L, Luo J, Zhang L, Lu X, Zhang Y, Zhang Z, Tu Z, Xu Y, Ren X, Ding K. *Discovery and optimization of 3-(2-(Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)ethynyl)benzamides as novel selective and orally bioavailable discoidin domain receptor 1 (DDR1) inhibitors.* Journal of medicinal chemistry, 2013. **56**(8): p. 3281-3295.

Glodowski SD, Wagener G. *New insights into the mechanisms of acute kidney injury in the intensive care unit.* J Clin Anesth, 2015. **27**(2): p. 175-80.

Gross O, Beirowski B, Harvey SJ, McFadden C, Chen D, Tam S, Thorner PS, Smyth N, Addicks K, Bloch W, Ninomiya Y, Sado Y, Weber M, Vogel WF. *DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria.* Kidney Int, 2004. **66**: p. 102–111.

Gross O, Girgert R, Beirowski B, Kretzler M, Kang HG, Kruegel J, Miosge N, Busse AC, Segerer S, Vogel WF, Muller GA, Weber M. *Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease.* Matrix Biol, 2010. **29**: p. 346–356.

Guerrot D, Kerroch M, Placier S, Vandermeersch S, Trivin C, Mael-Ainin M, Chatziantoniou C Dussaule JC. *Domain Receptor 1 Is a Major Mediator of Inflammation and Fibrosis in obstructive Nephropathy.* Am J Pathol, 2011. **179**: p. 83-91.

Hachehouche LN, Chetoui N, Aoudjit F. *Implication of discoidin domain receptor 1 in T cell migration in three-dimensional collagen.* Mol Immunol, 2010. **47**: p. 1866–1869.

Hahn WH, Suh JS, Cho BS, Kim SD. *Linkage and association study of discoidin domain receptor 1 as a novel susceptibility gene for childhood IgA nephropathy.* Int J Mol Med, 2010. **25**: p. 785–791.

Hakroush S, Moeller MJ, Theilig F, Kaissling B, Sijmonsma TP, Jugold M, Akeson AL, Traykova-Brauch M, Hosser H, Hähnel B, Gröne HJ, Koesters R, Kriz W. *Effects of increased renal tubular vascular endothelial growth factor (VEGF) on fibrosis, cyst formation, and glomerular disease.* Am J Pathol, 2009. **175**(5): p. 1883-95.

Hansen C, Greengard P, Nairn AC, Andersson T, Vogel WF. *Phosphorylation of DARPP-32 regulates breast cancer cell migration downstream of the receptor tyrosine kinase DDR1.* Exp Cell Res, 2006. **312**(20): p. 4011-8.

Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry J, Scolyer RA, Davies MJ, Heinzelmann M, Kalish LH, Bali A, Kench JG, Edwards LS, Vanden Bergh PM, Hacker NF, Sutherland RL, O'Brien PM. *Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(13): p. 4427-36.

Hertig A, Berrou J, Allory Y, Breton L, Commo F, Costa De Beauregard MA, Carmeliet P, Rondeau E. *Type 1 plasminogen activator inhibitor deficiency aggravates the course of experimental glomerulonephritis through overactivation of transforming growth factor beta*. FASEB, 2003. **17**: p. 1904-6.

Hetz C. *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**: p. 89–102.

Hidalgo-Carcedo C, Hooper S, Chaudhry SI, Williamson P, Harrington K, Leitinger B, Sahai E. *Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(1): p. 49-58.

Higashiyama S, Nanba D, Nakayama H, Inoue H, Fukuda S. *Ectodomain shedding and remnant peptide signalling of EGFRs and their ligands*. J Biochem, 2011. **150**: p. 15–22.

Hilton HN, Stanford PM, Harris J, Oakes SR, Kaplan W, Daly RJ, Ormandy CJ. *KIBRA interacts with discoidin domain receptor 1 to modulate collageninduced signalling*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(3): p. 383-93.

Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Fertmann JM, Jauch KW, Menger MD. *Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis: effects of activated protein C and thrombin inhibition*. Crit Care, 2005. **9**(Suppl. 4): S33-7.

Hou G, Vogel W, Bendeck MP. *The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair*. J Clin Invest, 2001. **107**: p. 727–735.

Hou G, Vogel WF, Bendeck MP. *Tyrosine kinase activity of discoidin domain receptor 1 is necessary for smooth muscle cell migration and matrixmetalloproteinase expression*. Circ Res, 2002. **90**(11): p. 1147-9.

Hu Y, Liu J, Jiang B, Chen J, Fu Z, Bai F, Jiang J, Tang Z. *MiR-199a-5p loss up- regulated DDR1 aggravated colorectal cancer by activating epithelial-to-mesenchymal transition related signaling*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(9): p. 2163-72.

Hubbard SR. *Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(6): p. 464-471.

Hynes RO. *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science, 2009. **326**: p. 1216–1219.

Ichikawa O, Osawa M, Nishida N, Goshima N, Nomura N, Shimada I. *Structural basis of the collagenbinding mode of discoidin domain receptor 2*. Embo J, 2007. **26**: p. 4168–4176.

Ikeda K, Wang LH, Torres R, Zhao H, Olaso E, Eng FJ, Labrador P, Klein R, Lovett D, Yancopoulos GD, Friedman SL, Lin HC. *Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 19206–19212.

Inagi R. *Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury*. Exp Nephrol, 2009. **112**: e1–e9.

Iwai LK, Luczynski MT, Huang PH. *Discoidin domain receptors: a proteomic portrait*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(17): p. 3269-79.

Jang HR, Rabb H. *Immune cells in experimental acute kidney injury*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(2): p. 88-101.

Jian ZX, Sun J, Chen W, Jin HS, Zheng JH, Wu YL. *Involvement of discoidin domain 1 receptor in recurrence of hepatocellular carcinoma by genome-wide analysis*. Med Oncol, 2012. **29**: p. 3077– 3082.

Johnson JD, Edman JC, Rutter WJ. *A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin like domain*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 5671-81.

Jones J, Holmen J, De Graauw J, Jovanovich A, Thornton S, Chonchol M. *Association of complete recovery from acute kidney injury with incident CKD stage 3 and all-cause mortality*. Am J Kidney Dis, 2012. **60**: p. 402–408.

Jones LK, O'Sullivan KM, Semple T, Kuligowski MP, Fukami K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Holdsworth SR, Kitching AR. *IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**: p. 3024–3032.

Jonsson M, Andersson T. *Repression of Wnt-5a impairs DDR1 phosphorylation and modifies adhesion and migration of mammary cells*. J Cell Sci, 2001. **114**: p. 2043–2053.

Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. *Collagens at a glance*, J Cell Sci, 2007. **120**: p. 1955–1958.

Kam Tao Li P, Burdmann EA, Mehta RL, For the World Kidney Day Steering Committee 2013. *Acute kidney injury: Global health alert*. J Nephropathol, 2013. **2**(2): p. 90–97.

Kalluri R, Neilson EG. *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**: p. 1776-84.

Karn T, Holtrich U, Braunerger A, Bohme B, Wolf G, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K. *Structure, expression and chromosomal mapping of TKT from man and mouse: a new subclass of receptor tyrosine kinases with a factor VIII-like domain.* Oncogene, 1993. **8**: p. 3433–3440.

Kamohara H, Yamashiro S, Galligan C, Yoshimura T. *Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1alpha) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices.* FASEB J, 2001. **15**(14): p. 2724-6.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. *KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease.* Kidney Int, 2013. **3**: p. 1–150.

Kerroch M, Guerrot D, Vandermeersch S, Placier S, Mesnard L, Jouanneau C, Rondeau E, Ronco P, Boffa JJ, Chatziantoniou C, Dussaule JC. *Genetic inhibition of discoidin domain receptor 1 protects mice against crescentic glomerulonephritis.* Faseb J, 2012. **26**: p. 4079-4091.

Khan SB, Cook HT, Bhangal G, Smith J, Tam FW, Pusey CD. *Antibody blockade of TNF- α reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis.* Kidney Int, 2005. **67**: p. 1812–1820.

Kida Y, Sato T. *Tubular changes in obstructed kidney of adult mice evaluated using immunohistochemistry for segment-specific marker.* Histol Histopathol, 2007. **22**(3): p. 291-303.

Kiedzierska A, Smietana K, Czepczynska H, Otlewski J. *Structural similarities and functional diversity of eukaryotic discoidin-like domains.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1774**: 1069–1078.

Kim BK, Kim I, Yoon SK. *Identification of miR-199a-5p target genes in the skin keratinocyte and their expression in cutaneous squamous cell carcinoma.* J Dermatol Sci, 2015. **79**(2):137-47.

Kim HG, Hwang SY, Aaronson SA, Mandinova A, SW Lee. *DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation.* J Biol Chem, 2011. **286**(20): p. 17672-81.

Kim HJ, Lee DW, Ravichandran K, O Keys D, Akcay A, Nguyen Q, He Z, Jani A, Ljubanovic D, Edelstein CL. *NLRP3 inflammasome knockout mice are protected against ischemic but not cisplatin-induced acute kidney injury.* J Pharmacol Exp Ther, 2013. **346**: p. 465–472.

Kim HG, Tan L, Weisberg EL, Liu F, Canning P, Choi HG, Ezell SA, Wu H, Zhao Z, Wang J, Mandinova A, Griffin JD, Bullock AN, Liu Q, Lee SW, Gray NS. *Discovery of a Potent and Selective DDR1 Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor*. ACS chemical biology, 2013. **8**(10): p. 2145-2150.

Kim MG, Koo TY, Yan JJ, Lee E, Han KH, Jeong JC, Ro H, Kim BS, Jo SK, Oh KH, Surh CD, Ahn C, Yang J. *IL-2/anti-IL-2 complex attenuates renal ischemia-reperfusion injury through expansion of regulatory T cells*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**: p. 1529–1536.

Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, Vergis AL, Ye H, Ju ST, Okusa MD. *Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**: p. 1744–1753.

Klahr S, Morrissey J. *Obstructive nephropathy and renal fibrosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(5): F861-75.

Koesters R, Kaissling B, Lehrer M, Picard N, Theilig F, Gebhardt R, Glick AB, Hähnel B, Hosser H, Gröne HJ, Kriz W. *Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells*. Am J Pathol, 2010. **177**(2): p. 632-43.

Koh M, Woo Y, Valiathan RR, Jung HY, Park SY, Kim YN, Kim HR, Fridman R, Moon A. *Discoidin domain receptor 1 is a novel transcriptional target of ZEB1 in breast epithelial cells undergoing H-Ras-induced epithelial to mesenchymal transition*. Int J Cancer, 2015. **136**(6): E508-20.

Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. *Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 191-203.

Koo DH, McFadden C, Huang Y, Abdulhussein R, Friese-Hamim M, Vogel WF. *Pinpointing phosphotyrosine-dependent interactions downstream of the collagen receptor DDR1*. FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 15-22.

Koza Y. *Acute kidney injury: current concepts and new insights*. J Inj Violence Res, 2016. **8**(1): p. 58-62.

Kramann R, Dirocco DP, Maarouf OH, Humphreys BD. *Matrix Producing Cells in Chronic Kidney Disease: Origin, Regulation, and Activation*. Curr Pathobiol Rep, 2013. **1**(4).

Kriz W, Elger M, Hosser H, Hähnel B, Provoost A, Kränzlin B, Gretz N. *How does podocyte damage result in tubular damage?* Kidney Blood Press Res, 1999. **22**(1-2): p. 26-36.

Kulkarni OP, Hartter I, Mulay SR, Hagemann J, Darisipudi MN, Kumar Vr S, Romoli S, Thomasova D, Ryu M, Kobold S, Anders HJ. *Toll-like receptor 4-induced IL-22 accelerates kidney regeneration*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**: p. 978–989.

Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. *The immune system and kidney disease: Basic concepts and clinical implications*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**: p. 738–753.

Labrador JP, Azcoitia V, Tuckermann J, Lin C, Olaso E, Manes S, Bruckner K, Goergen JL, Lemke G, Yancopoulos G, Angel P, Martinez AC, Klein R. *The collagen receptor DDR2 regulates proliferation and its elimination leads to dwarfism*. EMBO Rep, 2001. **2**: p. 446–452.

Lai C, Lemke G. *Structure and expression of the Tyro 10 receptor tyrosine kinase*. Oncogene, 1994. **9**: p. 877–883.

Lan R, Geng H, Polichnowski AJ, Singha PK, Saikumar P, McEwen DG, Griffin KA, Koesters R, Weinberg JM, Bidani AK, Kriz W, Venkatachalam MA. *PTEN loss defines a TGF- β -induced tubule phenotype of failed differentiation and JNK signaling during renal fibrosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**: F1210–F1223.

Laval S, Butler R, Shelling AN, Hanby AM, Poulsom R, Ganesan TS. *Isolation and characterization of an epithelial-specific receptor tyrosine kinase from an ovarian cancer cell line*. Cell Growth Differ, 1994. **5**: p. 1173–1183.

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

Le Hir M, Keller C, Eschmann V, Hähnel B, Hosser H, Kriz W. *Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**: p. 2060–71.

Lee R, Eidman KE, Kren SM, Hostetter TH, Segal Y. *Localization of discoidin domain receptors in rat kidney*. Nephron Exp Nephrol, 2004. **97**(2): e62–70.

Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG. *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**: p. 317–326.

Leitinger B. *Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 16761–16769.

Leitinger B, Steplewski A, Fertala A. *The D2 period of collagen II contains a specific binding site for the human discoidin domain receptor, DDR2*. J Mol Biol, 2004. **344**: p. 993–1003.

Leitinger B, Kwan AP. *The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen*. Matrix Biol, 2006. **25**: p. 355–364.

Leitinger B. *Transmembrane collagen receptors*. Annu. Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 265–290.

Leitinger B. *Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions*. Int Rev Cell Mol Biol, 2014. **310**: p. 39-87.

Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund LR, Werb Z, Ronco PM. Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. J Exp Med, 2001. **193**: p. 793-802.

Lemeer S, Bluwstein A, Wu Z, Leberfinger J, Muller K, Kramer K, Kuster B. *Phosphotyrosine mediated protein interactions of the discoidin domain receptor 1*. J Proteomics, 2012. **75**(12): p. 3465-77.

Lemmon MA, Schlessinger J. *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**: p. 1117–1134.

Lerolle N, Nochy D, Guerot E, Bruneval P, Fagon JY, Diehl JL, Hill G. *Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration*. Intensive Care Med, 2010. **36**: p. 471-8.

L'Hote CG, Thomas PH, Ganesan TS. *Functional analysis of discoidin domain receptor 1: effect of adhesion on DDR1 phosphorylation*. Faseb J, 2002. **16**: p. 234–236.

Li L, Zepeda-Orozco D, Black R, Lin F. *Autophagy is a component of epithelial cell fate in obstructive uropathy*. Am J Pathol, 2010. **176**: p. 1767–1778.

Li Y, Lu X, Ren X, Ding K. *Small molecule discoidin domain receptor kinase inhibitors and potential medical application*. J Med Chem, 2015. **58**(8): p. 3287-301.

Lin KL, Chou CH, Hsieh SC, Hwa SY, Lee MT, Wang FF. *Transcriptional upregulation of DDR2 by ATF4 facilitates osteoblastic differentiation through p38 MAPK-mediated Runx2 activation*. J Bone Miner Res, 2010. **25**: p. 2489–2503.

Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. *Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury*. Transplant Rev (Orlando), 2009. **23**: p. 1–10.

Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. *Regulated cell death in AKI*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**: p. 2689–2701.

Liu Y. *Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(1): p. 1-12.

Liu Y. *Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics*. Kidney Int, 2006. **69**(2): p. 213-217.

Liu Y. *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(12): p. 684-96.

Liu SH, Wu CT, Huang KH, Wang CC, Guan SS, Chen LP, Chiang CK. *C/EBP homologous protein (CHOP) deficiency ameliorates renal fibrosis in unilateral ureteral obstructive kidney disease*. Oncotarget, 2016. [Epub ahead of print].

López-Novoa JM, Rodríguez-Peña AB, Ortiz A, Martínez-Salgado C, López Hernández FJ. *Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications*. J Transl Med, 2011. **9**:13.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K et al. *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**: p. 2095–2128.

Lu KK, Trcka D, Bendeck MP. *Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src*. Cardiovasc Pathol, 2011. **20**: p. 71–76.

Lund AW, Stegemann JP, Plopper GE. *Mesenchymal Stem Cells Sense Three Dimensional Type I Collagen through Discoidin Domain Receptor 1*. Open Stem Cell J, 2009. **1**: p. 40-53.

Martín-Cleary C, Ortiz A. *CKD hotspots around the world: where, why and what the lessons are*. Clin Kidney J, 2014. **7**(6): p. 519-23.

Martinez-Marignac VL, Rodrigue A, Davidson D, Couillard M, Al-Moustafa AE, Abramovitz M, Foulkes WD, Masson JY, Aloyz R. *The effect of a DNA repair gene on cellular invasiveness: XRCC3 over-expression in breast cancer cells*. PLoS ONE, 2011. **6**: e16394.

Masugi M. *Über die spezifischen zytotoxischen Veränderungen der Niere und der Leber durch das spezifische Antiserum (Nephrotoxin and Hepatotoxin)*. Zugleich ein Beitrag zur Pathogenese der Glomerulonephritis. Jap Path Soc, 1932. **21**: p. 329-41.

Matà R, Palladino C, Nicolosi ML, Lo Presti AR, Malaguarnera R, Ragusa M, Sciortino D, Morrione A, Maggiolini M, Vella V, Belfiore A. *IGF-I induces upregulation of DDR1 collagen receptor in breast cancer cells by suppressing MIR-199a-5p through the PI3K/AKT pathway*. Oncotarget, 2016. **7**(7): p. 7683-700.

Matsuyama W, Wang L, Farrar WL, Faure M, Yoshimura T. *Activation of discoidin domain receptor I isoform b with collagen up-regulates chemokine production in humanmacrophages: role of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2332-40.

Mesnard L, Keller AC, Michel ML, Vandermeersch S, Rafat C, Letavernier E, Tillet Y, Rondeau E, Leite-de-Moraes MC. *Invariant natural killer T cells and TGF-beta attenuate anti-GBM glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**: p. 1282–1292.

Meyer zum Gottesberge AM, Gross O, Becker-Lenzian U, Massing T, Vogel WF. *Inner ear defects and hearing loss in mice lacking the collagen receptor DDR1*. Lab Invest, 2008. **88**: p. 27–37.

Miao L, Zhu S, Wang Y, Li Y, Ding J, Dai J, Cai H, Zhang D, Song Y. *Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer and promotes cell invasion via epithelial-to-mesenchymal transition*. Med Oncol, 2013. **30**: p. 626.

Mihai C, Chotani M, Elton TS, Agarwal G. *Mapping of DDR1 distribution and oligomerization on the cell surface by FRET microscopy*. J Mol Biol, 2009. **385**: p. 432–445.

Mimura I, Nangaku M. *The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**: p. 667–678.

Miyajima A, Chen J, Poppas DP, Vaughan ED Jr, Felsen D. *Role of nitric oxide in renal tubular apoptosis of unilateral ureteral obstruction*. Kidney Int, 2001. **59**(4): p. 1290-303.

Moeller MJ, Soofi A, Hartmann I, Le Hir M, Wiggins R, Kriz W, Holzman LB. *Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**: p. 61-7.

Molitoris BA. *Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2004. **66**: p. 871–883.

Murphy JE, Padilla BE, Hasdemir B, Cottrell GS, Bunnett NW. *Endosomes: a legitimate platform for the signaling train*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**: p. 17615–17622.

Murray CJ, Vos T, Lozano R et al. *Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**: p. 2197–2223.

Murray CJ, Lopez AD. *Measuring the global burden of disease*. N Engl J Med, 2013. **369**: p. 448–457.

Murray CW, Berdini V, Buck IM et al. *Fragment-Based Discovery of Potent and Selective DDR1/2 Inhibitors*. ACS Med Chem Lett, 2015. **6**: p. 798-803.

Nagata M. *Podocyte injury and its consequences*. Kidney Int, 2016. [Epub ahead of print].

Nagle RB, Bulger RE, Cutler RE, Jervis HR, Benditt EP. *Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. I. Early morphologic, physiologic, and histochemical changes*. Lab Invest, 1973. **28**(4): p. 456-67.

Naish PF, Thomson NM, Simpson IJ, Peters DK. *The role of polymorphonuclear leucocytes in the autologous phase of nephrotoxic nephritis*. Clin Exp Immunol, 1975. **22**: p. 102-11.

Nathan C, Ding A. *Nonresolving inflammation*. Cell, 2010. **140**: p. 871–882.

Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J. *The renal mononuclear phagocytic system*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**: p. 194–203.

Nemoto T, Ohashi K, Akashi T, Johnson JD, Hirokawa K. *Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer*. Pathobiology, 1997. **65**(4): p. 195-203.

Neuhaus B, Buhren S, Bock B, Alves F, Vogel WF, Kiefer F. *Migration inhibition of mammary epithelial cells by Syk is blocked in the presence of DDR1 receptors*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(22): p. 3757-70.

Noh MR, Kim JI, Han SJ, Lee TJ, Park KM. *C/EBP homologous protein (CHOP) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(9): p. 1895-901.

Noordeen NA, Carafoli F, Hohenester E, Horton MA, Leitinger B. *A transmembrane leucine zipper is required for activation of the dimeric receptor tyrosine kinase DDR1*. J Biol Chem, 2006. **281**: p. 22744–22751.

Ongusaha PP, Kim JI, Fang L, Wong TW, Yancopoulos GD, Aaronson SA, Lee SW. *p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop*. Embo J, 2003. **22**: p. 1289–1301.

Ortiz A, Covic A, Fliser D et al. Board of the EURECA-mWorking Group of ERA-EDTA. *Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure*. Lancet, 2014. **383**: p. 1831–1843.

Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Izquierdo MC et al. Red de Investigacion Renal (REDINREN) and Consorcio Madrileño para investigación del fracaso renal agudo (CIFRA). *Translational value of animal models of kidney failure*. Eur J Pharmacol, 2015. **759**: p. 205-20.

Ouyang F, Huang H, Zhang M, Chen M, Huang H, Huang F, Zhou S. *HMGB1 induces apoptosis and EMT in association with increased autophagy following H/R injury in cardiomyocytes*. Int J Mol Med, 2016. [Epub ahead of print].

Perez JL, Shen X, Finkernagel S, Sciorra L, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Wong TW. *Identification and chromosomal mapping of a receptor tyrosine kinase with a putative phospholipid binding sequence in its ectodomain*. Oncogene, 1994. **9**: 211–219.

Perez JL, Jing SQ, Wong TW. *Identification of two isoforms of the Cak receptor kinase that are coexpressed in breast tumor cell lines*. Oncogene, 1996. **12**: p. 1469–1477.

Phan TN, Wong EL, Sun X, Kim G, Jung SH, Yoon CN, Yang BS. *Low Stability and a Conserved Nglycosylation Site Are Associated with Regulation of the Discoidin Domain Receptor Family by Glucose via Post-Translational N-Glycosylation*. Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**: p. 1907–1916.

Playford MP, Butler RJ, Wang XC, Katso RM, Cooke IE, Ganesan TS. *The genomic structure of discoidin receptor tyrosine kinase*. Genome Res, 1996. **6**: p. 620–627.

Puré E, Cuff CA. *A crucial role for CD44 in inflammation*. Trends Mol Med, 2001. **7**(5): p. 213-21.

Rabb H, Griffin MD, McKay DB, Swaminathan S, Pickkers P, Rosner MH, Kellum JA, Ronco C, Acute Dialysis Quality Initiative Consensus XIII Work Group. *Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(2): p. 371-9.

Ratliff BB, Rabadi MM, Vasko R, Yasuda K, Goligorsky MS. *Messengers without borders: Mediators of systemic inflammatory response in AKI*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**: p. 529–536.

Reynolds J, Moss J, Duda MA, Smith J, Karkar AM, Macherla V, Shore I, Evans DJ, Woodrow DF, Pusey CD. The evolution of crescentic nephritis and alveolar haemorrhage following induction of autoimmunity to glomerular basement membrane in an experimental model of Goodpasture's disease. J Pathol, 2003. **200**: p. 118–129.

Ricard-Blum S. *The collagen family*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**: a004978.

Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. *Macrophage diversity in renal injury and repair*. J Clin Invest, 2008. **118**: p. 3522–3530.

Rifkin DE, Coca SG, Kalantar-Zadeh K. *Does AKI truly lead to CKD?* J Am Soc Nephrol, 2012. **23**: p. 979–984. A commentary reviewing the criteria for establishing a causal relationship based on epidemiologic data questioning whether such criteria are met for the association between acute kidney injury and chronic kidney disease.

Rix U, Hantschel O, Durnberger G, et al. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. Blood, 2007. **110**(12): p. 4055-4063.

Rix U, Remsing Rix LL, Terker AS. *A comprehensive target selectivity survey of the BCR-ABL kinase inhibitor INNO-406 by kinase profiling and chemical proteomics in chronic myeloid leukemia cells*. Leukemia, 2010. **24**(1): p. 44-50.

Roarty K, Serra R. *Wnt5a is required for proper mammary gland development and TGF-beta-mediated inhibition of ductal growth*. Development, 2007. **134**: p. 3929–3939.

Roberts ME, Magowan L, Hall IP, Johnson SR. *Discoidin domain receptor 1 regulates bronchial epithelial repair and matrix metalloproteinase production*. Eur Respir J, 2011. **37**: p. 1482–1493.

Ruiz PA, Jarai G. *Collagen I induces discoidin domain receptor (DDR) 1 expression through DDR2 and a JAK2-ERK1/2-mediated mechanism in primary human lung fibroblasts*. J Biol Chem, 2011. **286**: p. 12912–12923.

Sakuma S, Saya H, Tada M, Nakao M, Fujiwara T, Roth JA, Sawamura Y, Shinohe Y, Abe H. *Receptor protein tyrosine kinase DDR is up-regulated by p53 protein*. FEBS Lett, 1996. **398**: p. 165–169.

Sanchez MP, Tapley P, Saini SS, He B, Pulido D, Barbacid M. *Multiple tyrosine protein kinases in rat hippocampal neurons: isolation of Ptk-3, a receptor expressed in proliferative zones of the developing brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**: p. 1819–1823.

Sanz AB, Santamaría B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**: p. 1634–1642.

Sayyed SG, Ryu M, Kulkarni OP, Schmid H, Lichtnekert J, Grüner S, Green L, Mattei P, Hartmann G, Anders HJ. *An orally active chemokine receptor CCR2 antagonist prevents glomerulosclerosis and renal failure in type 2 diabetes*. Kidney Int, 2011. **80**: p. 68–78.

Schlessinger J. *Cell Signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**: 211-225.

Scholz J, Lukacs-Kornek V, Engel DR, Specht S, Kiss E, Eitner F, Floege J, Groene HJ, Kurts C. *Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(3): p. 527-37.

Schonig K, Schwenk F, Rajewsky K, Bujard H. *Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**: e134.

Schroder K, Tschopp J. *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**: p. 821-832.

Seo MC, Kim S, Kim SH, Zheng LT, Park EK, Lee WH, Suk K. *Discoidin domain receptor 1 mediates collagen-induced inflammatory activation of microglia in culture*. J Neurosci Res, 2008. **86**(5): p. 1087-95.

Senft D, Ronai ZA. *UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**: p. 141-48.

Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF. *Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. Kidney Int, 1993. **44**(4):774-88.

Shen Q, Cincinnati VR, Zhang X, Jacob S, Weber F, Sotiropoulos GC, Radtke A, Lu M, Paul A, Gerken G, Beckebaum S. *Role of microRNA-199a-5p and discoidin domain receptor 1 in human hepatocellular carcinoma invasion*. Mol Cancer, 2010. **9**:227.

Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Svoboda R, Wheelock MJ, Johnson KR. *Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1*. J Cell Biol, 2008. **180**(6): p. 1277-89.

Shirato I. Podocyte process effacement in vivo. Microsc Res Tech, 2002. **57**(4): p. 241-6.

Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, Kriz W. *Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis*. Am J Pathol, 1996. **148**(4): p. 1283-96.

Shitomi Y, Thøgersen IB, Ito N, Leitinger B, Enghild JJ, Itoh Y. *ADAM10 controls collagen signaling and cell migration on collagen by shedding the ectodomain of discoidin domain receptor 1 (DDR1)*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(4): p. 659-73.

Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD. *An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors*. Mol Cell, 1997. **1**(1): 25.

Simpson DL, Rosen SD, Barondes SH. *Discoidin, a developmentally regulated carbohydrate-binding protein from Dictyostelium discoideum. Purification and characterization*. Biochemistry, 1974. **13**(17): p. 3487-93.

Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. *Animal models of acute renal failure*. Pharmacol Rep, 2012. **64**(1): p. 31-44.

Slack BE, Siniaia MS, Blusztajn JK. *Collagen type I selectively activates ectodomain shedding of the discoidin domain receptor 1: involvement of Src tyrosine kinase*. J Cell Biochem, 2006. **98**: p. 672– 684.

Smeets B, Dijkman HB, Wetzels JF, Steenbergen EJ. *Lessons from studies on focal segmental glomerulosclerosis: an important role for parietal epithelial cells?* J Pathol, 2006. **210**(3): p. 263-72.

Song J, Chen X, Bai J, Liu Q, Li H, Xie J, Jing H, Zheng J. *Discoidin domain receptor 1 (DDR1), a promising biomarker, induces epithelial to mesenchymal transition in renal cancer cells*. Tumour Biol, 2016. [Epub ahead of print].

Song S, Rosen KM, Corfas G. *Biological function of nuclear receptor tyrosine kinase action*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(7). pii: a009001.

Staudinger LA, Spano SJ, Lee W, Coelho N, Rajshankar D, Bendeck MP, Moriarty T, McCulloch CA. *Interactions between the discoidin domain receptor 1 and beta1 integrin regulate attachment to collagen*. Biol Open. 2013, **2**(11): p. 1148- 59.

Suh HN, HJ Han. *Collagen I regulates the self-renewal of mouse embryonic stem cells through alpha2beta1 integrin- and DDR1-dependent Bmi-1*. J Cell Physiol, 2011. **226**(12): p. 3422-32.

Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, Jaber BL. *Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of Nephrology. World incidence of AKI: a meta-analysis*. Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(9): p. 1482-93.

Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, et al. *Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**: p. 509-17.

Tampe D, Zeisberg M. *Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2014. 10(4): p. 226-37.

Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M. *Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **307**(11): F1187-95.

Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, et al. *Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**: p. 15449–15454.

Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. *Acute Renal Failure*. New England Journal of Medicine, 1996. **334**: p. 1448–1460.

Thorner PS, Ho M, Eremina V, Sado Y, Quaggin S. *Podocytes contribute to the formation of glomerular crescents*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**: p. 495-502.

Tipping PG, Huang XR, Qi M, Van GY, Tang WW. *Crescentic glomerulonephritis in CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells*. Am J Pathol, 1998. **152**(6): p. 1541-8.

Traykova-Brauch M, Schöning K, Greiner O et al. *An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice*. Nat Med, 2008. **14**(9): p. 979-84.

Tryggvason K, Wartiovaara J. *How does the kidney filter plasma?* Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 96-101.

Ucero AC, Berzal S, Ocaña-Salceda C, Sancho M, Orzáez M, Messeguer A, Ruiz-Ortega M, Egido J, Vicent MJ, Ortiz A, Ramos AM. *Apolymeric nanomedicine diminishes inflammatory events in renal tubular cells*. PloSOne, 2013. **8**: e51992.

Ucero AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. *Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction*. Int Urol Nephrol, 2014. **46**: p. 765–776.

Unanue ER, Mardiney MR Jr, Dixon FJ. *Nephrotoxic serum nephritis in complement intact and deficient mice*. J Immunol, 1967. **98**(3): p. 609-17.

Underwood DC, Osborn RR, Bochnowicz S, Webb EF, Rieman DJ, Lee JC, Romanic AM, Adams JL, Hay DW, Griswold DE. *SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**: L895–L902.

Valderrabano F, Berthoux FC. *Report on management of renal failure in Europe, XXV, 1994 end stage renal disease and dialysis report. The EDTA-ERA Registry*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11**(Suppl. 1): p. 2–21.

Valencia K, Ormazabal C, Zandueta C, et al. *Inhibition of collagen receptor discoidin domain receptor-1 (DDR1) reduces cell survival, homing, and colonization in lung cancer bone metastasis*. Clin Cancer Res, 2012. **18**: p. 969–980.

Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, Kleer CG, Fridman R. *Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression*. Cancer Metastasis, 2012. **31**: p. 295–321.

Vallés PG, Lorenzo AG, Bocanegra V, Vallés R. *Acute kidney injury: What part do toll-like receptors play?* Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014. **7**: p. 241–251.

van Kilsdonk JW, van Kempen LC, van Muijen GN, Ruiter DJ, Swart GW. *Soluble adhesion molecules in human cancers: sources and fates*. Eur J Cell Biol, 2010. **89**: p. 415–427.

Vaughan ED Jr, Marion D, Poppas DP, Felsen D. *Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York*. J Urol, 2004. **172**(6 Pt 2): p. 2563-9.

Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. *Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2, and S3 segments*. Kidney Int, 1978. **14**: p. 31–49.

Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK. *Acute kidney injury: A springboard for progression in chronic kidney disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**: F1078–F1094.

Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. *Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(8): p. 1765-76.

Vernon MA, Mylonas KJ, Hughes J. *Macrophages and renal fibrosis*. Semin Nephrol, 2010. **30**: p. 302–317.

Vielhauer V, Kulkarni O, Reichel CA, Anders HJ. *Targeting the recruitment of monocytes and macrophages in renal disease*. Semin Nephrol, 2010. **30**: p. 318–333.

Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T. *The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen*. Mol Cell, 1997. **1**: p. 13-23.

Vogel W. *Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications*. FASEB J, 1999. **13**(Suppl): S77-82.

Vogel W, Brakebusch C, Fassler R, Alves F, Ruggiero F, Pawson T. *Discoidin domain receptor 1 is activated independently of b1 integrin*. J Biol Chem, 2000. **275**: p. 5779–5784.

Vogel WF, Aszodi A, Alves F, Pawson T. *Discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase has an essential role in mammary gland development*. Mol Cell Biol, 2001. **21**: p. 2906–2917.

Vogel W. *Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1*. FEBS Lett, 2002. **514**(2-3): p. 175-80.

Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE. *Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function*. Cell Signal, 2006. **18**: 1108–1116.

von Zastrow M, Sorkin A. *Signaling on the endocytic pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**: p. 436– 445.

Waikar SS, Liu KD, Chertow GM. *Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(3): p. 844-61.

Wang CZ, Hsu YM, Tang MJ. *Function of discoidin domain receptor I in HGF-induced branching tubulogenesis of MDCK cells in collagen gel*. J Cell Physiol, 2005. **203**: p. 295–304.

Wang CZ, Su HW, Hsu YC, Shen MR, Tang MJ. *A discoidin domain receptor 1/SHP-2 signaling complex inhibits alpha2beta1-integrin-mediated signal transducers and activators of transcription 1/3 activation and cell migration*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(6): p. 2839-52.

Wang CZ, Yeh YC, Tang MJ. *DDR1/E-cadherin complex regulates the activation of DDR1 and cell spreading*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**: C419–429.

Weiner HL, Huang H, Zagzag D, Boyce H, Lichtenbaum R, Ziff EB. *Consistent and selective expression of the discoidin domain receptor-1 tyrosine kinase in human brain tumors*. Neurosurgery, 2000. **47**(6): p. 1400-9.

Wheeler J, Morley AR, Appleton DR. *Anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in the mouse: development of disease and cell proliferation*. J Exp Pathol (Oxford), 1990. **71**(3): p. 411-22.

Wilson GW, Oliver J. *Experiments on the production of specific antisera for infections of unknown cause : III. Nephrotoxins: Their specificity as demonstrated by the method of selective absorption*. J Exp Med, 1920. **32**: p. 183-98.

Wong MG, Suzuki Y, Tanifuji C, et al. *Peritubular ischemia contributes more to tubular damage than proteinuria in immune-mediated glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(2): p. 290-7.

Xu H, Raynal N, Stathopoulos S, Myllyharju J, Farndale RW, Leitinger B. *Collagen binding specificity of the discoidin domain receptors: binding sites on collagens II and III and molecular determinants for collagen IV recognition by DDR1*. Matrix Biol, 2011. **30**: p. 16–26.

Xu H, Bihan D, Chang F, Huang PH, Farndale RW, Leitinger B. *Discoidin domain receptors promote alpha1beta1- and alpha2beta1-integrin mediated cell adhesion to collagen by enhancing integrin activation*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52209.

Yang G, Li Q, Ren S, Lu X, Fang L, Zhou W, Zhang F, Xu F, Zhang Z, Zeng R, Lottspeich F, Chen Z. *Proteomic, functional and motif-based analysis of C-terminal Src kinase-interacting proteins*. Proteomics, 2009. **9**: p. 4944–4961.

Yang K, Kim JH, Kim HJ, Park IS, Kim IY, Yang BS. *Tyrosine 740 phosphorylation of discoidin domain receptor 2 by Src stimulates intramolecular autophosphorylation and Shc signaling complex formation*. J Biol Chem, 2005. **280**: p. 39058–39066.

Yang SH, Baek HA, Lee HJ, Park HS, Jang KY, Kang MJ, Lee DG, Lee YC, Moon WS, Chung MJ. *Discoidin domain receptor 1 is associated with poor prognosis of non-small cell lung carcinomas*. Oncol Rep, 2010. **24**: 311–319.

Yeh YC, Wang CZ, Tang MJ. *Discoidin domain receptor 1 activation suppresses alpha2beta1 integrin-dependent cell spreading through inhibition of Cdc42 activity*. J Cell Physiol, 2009. **218**: p. 146– 156.

Yeh YC, Wu CC, Wang YK, Tang MJ. *DDR1 triggers epithelial cell differentiation by promoting cell adhesion through stabilization of E-cadherin*. Mol Biol Cell, 2011. **22**: p. 940–953.

Yuan HT, Tipping PG, Li XZ, Long DA, Woolf AS. *Angiopoietin correlates with glomerular capillary loss in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis*. Kidney Int, 2002. **61**: p. 2078-89.

Zamzami N, Kroemer G. *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**: p. 67–71.

Zerlin M, Julius MA, Goldfarb M. *NEP: a novel receptor-like tyrosine kinase expressed in proliferating neuroepithelia*. Oncogene, 1993. **8**: p. 2731–2739.

Zhang J, Yang PL, Gray NS. *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*. Nature reviews Cancer, 2009. **9**(1): p. 28-39.

Zhang K, Kaufman RJ. *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response*. Nature, 2008. **454**: p. 455–62.

Zhang MZ, Yao B, Yang S, et al. *CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury*. J Clin Invest, 2012. **122**: p. 4519–4532.

Zhang Y, Su J, Yu J, Bu X, Ren T, Liu X, Yao L. *An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation.* J Bone Miner Res, 2011. **26**: p. 604–617.

Zhu M, Xing D, Lu Z, Fan Y, Hou W, Dong H, Xiong L, Dong H. *DDR1 may play a key role in destruction of the blood-brain barrier after cerebral ischemia-reperfusion.* Neurosci Res, 2015. **96**: p. 14-9.

Zuk A, Bonventre JV. *Acute Kidney Injury.* Annu Rev Med, 2016. **67**: p. 293-307.

Annexe

Chapitre du livre "DDR in health and diseases", édité par Dr Raphael Fridman et Dr Paul Huang
et publié par Springer New York, 2016 (sous-presse)

DDR1 in Renal Function and Disease

Christos Chatziantoniou, Aude Dorison, Jean-Claude Dussaule

Inserm UMR S 1155 and Sorbonne University, Pierre and Marie Curie University (University of Paris 6), Paris, France

Corresponding author:

Christos Chatziantoniou, PhD

Inserm UMR S 1155, Tenon Hospital,
4, rue de la la Chine 75020 Paris, France

Tel: 331 5601 6653

Fax: 331 5601 6659

e-mail: christos.chatziantoniou@upmc.fr

Key Words: Renal Failure, Renal Fibrosis, Renal Inflammation, Glomerulonephritis, Therapy target.

A B S T R A C T

The incidence and prevalence of chronic kidney disease are constantly increasing and represent a major for public health. Renal failure is a complex mechanism involving a crosstalk between agents promoting renal inflammation and renal fibrosis. Because DDR1 is capable of participating to both, inflammation and fibrosis, investigations were carried out to test whether it can be a mediator of the progression of renal disease. To this end, a variety of experimental models of nephropathy each aggressing a different compartment of the kidney (vessels, tubular epithelium, glomeruli) were applied to mice lacking expression of DDR1. In all tested models, DDR1 was induced in the corresponding renal compartment immediately after the disease and this local overexpression was accompanied by the activation of several pro-inflammatory and pro-fibrotic pathways. In contrast, in DDR1 null animals these pathways were not activated which resulted to an impressive preservation of renal function and structure. Further proof of evidence came from experiments with in vivo administration of antisense oligonucleotides against DDR1. The fact that this pharmacogenetic approach protected animals against the development of renal disease further support the hypothesis that DDR1 blockade can be a future treatment for renal disease, an incurable today human pathology.

1. BACKGROUND: THE LONG ROAD FOR THERAPY OF CHRONIC KIDNEY DISEASE

Even though significant progress has been made and many aspects of the complex mechanisms orchestrating Chronic Kidney Disease (CKD) have been identified, CKD represents a major problem for public health. It affects up to 10% of the general population with a prevalence and incidence which has increased worldwide over the past 25 years and has almost doubled both in the United States and Europe (United States Renal Data System 2003). Severe CKD requires renal replacement therapy, which may involve a form of dialysis or renal transplantation (Lozano 2012). Diabetes and high blood pressure are the major causes of CKD, followed by glomerulonephritis. Independently of the underlying cause, pathogenesis of CKD is characterized by a continuous cross-talk between inflammation and fibrosis leading with time to the progressive impairment of glomerular, tubulointerstitial and vascular compartments. Today, there are no drugs capable of reducing, arresting or (even better) reversing the decline of renal function.

Our lab was among the first to demonstrate that CKD can be reversed in animal models by inhibiting the deleterious effects of the renin-angiotensin system (Boffa et al. 2003, Placier et al. 2006, Huby et al. 2009, Kavvadas et al. 2013). However, inhibitors or antagonists of the reninangiotensin system do not exhibit the same efficiency in arresting or reversing chronic renal disease progression in humans (Chatziantoniou and Dussaule JC 2008, ;17:76-81. Mauer et al. 2009). Therefore, detection of the disease in early stages and discovery of novel therapeutic targets are of crucial importance for an efficient treatment against CKD. As shown in other chapters, DDR1 is a tyrosine kinase receptor that binds directly to collagens. It is expressed in a variety of cells, including vascular smooth muscle and mesangial cells, (Hou et al. 2001, Curat and Vogel 2002) and its phosphorylation by collagens (all tested types of collagen) leads to a tyrosine kinase-MAPK/p38 cascade activation. For these reasons, it appeared as an interesting candidate to be investigated in connection to the pathogenesis of renal fibrosis. Towards this direction, our team showed that DDR1 is indeed a major mediator of renal inflammation and fibrosis and a promising target for therapy.

2. DDR1 in Normal Kidneys

DDR1 is expressed in normal kidneys in low levels in vessels and distal tubules, as shown by by immunochemistry studies. Its expression has also been reported in podocytes (Gross et al. 2004). These investigators reported a slightly higher urinary protein excretion in mice lacking

DDR1 expression, but these values were at the normal range. Uremia values were also normal. They have observed that adult mice lacking DDR1 displayed a focal thickening of the glomerular basement membrane without any alteration of the proteins controlling podocyte structure. In a subsequent study this group reported that this glomerular abnormality was confined to less than 2% of the total glomerular basement membrane and appeared only in aged mice (Gross et al. 2010). Our group, with more than ten years experience looking at the renal function of mice deficient in DDR1 expression, never observed any structural or functional renal abnormalities under control conditions in these mice until the age of 8 month old.

3. DDR1 in Renal Disease

3.1. DDR1 in Hypertensive Nephropathy

Continuous infusion of angiotensin II through subcutaneous osmotic minipumps or inhibition of endogenous production of NO by NO-synthase inhibitors such as L-NAME are classical models of hypertension-associated renal disease. Both models of hypertension are accompanied by severe renal vascular and glomerular lesions that extend with time to renal interstitium and lead to gradual decline of renal function and structure as evidenced by increasing creatininemia, proteinuria and fibrosis. The initial hypothesis was that if DDR1 is involved in the fibrogenic process acting as a collagen receptor, then mice lacking functional DDR1 should be protected against renal fibrosis compared to wild type animals and this protection should be independent of blood pressure levels (Flamant et al. 2006). Indeed, systolic pressure increased to a similar way in wild type and DDR1 deficient mice after chronic administration of angiotensin II or L-NAME. DDR1 expression was low in the kidney of wild type mice under normal conditions whereas it was upregulated during angiotensin II or L-NAME treatment. Interestingly, the increased expression of DDR1 was specific to renal vessels and glomeruli, the two main renal compartments that the abnormal collagen formation and the subsequent fibrosis are originating in these experimental models. A major finding was that contrary to the wild type mice, several indexes of renal function and structure such as proteinuria, micro-albuminuria, collagen I or IV expressions and neo-formation did not increase and remained close to normal levels indicating prevention against angiotensin II or L-NAME-induced renal damage even when the disease was prolonged to chronic (for the mice) conditions (Figure 1).

An additional striking strain difference was the degree of the inflammatory response. The prolonged action of angiotensin II or L-NAME on vessels is activating inflammatory

pathways resulting recruitment of infiltrating cells and induction of renal vascular inflammation (Ruiz-Ortega et al. 2001, Fliser et al. 2004). These models are accompanied by important accumulation of infiltrating cells around renal vessels and glomeruli (Figure 1B&C). In sharp contrast, DDR1 deficient mice showed an almost complete absence of inflammatory cell infiltration in the renal vasculature (Figure 1B&D). This impressive protection against inflammation was not due a phenotype strain difference because basal values of leukocytes were similar between wild type and DDR1 KO mice. In addition, mice lacking DDR1 expression showed a blunted response of chemokines to sepsis, induced by LPS, and survived at doses that are lethal for wild type mice. Since DDR1 was not expressed in lymphocytes or macrophages in the hypertensive models of nephropathy, the mechanism of action that appears the most probable is the following: angiotensin II or NO inhibition increase DDR1 expression in renal vessels and mesangial cells (probably through a cellular mechanism involving endothelial cell stress, a common deleterious action of angiotensin II and L-NAME in the vessel wall). In parallel, angiotensin II and L-NAME directly induce collagen I, III and IV neo-expression in renal microvessels and glomeruli (Chatziantoniou et al. 1998, Boffa et al. 1999). As result, collagens bind DDR1 and induce phosphorylation of its intracellular part. This activation of DDR1 stimulates proinflammatory pathways (such as P38 pathway and/or NFkB), which in turn lead to cytokines synthesis. Cytokine release facilitates inflammatory cell infiltration and further stimulates collagen synthesis and DDR1 expression. Under this scheme, DDR1 is an amplifier of the initial renal vascular lesion by creating a positive deleterious cross talk between inflammation and extracellular matrix synthesis, which is independent from the initiating cause and which ultimately leads to the development and progression of chronic kidney disease.

3.2 DDR1 in a Genetic Model of Hereditary Kidney Disease

Other investigators studied the role of DDR1 in kidney of mice mimicking the Alport syndrome (Gross et al. 2010). Alport syndrome is a hereditary disease due to mutations in the chains of collagen IV (mainly a3, a4 and a5 chains). As result, the mutations in any of these chains alter the proper assembly of the collagen IV network, affecting thus tissues in which collagen IV is an important structural component of basement membranes such as the kidney, ear, and eye. The abnormalities in the structure of glomerular basement membrane cause proteinuria and gradual scarring of glomeruli. Renal function is severely affected from early childhood and usually the patients progress towards End Stage Renal Failure during adolescence. Mice lacking the a3 chain of collagen IV present several histological renal

abnormalities similar to those observed in humans and are considered as a model mimicking well the renal pathology of this genetic disorder. Crossbreeding Alport mice with mice lacking DDR1 expression substantially improved the loss of renal function (decreases in proteinuria and blood urea nitrogen) and increased the lifespan. The genetic invalidation of DDR1 in the Alport mice was also accompanied by reduced levels of several pro-inflammatory and pro-fibrotic pathways such as TGFbeta, CTGF, NFkB and IL-6. Of interest, the expression of DDR1 in the Alport mice occurred in podocytes which are the cells involved in this renal disease.

3.3 DDR1 in Tubular Obstructive Nephropathy

Unilateral Ureteral Obstruction (ligation of the one ureter while the other remains untouched) is a classical model of rapid decomposition of the renal tubular structure. The pathophysiological mechanism is mainly a combination of tubular inflammation, fibrogenesis and epithelial apoptosis. Although it is not very relevant to human CKD, it is popular among investigators because it represents several advantages: it represents a form of primitive tubulointerstitial injury, is a simple and rapid chirurgical intervention, the contre-lateral kidney can serve as control, it does not depend on the genetic background of the mice and the structural decay is relatively fast. There is although the limitation that only the histopathology indexes can be used for analysis. The classical indexes of overall renal function such as proteinuria or creatininemia remain normal since the contre-lateral kidney compensates for the loss of the obstructed kidney. Since interstitial injury and the cellular infiltration and extracellular matrix deposition within the interstitium are considered as key steps in the progression of CKD, the role of DDR1 was studied also in the UUO model using again mice deficient in DDR1 expression (Guerrot et al. 2011). DDR1 was several fold up-regulated after UUO at both the mRNA and the protein expression levels. Interestingly, the major induction of DDR1 expression did not occur in the injured tubular epithelial cells. The major cells responsible for the *de novo* induction of DDR1 expression in the kidney were interstitial cells, and specifically in cells positive to F4/80. Co-localization experiments indicated that the interstitial cells expressing DDR1 were mainly macrophages and to a lesser extent dendritic cells. The mechanism producing renal injury following UUO is characterized by an early onset of renal interstitial inflammation due to the production of inflammatory cytokines, such as MCP-1, by resident interstitial and/or epithelial cells (Chevalier 2006, Chevalier et al. 2009). Infiltration by activated macrophages is a central step in the inflammatory response to UUO and in the progression of the subsequent renal injury (Vielhauer et al. 2001, Lange-

Sperandio et al. 2002, Anders et al. 2002, Lange-Sperandio et al. 2006). This observation indicates that DDR1 is induced locally in cell types that are predominantly activated by the specific physiopathological process and involved in the response to the renal injury: renal vessels and mesangium in hypertension (Flamant et al. 2006) podocytes in a model of Alport syndrome (Gross et al. 2010), and macrophages in the UUO model (Guerrot et al. 2011). This implies that the absence of DDR1 expression in macrophages was protective against UUO induced lesions in DDR1 deficient mice. Experiments performed with Boyden chambers, coated with collagen IV or not, (Franco et al. 2009, Guerrot et al. 2011) showed that macrophages freshly isolated from mice lacking DDR1 expression exhibited a deficient capacity of migration compared with macrophages isolated from wild type animals. This observation suggests that DDR1 expression and activation in macrophages is essential for an efficient migration and indicates the role of DDR1 in interstitial lesions associated to macrophage infiltration in kidneys.

3.4 DDR1 in Crescentic Glomerulonephritis

Crescentic glomerulonephritis is a lethal rapidly progressive renal pathology. It is an autoimmune disease in which circulating antibodies are directed towards antigens present in the chains of type IV collagen of the glomerular basement membrane. The experimental alloimmune anti-glomerular basement membrane (anti-GBM) nephritis referred also as nephrotoxic serum nephritis (NTS) is a model commonly used to study mechanisms of crescentic glomerulonephritis. This model is based on injecting mice (or rats) with a sheep (or goat) serum immunized against glomerular extracts of the mice. This serum obviously contains additional glomerular target antigens compared to human pathology. The injection of NTS, induces an immediate major vasoconstriction followed by an inflammatory response characterized with the infiltration of polymorphonuclear cells. This first wave of the innate immune response is followed by T and B cell activation, which leads to progressive infiltration by CD4+ T cells and macrophages. After few days significant proteinuria, GFR decrease, renal inflammation and tubular injury can be observed, associated with glomerular fibrin deposits, the formation of glomerular crescents and tubulointerstitial fibrosis. After few weeks animals progress to End Stage Renal Failure and die (Kerroch et al. 2012).

As was the case with the previous models, NTS administration was followed by a progressive increase of DDR1 mRNA and protein expressions predominantly in the initial sites of aggression, glomeruli and proximal tubular cells, the two compartments that are the main

targets of NTS (Kerroch et al 2012). As with the hypertensive models was not expressed in the infiltrating cells (macrophages or lymphocytes). It appears thus, that the disease-driven expression of DDR1 is cell/tissue specific, strongly depending the underlying mechanisms. It can be expressed in infiltrating cells in models such as the UUO (Guerrot et al. 2011), or in resident cells in response to the inflammatory process in models such as the hypertensive nephropathy (Flamant et al, 2006) or crescentic glomerulonephritis (Kerroch et al. 2012), or in a combination of infiltrating and resident cells: DDR1 is present in smooth muscle cells and macrophages in atherosclerosis (Franco et al. 2008, Franco et al. 2009), and in epithelial cells and macrophages in the model of bleomycin-induced lung fibrosis (Avivi-Green et al. 2006). As with the previous models of renal disease, mice lacking expression of DDR1 were strongly protected. They showed less proteinuria, uremia, and fibrosis, decreased fibrin deposits and crescentic formation, and blunted inflammatory influx. As a result these mice displayed a better preservation of renal function and structure and a seven-fold increase in lifespan (Kerroch et al. 2012). In addition, a positive feed-back interaction was observed between DDR1 and IL-1 beta: IL-1 beta induced mRNA and protein expression of DDR1 in cultured podocytes in vitro, and inversely genetic deletion of DDR1 strongly diminished expression of IL-1 beta. Since cytokine secretion such as IL-1 beta by macrophages is a major mechanism to induce podocyte injury in crescentic glomerulonephritis (Timoshanko et al. 2004, Tipping and Timoshanko 2005) it is probable that the above-described positive interaction between IL-1 beta and DDR1 is responsible for the deleterious effects of DDR1 activation in the renal function in this model.

When antisense oligonucleotides directed against DDR1 were continuously administered in wild type mice during the development of the disease, an important renoprotection was observed, similar to that seen with the mice lacking DDR1 expression (Kerroch et al. 2012). The experimental approach using antisense oligonucleotides avoided any potential renal or vascular consequence of DDR1 gene deletion during the development of mice and provided a first proof of concept that DDR1 can be a potential target for therapy in renal disease.

4. Molecular and cellular mechanisms of DDR1 in CKD

Still, several questions regarding the mechanisms of action of DDR1 remain unanswered such as the identity of the signal inducing DDR1 neo-expression and/or activation, whether DDR1 is activated only by collagen binding or if it can be transactivated as other tyrosine kinase receptors do, the existence and consequences of DDR1 shedding in vivo, the fate of DDR1 receptor after its phosphorylation, and if the neo-expression and stimulation of DDR1 is

enough to initiate and promote renal disease by itself without the synergy of other surrounding factors such as hemodynamic alterations, electrolyte changes, or cell stress.

From a point of view of renal physiopathology, the questions regarding the identification of the signal inducing DDR1 expression in kidneys and the direct promotion of renal disease by DDR1 activation are essential. Since a feature common to the above presented models are important hemodynamic alterations early after the induction of the disease, it is probable that DDR1 activation is due to a cell event associated with these hemodynamic alterations such as endothelial stress, hypoxia, or shear stress. We are currently investigating these directions and the first results confirm the above mentioned hypotheses.

Regarding the capacity of DDR1 activation to initiate and promote renal disease we are currently investigating whether the time conditional and local overexpression of DDR1 in the renal epithelium is a turning point to induce renal damage independently of the external cause. To address this objective the Paxillin 8 (Pax8) promoter approach was used (Traykova-Brauch et al 2008, Hakroush et al. 2009, Koesters et al. 2010) to create conditional strains overexpressing DDR1 in the renal tubular epithelium (Figure 2). This approach consists to create and cross-breed Pax8-rtTA/LC-1 mice with the Tet-o/LacZ/DDR1. Under basal conditions, animals will not express DDR1 but LacZ instead (allowing thus a control of the promoter-tissue specificity). After administration of Dox, rtTA will activate TRE and Cre recombinase, which will excise LacZ and thus will approach TRE to DDR1. As a result, DDR1 will be overexpressed in the same tissue as LacZ was expressed before. This approach has been already validated in renal physiopathology. The first results are supportive of DDR1 being capable to initiate and promote renal disease.

5. DDR1 in human CKD

Clinical data regarding the role of DDR1 in human nephropathies and the potential effects of its inhibition for therapy are scarce. In few biopsies from focal segmental glomerulosclerosis, diabetic nephropathy and Goodpasture's syndrome, DDR1 was expressed in glomeruli, parietal epithelial cells, proximal and distal tubules and the interstitium (Kerroch et al. 2012). Some inhibitors of tyrosine kinase receptors with a selectivity also for DDR1, such as imatinib or nilotinib have been tested with mixed results. Imatinib is a non-selective inhibitor of several tyrosine kinase receptors, including DDR1. Imatinib is currently used in patients with hematologic disorders such as chronic and acute myeloid leukemia and gastrointestinal stromal tumors. It has been tested in experimental

studies with encouraging results in diabetic and lupus nephropathy models. However, it displays several unpleasant secondary effects (such as nausea, diarrhea, periorbital edema or muscle cramps), probably due to non-selective inhibition of tyrosine kinase receptors which results in epithelial toxicity spread in several tissues. Nilotinib was tested in a model of chronic nephropathy with promising results. However, its tolerance and toxicity in humans has not been tested, and due to lack of selectivity it will probably result in similar to imatinib secondary effects.

6. DDR1 as a target for therapy of CKD

Several elements support the hypothesis that a specific blockade of DDR1 can be a promising target for therapy of CKD:

- 1) DDR1 expression in healthy kidney is low, but it is overexpressed in several models of renal disease.
- 2) DDR1 activation is accompanying a tissue aggression and is focal to the damaged tissue.
- 3) DDR1 amplifies renal injury by enhancing the interaction between renal inflammation and fibrosis the two pillars of CKD.
- 4) Genetic deletion of DDR1 expression impairs the inflammatory response and preserves renal function and structure.
- 5) Silencing of DDR1 gene with anti-sense oligonucleotides preserves renal function.
- 6) Inhibition of DDR1 neo-expression/activation does not affect physiological functions.
- 7) As membrane receptors, DDR1 are easily accessible for detection and therapy intervention.
- 8) Preliminary experiments show DDR1 overexpression in human renal pathologies.

Unpublished data from our lab with the NTS model further support the hypothesis that DDR1 can be a target for therapy. DDR1 inhibition by antisense after the establishment of the disease (severe proteinuria) was accompanied by an arrest in the progression of renal disease. For the moment, tools do not exist to allow an in depth investigation in human CKD (Elisa kits, specific blockers). Thus, studies about DDR1's levels in renal biopsies, or correlating its expression with the decline of renal function will still wait for a while. Hopefully, the waiting time will not be so long, because several groups of investigators are currently pursuing these objectives and these tools will become available in a nearby future. Already, recent investigations report the synthesis of specific DDR1 inhibitors, in *in vitro* settings (Kim et al. 2013, Li et al. 2015, Murray et al. 2015). It remains to test their efficiency and selectivity in *in vivo* studies.

7.Perspectives: Do DDR1 inhibitors have the potential of transfer in human CKD?

Our recent investigations, using mainly experimental models, lead us to identify DDR1 as promising target of therapy. The observations supporting such a role are listed above. The most important limitation is the current lack of widely validated tools ready for use in humans, but this limitation will not exist in a near future as the field is rapidly expanding and several antibodies or blocking agents are expected to be generated or are currently under testing.

REF E R E N C E S

1. United States Renal Data System (2003). Annual data report: incidence and prevalence of ESRD. *Am J Kidney Dis* 42: S37–173.
2. Lozano R (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2095–2128.
3. Boffa JJ, Ying L, Placier S et al (2003) Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: Role of angiotensin II receptor antagonism and metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* 14: 1132-1144.
4. Placier S, Boffa JJ, Dussaule JC et al (2006) Reversal of renal lesions following interruption of nitric oxide synthesis inhibition in transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 21: 881-888.
5. Huby AC, Rastaldi MP, Caron K et al (2009) Restoration of podocyte structure and improvement of chronic renal disease in transgenic mice overexpressing renin. *PLoS One* 21: e6721.
6. Kavvadas P, Weis L, Abed AB et al (2013) Renin inhibition reverses renal disease in transgenic mice by shifting the balance between profibrotic and antifibrotic agents. *Hypertension* 61: 901-907.
7. Chatziantoniou C, Dussaule JC (2008) Is kidney injury a reversible process? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:76-81.
8. Mauer M, Zinman B, Gardiner R et al (2009) Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 361:40-51.
9. Hou G, Vogel W, Bendeck MP (2001). The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest* 107: 727-735.
10. Curat AC, Vogel WF (2002) Discoidin domain receptor 1 controls growth and adhesion of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 13:2648-2656.
11. Gross O, Beirowski B, Harvey SJ et al (2004) DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria, *Kidney Int* 66:102-111.
12. Gross O, Girgert R, Beirowski B, et al (2010) Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease, *Matrix Biol* 29:346-356.
13. Flamant M, Placier S, Rodenas A et al (2006) Discoidin Domain Receptor 1 Null Mice Are Protected Against Hypertension-induced Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 3374-3381.

14. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y et al (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10 :321-329.
15. Fliser D, Buchholz K, Haller H (2004). EUropean Trial on Olmesartan and Pravastatin in Inflammation and Atherosclerosis (EUTOPIA) Investigators. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation *Circulation* 110:1103-1107.
16. Chatziantoniou C, Boffa JJ, Ardaillou R et al (1998) Nitric oxide inhibition induces early activation of type I collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice: role of endothelin. *J Clin Invest* 101: 2780-2789.
17. Boffa JJ, Tharaux PL, Placier S et al (1999) Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal vasculature of transgenic mice during inhibition of nitric oxide synthesis: evidence for an endothelin-mediated mechanism. *Circulation* 100:1901-1908.
18. Guerrot D, Kerroch M, Placier S et al (2011) Discoidin Domain Receptor 1 is a Major Mediator of Inflammation and Fibrosis Induced by Unilateral Ureteral Obstruction. *Am J Pathol* 179: 83-91.
19. Chevalier R (2006) Specific molecular targeting of renal injury in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 70:1200–1201.
20. Chevalier R, Forbes M, Thornhill B (2009) Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 75:1145–1152.
21. Vielhauer V, Anders H, Mack M et al (2001) Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 12:1173–1187.
22. Lange-Sperandio B, Cachat F, Thornhill B et al (2002). Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice. *Kidney Int* 61:516–524.
23. Anders H, Vielhauer V, Frink M et al (2002) A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest* 109:251–259.
24. Lange-Sperandio B, Schimpgen K, Rodenbeck B et al Distinct roles of Mac-1 and its counter-receptors in neonatal obstructive nephropathy. *Kidney Int* 69:81–88.

25. Franco C, Britto K, Wong E et al (2009) Discoidin domain receptor 1 on bone marrowderived cells promotes macrophage accumulation during atherogenesis. *Circ Res* 105:1141–1148.
26. Kerroch, M, Guerrot D, Vandermeersch S et al (2012) Genetic inhibition of discoidin domain receptor 1 protects mice against crescentic glomerulonephritis. *Faseb J* 26: 4079-4091.
27. Franco C, Hou G, Ahmad PJ et al (2008) Discoidin Domain Receptor 1 Deletion Decreases Atherosclerosis by Accelerating Cell Matrix Accumulation and Reducing Inflammation in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circ Res* 102: 1202-1211.
28. Avivi-Green C, Singal M, Vogel WF (2006) Discoidin domain receptor 1-deficient mice are resistant to bleomycin-induced lung fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med* 174:420-427.
29. Timoshanko JR, Kitching AR, Iwakura Y et al (2004) Leukocyte-derived interleukin- 1beta interacts with renal interleukin-1 receptor I to promote renal tumor necrosis factor and glomerular injury in murine crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* 164:1967-1977.
30. Tipping PG, Timoshanko J (2005) Contributions of intrinsic renal cells to crescentic glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 101: 173-178.
31. Traykova-Brauch, M., Schönig K, Greiner O et al (2008) An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nat Med* 14: 979-984.
32. Hakroush S, Moeller MJ, Theilig F et al (2009) Effects of increased renal tubular vascular endothelial growth factor (VEGF) on fibrosis, cyst formation, and glomerular disease. *Am J Pathol* 175: 1883-1895.
33. Koesters, R., Kaissling B, Lehir M et al (2010) Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells. *Am J Pathol* 177: 632-643.
34. Kim HG, Tan L, Weisberg E et al (2013) Discovery of a potent and selective DDR1 receptor tyrosine kinase inhibitor. *ACS Chem Biol* 8:2145-2150.
35. Li Y, Lu X, Ren X et a (2015) Small molecule discoidin domain receptor kinase inhibitors and potential medical applications. *J Med Chem* 58:3287-3301.
36. Murray CW, Berdini V, Buck IM et al (2015) Fragment-Based Discovery of Potent and Selective DDR1/2 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* 6:798-803.

FIGURES

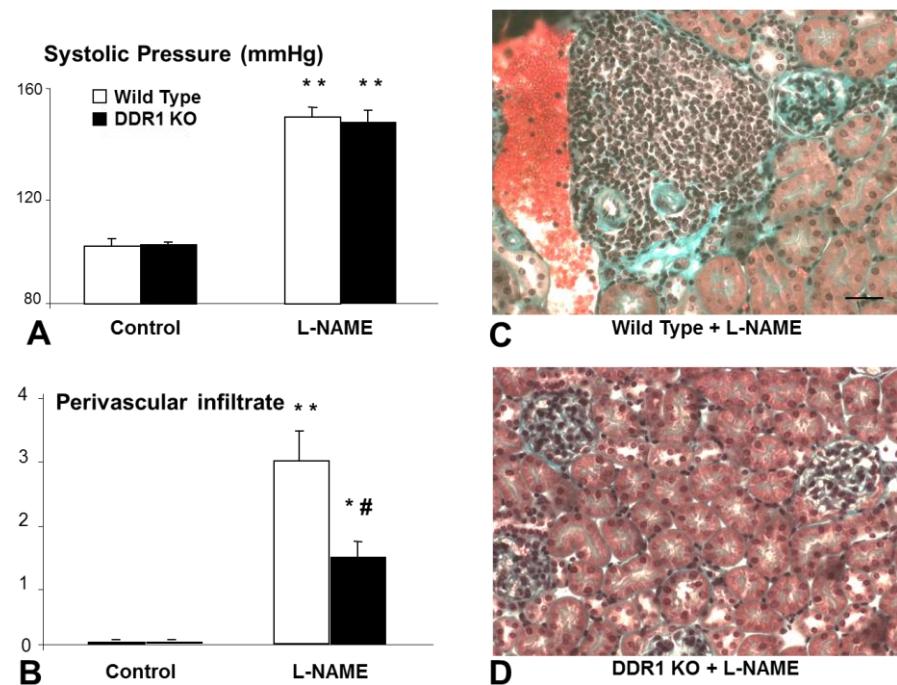


Figure 1. Systolic blood pressure increase (A) and perivascular infiltrate score (B) in wild type and DDR1 deficient mice after 20 weeks of NO inhibition. Values are means \pm SE; n=10; * $P < 0.05$ vs. control; ** $P < 0.01$ vs. control; # $P < 0.05$ vs. wild type. Representative examples of extracellular matrix staining (Masson's trichromic solution, bar = 20 μ m)) in renal cortex of wild type (C) and DDR1 null mice (D) treated for 20 weeks with the NO synthase inhibitor L-NAME. Note the absence of inflammatory cells and the decreased degree of structural alterations in the DDR1 null mice.

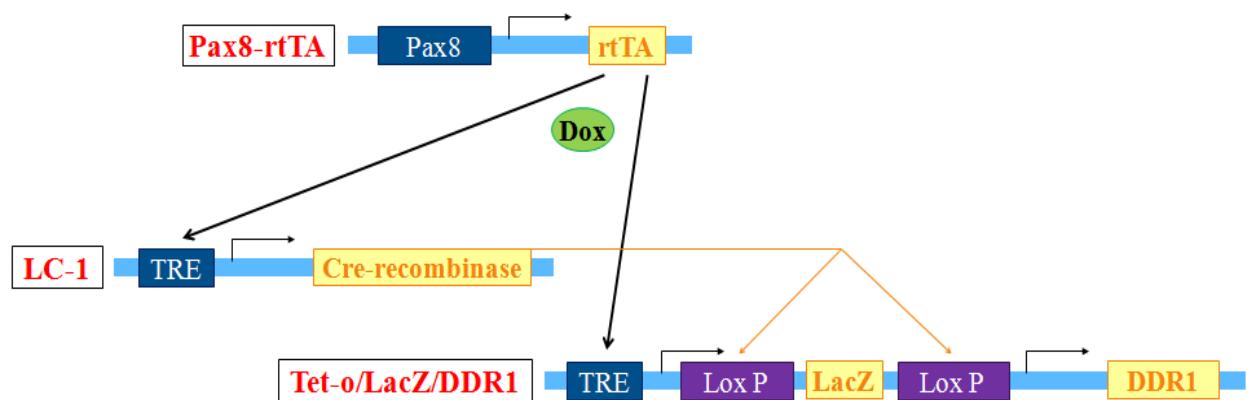


Figure 2. Experimental design for the creation of a strain of transgenic mice expressing DDR1 in a time and tissue conditional fashion. In this case, the Pax8 promoter approach was used for the creation and activation DDR1 in the renal tubular epithelium.

Résumé de la thèse en Anglais

Renal diseases lead to severe long-term complications of kidney function and only few preventive and therapeutic options exist.

Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) is a non-integrin collagen receptor expressed in several cell types within the kidney. Its abnormal expression has a deleterious role in experimental chronic kidney diseases (CKD) by promoting renal inflammation and fibrosis. The first aim of this thesis was to determine whether blocking the expression of DDR1 after the establishment of experimental CKD can affect the final outcome of the disease. A second objective was to examine if DDR1 was involved in renal Ischemia-Reperfusion (I/R) injury, to investigate the molecular mechanism(s) leading to the abnormal expression of DDR1 during I/R and to evaluate the renal protection elicited by the pharmaco-genetic inhibition of DDR1. Finally, we created and validated new tools in order to study the molecular mechanisms induced by DDR1.

The administration of oligodeoxynucleotides antisense inhibiting DDR1 after the initiation of experimental CKD stopped the progression of renal disease in two different models of CKD : NTS-induced nephropathy and Unilateral Ureteral Obstruction.

DDR1 expression was also strongly induced in proximal epithelial tubular cells (PETCs) after I/R. Pharmaco-genetic inhibition of DDR1 expression preserved renal function through the decrease of tubular damage and renal inflammation. Moreover, isolated PETCs from DDR1 heterozygous mice after I/R did not acquire the pro-inflammatory phenotype displayed by PETCs from WT mice. Endoplasmic reticulum (ER) stress was responsible for DDR1 pathological expression in hypoxic PETCs after I/R through the activation of CHOP transcription factor. Interestingly, biopsies of transplant patients with prolonged ischemia during transplantation had a very similar expression profile of DDR1 in proximal tubules as in experimental I/R.

Finally, we created a conditional transgenic mouse model allowing the induction of DDR1 in a time-dependent and tissue-specific manner in epithelial tubular cells. DDR1 overexpression for four weeks led to the development of renal inflammation and fibrosis.

To conclude, our results suggest that ER stress induces DDR1 expression through CHOP activation in PETCs after I/R. The genetically-induced or the pathological overexpression of DDR1 promotes renal inflammation and fibrosis. Thus, targeting DDR1 can be a promising strategy in the treatment of renal diseases.

Keywords : Endoplasmic reticulum stress, Inflammation, Fibrosis.

Résumé de la thèse en français

Les maladies rénales sont des pathologies sévères dont les complications terminales conduisent à la dialyse ou la transplantation. Ces pathologies ont un impact socio-économique majeur sur la santé publique nécessitant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le Récepteur à Domaine Discoïdine de type 1 (DDR1) est un récepteur non-intégrine des collagènes, à activité tyrosine-kinase. Son expression aberrante est un facteur clé de la pathologie rénale qui promeut le développement de l'inflammation et de la fibrose. Les objectifs de cette thèse étaient de déterminer si l'inhibition de l'expression de DDR1 pouvait ralentir ou arrêter la progression de néphropathies chroniques et si ce récepteur jouait un rôle dans la pathologie rénale aigüe. Nous avons également cherché à mettre en évidence un mécanisme moléculaire impliqué dans l'expression *de novo* de DDR1 en conditions pathologiques. Enfin, nous souhaitions créer des outils permettant l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires induits par l'expression et l'activation de DDR1.

Dans un premier temps, nous avons démontré un arrêt de la progression de maladies rénales chroniques expérimentales consécutivement à l'inhibition retardée de l'expression de DDR1 par administration d'oligodésoxynucléotides anti-sens (ODN AS) dans deux modèles différents de néphropathies ; la glomérulonéphrite par injection de sérum néphrotoxique et l'obstruction urétérale unilatérale.

Dans un second temps, nous avons montré que l'administration préventive d'ODN AS permettait de préserver la fonction rénale, dans un modèle d'ischémie-reperfusion (I/R), en diminuant les lésions tubulaires et l'inflammation rénale. Dans ce modèle, les cellules épithéliales tubulaires proximales (CETP) étudiées *ex vivo*, exprimaient anormalement DDR1. Lorsque les CETP étaient issues de souris hétérozygotes pour DDR1, elles n'acquéraient pas de phénotype pro-inflammatoire après I/R.

Dans un troisième temps, nous avons reproduit *in vitro*, l'induction de l'expression de DDR1 observée *in vivo* dans les CETP après I/R. Nous avons démontré que le stress du réticulum endoplasmique (RE), secondaire à l'hypoxie, était responsable de cette induction, via l'activation du facteur de transcription CHOP.

Enfin, nous avons créé et validé un nouveau modèle de souris triples transgéniques permettant la surexpression inductible de DDR1 dans les cellules épithéliales tubulaires. Les résultats préliminaires obtenus ont montré l'installation d'une inflammation et d'une fibrose rénales suivant l'expression artificielle de DDR1 durant 4 semaines.

En conclusion, nos résultats suggèrent que le stress du RE induit l'expression de DDR1 dans les CETP via l'activation du facteur de transcription CHOP. De plus, la surexpression de DDR1 joue un rôle délétère dans l'I/R rénale, et promeut l'inflammation et la fibrose, ce qui renforce l'intérêt du développement d'inhibiteurs spécifiques de l'activité tyrosine-kinase de DDR1 capables de bloquer la fonction de ce récepteur.

Mots clés : Stress du réticulum endoplasmique, Inflammation, Fibrose.