

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS  
Université de Poitiers, UFR de médecine et de pharmacie  
Ischémie reperfusion en transplantation d'organes mécanismes et innovations thérapeutiques -  
IRTOMIT (Poitiers)  
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé  
Secteur de recherche : Aspect moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :  
**Antoine Thierry**

### **Implication de l'immunité innée au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion : rôle de l'axe IL-33/lymphocytes iNKT**

Directeur(s) de Thèse :  
Jean-Marc Gombert, Thierry Hauet

Soutenue le 13 juin 2013 devant le jury

#### Jury :

|            |                          |                                                    |
|------------|--------------------------|----------------------------------------------------|
| Président  | <b>Guy Touchard</b>      | Professeur des Universités, Université de Poitiers |
| Rapporteur | <b>Alain Le Moine</b>    | Docteur, Université libre de Bruxelles             |
| Rapporteur | <b>Christian Noël</b>    | Professeur des Universités, Université de Lille 2  |
| Membre     | <b>Jean-Marc Gombert</b> | Professeur des Universités, Université de Poitiers |
| Membre     | <b>Thierry Hauet</b>     | Professeur des Universités, Université de Poitiers |
| Membre     | <b>Guy Touchard</b>      | Professeur des Universités, Université de Poitiers |
| Membre     | <b>Gilles Blanche</b>    | Professeur des Universités, Université de Nantes   |

#### **Pour citer cette thèse :**

Antoine Thierry. *Implication de l'immunité innée au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion : rôle de l'axe IL-33/lymphocytes iNKT* [En ligne]. Thèse Aspect moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

# **THESE**

pour l'obtention du Grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS  
(Faculté de Médecine et Pharmacie)  
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524

Champ disciplinaire : Biologie-Médecine-Santé  
Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie (510)

Présentée par :

**Antoine THIERRY**

\*\*\*\*\*

**Implication de l'immunité innée au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion :  
rôle de l'axe IL-33 / lymphocytes iNKT**

\*\*\*\*\*

Directeurs de Thèse :  
Jean-Marc GOMBERT, Thierry HAUET, Professeurs, Université de Poitiers

\*\*\*\*\*

Soutenue le 13 juin 2013  
devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

## **JURY**

Alain LE MOINE, Docteur, Université libre de Bruxelles : Rapporteur  
Christian NOEL, Professeur, Université de Lille : Rapporteur  
Gilles BLANCHO, Professeur, Université de Nantes : Examineur  
Jean-Marc GOMBERT, Professeur, Université de Poitiers : Examineur  
Thierry HAUET, Professeur, Université de Poitiers : Examineur  
Guy TOUCHARD, Professeur, Université de Poitiers : Examineur

A Laurence, Elise et Clémence

A mes parents, à Benoit et Charles et toute ma famille

A mes amis

A ceux qui ne sont plus là, je n'oublie pas ce que je leur dois

# REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Guy TOUCHARD, qui m'a encadré depuis mes débuts en Néphrologie et a contribué à ma vocation pour la transplantation rénale. Je n'oublie pas sa confiance, son exigence et les valeurs qu'il a pu me transmettre, bien au delà de l'exercice de la médecine.

Je remercie Monsieur le Professeur Christian NOEL et Monsieur le Docteur Alain LE MOINE qui ont accepté avec diligence d'être rapporteurs de mon travail de thèse : soyez assurés de ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Gilles BLANCHO qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ma thèse. D'Athènes à Boston, nos échanges, scientifiques ou non, ont nourri notre amitié.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans mes directeurs de thèse, Messieurs les Professeurs Jean-Marc GOMBERT et Thierry HAUET, qui m'ont soutenu en m'accordant patience et confiance : soyez en vivement remerciés.

J'adresse ma profonde reconnaissance également au Docteur André HERBELIN, qui a contribué à mon cheminement tout au long de ce travail.

Ma thèse s'est déroulée dans les laboratoires des Unités INSERM U935 et U1082 à Poitiers, dont je remercie les responsables respectifs, les Professeurs Ali TURHAN et Thierry HAUET.

Je salue ici le « groupe immuno » de l'Unité INSERM U1082:

Aurélien et Sébastien, vos disponibilités et vos compétences multiples m'ont été plus que précieuses : soyez assurés de ma reconnaissance.

André, pour ton apport intellectuel à notre groupe, ton regard bienveillant, ta vision de la recherche et nos soirées bière : reçoit toute mon amitié.

Jean-Marc (Unité U935) : pour ton enseignement rigoureux, ton humanisme érudit, ta tolérance opérationnelle à mon égard et notre amitié : merci.

Je remercie les autres membres de l'Unité U1082 qui se sont toujours montrés ouverts et disponibles à mon égard.

Je n'oublie pas mes amis et confrères, le Professeur Frank BRIDOUX, les Docteurs BAUWENS, BELMOUAZ, DESPORT, LEROY, DELBES, POURREAU, ECOTIERE et les internes de Néphrologie pour leur confiance et pour avoir assuré les soins aux patients pendant mes journées « au labo ». Une pensée pour le Docteur Ramzi ABOU-AYACHE, parti sous d'autres cieux, à qui je dois aussi d'avoir pu me libérer pour la recherche.

Ma reconnaissance va enfin aux infirmières, en particulier de la consultation de greffe, à notre infirmière coordinatrice de greffe Nathalie, aux aides-soignantes et secrétaires du Service de Néphrologie de Poitiers pour la qualité de leur travail et leur capacité d'adaptation face à mon emploi du temps ces derniers mois.

# SOMMAIRE

|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>                                                 | <b>8</b>  |
| <b>CHAPITRE 1. L'ISCHEMIE-REPERFUSION .....</b>                          | <b>9</b>  |
| GENERALITES .....                                                        | 9         |
| 1. Définition .....                                                      | 9         |
| 2. Effecteurs cellulaires et moléculaires de l'IR.....                   | 11        |
| 3. Souffrance endothéliale au cours de l'IR.....                         | 13        |
| 4. Conséquence tissulaire : concept d'inflammation stérile.....          | 15        |
| LA TRANSPLANTATION D'ORGANE : UN MODELE D'ISCHEMIE-REPERFUSION .....     | 17        |
| IMPACT DE LA MORT ENCEPHALIQUE SUR L'ISCHEMIE REPERFUSION .....          | 19        |
| LA TRANSPLANTATION RENALE CHEZ L'HOMME : UN EXEMPLE D'IR .....           | 20        |
| 1. Conséquences endothéliales .....                                      | 20        |
| 2. Conséquences épithéliales .....                                       | 21        |
| 3. Infiltrat interstitiel.....                                           | 23        |
| 4. La réparation tissulaire .....                                        | 26        |
| <b>CHAPITRE 2. IR ET ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE .....</b>         | <b>28</b> |
| GENERALITES .....                                                        | 28        |
| ROLE DES ALARMINES/DAMPs.....                                            | 30        |
| 1. Généralités.....                                                      | 30        |
| 2. La théorie du danger.....                                             | 32        |
| 3. HMGB1 : exemple d'une alarmine portant le signal danger après IR..... | 34        |
| 3.1 Généralités.....                                                     | 35        |
| 3.2 Récepteur et transduction du signal.....                             | 35        |
| 3.3 Cibles cellulaires et activité biologique.....                       | 36        |
| 3.4 Implication d'HMGB1 dans l'IR.....                                   | 38        |
| 4. TLRs, cibles des DAMPs en transplantation .....                       | 40        |
| 4.1 TLR et IR.....                                                       | 40        |
| 4.2 TLR et transplantation.....                                          | 41        |
| 5. IL-33 : nouvelle alarmine potentiellement impliquée dans l'IR .....   | 43        |
| 5.1 Généralités.....                                                     | 43        |
| 5.2 Transduction du signal .....                                         | 45        |
| 5.3 L'IL-33 et le rein .....                                             | 46        |
| 5.4 IL-33 : un rôle dans l'IR ? .....                                    | 47        |
| 5.5 IL-33: un rôle en transplantation ? .....                            | 48        |
| <b>CHAPITRE 3. CELLULES NKT : CIBLE PRIVILEGIEE DE L'IR .....</b>        | <b>49</b> |
| GENERALITES .....                                                        | 49        |
| UN TCR PARTICULIER, RESTREINT PAR CD1d .....                             | 50        |
| STIMULATION DES LYMPHOCYTES iNKT.....                                    | 50        |
| CARACTERISATION PHENOTYPIQUE.....                                        | 52        |
| PRODUCTION DE CYTOKINES .....                                            | 54        |
| LES LYMPHOCYTES iNKT : UNE CIBLE DE L'IL-33 .....                        | 55        |
| LYMPHOCYTES iNKT : UN ROLE CLEF DANS L'IR .....                          | 55        |

|                                          |            |
|------------------------------------------|------------|
| LYMPHOCYTES iNKT ET REJET DE GREFFE..... | 57         |
| <b>RESULTATS .....</b>                   | <b>59</b>  |
| <b>MANUSCRIT N°1.....</b>                | <b>60</b>  |
| <b>MANUSCRIT N°2.....</b>                | <b>71</b>  |
| <b>DISCUSSION .....</b>                  | <b>106</b> |
| <b>CONCLUSION.....</b>                   | <b>121</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>               | <b>123</b> |
| <b>ANNEXE .....</b>                      | <b>137</b> |

## *Liste des abréviations*

Ac : anticorps

Ag : antigène

$\alpha$ -GC :  $\alpha$ -galactosylcéramide

ATP : adénosine triphosphate

Bcl3 : *B cell leukemia/lymphoma*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CTGF : *connective tissue growth factor*

DAMP: *Damage Associated Molecular Pattern*

DC: *dendritic cell*

ERK : *extracellular signal regulated kinase*

G-CSF : *granulocyte colony stimulating factor*

HIF: *Hypoxia-inducible Factor*

HMGB1: *High Mobility Group Box 1*

HSP: *Heat-Shock Protein*

ICAM: *intercellular adhesion molecule*

IFN: Interféron

IKK $\beta$  : *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*

iNKT: invariant Natural killer T

IL: Interleukine

IL-1Rap : *IL-1 receptor accessory protein*

IR : ischémie-reperfusion

IRF3 : *interferon regulatory factor 3*

JNK : JUN N terminal kinase

KIM-1 : *kidney injury molecule-1*

LPS : LipoPolySaccharide

MAIT : Mucosal-associated invariant T cell

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MyD88 : *myeloid differentiation primary response gene 88*

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite

NF-HEV : nuclear factor from high endothelial veinules

NF- $\kappa$ B : *Nuclear Factor of  $\kappa$  light chain gene enhancer in B cell*

NGAL : *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*

NK : Natural Killer

NKG2D : *natural killer group 2D*

PAMP : *Pathogen associated Molecular Pattern*

PARP-1 : poly(ADP-ribose) polymerase 1

PLZF : *promyelocytic leukaemia zinc finger*

PNN : Polynucléaire Neutrophile

PRR : *Pattern Recognition receptors*

RAG : recombination-activating gene-1

RAGE : *Receptor for Advanced Glycation End-products*

RANTES : *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

siRNA : *small interfering RNA*

ST2s : *Interleukin-1 Receptor Like 1 (IL-1RL1) soluble fraction*

ST2L : *Interleukin-1 Receptor Like 1 (IL-1RL1) membrane fraction*

TCR : *T Cell Receptor*

TP : tube contourné proximal

TLR : *Toll-Like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TRIF : *TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$*

TSP-1 : Thrombospondine-1

Tregs : T régulateurs

VCAM : vascular cell adhesion molecule

# ***Introduction***

## CHAPITRE 1. L'ISCHEMIE-REPERFUSION

---

### GENERALITES

---

#### 1. DEFINITION

---

L'ischémie-reperfusion est un phénomène caractérisé par la restriction de la circulation sanguine d'un tissu ou un organe suivi de la restauration de la perfusion et de la réoxygénation concomitante. Initialement, l'interruption du flux artériel entraîne de sévères anomalies métaboliques, liées à l'hypoxie cellulaire. Secondairement, la reperfusion exacerbe les lésions tissulaires et contribue à générer une forte réponse inflammatoire non seulement au sein de l'organe concerné mais aussi à distance (1). Ce syndrome d'IR (pour « ischémie-reperfusion ») survient au cours de nombreuses situations, telles une transplantation d'organe, un infarctus du myocarde ou encore un traumatisme. Le Tableau n°1 rapporte quelques exemples d'IR affectant différents organes et rappelle le large éventail des conséquences cliniques possibles.

L'IR est donc une véritable « réaction en chaîne », initiée par l'hypoxie d'un tissu ou d'un organe, majorée par la reperfusion, pour aboutir à la réponse inflammatoire locale et souvent systémique sous la forme de la libération de cytokines (2). Il est important ici de considérer l'IR comme un phénomène actif et séquentiel, illustré par la Figure n°1, aux conséquences fonctionnelles variables en fonction du tissu concerné.

Néanmoins, il peut être difficile d'identifier dans les différents modèles animaux ce qui revient à l'ischémie de ce qui est lié à la reperfusion dans la genèse des lésions. La littérature qui aborde l'IR demeure très riche en ce qui concerne l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires qui surviennent en particulier au cours de la phase ischémique. Les phénomènes associés à la reperfusion sont certainement plus complexes à appréhender, notamment après transplantation d'organe où les suites opératoires, les médicaments anti-rejets et la réaction allo-immune jouent également un rôle.

**Tableau 1 : Exemples de d'ischémie-reperfusion**

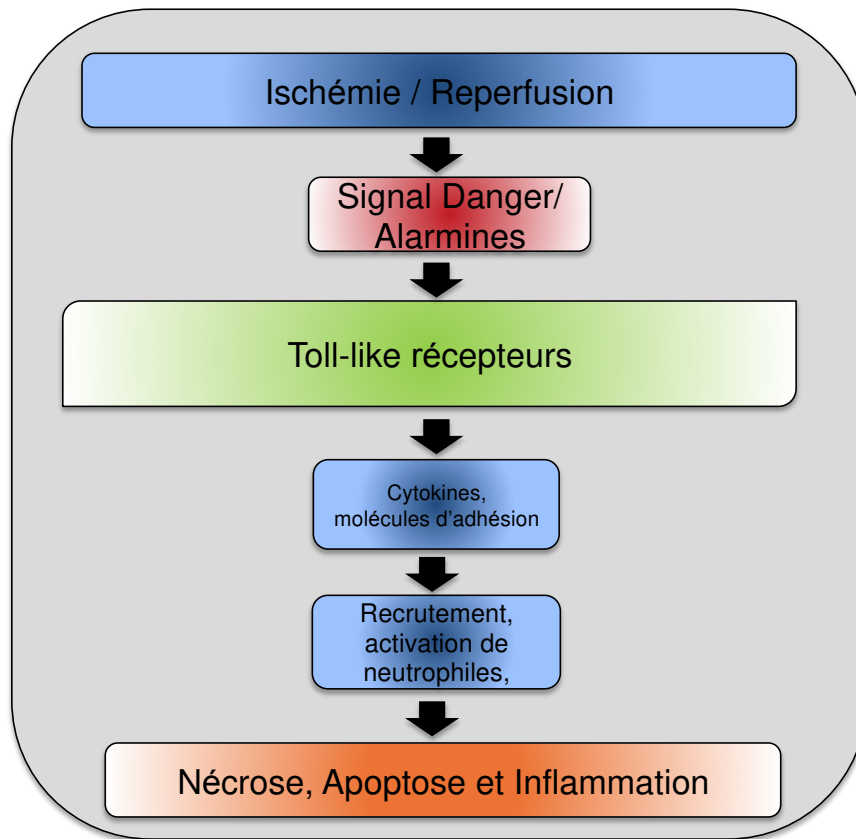
| <b>Organes</b>                                          | <b>Conséquences cliniques</b>                                   |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Ischémie de reperfusion simple-organe</b>            |                                                                 |
| Cœur                                                    | Syndrome coronarien aigu                                        |
| Rein                                                    | Insuffisance rénale aiguë                                       |
| Intestin                                                | Ischémie et reperfusion intestinales                            |
|                                                         | Défaillance multi-viscérale                                     |
| Cerveau                                                 | Accident vasculaire cérébral                                    |
| <b>Ischémie et reperfusion multi-organes</b>            |                                                                 |
| Traumatisme et réanimation                              | Défaillance multi-organes                                       |
| Arrêt circulatoire                                      | Hypoxie cérébrale, insuffisance rénale aiguë...                 |
| Drépanocytose                                           | Douleur thoracique, HTAP*, priapisme, Insuffisance rénale aiguë |
| Apnée du sommeil                                        | Hypertension, diabète                                           |
| <b>Ischémie et reperfusion au cours de la chirurgie</b> |                                                                 |
| Chirurgie cardiaque                                     | Insuffisance cardiaque aiguë                                    |
| Chirurgie thoracique                                    | Insuffisance respiratoire aiguë                                 |
| Chirurgie vasculaire périphérique                       | Syndrome de loge                                                |
| Chirurgie vasculaire majeure                            | Insuffisance rénale aiguë                                       |
| Transplantation d'organes solides                       | Défaillance aiguë d'organe, rejet précoce                       |

\*Hypertension artérielle pulmonaire

D'après d'Eltzschig et Eckle, 2011

L'IR associée à la transplantation d'organe présente d'autres spécificités. Elle est en effet inéluctable, avec une durée dite d'ischémie froide plus ou moins longue. Celle-ci se définit par le délai qui s'écoule entre le clampage définitif de l'aorte chez le donneur au moment du prélèvement et la reperfusion de l'organe chez le receveur. L'ischémie tiède est un autre paramètre important de l'IR en transplantation, qui correspond au délai qui s'écoule entre la sortie du greffon de son milieu de conservation et la reperfusion chez le receveur.

Nous traiterons ci-après de ces principaux mécanismes lésionnels associés à l'IR, avant d'envisager les conséquences inflammatoires pour les tissus.



**Figure n°1 : L'ischémie reperfusion : un phénomène dynamique, qui comporte plusieurs étapes et aboutit au dommage tissulaire (d'après J. Evankovich, 2010)**

---

## 2. EFFECTEURS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'IR

---

Les souffrances endothéliales et épithéliales au cours de l'IR se traduisent par la mise en jeu de différents programmes de mort cellulaire, associant nécrose et apoptose. La souffrance cellulaire au cours de l'IR peut également s'exprimer sous la forme du phénomène d'autophagie.

Le phénomène de nécrose, induisant la libération du contenu intracellulaire après rupture des membranes, est associé à la production de cytokines et au recrutement de cellules inflammatoires. L'extension de la nécrose est en lien direct avec l'intensité et la durée de l'ischémie et dépend de la nature du tissu lésé.

L'apoptose est un processus moins immunogène mais qui libère des nucléotides et de l'ATP (pour « adénosine triphosphate ») en particulier. Il permet également d'initier le recrutement de cellules mononucléées, potentiellement utile à la réparation tissulaire (3).

L'apoptose est associée à une restitution *ad integrum* du tissu après IR plus fréquente que la nécrose.

Enfin l'autophagie plus récemment décrite, est un processus catabolique des protéines et organelles intracellulaires, permettant de générer des substrats pour la production d'ATP et la synthèse protéique. Bien que son rôle soit controversé, l'autophagie pourrait constituer une défense de l'épithélium à un stress hypoxique majeur et limiter la mort cellulaire des cellules adjacentes. L'IR est donc un phénomène actif, où coexistent différents programmes de mort cellulaire et des mécanismes de survie (autophagie). De plus, la mort cellulaire, en particulier la nécrose, induit au cours de l'IR la libération rapide de molécules appelées alarmines, capables d'activer le système immunitaire et que nous aborderons plus en détail au Chapitre 2.B.

Afin d'étudier finement les différentes séquences de l'IR, la principale stratégie des modèles animaux, murins notamment, repose sur l'invalidation de gènes. Cette approche permet de modéliser et d'individualiser les événements moléculaires qui surviennent au cours de l'ischémie et/ou de la reperfusion. Ainsi la délétion par recombinaison homologe de gènes impliqués dans la mort cellulaire par exemple, apporte des informations sur le comportement de la cellule après IR.

Citons à titre d'exemple dans un modèle d'IR rénale, que les souris invalidées pour le gène *TSP1* (pour « Thrombospondine 1 ») (*TSP-1<sup>-/-</sup>*) sont protégées des lésions d'IR (4). Or la protéine TSP-1, libérée par les cellules du tube proximal du rein en souffrance, a un effet pro-apoptotique. Dans ce modèle, la réduction d'un signal pro-apoptotique limite les dommages de l'IR, suggérant le rôle critique de l'apoptose.

Le facteur de transcription hétérodimérique HIF (pour « hypoxia-inducible factor »), qui contrôle l'expression de gènes de l'érythropoïèse et de l'angiogenèse, est activé par l'hypoxie, exerçant un effet protecteur après IR. Ainsi la souris déficiente en sous-unité HIF-1 $\alpha$  ou HIF-2 $\alpha$  présente des lésions endothéliales plus marquées dans un modèle d'IR rénal (5)(6). Plus récemment, des résultats obtenus chez la souris suggèrent que HIF interviendrait dans le mécanisme d'autophagie mitochondriale secondaire à l'hypoxie (7). Ainsi dans un modèle murin d'IR rénale, l'inhibition pharmacologique ou par délétion génique de l'autophagie majore les lésions tubulaires proximales (8).

Citons enfin le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (pour « Nuclear Factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells »), qui régule l'expression de nombreux gènes de

l'inflammation, joue un rôle important au cours de l'IR. Il est également activé par un mécanisme dépendant de l'hypoxie (9). Son inactivation chez la souris, par délétion de IKK $\beta$  (pour « inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta ») permet de réduire l'inflammation systémique, contrastant avec une augmentation de l'apoptose des entérocytes, dans un modèle d'IR intestinal (10). Ces résultats soulignent la dualité du rôle de NF- $\kappa$ B dans l'IR, impliqué dans l'inflammation systémique mais aussi dans la protection cellulaire.

Ces différents résultats suggèrent que l'IR est capable de modifier le programme transcriptionnel des cellules pour moduler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la mort cellulaire, la réponse à l'hypoxie (mécanisme de survie) ou l'inflammation.

Enfin les conséquences biochimiques de l'IR induisent de nombreuses modifications du métabolisme cellulaire. L'IR conduit ainsi à la production de dérivés réactifs de l'oxygène, appelés ROS (pour « Reactive oxygen Species »). Ils sont générés par les tissus en souffrance et induisent des dommages cellulaires par stress oxydatif (11). Les ROS altèrent en effet le métabolisme cellulaire par une toxicité sur les protéines, les lipides et les acides ribonucléiques. En présence d'ions superoxyde ( $O_2^-$ ) générés par la reperfusion, la NADPH (pour « nicotinamide adénine dinucleotide phosphate») oxydase exprimée par les cellules en souffrance ischémique permet la synthèse de peroxynitrite ( $ONOO^-$ ), agent oxydant particulièrement cytotoxique. Sous l'action de l'enzyme superoxyde dismutase, l'ion superoxyde peut également être transformé en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui à forte concentration génère des radicaux hydroxylés toxiques pour l'ADN. Ces atteintes oxydatives de l'ADN mettent en jeu également l'enzyme nucléaire PARP-1 (pour « poly(ADP-ribose) polymerase 1») dont l'activation aboutit entre autres à une privation de la cellule en ATP et *in fine* à la nécrose (12).

---

### 3. SOUFFRANCE ENDOTHELIALE AU COURS DE L'IR

---

L'endothélium vasculaire est un tissu stratégique d'échange entre un organe et le sang circulant. La souffrance endothéliale consécutive à l'IR est associée à des troubles de la perméabilité vasculaire et une activation des cellules endothéliales. Cette activation se traduit par l'expression de molécules d'adhésion ou encore par la mise en jeu de la coagulation et de la cascade du complément.

Chronologiquement l'ischémie induit tout d'abord une perméabilité accrue de la barrière endothéliale, liée à la diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc (13).

Cette souffrance ischémique s'accompagne d'une expression à la surface de l'endothélium de molécules d'adhésion, telle ICAM-1 (pour « intercellular adhesion molecule ») qui permettent le recrutement très précoce des PNN (« pour polynucléaires neutrophiles ») et de monocytes/macrophages (14). Le recrutement de ces derniers met en jeu une molécule chémoattractante, la fractalkine (CX3CL1), exprimée à la surface de l'endothélium. Dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë ischémique, les souris invalidées pour le gène *CX3CR1* qui code le récepteur de la fractalkine, exprimé à la surface des monocytes, sont protégées de l'infiltrat riche en macrophages observé chez la souris sauvage (15).

Le recrutement et l'activation des leucocytes au contact de la barrière endothéliale ont de multiples conséquences. Il peut s'agir d'une obstruction capillaire, d'une migration des cellules du sang circulant vers l'interstitium par diapédèse, ou de la production de cytokines pro-inflammatoires (voir pour revue (16)).

Les plaquettes sont d'autres cellules capables d'interagir avec l'endothélium activé. En effet, l'agression endothéliale consécutive à l'IR induit une agrégation plaquettaire excessive et la libération de médiateurs plaquettaires qui aggravent les lésions tissulaires. Cette activation plaquettaire s'accompagne de l'expression d'intégrines ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$ ), notamment régulée par la protéine kindlin-3. La souris invalidée pour cette protéine présente des PNN anormaux quant à leur capacité d'adhésion à l'endothélium, suggérant un rôle déterminant des intégrines dans l'interaction des plaquettes et des PNN avec l'endothélium (17). L'activation plaquettaire induite par l'IR active également la coagulation et l'inflammation, en ciblant le facteur XII, via la libération de polyphosphates inorganiques (18)

Enfin, l'agression endothéliale, d'abord due à l'hypoxie, altère les structures vasculaires, détériore le glycocalyx et désorganise le cytosquelette d'actine de l'endothélium (19). Dans un modèle d'IR chez le rat, des anomalies de perméabilité de la barrière endothéliale sont mises en évidence dès la deuxième heure de reperfusion (20). Par une approche de micro-vidéo chez le rat après une séquence d'IR, Yamamoto *et al.* ont observé une atteinte de la microcirculation prédominant dans les capillaires péri-tubulaires (21).

La reperfusion est quant à elle associée non seulement à une adhérence leucocytaire à l'endothélium accrue mais aussi à une activation du système du complément et à une augmentation de l'agrégation plaquettaire. Le système du complément joue un rôle dans l'immunosurveillance de l'intégrité tissulaire, s'activant en présence de cellules apoptotiques ou de débris cellulaires. Son activation locale au sein de l'organe atteint par l'IR et la libération d'anaphylatoxines amplifient la réponse inflammatoire, notamment au cours de l'infarctus du myocarde ou de l'accident vasculaire cérébral (22)(23). Néanmoins, un certain degré d'activation du complément limiterait les conséquences de l'IR dans un modèle d'IR hépatique chez la souris (24).

---

#### 4. CONSEQUENCE TISSULAIRE : CONCEPT D'INFLAMMATION STERILE

---

Le sens commun associe habituellement l'inflammation comme un processus de défense de l'hôte vis-à-vis d'un agent infectieux invasif ou d'un allergène. Elle se conçoit alors comme une réaction immunitaire face à une agression extérieure. Cependant, dans d'autres situations, le stress cellulaire et tissulaire peut initier cette réponse inflammatoire, indépendamment de toute infection ou phénomène extérieur. Ainsi un processus inflammatoire, dans un environnement stérile, peut être observé dans de nombreuses circonstances cliniques comme l'IR bien sûr mais aussi la goutte, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer ou encore les cancers.

Dans tous les cas, l'inflammation se caractérise par un recrutement *in situ* de neutrophiles, de macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  (pour « tumor necrosis factor ») et/ou chemoattractantes telle que RANTES (pour « regulated on activation, normal T cell expressed and secreted »).

Précisons à ce stade la dualité potentielle du processus inflammatoire, qu'il survienne après une agression par un pathogène ou dans un contexte stérile (IR...). L'inflammation peut en effet constituer la première lésion et favoriser les dommages tissulaires. Mais l'inflammation peut aussi être une étape essentielle au futur processus de réparation tissulaire.

Après IR, les premières cellules à être recrutées, dès la phase de reperfusion, sont des cellules de l'immunité innée. Leur signification fonctionnelle n'est cependant pas clairement établie, entre effet délétère et effet protecteur pour limiter les lésions et initier la réparation tissulaire. Ainsi les monocytes recrutés à partir d'un réservoir splénique après ischémie myocardique contribuent aux dommages tissulaires (25). En revanche, dans un modèle d'IR

hépatique, la déplétion en DCs (pour « dendritic cell ») conventionnelles aggrave les lésions d'IR. En effet ces DCs, par leur sécrétion d'IL-10 limitent la production d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et des ROS (26). Ces résultats suggèrent que le rôle des cellules de l'immunité innée et des DCs en particulier, recrutées après IR n'est pas univoque et peut contribuer à orienter la réponse immunitaire afin de favoriser la réparation tissulaire.

L'accumulation dans le greffon des granulocytes semble être également finement régulée. Ainsi dans un modèle murin d'IR après transplantation pulmonaire orthotopique, l'expression de la protéine Bcl3 (pour « B cell leukemia/lymphoma ») chez le receveur régule l'expression des gènes dépendants de NF- $\kappa$ B au sein des progéniteurs myéloïdes (27). Dans ce modèle, *Bcl3* contribue au contrôle de la granulopoïèse dépendante du G-CSF (pour « granulocyte colony stimulating factor »), et limite les lésions inflammatoires d'IR.

Les cellules de l'immunité adaptative et en particulier les lymphocytes T sont également un composant de l'infiltrat du tissu atteint par l'IR et jouent un rôle régulateur et/ou effecteur. L'implication des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans l'IR hépatique est illustrée dans plusieurs travaux (28)(29) qui ont montré l'importance des signaux de co-stimulation (CD40-CD40 ligand) et du répertoire du TCR (pour « T cell receptor ») dans la constitution des lésions.

Dans le cadre de l'IR rénale, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont impliqués puisque dans le travail de Day *et al.*, les souris *RAG-1*<sup>-/-</sup> (pour « recombination-activating gene-1 ») déficientes en lymphocytes ont des lésions d'IR moindre, alors que le transfert adoptif de lymphocytes CD4<sup>+</sup> dans ces souris *RAG-1*<sup>-/-</sup> majore ces lésions (30). D'une manière générale, l'identification des populations de lymphocytes T impliquée dans l'IR est difficile. Le rôle des cellules productrices d'IL-17 dans la genèse des lésions a été discuté. Une étude a récemment identifié le rôle des lymphocytes T producteurs d'IL-17 dans un modèle d'IR cérébrale chez la souris (31). Dans ce travail, les cellules productrices d'IL-17 sont des lymphocytes T $\gamma\delta$ , mais leur caractérisation chez l'homme n'est pas établie. De plus, d'autres sources cellulaires productrices d'IL-17 sont susceptibles d'être impliquées dans l'IR, telles que les lymphocytes iNKT que nous aborderons au Chapitre 3 (32)(33).

Néanmoins, le recrutement des lymphocytes Tregs (pour « T régulateurs ») CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> permet de limiter les conséquences tissulaires de l'IR. Chez la souris,

cette population est présente dans l'infiltrat inflammatoire intra-rénal après une séquence d'IR et les auteurs postulent qu'elle joue un rôle protecteur à l'égard des lésions d'IR (34). En effet, la déplétion *in vivo* des lymphocytes Tregs par un Ac (pour « anticorps ») anti-CD25 dans ce modèle, majore les lésions, altère la fonction rénale, augmente l'expression d'IFN- $\gamma$  (pour « interféron gamma ») et augmente la mortalité. Ce rôle critique est confirmé par le fait que le transfert de lymphocytes Tregs à des souris soumises à l'ischémie favorise la réparation tissulaire et limite la production de cytokines inflammatoires. Des résultats comparables sont rapportés dans un modèle expérimental d'accident vasculaire cérébral ischémique chez la souris. Dans ce modèle, les cellules Tregs exercent un effet neuro-protecteur dépendant de l'IL-10 (35).

Ces différentes données ouvrent des perspectives intéressantes quant à la pertinence de moduler le recrutement des cellules immunitaires après IR. En effet, certaines composantes « bénéfiques » de l'inflammation stérile peuvent être mises à profit. Ainsi la connaissance des effecteurs moléculaires et cellulaires impliqués permet d'envisager des stratégies thérapeutiques que nous aborderons dans la discussion (36).

---

## LA TRANSPLANTATION D'ORGANE : UN MODELE D'ISCHEMIE-REPERFUSION

---

En transplantation d'organe solide, le syndrome d'IR associe deux phases distinctes : la phase d'ischémie qui débute dès l'instant où la vascularisation du greffon est interrompue chez le donneur puis la phase de reperfusion, après confection des anastomoses et déclampage chez le receveur. La transplantation d'organe solide est un modèle particulier d'IR, dans la mesure où elle débute par une ischémie froide, lorsque l'organe explanté est placé dans une solution statique et hypothermique de conservation dans le but de réduire l'activité métabolique. Les processus physiopathologiques responsables des lésions moléculaires, cellulaires et tissulaires du greffon définissent alors le syndrome d'IR en transplantation d'organes.

La sévérité du syndrome d'IR, qui comporte une vasoconstriction de l'organe plus ou moins prolongée altérant sa vascularisation, détermine la qualité et la vitesse de reprise de fonction du greffon après transplantation. Le syndrome d'IR se traduit par des conséquences

fonctionnelles immédiates pour le greffon, expliquant que l'ischémie froide prolongée soit un facteur de risque indépendant de non-fonction primaire et/ou de reprise différée de fonction du greffon. Cependant, la tolérance à une ischémie froide prolongée est variable selon l'organe transplanté. Ainsi le greffon cardiaque exige une ischémie froide courte, inférieure à 6 heures, alors que le foie « supporte » une ischémie froide pouvant aller jusqu'à 12 heures et le rein supérieur à 24 heures. Les lésions épithéliales et/ou endothéliales consécutives à l'IR peuvent menacer la reprise de fonction de l'organe avec des conséquences particulièrement graves lorsqu'il s'agit de greffe vitale, telle la transplantation pulmonaire (37). Le lien entre durée d'ischémie froide, reprise différée de fonction et rejet aigu est particulièrement clair en transplantation rénale. Dans une cohorte belge de 611 patients transplantés rénaux, la durée d'ischémie froide est un facteur de risque indépendant de rejet aigu (38). Dans ce travail, chaque heure d'ischémie froide supplémentaire majore le risque de rejet aigu de 4%.

Les conséquences à moyen terme peuvent être également évaluées par le taux d'échec à un an. A titre d'exemple, pour des transplantations rénales pédiatriques réalisées entre janvier 2000 et décembre 2009, le risque d'échec à 1 an défini par le décès du patient ou la perte du greffon, en analyse multivariée, est significativement majoré avec un Hazard Ratio à 2,35 (intervalle de confiance à 95% : 1,17-4,74) si l'ischémie froide est comprise entre 18 et 24 heures, par rapport aux transplantations réalisées avec une ischémie froide inférieure à 18 heures, dont le Hazard Ratio est à 1 (source : Agence de la Biomédecine).

Enfin l'IR impacte sur le devenir des greffons à long terme et l'incidence du rejet chronique. Une étude américaine portant sur plus de 6400 transplantés rénaux montre que le temps prolongé d'ischémie froide est un facteur de perte du greffon à 6 ans (39). Une autre étude incluant 518 transplantés rénaux, révèle que la reprise différée de fonction et la durée d'ischémie froide sont les deux paramètres prédictifs les plus importants de la survie du greffon à long terme (40). Des données en transplantation hépatique montrent que la survie du greffon à 5 ans est de 57 % lorsque l'ischémie froide est supérieure à 15 heures, contre 67 % lorsque l'ischémie froide est inférieure à 12 heures (source : Agence de la Biomédecine).

## IMPACT DE LA MORT ENCEPHALIQUE SUR L'ISCHEMIE REPERFUSION

---

La mort encéphalique est la conséquence d'un arrêt de la perfusion cérébrale qui aboutit à la perte des fonctions cérébrales. Le diagnostic de la mort encéphalique qui seul autorise le prélèvement d'organe chez le donneur décédé en France, est défini par décret (Journal officiel du 2 décembre 1996). La mort encéphalique est associée à un grand nombre de désordres hémodynamiques et métaboliques, bien connus des réanimateurs.

Les moins bons résultats obtenus à court et à long terme en transplantation d'organe avec un greffon provenant d'un donneur cadavérique (en mort encéphalique) versus un donneur vivant, peuvent s'expliquer par des raisons immunologiques (meilleure compatibilité avec un donneur vivant apparenté) et non-immunologiques (sélection rigoureuse du donneur vivant). Les modèles animaux en transplantation rénale, pulmonaire ou hépatique ont également permis d'établir le rôle délétère de la mort encéphalique sur le pronostic de la greffe (41). Ainsi peut-on considérer que le syndrome d'IR en transplantation intègre les lésions générées par la mort encéphalique du donneur avec trois types de conséquences. L'orage catécholaminergique tout d'abord qui induit une vasoconstriction périphérique massive et une ischémie tissulaire, parfois associées à une défaillance hémodynamique majorant le bas débit périphérique. La deuxième conséquence est hormonale avec en particulier un diabète insipide par défaut de synthèse de la vasopressine par la post-hypophyse. Il en résulte une diurèse massive, hypotonique, qui peut aggraver les troubles hémodynamiques. Enfin la mort encéphalique a des conséquences inflammatoires avec l'expression majorée de cytokines inflammatoires et de molécules d'adhésion, pouvant aboutir à une réponse inflammatoire systémique et à une activation endothéliale. Dans un modèle de mort encéphalique chez le rat, Van der Hoeven *et al.* montrent la relation entre la mort

encéphalique, sa durée et la réponse inflammatoire intra-rénale, évaluée par l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) (pour « vascular cell adhesion molecule ») et l'infiltrat leucocytaire (42). Ainsi l'infiltrat leucocytaire observé dans le rein est plus important après 6 heures de mort encéphalique qu'après une heure.

Chez l'homme, les études portant sur l'impact de la mort encéphalique dans le syndrome d'IR sont parfois contradictoires, indépendamment de la durée d'ischémie froide. Il peut être en effet délicat de différencier les conséquences de la mort encéphalique des conséquences de l'ischémie froide dans la genèse des lésions. Citons à titre d'exemple le travail en transplantation rénale de Nijboer *et al.* où les auteurs ont étudié l'inflammation sur des biopsies de donneur vivants et de donneurs en mort encéphalique, réalisées juste avant le prélèvement (43). Les résultats, cohérents avec les modèles animaux, montrent que l'infiltrat leucocytaire, l'expression de la molécule d'adhésion E-sélectine et des protéines HSP-70 (pour « heat shock protein ») est plus importants dans les greffons rénaux issus de donneurs cadavériques, suggérant un stress inflammatoire spécifique associée à la mort encéphalique.

---

## LA TRANSPLANTATION RENALE CHEZ L'HOMME : UN EXEMPLE D'IR

---

Les conséquences cliniques de l'IR en transplantation rénale peuvent être majeures : reprise retardée de fonction, prolongation de la durée d'hospitalisation, majoration du risque de rejet aigu et diminution à long terme de la survie du greffon (44). C'est la raison pour laquelle la compréhension des processus physiopathologiques et les éventuelles interventions thérapeutiques qui en résulte, intéresse cliniciens et chercheurs.

---

### 1. CONSEQUENCES ENDOTHELIALES

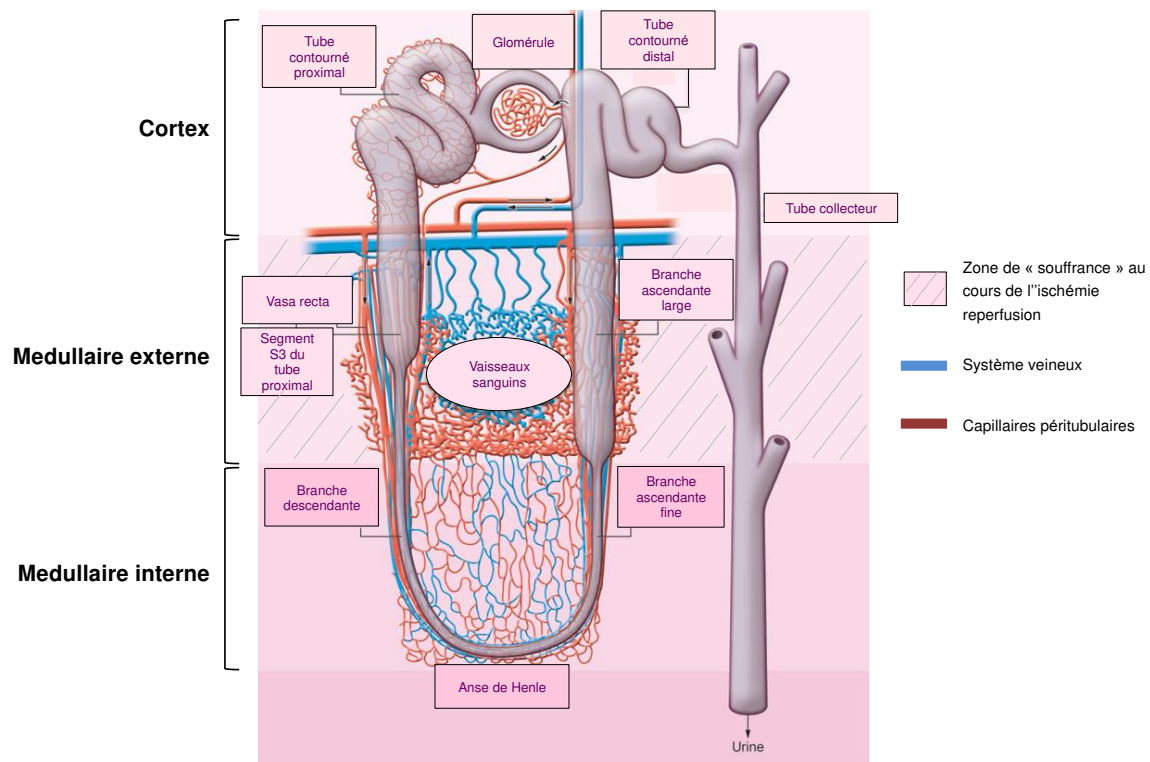
---

La microcirculation qui assure la vascularisation du néphron est directement touchée par l'IR, sous la forme d'une vasoconstriction persistante. Celle-ci est entretenue soit par la

diminution de la production d'agents vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote soit par la moindre sensibilité de l'endothélium à leur action, en rapport avec les altérations endothéliales (45). La libération de cytokines vasoactives (TNF, IL-6, IL-15, IL-18...) produites par les leucocytes activés à la surface de l'endothélium, participe également au processus (46).

Ces leucocytes activés favorisent également l'activation de la coagulation et la formation de microthrombi, qui affecte en premier lieu la vascularisation de la médullaire externe.

Enfin, la raréfaction de la microcirculation induite par l'IR, observée en particulier au niveau des vasa recta de la médullaire externe, aggrave l'ischémie et favorise le développement de la fibrose interstitielle (Figure n°2).



**Figure n°2 : Anatomie du néphron.**

La médullaire externe qui contient le segment S3 du tube proximal est une zone particulièrement sensible aux lésions d'ischémie-reperfusion (d'après Bonventre et Yang, 2011).

## 2. CONSEQUENCES EPITHELIALES

La médullaire externe est la zone la plus touchée au cours de l'IR par l'altération du flux sanguin rénal (Figure n°2). Cette partie comprend le segment S3 du TP (pour « tube proximal ») qui est un épithélium polarisé, monocouche et hautement spécialisé. La mort cellulaire survient par nécrose et/ou apoptose, pouvant aboutir à la desquamation cellulaire dans la lumière tubulaire et à l'obstruction de celle-ci. Cependant, l'importance de ces lésions peut être sous-estimée par la biopsie du greffon, celle-ci ciblant principalement la zone corticale.

Les mécanismes de la souffrance épithéliale tubulaire au cours de l'IR peuvent se résumer chronologiquement à une altération du cytosquelette, à une perte de la bordure en brosse et de la polarité cellulaire. Ces lésions, associées à des anomalies de localisation des molécules d'adhésion, en détruisant les jonctions serrées entre les cellules, aboutissent à la desquamation des cellules, lesquelles seront éliminées dans les urines sous forme de débris cellulaires.

Enfin la souffrance tubulaire au cours de l'IR peut se traduire par l'augmentation d'expression de protéines par le TP, qui ont valeurs de biomarqueurs de l'atteinte tubulaire. Citons tout d'abord la molécule transmembranaire KIM-1 (pour « kidney injury molecule-1 »), surexprimée à la surface des cellules tubulaires proximales après un stress ischémique (47). KIM-1 est un récepteur qui reconnaît les cellules apoptotiques pour permettre leur phagocytose par les cellules du TP puis leur dégradation lysosomale. Au cours de l'ischémie, l'ectodomaine du récepteur est libéré dans les urines, permettant un dosage et un diagnostic précoce de la souffrance tubulaire. La protéine NGAL (pour « neutrophil gelatinase-associated lipocalin ») est également exprimée précocement par le TP après IR. Une étude française, portant sur 41 patients transplantés rénaux, a récemment montré que l'augmentation précoce des taux sériques de NGAL, 12 heures après la greffe, était plus prédictif de la reprise différée de fonction que le dosage de la créatininémie (48).

L'épithélium tubulaire exprime également après IR des molécules qui induisent l'activation du système immunitaire. Il en est ainsi des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité et des molécules de co-stimulation du lymphocyte T. Chez l'homme, les cellules de l'épithélium tubulaire proximal analysées en immunohistochimie, ont une expression des molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) corrélée positivement avec le degré d'inflammation interstitielle. Ces molécules, en interagissant avec la molécule CD28 à

la surface des lymphocytes T, permettent la production de cytokines et participent au recrutement de cellules inflammatoires (49).

De plus, les cellules tubulaires expriment également à leur surface les TLRs (pour « Toll-like receptors ») en particulier les TLR2 et TLR4 que nous aborderons au Chapitre 2.4 et dont l'activation contribue à la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) et chemoattractantes (RANTES...).

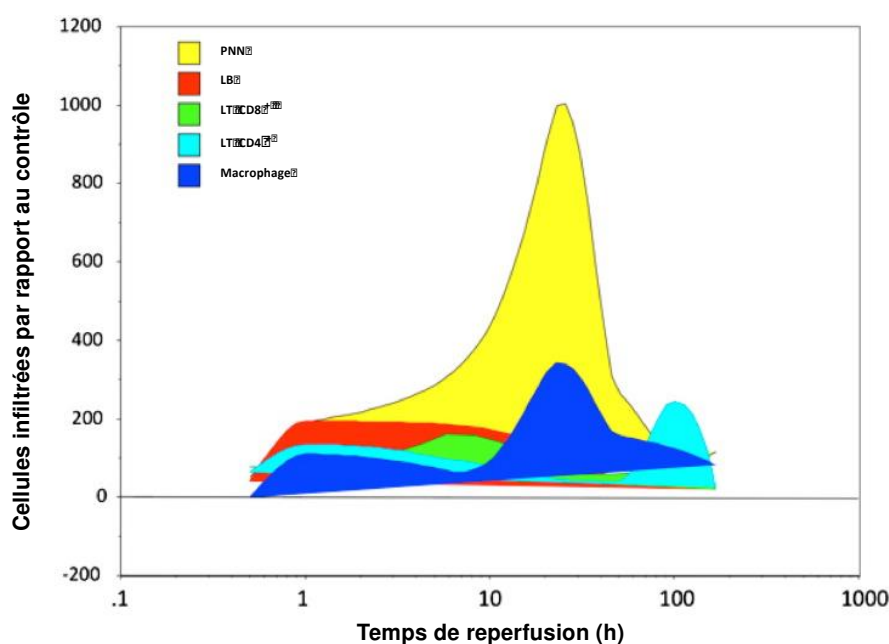
Enfin, certaines protéines exprimées par le TP au cours de l'IR ont des propriétés protectrices à l'égard des lésions, comme l'hème oxygénase et les protéines HSPs. Le processus d'autophagie qui chez la souris a montré un effet protecteur des cellules tubulaires proximales vis-à-vis de l'IR, contribue aussi à la protection de l'épithélium (8).

---

### 3. INFILTRAT INTERSTITIEL

---

Dans les heures qui suivent l'IR, le système immunitaire est mis en jeu comme en témoigne l'infiltrat inflammatoire dans l'interstitium rénal. Cet infiltrat n'est pas monomorphe et la nature des cellules qui le composent varie au cours du temps (Figure n°3).



**Figure 3 : Analyse de l'infiltrat leucocytaire intra-rénal après ischémie reperfusion chez la souris.** Les différentes populations leucocytaires ont été identifiées et analysées en

cytométrie en flux, dans la fenêtre des cellules vivantes CD45<sup>+</sup> 7AAD<sup>-</sup>. PNN: Polynucléaire neutrophile ; LB : Lymphocyte B ; LT : Lymphocyte T (d'après Li et Okusa, 2010).

L'apport de la cytométrie en flux et les travaux menés chez des souris génétiquement modifiées ont permis des avancées dans la compréhension de la pathogénie de l'inflammation, notamment sur la chronologie du recrutement cellulaire et sur les interactions entre cellules résidentes et cellules recrutées *in situ*.

Ainsi les cellules de l'immunité innée (DC, monocyte/macrophage, PNN, NK et iNKT) (pour « natural killer » et « natural killer T ») sont les premières activées et/ou recrutées, indépendamment d'une stimulation par l'Ag (pour « antigène »).

Parmi les leucocytes résidents, les DCs sont les plus représentées (50). Chez la souris après IR, ces cellules constituent la principale source de TNF- $\alpha$  (51). L'activation des DCs permet le recrutement précoce des PNN, qui dès 30 mn après la reperfusion, par leur interaction avec les molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium activé, sont présents dans les capillaires péri-tubulaires et l'interstitium. Cette activation des PNN induit la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-17, de manière dépendante de l'IL-23 produite par les DCs (33).

Les monocytes/macrophages sont recrutés dans les minutes qui suivent l'IR et jouent un rôle déterminant dans l'infiltration rénale. Chez la souris, deux phénotypes caractérisent les monocytes circulants. A l'état basal, les monocytes CD11b<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup>Gr-1<sup>-</sup>Ly6C<sup>-</sup>CX3CR1<sup>hi</sup> se différencient en DCs et en macrophages résidents, avec un rôle principalement d'immunosurveillance. En revanche, après IR, les monocytes CD11b<sup>+</sup>CCR2<sup>hi</sup>Gr-1<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>lo</sup> se différencient en macrophages activés, de type M1. Ceux-ci sont présents dans le rein dès la première heure de reperfusion, pour atteindre un pic à 24 heures et persister jusqu'à 7 jours. En présence de cytokines de type Th2 (IL-4, IL-10), ils peuvent générer des macrophages M2 « réparateurs », capable de produire à leur tour des cytokines de type Th2.

Quant à la place des cellules NK dans la pathogénie de l'IR rénale, il n'y a que peu de données dans la littérature. Dans un modèle murin d'IR, Ascon *et al.* ont mis en évidence une infiltration précoce du rein, dès 3 heures après la reperfusion, par les cellules NK (CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) (52). La décroissance est ensuite rapide puisqu'à 24 heures après IR, la fréquence de cellules NK est inférieure au contrôle. Ces données sont confirmées par Zhang *et al.* qui mettent en évidence des cellules NK infiltrant le rein murin 4 heures après IR (53). Dans ce

travail, la déplétion des souris en cellules NK protège le rein des lésions d'IR, phénomène perdu lors de la reconstitution des cellules NK par transfert adoptif. Enfin *in vitro*, les cellules tubulaires apoptotiques sont ciblées par les cellules NK activées. *In vivo* après IR, les cellules épithéliales tubulaires majorent l'expression de Rae1, le ligand de NKG2D (pour « natural killer group 2D »), confortant l'hypothèse d'implication des cellules NK dans la genèse des lésions rénales d'IR. Plus récemment, le même groupe a montré que le recrutement intra-rénal des cellules NK et leur activation dépendaient d'une protéine exprimée par les cellules tubulaires, l'ostéopontine (54).

Enfin l'implication des cellules iNKT dans les phénomènes d'IR sera l'objet du Chapitre 3.G.

Bien qu'il soit habituel de dissocier les rôles de l'immunité innée et adaptative, ceci sur la base de la reconnaissance de l'allo-antigène, il est important de noter que dans les heures qui suivent la reperfusion rénale, sont recrutées et activées des cellules tant de l'immunité innée que de l'immunité adaptative.

Chez la souris, à l'état basal, sont présentes dans le rein diverses populations lymphocytaires T, principalement CD3<sup>+</sup>. Leur phénotype est alors soit CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, soit non conventionnel (double négatif) (55)

Comme précédemment évoqué au Chapitre 4 sur l'inflammation stérile, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle prépondérant dans la genèse des lésions précoces et tardives de l'IR rénale (30)(56)(57). Des expériences de transfert ont montré le rôle crucial de la molécule de costimulation CD28 et de la production d'IFN- $\gamma$  portée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont présents dans les lésions précoces d'IR rénale et persiste jusqu'à 6 semaines. De façon intéressante, ces cellules ont un phénotype de type effecteur-mémoire activé (CD69<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>) qui s'accompagne de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ...) (58).

A l'inverse, d'autres types cellulaires tels les lymphocytes Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> recrutés après IR chez la souris, pourraient limiter le processus inflammatoire par la production d'IL-10 (59).

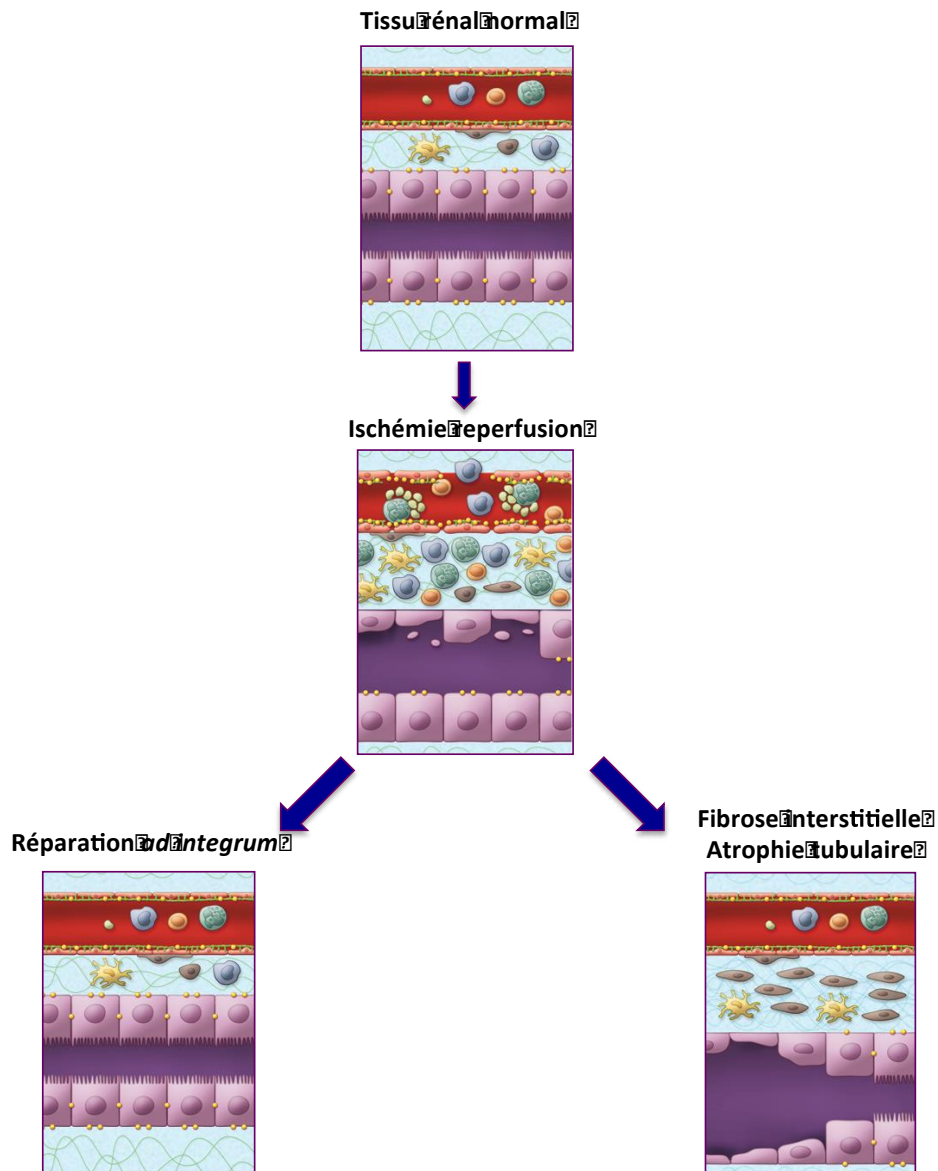
Quant aux lymphocytes B, ils contribuent également à la pathogénie de l'infiltrat. Certaines sous-populations B pourraient avoir une fonction protectrice (60)(61).

---

#### 4. LA REPARATION TISSULAIRE

---

Contrairement au cœur ou au cerveau, le rein après IR est capable d'une réparation cellulaire *ad integrum* (Figure n°4). En situation physiologique, l'épithélium tubulaire rénal est à faible renouvellement, alors qu'après IR, la prolifération cellulaire épithéliale est fortement sollicitée.



**Figure 4 : Réparation tissulaire *ad integrum* ou anormale après ischémie-reperfusion rénale.** Le processus de réparation tissulaire peut induire des lésions de fibrose interstitielle et/ou d'atrophie tubulaire, altérant alors la fonction rénale (d'après Bonventre et Yang, 2011).

Après des incertitudes sur l'origine des cellules recrutées pour la réépithélialisation, on sait aujourd'hui que cette dernière implique la migration des cellules tubulaires survivantes, après deux phases successives de dédifférenciation/prolifération puis de différenciation/polarisation. Bien que les mécanismes de cette réversion vers un phénotype moins mature ne soient pas clairement établis, il est intéressant de signaler que des molécules comme la vimentine, exprimées uniquement durant le développement rénal, le sont à nouveau après IR. Nous avons déjà évoqué ci-dessus le rôle des lymphocytes T régulateurs et des

macrophages M2 dans la réparation tissulaire. Ajoutons la libération de protéines HSPs, abordées ci-dessous, qui contribuerait également au contrôle de l'inflammation.

Cependant, la réparation endothéliale peut être inadaptée et incomplète, avec d'importantes conséquences telles une inflammation tubulo-interstitielle persistante et surtout une fibrose post-ischémique (Figure n°4). Le lien entre la souffrance ischémique de l'endothélium et la fibrose fait appel à la notion de transition épithélio-mésenchymateuse, c'est à dire la capacité d'une cellule épithéliale stressée à acquérir un phénotype de myofibroblaste. L'origine de ces myofibroblastes demeure controversée. Il pourrait s'agir de cellules épithéliales tubulaires ou de fibroblastes périvasculaires. Enfin, la réparation anormale de l'épithélium peut être associée à une production élevée de cytokines pro-fibrosantes comme le TGF- $\beta$  et le CTGF (pour « connective tissue growth factor »).

---

## CHAPITRE 2. IR ET ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

---

---

### GENERALITES

---

La réponse inflammatoire secondaire à la souffrance/mort cellulaire liée à une séquence d'IR présente de nombreuses similitudes à celle observée après agression tissulaire

par un agent pathogène. Ainsi sont mis en jeu des signaux spécifiques, agissant sur des récepteurs de la famille des TLRs que nous aborderons ci-après.

Dans le contexte de l'IR, les ligands d'origine endogène des TLRs sont regroupés sous le terme de DAMPs (pour « damage-associated molecular pattern »). Ces signaux activent des voies de transduction du signal impliquant NF- $\kappa$ B, les MAP (pour « mitogen-activated protein ») kinases et l'IFN de type I (62) pour aboutir à la synthèse de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires ainsi qu'à l'activation des molécules du complément.

Si le lien de causalité entre l'IR et l'activation des cellules de l'IMMUNITE INNEE est une notion admise en transplantation d'organe (63), les mécanismes précis de cette activation, tels les molécules impliquées ou les cibles cellulaires, restent méconnus. Lors d'une transplantation d'organe, les différentes étapes que sont l'acte chirurgical du prélèvement, le transport du greffon responsable de l'ischémie froide puis la chirurgie de greffe proprement dite, associée à une ischémie tiède et parfois à une ischémie chaude, génèrent les phénomènes d'IR. Ces stress tissulaires conduisent à des lésions cellulaires et tissulaires qui déclenchent la réponse immunitaire innée.

Celle-ci se caractérise par son activation rapide (quelques minutes à quelques heures), par son indépendance à l'égard de l'allo-antigène et enfin par les cellules qu'elle implique: neutrophiles, monocytes/macrophages, DCs, cellules NK et iNKT. Ainsi les neutrophiles, les macrophages et les cellules iNKT sont responsables des premières lésions tissulaires consécutives à l'IR, avant même toute reconnaissance allogénique. Associés également à la réponse immunitaire innée la cascade d'activation du complément dont nous avons déjà évoqué le rôle dans le recrutement de cellules inflammatoires.

L'activation du système immunitaire inné initie à son tour la réponse immunitaire adaptative. Celle-ci implique la maturation de DCs, la présentation antigénique, l'activation et la prolifération des lymphocytes T et enfin à la coopération T-B. Cette cascade d'activation innée/adaptative est impliquée dans la genèse des lésions précoces d'IR (quelques minutes à quelques après la greffe) mais également dans le processus de rejet aigu cellulaire et/ou humoral (quelques jours à quelques semaines). Enfin, elle est également en relation avec des phénomènes plus tardifs (quelques semaines à quelques mois) responsables de la perte progressive de fonction rénale comme la fibrose interstitielle (39).

Ainsi la libération des DAMPs après IR est à la source d'une cascade d'activation et de recrutement *in situ* de cellules immunitaires, dont les conséquences marqueront la reprise de fonction du greffon mais aussi la fonction à long terme. La compréhension de la biologie de ces signaux DAMPs a progressé ces dernières années, notamment grâce aux modèles murins d'IR, en lien avec les concepts d'alarmine et de signal danger.

---

## ROLE DES ALARMINES/DAMPS

---

---

### 1. GENERALITES

---

Les DAMPs sont des molécules endogènes d'origine intracellulaire ou des fragments de la matrice extracellulaire, libérés après un stress cellulaire majeur et capable d'induire une inflammation dans un contexte stérile, en agissant sur les récepteurs PRRs (pour « pattern recognition receptors ») associés à l'immunité innée, et en particulier leurs récepteurs spécifiques TLRs (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9) et RAGE (pour « receptor for advanced glycation end-products ») (64)(65). Ces récepteurs de l'immunité innée sont exprimés à la surface de cellules hématopoïétiques et parenchymateuses. Ils sont exprimés non seulement à la surface des cellules de l'immunité innée mais aussi de certaines cellules de l'immunité adaptative. Ainsi, les neutrophiles, les macrophages et les DCs ont une expression membranaire de TLR.

Selon Kono et Rock, les DAMPs se caractérisent par leur capacité à induire, à l'état purifié et à concentration identiques aux situations pathologiques, une réponse inflammatoire *in vitro* et/ou *in vivo* (66). De plus, cette réponse est diminuée en cas de déplétion ciblée du DAMP. Néanmoins, le rôle respectif de chaque molécule DAMP dans l'initiation de l'inflammation stérile et l'éventuelle redondance de leur action n'est pas connu. De plus, la nature de ces signaux demeure très hétérogène : par leur source (intra versus extracellulaire), leur expression (constitutive versus inductible) ou leurs éventuelles modifications post-traductionnelles.

La mise en jeu de DAMPS après agression tissulaire est un mécanisme général de défense qui n'est pas restreint à l'IR. Cependant, quel que soit l'événement initial induisant

cette agression, les PRRs et les voies de transduction engagés sont communs, comparables à ceux impliqués au cours d'un processus infectieux (pour revue : (62)).

En transplantation, les conséquences de la libération des DAMPs ne sont pas anecdotiques. Les DAMPs contribuent en effet à la réponse allogénique et à la perte du greffon, comme cela a été montré dans un modèle murin de greffe d'îlots de Langerhans (67). L'activation des TLRs par les DAMPs qui déclenche la transduction du signal via la protéine adaptatrice intracellulaire MyD88 que nous aborderons ci-après, est ainsi impliquée dans la pathogénie du rejet de greffe. De plus, parce que les TLRs sont exprimés à la surface des DCs, les DAMPs peuvent induire leur maturation, à l'interface de l'immunité innée et de la réponse adaptative (68)(69)(70).

Le terme d'alarmine a quant à lui été proposé par Joost Oppenheim en 2006, à l'issue d'un Workshop consacré au signal danger et à la protéine HMGB1 (pour « high mobility group box 1 »). L'objectif était de distinguer, parmi les molécules capable d'activer le système immunitaire, celles d'origine microbienne : les PAMPs (pour « pathogen-associated molecular patterns »), de celles d'origine endogène : les alarmines. Selon cette définition, le terme de DAMPs regroupe l'ensemble des PAMPs et des alarmines. Les alarmines sont donc des DAMPs d'origine endogène, qui partagent plusieurs propriétés : 1) libération passive mais rapide au cours de la mort cellulaire par nécrose (et non par apoptose) y compris par les cellules du système immunitaire ; 2) recrutement et activation de cellules de l'immunité innée telles les DCs, permettant d'initier la réponse adaptative ; 3) implication dans la restauration de l'intégrité tissulaire après une agression cellulaire majeure ou une inflammation.

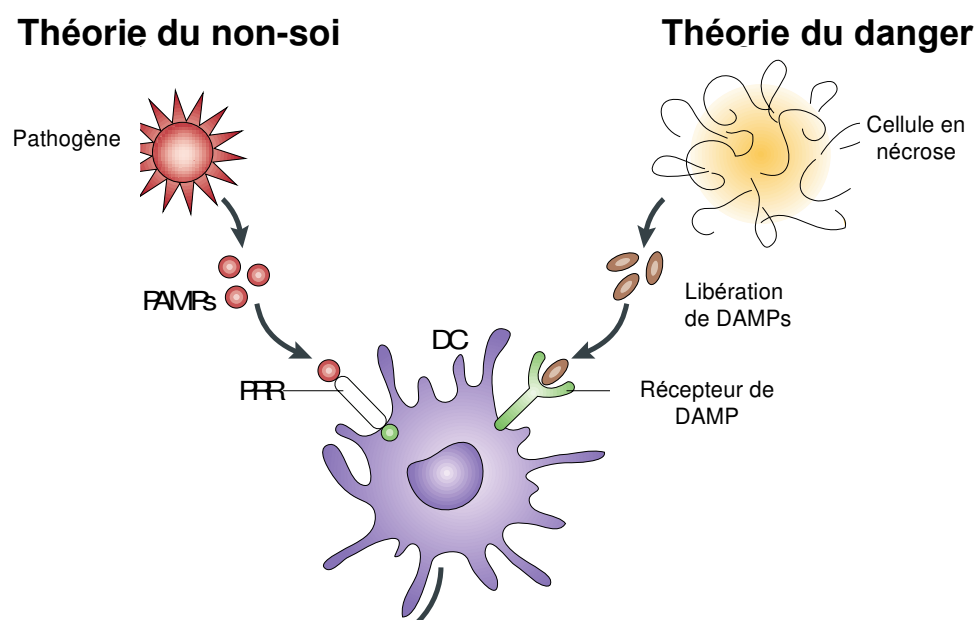
Les alarmines sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiopathologiques, en lien avec les concepts de signal danger et d'inflammation stérile. Parmi ces alarmines, HMGB1 en est la figure de proue, pour des raisons historiques et ses propriétés fonctionnelles. Depuis, la liste des molécules répondant à la définition d'une alarmine, s'appuyant principalement sur des modèles murins, s'agrandit régulièrement. Dans le champ de la transplantation d'organe, l'IR induit une nécrose tissulaire (endothéliale ou épithéliale) dans un environnement stérile, aboutissant au recrutement de cellules inflammatoires. Ainsi, plusieurs alarmines ont été impliquées dans la genèse des lésions d'IR par leur capacité à induire l'inflammation stérile. Ce rôle d'alarme du système immunitaire résulte de la capacité des alarmines à porter le signal danger.

---

## 2. LA THEORIE DU DANGER

---

La théorie infectieuse du non-soi, portée par Charles Janeway à la fin du XXe siècle, défend que les signaux exogènes produits des organismes extérieurs, tels des agents pathogènes (PAMPs), ciblent directement les cellules de l'immunité innée pour secondairement initier la réponse adaptative (Figure n°5) (71).



**Figure 5 : Théorie du non-soi et du danger.**

Les cellules dendritiques sont présentes dans les tissus, à l'état non stimulé. Dans la théorie du non-soi, les PRRs exprimés à la surface des DCs reconnaissent les molécules dérivées d'agents pathogènes appelées PAMPs. Dans la théorie du danger, l'évènement contrôlant l'initiation de la réponse immunitaire n'est pas d'origine infectieuse, mais provient de la production de « signaux danger » appelés DAMPs. DC: cellule dendritique ; PRR: Pattern Recognition Receptor ; PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern ; DAMP: Damage Associated Molecular Pattern (d'après Kono et Rock, 2008).

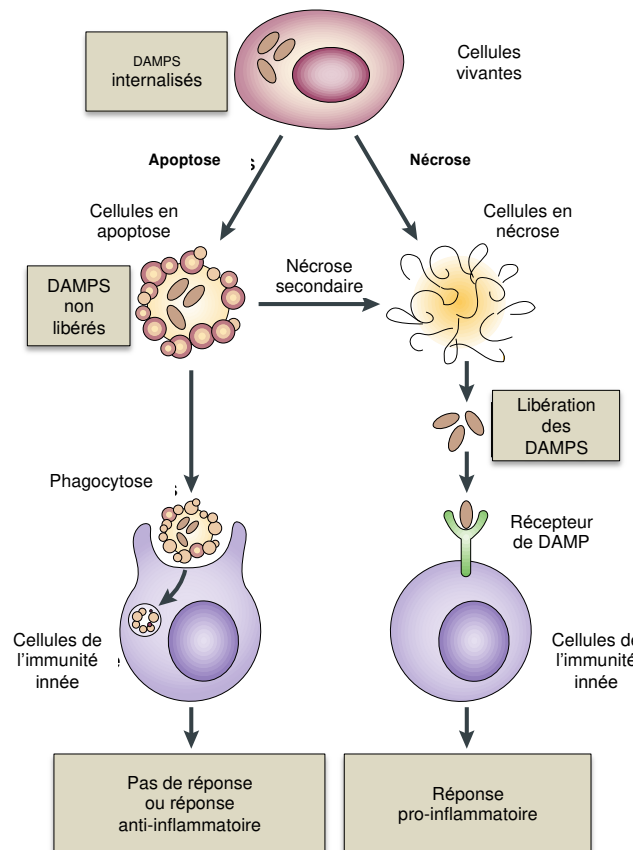
La théorie du danger, énoncée pour la première fois par Polly Matzinger en 1994, s'oppose à celle du soi et du non-soi, qui « règne » sur l'immunologie depuis plus de 60 ans. La théorie du signal danger postule que le système immunitaire répond à des substances libérées par l'organisme suite un stress tissulaire, et non uniquement à un allo-antigène (pour revue : (72)(73)). Pour Matzinger, une molécule du soi n'est pas gage de tolérance, et un constituant du non-soi n'est pas synonyme de réponse immune. Ainsi des constituants du soi sont capables d'initier une réponse immunitaire, en dehors d'un stimulus antigénique. En d'autres termes, la réponse immunitaire secondaire à une agression tissulaire, y compris par un agent infectieux, résulte de la libération par les cellules endommagées de signaux d'alarmes de système immunitaire. Proposé en 2006, plus de 10 ans après l'article princeps de Matzinger, le terme d'alarmine regroupe ces différents signaux.

La notion de danger associée aux signaux peut être difficile à définir, secondaire selon le contexte aux situations de stress, de dommage (« damage »), de lésion (« injury »), ou encore de mort cellulaire inappropriée. (73). Concernant cette dernière notion, la théorie du danger oppose la mort cellulaire « anormale » : la nécrose à la mort cellulaire « normale » ou physiologique : l'apoptose (74). Ainsi, chez la souris, seule la lyse cellulaire par nécrose, et non par apoptose, libère des signaux danger capables d'activer les DCs (75) (Figure n°6). Dans cette situation, les signaux danger libérés sont des DAMPs d'origine intracellulaire, autrement dits des alarmines.

Avant même l'apparition du terme alarmine, les protéines HSPs ont été, pour les partisans de la théorie du danger, des molécules candidates pour porter le signal danger (72). Les HSPs sont présentes chez les procaryotes comme chez les eucaryotes et libérées par la cellule stressée (augmentation de température...). Elles peuvent activer les cellules dendritiques, en présence ou non d'un antigène, sur lequel elles agissent alors comme protéines chaperonnes. Ainsi les protéines HSPs d'origine endogène étaient considérées comme appartenant aux DAMPs. Récemment, plusieurs travaux ont suggéré qu'elles puissent avoir un rôle dans le contrôle de la réaction inflammatoire induite par une agression tissulaire, et dans la réparation tissulaire (76).

Il est intéressant de confronter la théorie du danger et le concept d'inflammation stérile à la transplantation d'organe et à l'IR en particulier. En effet, comme nous l'avons vu ci-dessus, l'IR se caractérise par une importante nécrose cellulaire consécutive au stress endothélial et épithélial, par une activation de l'immunité innée et enfin par une réaction

inflammatoire dans un contexte stérile. En considérant cette séquence, la théorie du danger est particulièrement pertinente pour expliquer la rapidité du recrutement et de l'activation des cellules inflammatoires dans le greffon. C'est la raison pour laquelle de nombreuses équipes ont cherché à caractériser les molécules de type DAMPs impliquées dans le phénomène d'IR. Parmi celle-ci, HMGB1 est l'une des mieux décrites.



**Figure 6 : Conséquence immunitaire de la mort cellulaire, selon la nécrose ou l'apoptose**

Les cellules de l'immunité innée expriment des récepteurs qui détectent les molécules DAMPs, normalement séquestrées à l'intérieur des cellules. Les cellules en apoptose, dont l'intégrité membranaire se maintient, ne libèrent pas les DAMPs intracellulaires. Les corps apoptotiques sont dégradés par phagocytose, en l'absence de stimulation du système immunitaire. La mort cellulaire par nécrose libère les DAMPs qui après interaction avec leurs récepteurs, induisent une réponse pro-inflammatoire. DAMP: Damage Associated Molecular Pattern (d'après Kono et Rock, 2008).

### 3. HMGB1 : EXEMPLE D'UNE ALARMINE PORTANT LE SIGNAL DANGER APRES IR

### 3.1 GENERALITES

---

Les protéines HMG, décrites au début des années 70, constituent une famille de protéines non histones, associées à la chromatine. Le groupe des protéines HMGB, qui comportent 3 membres (HMGB1, HMGB2, HMGB3) est particulièrement conservé chez les mammifères. La molécule HMGB1 se caractérise par son expression ubiquitaire et élevée, contrairement aux deux autres, exprimées principalement durant l'embryogénèse. Au sein du noyau, HMGB1 joue un rôle dans l'organisation de la chromatine et la régulation transcriptionnelle (77). Ce rôle est capital puisque la souris déficiente pour le gène *HMGB1* (HMGB1<sup>-/-</sup>) est non viable.

La sécrétion d'HMGB1 peut être passive après nécrose cellulaire mais également active en réponse à un stress cellulaire tel l'ischémie (78). Dans les deux cas, libérée dans l'espace extracellulaire, HMGB1 se comporte comme une cytokine pro-inflammatoire (78) (79). Cette sécrétion impose la translocation d'HMGB1 du noyau vers le cytoplasme, mais n'implique pas la voie du réticulum endoplasmique ni de l'appareil de Golgi (77) (80). Notons ici que l'activité biologique d'HMGB1 peut être régulée par des modifications post-traductionnelles, en fonction par exemple de son état d'acétylation ou encore d'oxydation (81). Ainsi la forme réduite d'HMGB1 favoriserait le processus d'autophagie (82) et la forme oxydée l'apoptose (83).

### 3.2 RECEPTEUR ET TRANSDUCTION DU SIGNAL

---

La liaison des alarmines aux récepteurs TLR active à des voies de signalisation incluant la voie des MAPK et du NF- $\kappa$ B, permettant la production des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires. L'activation des TLRs par les DAMPs permet également la maturation des cellules présentatrices d'antigènes. Parmi les DAMPs incriminés, l'héparane sulfate qui est un ligand endogène des PRRs, induit une maturation des cellules dendritiques dépendante de TLR4 (68). De même, l'acide hyaluronique, fragment de la matrice extracellulaire libéré après IR par les cellules stressées génère une réponse inflammatoire dépendante de l'activation des cellules dendritiques et des macrophages (84) (pour revue : (85)). Enfin, le groupe de Goldstein a montré que l'haptoglobine, protéine de l'inflammation libérée au cours de la nécrose cellulaire, accélère le rejet de greffe de peau chez la souris, par

une voie dépendante de la molécule adaptatrice MyD88 (pour « myeloid differentiation primary response gene 88 ») commune à l'ensemble des TLRs, excepté TLR3 (86).

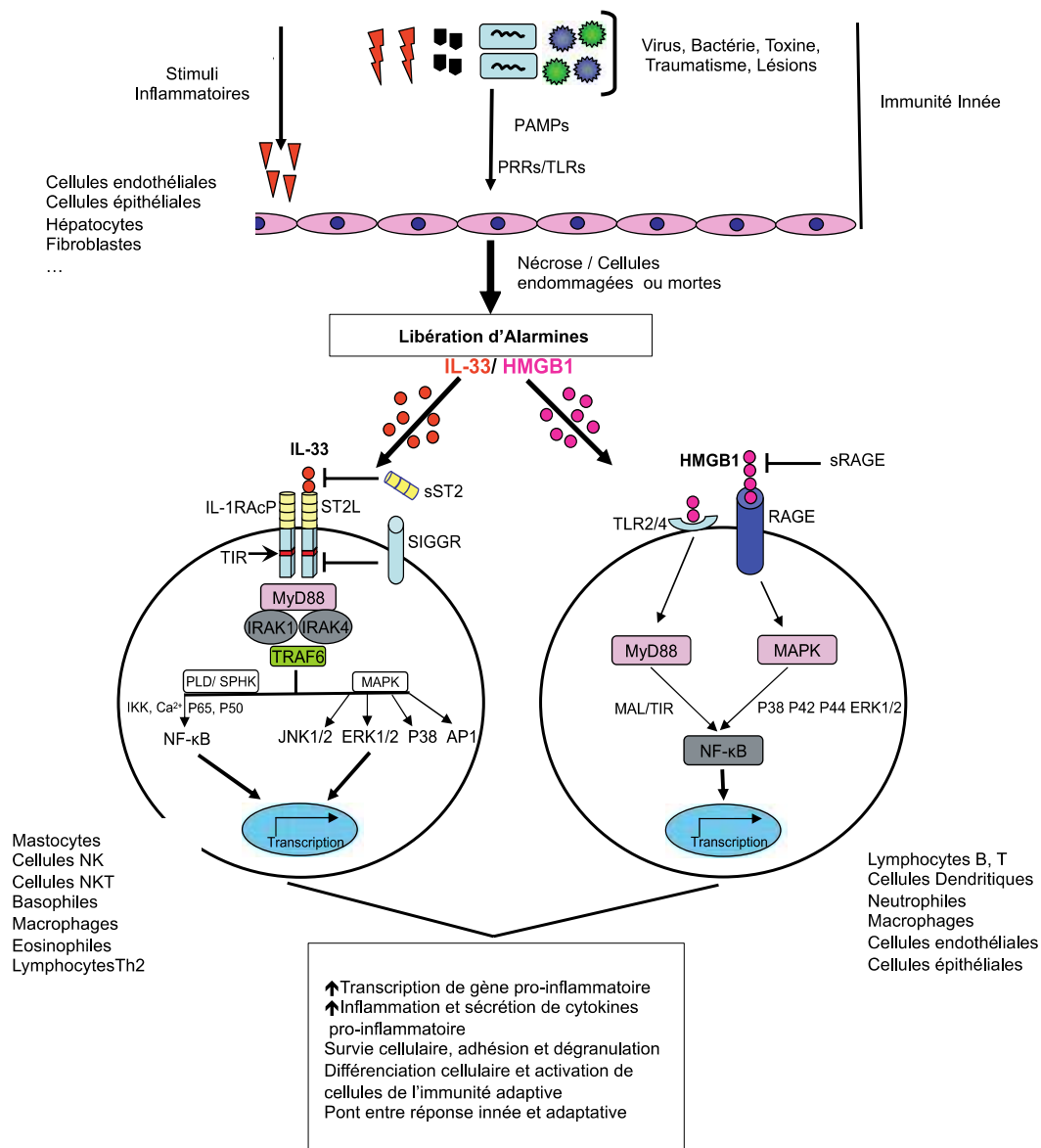
L'alarmine HMGB1 interagit avec de nombreux récepteurs, en lien avec son pléiotropisme d'action. Citons les RAGE, et les récepteurs TLRs 2, 4, 9 que nous aborderons ci-après. Le récepteur RAGE appartient à la superfamille des immunoglobulines, initialement identifié chez le patient diabétique comme récepteur aux produits de glycation avancée. Il est exprimé, à des niveaux très variables, à la surface de nombreuses cellules somatiques et endothéliales. La transduction du signal implique alors la voie des MAP kinases et conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B. La voie de signalisation impliquant les TLRs, notamment exprimés à la surface des cellules d'origine myéloïdes, aboutit également à l'activation de NF- $\kappa$ B et à la synthèse de cytokines inflammatoires, via MyD88 (Figure n°7). Notons également l'existence d'une autre cascade d'activation du signal, indépendante de MyD88, et dépendante de la molécule adaptatrice TRIF (pour « TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$  »). Cette voie induit l'activation d'IRF3 (pour « interferon regulatory factor 3 ») et la synthèse d'IFN de type I.

De manière intéressante, HMGB1 peut également se lier à des molécules partenaires, telle des LPS, ou la cytokine IL-1 $\beta$ , avec pour effet une amplification de la réponse inflammatoire (87). Enfin la liaison d'HMGB1 avec CXCL12, entraîne le recrutement de cellules mononucléées inflammatoires dans un tissu lésé (88).

### 3.3 CIBLES CELLULAIRES ET ACTIVITE BIOLOGIQUE

---

Une des premières cibles cellulaires identifiées d'HMGB1 a été les monocytes/macrophages dans un modèle de choc septique chez la souris, qui sous l'action de cette alarmine, sécrètent des cytokines pro-inflammatoire, notamment pro-Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6...) (80). La DC, via l'expression membranaire de TLR4, est également ciblée par HMGB1, qui induit leur migration, leur maturation et leur activation via la production de cytokines (89) (90) (91) (92) (93). Concernant la cellule endothéliale, qui exprime les récepteurs TLRs et RAGE, son activité est largement modulée par HMGB1 qui induit la sécrétion de cytokines, augmente l'expression de molécules d'adhésion et favorise le recrutement cellulaire (94).



**Figure 7 : Principales fonctions et voies de signalisation d'IL-33 et d'HMGB1.**

Après une agression, les cellules stressées libèrent les alarmines HMGB1 et IL-33 pour alerter le système immunitaire. Les alarmines libérées interagissent avec les cellules cibles (mastocytes, NK, NKT, basophiles, macrophages, éosinophiles, lymphocytes B et T, cellules dendritiques, cellules épithéliales et endothéliales...) via leurs récepteurs spécifiques (ST2L pour l'IL-33 et TLR2/4 ou RAGE pour HMGB1) pour induire la transcription de gènes pro-inflammatoires (d'après Arshad *et al.*, 2012)

HMGB1 cible enfin de nombreux autres types cellulaires, tel que le PNN, le fibroblaste ou encore la cellule musculaire lisse en induisant leur migration vers les tissus lésés. Ces données suggèrent qu'HMGB1 pourrait participer non seulement à la signalisation de la lésion mais aussi à sa réparation via le recrutement de cellules *ad hoc*.

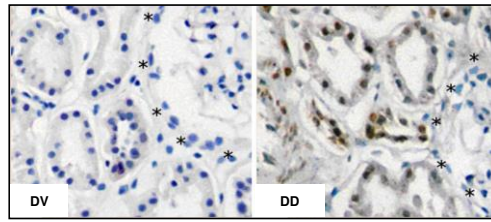
Ainsi HMGB1, l'une des DAMPs les mieux caractérisée, correspond typiquement à la définition d'une alarmine: sécrétion rapide par des cellules en souffrance puis déclenchement d'une réaction inflammatoire et recrutement/activation de cellules de l'immunité innée.

### 3.4 IMPLICATION D'HMGB1 DANS L'IR

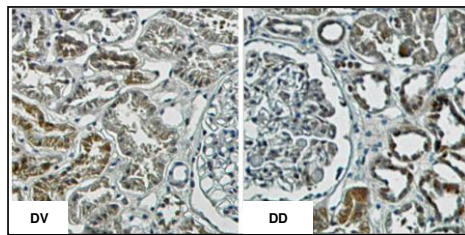
---

La littérature qui traite du rôle d'HMGB1 dans l'IR repose sur des données solides, mais obtenues principalement dans des modèles murins. Ainsi, dans un modèle d'IR rénale chez la souris, le blocage d'HMGB1 réduit les lésions tubulaires alors que l'administration d'HMGB1 exogène les majore (95) (96). Dans un autre modèle murin, HMGB1 joue un rôle clef dans l'échec précoce de la greffe d'îlots pancréatiques (97) et l'administration d'un Ac anti-HMGB1 prévient la perte du greffon. Des données comparables sont rapportées dans un modèle murin d'IR hépatique où le blocage d'HMGB1 par un Ac neutralisant prévient les lésions histologiques (98).

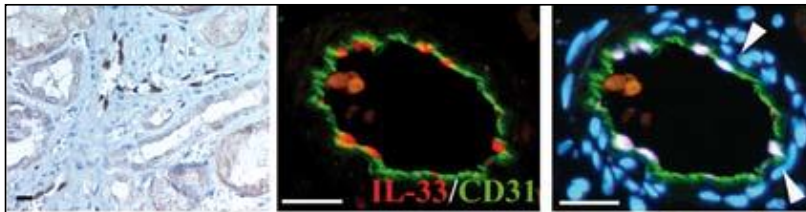
En revanche, chez l'homme, le rôle d'HMGB1 dans l'IR après transplantation d'organe est nettement moins documenté. Le travail de référence est celui de Krüger et *al.* qui rapportent en immunohistochimie, l'expression nucléaire et cytoplasmique d'HMGB1 dans les cellules tubulaires proximales et distales, et les cellules musculaires lisses, dans des biopsies rénales préimplantatoires (Figure n°8A) (99). Cependant, HMGB1 n'était pas détectée dans les cellules endothéliales ni glomérulaires. De manière intéressante, cette expression d'HMGB1 n'est mise en évidence qu'à partir de biopsies de donneurs décédés, où sont observées précocement après l'IR des cellules tubulaires nécrotiques et apoptotiques. En revanche, HMGB1 n'est pas exprimée sur les biopsies rénales de donneur vivant. Ces données suggèrent dans le contexte de transplantation rénale, une modulation de l'expression tubulaire d'HMGB1 par l'ischémie.



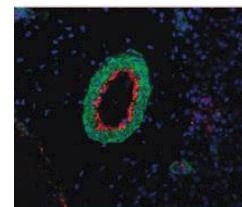
**Figure 8A : Expression rénale d'HMGB1 chez le donneur vivant (DV) ou décédé (DD) en immunohistochimie (biopsie pré-implantatoire).** HMGB1 est exprimé dans les tubes des greffons de donneurs décédés. En revanche, aucun marquage d'HMGB1 n'est observé dans les greffons de donneurs vivants. Les glomérules (délimités par \*) sont négatifs pour HMGB1 que les donneurs soient vivants ou décédés (d'après Krüger, 2009).



**Figure 8B : Expression rénale de TLR4 chez le donneur vivant ou décédé en immunohistochimie (biopsie pré-implantatoire).** TLR4 est exprimé plus fortement dans les tubes des reins de donneurs décédés que dans les tubes des reins de donneurs vivants (d'après Krüger, 2009).



**Figure 8C : Expression rénale constitutive d'IL-33 dans le noyau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins chez l'homme.** L'expression d'IL-33 est analysée par un marquage en immunohistochimie (à gauche) et en immunofluorescence (à droite). Un double marquage est réalisé avec les anticorps anti-IL-33 (rouge) et anti-CD31 (vert), l'ADN est marqué par contre-coloration au DAPI (d'après Moussion, 2008).



**Figure 8D : Marquage en immunofluorescence d'IL-33 dans le rein de souris.** Marquage à la surface des cellules endothéliales de l'actine (vert) et d'IL-33 (rouge) (d'après Ackay, 2011).

---

## 4. TLRs, CIBLES DES DAMPS EN TRANSPLANTATION

---

---

### 4.1 TLR ET IR

---

De nombreux modèles animaux et résultats obtenus chez l'homme ont établi que les lésions d'IR, dans le contexte de la transplantation ou non, étaient modulées par des signaux transmis par les TLRs, initiés par les DAMPs (tableau n°2). Les TLRs sont constitutivement exprimés dans des organes comme le cœur, le foie ou le rein. Concernant ce dernier, TLR2 et TLR4 y sont exprimés à la surface des cellules tubulaires et épithéliales. TLR4 est également exprimé à la surface des podocytes et des DCs résidentes. Après IR chez la souris, l'augmentation d'expression des transcrits TLR2 et TLR4 est mise en évidence au sein de tissu rénal (mais pas dans les leucocytes circulants) (100). Ces données suggèrent que le phénomène d'IR module l'expression des TLRs, au sein de l'organe concerné. Cette expression majorée survient dans les heures qui suivent la reperfusion, mais avec des cinétiques différentes en fonction du tissu, plus précocement pour l'endothélium que pour l'épithélium (94). L'expression des TLRs par le greffon exerce donc un rôle crucial dans le processus d'IR, confirmée par des données montrant que la signalisation intrinsèque rénale du TLR4 "donneur" prévaut sur les signaux issus du TLR4 de l'hôte, dans la genèse des lésions d'I/R (101).

Les données les plus riches de la littérature sur le sujet portent sur des modèles murins explorant l'axe HMGB1/TLR. Des souris porteuses d'une délétion du gène codant *TLR4* sont protégées partiellement de l'ischémie rénale. Or chez la souris *TLR4*<sup>-/-</sup> l'administration d'HMGB1 exogène ou le blocage d'HMGB1 n'a pas d'impact sur les lésions tubulaires après IR rénale, contrairement à ce qui est observé chez la souris sauvage. Ces données suggèrent le rôle crucial de l'axe HMGB1/TLR4 dans la genèse des lésions rénales d'IR (96). Cependant l'intensité des lésions rénales après IR est identique chez les souris déficientes pour TLR2, ou TLR4 ou qui associent les deux déficiences (*TLR2/4*<sup>-/-</sup>). Ces résultats suggèrent qu'après IR, les DAMPs ciblent TLR2 au même titre que TLR4 (102). Néanmoins, en fonction des modèles et des organes étudiés, les TLRs impliqués peuvent être différents. Ainsi dans un modèle de greffe d'îlots de Langerhans, les souris déficientes pour le récepteur TLR2 ou RAGE sont protégées de la perte précoce du greffon dépendante d'HMGB1, mais non les souris *TLR4*<sup>-/-</sup> (97). En revanche, dans un autre travail, la signalisation HMGB1/TLR4 est impliquée dans les dysfonctions précoces du greffon d'îlots pancréatiques (103). Quant à

TLR2, son expression sur l'épithélium rénal est induite par l'hypoxie par l'intermédiaire de HIF (104) et par l'inflammation, dépendante de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  (105). Chez la souris, Leemans *et al.* ont montré que TLR2 contribue aux lésions rénales aiguës et à l'inflammation au cours de l'ischémie et la reperfusion (100).

Concernant l'IR hépatique, le développement des lésions implique également l'activation de TLR4 et de TLR9, alors que contrairement au rein, TLR2 n'est pas concerné. TLR4 est exprimé dans le foie essentiellement par les DCs résidentes et les cellules de Kupffer qui sont les principales cellules ciblées lors de la phase d'ischémie froide. L'activation de TLR4 transmet un signal par la molécule adaptatrice IRF-3, indépendamment de MyD88, ce qui constitue là encore une différence notable avec le rein (106). Cela pourrait s'expliquer par l'environnement cytokinique et la nature des cellules ciblées (cellules de Kupffer). L'équipe de Peng a observé après une séquence d'IR, une augmentation de l'expression des transcrits de TLR4 associée à une production de TNF- $\alpha$  dans les cellules de Kupffer, laquelle est inhibée en présence d'Ac anti-TLR4 (107). Notons également le rôle dans la physiopathologie de l'IR hépatique des récepteurs RAGE, autre ligand d'HMGB1, activant la voie des MAP kinases. La conséquence de ces différents signaux est principalement la production de cytokines inflammatoires qui induisent le recrutement de cellules de l'immunité innée (pour revue : (108) et (109)).

Chez l'homme, Krüger *et al.* ont montré une expression majorée de TLR4 dans les tubes proximaux et distaux de greffons rénaux issus de donneurs cadavériques (*versus* donneur vivants) (Figure n°8B) et l'implication de la signalisation TLR4 dans la perte précoce du greffon (99). De plus, l'activation de TLR4 induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et MCP-1. Ces résultats sont confortés par un travail récent objectivant une expression intra-rénale majorée de TLR4 et MyD88 sur des biopsies préimplantatoires de greffons de donneurs décédés par rapport au donneur vivant (110).

#### 4.2 TLR ET TRANSPLANTATION

---

L'implication des TLRs en transplantation ne se réduit pas au phénomène initial d'IR (pour revue : (111)). Ainsi les souris déficientes pour *MyD88* sont protégées du rejet de greffe de peau en cas d'incompatibilité mineure, alors que le rejet est retardé chez les souris *MyD88/TRIF*<sup>-/-</sup> en situation d'incompatibilité majeure. Récemment, dans un modèle de transplantation rénale orthotopique chez la souris, Wu *et al.* rapportent que les greffons rénaux

provenant de souris sauvages transplantés à des souris MyD88<sup>-/-</sup> ont une survie prolongée par rapport aux souris contrôles (rein de souris sauvages transplantés à des souris sauvages) (112). Les greffons rénaux provenant de souris MyD88<sup>-/-</sup> greffés chez des souris sauvages ont quant à eux une survie intermédiaire. De plus, lorsque les souris donneuses et receveuses sont déficientes pour MyD88, il n'est pas observé de lésion de rejet aigu. Enfin, l'expression de cytokines pro-inflammatoires Th1 était significativement réduite au 14<sup>ème</sup> jour post-greffe dans les greffons provenant de souris MyD88<sup>-/-</sup>.

Ces différents travaux suggèrent le lien entre l'activation de la voie MyD88 et la réponse allogénique Th1.

De manière intéressante, les souris déficientes pour MyD88<sup>-/-</sup> et greffées rénales développent un état de tolérance, spécifique du donneur (112). Cette tolérance est abolie après administration d'un Ac anti-CD25 ciblant les cellules Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. Dans un modèle murin de greffe d'îlots, l'activation des TLRs favorise le rejet de greffe en bloquant la génération de lymphocytes Tregs (113). Ces données suggèrent une modulation de l'activité des cellules Tregs par la mise en jeu de l'immunité innée et de la voie TLR/MyD88 en particulier.

Chez l'homme, les patients transplantés rénaux porteurs d'une mutation de TLR4 induisant une perte de fonction, développent moins de rejet aigu (114). En transplantation hépatique, Testro *et al.* ont étudié l'expression de TLR4 par les monocytes circulants avant greffe (115). De manière intéressante, les patients ayant développé un rejet aigu ont une expression plus importante de TLR4 et une production augmentée de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 en réponse à une stimulation par le LPS.

En revanche, la relation entre l'activation des TLRs et la dysfonction du greffon à plus long terme est moins documentée. Néanmoins, les reins transplantés chez des souris déficientes TLR2/4<sup>-/-</sup>, ou MyD88<sup>-/-</sup> ou TRIF<sup>-/-</sup>, développent moins de glomérulosclérose et moins de fibrose interstitielle que les souris contrôle (112) (116).

Chez l'homme, l'expression intra-rénale et monocyttaire de TLR4 est augmentée chez les patients en rejet chronique, en comparaison à ceux en état de tolérance opérationnelle (117). Des résultats similaires sont rapportés dans le rejet chronique cardiaque (118).

---

## 5. IL-33 : NOUVELLE ALARMINE POTENTIELLEMENT IMPLIQUEE DANS L'IR

---

---

### 5.1 GENERALITES

---

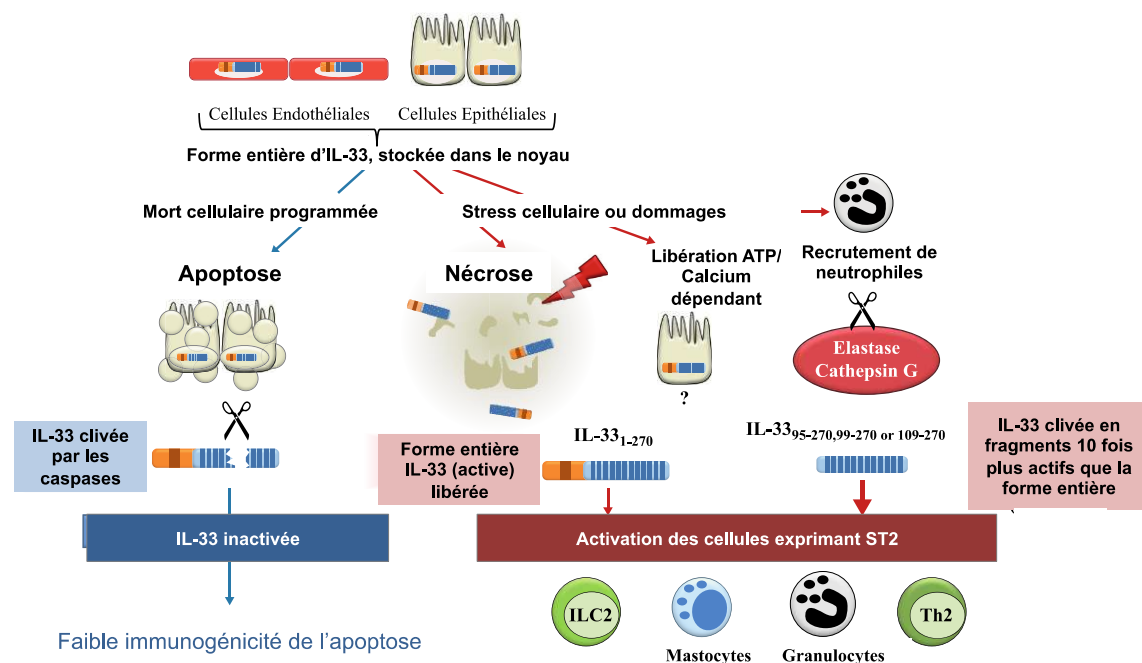
L'IL-33 est le dernier membre de la famille de l'IL-1, par ailleurs connue pour son rôle dans l'inflammation et l'activation de l'immunité innée après une agression tissulaire. La description initiale de l'IL-33 en 2003 sous le nom de NF-HEV (pour « nuclear factor from high endothelial venules ») était celle d'un facteur nucléaire présent dans les cellules endothéliales (119). Deux ans plus tard, l'IL-33 est « redécouverte » comme ligand de ST2, récepteur jusqu'alors orphelin, appartenant à la famille des récepteurs à l'IL-1 (120).

Chez l'homme, l'IL-33 est constitutivement exprimée et stockée dans le noyau des cellules vasculaires endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes, les organes lymphoïdes secondaires et le cerveau (121). Lors de la nécrose cellulaire induite par une agression tissulaire, l'IL-33 intranucléaire est libérée dans l'espace extracellulaire sous sa forme entière active (122). La sécrétion d'IL-33, comme celle des autres membres de la famille de l'IL-1, est particulièrement rapide après un stress cellulaire, car elle est indépendante de la voie du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Elle peut alors agir sur son récepteur membranaire ST2L (pour « *Interleukin-1 Receptor Like 1 (IL-1RL1) membrane fraction* »), exprimé à la surface de nombreuses cellules, dont les mastocytes, les monocytes, les basophiles et les lymphocytes Th2, NK et iNKT pour induire notamment l'expression d'IFN- $\gamma$  (123) (124) (Figure n°7).

Le récepteur ST2L appartient à la superfamille des récepteurs TLR/IL-1R. Le gène *ST2* code également, après épissage alternatif pour une protéine isoforme ST2s (pour « *Interleukin-1 Receptor Like 1 (IL-1RL1) soluble fraction* »). Ce récepteur soluble circulant ST2s interagit avec l'IL-33, avec une fonction de récepteur leurre (« decoy receptor ») (125). En effet, son administration dans le sang périphérique chez la souris neutralise l'action de l'IL-33. Il existe enfin une forme variante de ST2 (ST2V), chez laquelle font défaut trois domaines immunoglobulines dans la région extracellulaire. La fonction de ST2V est cependant inconnue.

L'IL-33 qui compte 270 acides aminés pour une masse molaire de 32 kDa chez l'homme, possède un site de clivage pour les caspases -1, -3 et -7, situé dans son domaine IL-1 en position 178 (126)(127). Le clivage par ces caspases rend l'IL-33 biologiquement inactive. De manière intéressante, ces caspases sont mises en jeu lors de l'apoptose. Ainsi la mort cellulaire programmée s'accompagne de la libération d'IL-33 sous une forme inactivée et n'induit pas de réponse inflammatoire, contrairement à la nécrose (Figure n°9). Enfin, l'IL-33 est également un substrat pour les protéases polynucléaires neutrophiles (élastase, cathepsine G, protéinase 3) (128)(129). La production de formes de 18 à 21 kDa de l'IL-33 après clivage induit une activation à un niveau élevé du récepteur ST2. Ainsi, l'activité de l'IL-33 pourrait être amplifiée dans un environnement inflammatoire, riche en PNN.

La source cellulaire, les modes d'activation et de sécrétion de la cytokine IL-33 sont autant de caractéristiques qui la définissent comme une alarmine, médiatrice d'un signal danger (130). La nature des cellules ciblées par l'IL-33, notamment les mastocytes, sous-tend également cette hypothèse.



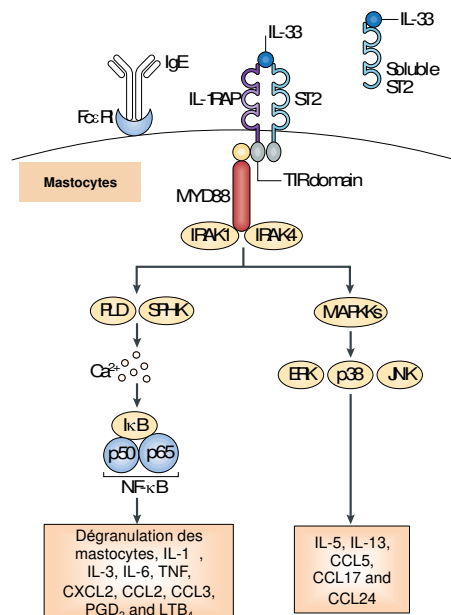
**Figure 9 : Représentation schématique de la sécrétion d'IL-33.**

L'IL-33, signal danger, est constitutivement exprimée et stockée dans le noyau des cellules endothéliales et des cellules épithéliales. Lors de l'apoptose, l'IL-33 est clivée et inactivée par les caspases, tandis qu'elle est libérée sous forme entière active pendant la nécrose. Les polynucléaires neutrophiles recrutés sécrètent des protéases, de la cathepsine G et de

l'élastase, capables de cliver l'IL-33 et d'amplifier son effet (d'après Lefrançais et Cayrol, 2012).

## 5.2 TRANSDUCTION DU SIGNAL

La signalisation de l'IL-33 implique l'hétérodimère ST2L-IL-1RAcP (pour « IL-1 receptor accessory protein »). IL-1RAcP est une protéine associée au récepteur de la famille de l'IL-1 dont le domaine TIR (pour « Toll-interleukin-1 receptor) permet le recrutement du complexe MyD88. Ce complexe active au moins deux voies indépendantes : la voie PLD-SPHK (pour « Phospholipase D-Sphingosine kinase ») qui conduit à la mobilisation du calcium intracellulaire puis à l'activation du facteur du transcription NF- $\kappa$ B, et la voie MAPK kinase. Cette dernière implique l'activation des kinases ERK (pour « extracellular signal regulated kinase »), p38 et JNK (pour « JUN N terminal kinase »). Les deux voies agissent en synergie pour induire l'expression de gènes conduisant, par exemple, à la synthèse de cytokines et chimiokines (Figure n°10).



**Figure 10 : Voie de signalisation de l'IL-33.**

La signalisation de l'IL-33 conduit au recrutement du complexe MYD88. Ce complexe active deux voies indépendantes : la voie PLD-SPHK qui conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la voie des MAP kinases. MYD88: Myeloid differentiation primary response protein 88 ; SPHK: Sphingosine kinase; PLD: Phospholipase D ; SpHK: Sphingosine kinase ; NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor of  $\kappa$  light chain gene enhancer in B cell ; I $\kappa$ B: Inhibitor  $\kappa$ B ; MAPK: Mitogen-activated protein kinase ; ERK: Extracellular signal regulated kinase ; JNK: JUN N-terminal kinase (d'après Liew, 2010).

### 5.3 L'IL-33 ET LE REIN

---

Chez l'homme, l'IL-33 est constitutivement exprimée dans le noyau des cellules endothéliales des vaisseaux de petits et gros calibres, sur l'ensemble de l'arbre vasculaire (130). Le rein est un organe qui comporte de nombreuses structures vasculaires, du capillaire (glomérulaire, péri-tubulaire) à l'artère de moyen calibre. L'IL-33 humaine est ainsi décelée en immunofluorescence, à l'aide d'un co-marquage avec le marqueur endothélial CD31, dans les cellules endothéliales des capillaires péri-tubulaires (Figure n°8C). En revanche, il n'est pas mis en évidence d'expression d'IL-33 dans les glomérules, ni au sein de la paroi musculaire lisse. Il existe également une expression constitutive au niveau des épithéliums exposés à l'environnement (poumon, digestif, vagin). Chez la souris, le profil d'expression est différent avec un marquage au niveau des endothéliums capillaires péri-tubulaires et glomérulaires, en l'absence de marquage de l'épithélium tubulaire (131) (Figure n°8D).

Cependant, la littérature est assez pauvre sur le rôle de l'IL-33 dans le rein. Dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë induit par le cisplatine chez la souris, l'injection d'IL-33 aggrave l'insuffisance rénale versus le cisplatine administré seul. De plus dans ce modèle, l'IL-33 aggrave les lésions tissulaires avec une majoration de l'infiltrat interstitiel riche en PNN. Enfin, la neutralisation de l'IL-33 par l'administration de son récepteur soluble sST2 réduit les lésions tissulaires comme l'infiltration en PNN, et améliore la fonction rénale (131). Il est intéressant de souligner que ce modèle d'insuffisance rénale aiguë se rapproche, sur le plan histologique (nécrose tubulaire aiguë, infiltrat interstitiel), des lésions observées au cours de l'IR.

Le rôle de l'IL-33 au cours des maladies rénales et de l'insuffisance rénale chronique est peu documenté. Une étude récente chez 69 patients insuffisants rénaux, rapporte une corrélation entre le taux de sST2 sérique et la sévérité de la maladie rénale chronique,

attribuant à sST2 un rôle de biomarqueur, déjà documenté notamment pour des pathologies cardiovasculaires (132). En revanche, il n'est pas mis en évidence de différence entre le taux sérique d'IL-33 de donneurs sains et celui de patients insuffisants rénaux, quel que soit le stade d'évolution de la maladie. En 2008, à l'époque où ST2 était encore considéré comme un marqueur de cellules T<sub>H</sub>2, Bruneau *et al.* avaient rapporté le rôle de sST2 comme prédicteur de la rechute de syndrome néphrotique cortico-résistant post-transplantation (133), sans discuter le lien avec la voie IL-33/ST2.

#### 5.4 IL-33 : UN ROLE DANS L'IR ?

---

Le rôle de l'IL-33 dans l'IR n'a été que peu exploré jusqu'à présent. Ainsi il n'y avait pas de données chez l'homme sur l'implication de cette cytokine/alarmine dans l'IR rénale, jusqu'à notre travail (cf. chapitre Résultats de la thèse).

Les premiers travaux publiés datent de 2006 et 2007 et portent sur le rôle de ST2, alors que son ligand -l'IL-33- venait d'être caractérisé l'année précédente. Dans un modèle d'IR hépatique avec une ischémie chaude de 60 mn chez la souris, Yin *et al.* rapporte ainsi l'effet protecteur et anti-inflammatoire d'une protéine de fusion associant ST2s et le fragment Fc d'une IgG1 humaine (134). Peu après, Fagundes *et al.* étudie l'effet de la même protéine de fusion ST2-Fc dans un modèle d'IR intestinale par clampage de l'artère mésentérique supérieure chez la souris (135). L'administration de la protéine de fusion 10 mn avant le déclampage réduit les lésions histologiques et la production de TNF- $\alpha$  dans le tissu digestif.

Cependant, les effets de la voie IL-33/ST2 semblent varier en fonction de l'organe concerné par l'IR. En effet, après infarctus du myocarde chez la souris, l'IL-33 améliore la survie (136). Le rôle de l'IL-33 après IR dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris diabétique a également été évalué, dans l'hypothèse de lésions cardiaques majorées au cours du diabète, par défaut d'expression d'IL-33 (137). De manière intéressante, l'expression myocardique d'IL-33 est réduite chez la souris diabétique à l'état basal. De plus, l'administration d'IL-33 exogène 2 heures avant le clampage artériel, réduit la taille de l'infarctus et améliore la contractilité myocardique.

L'IL-33 pourrait avoir également des effets protecteurs au cours de l'IR hépatique. Chez la souris, Sakai *et al.* rapportent une augmentation significative intra-hépatique de

l'expression de la protéine IL-33 et de son récepteur membranaire ST2L dans les heures qui suivent la reperfusion. De plus, l'administration d'un anticorps anti-ST2L bloquant ou d'IL-33 exogène diminue les lésions histologiques et améliore les paramètres biochimiques après IR (138). Cependant, les mécanismes hépato-protecteurs de l'IL-33 dans ce modèle restent à déterminer.

#### 5.5 IL-33: UN ROLE EN TRANSPLANTATION ?

---

Les travaux portant sur l'implication de la voie IL-33/ST2 en transplantation d'organe sont peu nombreux (pour revue : (139)) et concernent principalement la transplantation cardiaque. Le rationnel pour évaluer les effets de l'IL-33 repose sur l'hypothèse d'une déviation immune pro-Th2 induite par l'IL-33, qui était communément admise dans les premières années qui suivirent sa caractérisation.

Ainsi dans un modèle de transplantation cardiaque chez la souris, l'administration d'IL-33, 24 heures avant la greffe puis quotidiennement pendant 7 jours, améliore la survie des greffons et diminue les lésions de rejet aigu. De plus, en présence d'IL-33, l'expression du transcrite de l'IFN- $\gamma$ , cytokine pro-Th1, est diminuée dans le greffon et les cellules spléniques T CD4<sup>+</sup>, à l'inverse des transcrits pro-Th2 (IL-4, IL-5) (140). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus dans un autre modèle murin de rejet chronique en transplantation cardiaque, où l'administration quotidienne d'IL-33 à partir du 5<sup>ème</sup> jour post-greffe améliore la survie et réduit l'intensité des lésions histologiques (141). Ces résultats suggèrent une déviation immune Th2 au détriment d'une polarisation Th17, associée à une expansion de cellules Tregs (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>).

Concernant le rôle des lymphocytes Tregs, Turnquist *et al.* ont récemment mis en évidence chez la souris transplantée cardiaque que l'administration d'IL-33 induit une survie prolongée, d'une manière dépendante des cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs. Dans ce travail, l'IL-33 permet non seulement une expansion de cellules CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs fonctionnelles mais aussi de cellules dendritiques et de cellules myéloïdes suppressives (142).

Ainsi le rôle de l'IL-33 ne se limite sans doute pas à une simple déviation immune mais implique à n'en pas douter d'autres propriétés immunorégulatrices. Il faut cependant noter l'absence de données, exceptée le cœur, pour d'autres organes tels que le foie ou le rein, dont la richesse en cellules dendritiques et/ou monocytes macrophages résidents exprimant ST2L est à prendre en compte.

---

### CHAPITRE 3. CELLULES NKT : CIBLE PRIVILEGIEE DE L'IR

---

---

#### GENERALITES

---

Les cellules iNKT (pour « invariant Natural Killer T ») sont des cellules T particulières qui comme les autres lymphocytes T, sont sélectionnées dans le thymus et expriment un TCR (pour « T Cell Receptor »). Leur description *princeps* date de 1991, avec les travaux de Bendelac *et al.* qui décrivaient une population T CD4<sup>+</sup> mature et de phénotype mémoire, capable de produire de l'IL-4 en réponse à un engagement du TCR, dès le stade thymique (143). Les lymphocytes iNKT constituent ainsi une sous-population distincte et minoritaire de lymphocytes T $\alpha\beta$ , qui représentent 0,01 à 0,5% des cellules mononucléées circulantes chez l'homme, avec une grande variabilité interindividuelle. De manière notable, cette fréquence est identique dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires, et légèrement augmentée dans le foie, de l'ordre de 1%. Chez la souris, en revanche, la fréquence des cellules iNKT circulantes est plus importante (0,2-0,5%). Dans le foie, cette fréquence peut atteindre 30% des cellules mononucléées.

Enfin, il convient de distinguer au moins deux types de lymphocytes iNKT, selon la structure de leur TCR. Nous traiterons ici uniquement des lymphocytes iNKT de type I, qui expriment chez la souris le TCR semi-invariant V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18.

## UN TCR PARTICULIER, RESTREINT PAR CD1D

---

La particularité des lymphocytes iNKT est l'expression d'une chaîne  $\alpha$  du TCR monomorphe, qui utilise chez l'Homme un réarrangement des gènes  $V\alpha 24$  et  $J\alpha 18$  (chez la souris  $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ ). Cette chaîne  $\alpha$  du TCR est associée à une chaîne  $\beta$  qui utilise exclusivement chez l'Homme le segment  $V\beta 11$  alors qu'un nombre très restreint de segments  $V\beta$  peuvent être utilisés chez la souris. Il en résulte un TCR semi-invariant, reconnaissant un spectre étroit de ligands. Ces ligands sont de nature glycolipidique, et non peptidique, présentés par la molécule monomorphe CD1d, apparentée aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. En effet, la molécule CD1d est constituée d'une chaîne  $\alpha$  et d'une molécule de  $\beta$ -2-microglobuline, bien que sa structure tridimensionnelle la différencie d'une molécule classique de classe I. La présence de deux poches hydrophobes permet d'accueillir les chaînes d'acides gras de l'antigène, exposant au TCR des cellules iNKT la partie contenant le résidu sucré.

L'expression de CD1d est documentée au sein des thymocytes corticaux, qui sont indispensables à la sélection thymique de lymphocytes iNKT et des cellules présentatrices d'antigènes : DCs, monocytes/macrophages, lymphocytes B. Bien que peu exprimée à la surface des cellules non-hématopoïétiques, CD1d est exprimée dans le foie, à la surface des hépatocytes, des cellules de Küppfer, et des cellules endothéliales des sinusoides. De manière intéressante, le foie de la souris, essentiel au métabolisme lipidique, est un organe particulièrement riche en lymphocytes iNKT parmi les cellules mononucléées. Enfin, les souris déficientes pour *CD1d*, en l'absence de sélection thymique, n'ont pas de lymphocytes iNKT.

## STIMULATION DES LYMPHOCYTES INKT

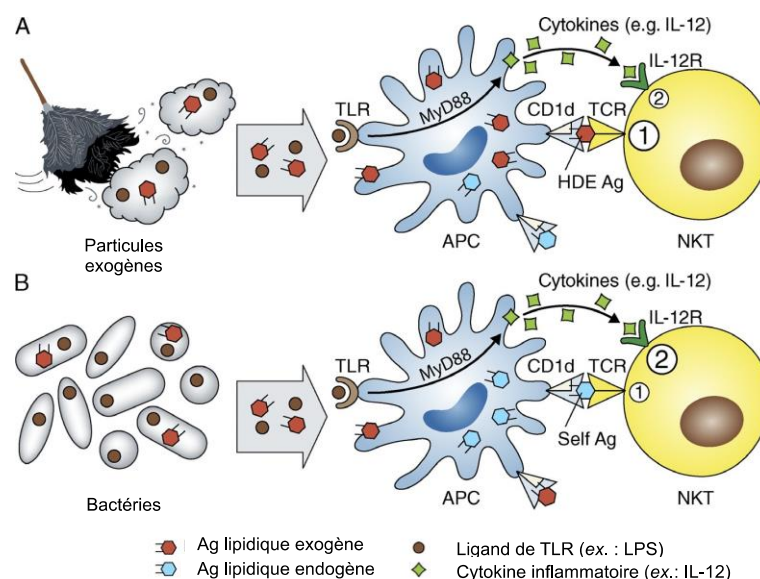
---

Il convient de distinguer au moins deux voies d'activation des lymphocytes iNKT : la voie dépendante du TCR et une voie dépendante des cytokines.

Pour la voie liée à un stimulus antigénique via le TCR, la nature des ligands qui assurent la sélection thymique et le maintien en périphérie des lymphocytes iNKT n'est pas précisément connue. Il est habituel cependant de distinguer tout d'abord les ligands exogènes, typiquement des antigènes microbiens représentés par des  $\alpha$ -glycolipides. Citons à titre d'exemple l' $\alpha$ -galactosyldiacylglycérol, exprimé par la bactérie *Borrelia burgdorferi*, responsable de la maladie de Lyme, ou encore l' $\alpha$ -glucosyldiacylglycérol dérivé de *Streptococcus pneumoniae*. Il peut également s'agir d'Ags ubiquitaires, présents dans l'environnement (144). Concernant les ligands endogènes, ils suscitent un vif intérêt, en lien avec le caractère potentiellement auto-réactif des lymphocytes iNKT. Ainsi, Brennan *et al.* ont récemment rapporté qu'un signal danger d'origine bactérienne, après stimulation du TLR exprimé à la surface de la CPA, était capable de moduler la production de  $\beta$ -glucosylceramide, un glycosphingolipide endogène présent dans les tissus lymphoïdes chez l'homme et la souris (145). D'autres antigènes endogènes, représentés par des  $\beta$ -glycosphingolipides, ont également été décrits.

L'activation des cellules iNKT est aussi possible, indépendamment d'une interaction entre le TCR et un Ag. Brigl *et al.* ont ainsi montré dans un modèle d'infection microbienne à *S. pneumoniae* chez la souris, une activation rapide des lymphocytes iNKT, dépendante de l'IL-12. De plus, ce mode d'activation n'exclut pas celui dépendant du TCR, déjà documenté avec cette bactérie. Cependant, le profil d'activation induit par l'IL-12 dans ce modèle était marqué par une forte production d'IFN- $\gamma$  et une faible production d'IL-4, à la différence de l'activation dépendante du TCR, où l'IL-4 est fortement exprimée (146).

Ces différents modes d'activation, représentés sur la Figure n°11, sont en accord avec l'hypothèse que les cellules iNKT partagent des propriétés de l'immunité innée et adaptative, modulées notamment par la nature de l'antigène et le contexte dans lequel il est présenté.



**Figure 11 : Activation des cellules iNKT en réponse à des stimuli environnementaux: la voie du TCR et la voie des cytokines.**

(A) Les particules exogènes contiennent des antigènes présentés par CD1d (hexagone orange) et reconnus par le TCR des cellules iNKT mais aussi des ligands des TLRs (hexagone marron).

(B) Après agression bactérienne, les cellules iNKT peuvent simultanément reconnaître les antigènes glycolipidiques du soi (hexagone bleu) et bactériens (hexagone orange) présenté par CD1d et reconnus par le TCR. Cependant, la réponse principale des cellules iNKT est induite par le signal transmis par les ligands des TLRs, dépendant de MyD88 et de l'IL-12 (carré vert) (d'après Godfrey et Rossjohn, 2011).

Enfin, l'utilisation des ligands de synthèse a joué un rôle déterminant dans l'étude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes iNKT. L' $\alpha$ -GC (pour «  $\alpha$ -galactosylcéramide ») est un glycolipide, initialement extrait d'une éponge marine. Produit sous sa forme synthétique, c'est un activateur puissant des lymphocytes iNKT, tant *in vivo* qu'*in vitro*, comme en témoigne l'augmentation d'expression du marqueur précoce d'activation CD69 et la production rapide de cytokines par les cellules iNKT, en présence d' $\alpha$ -GC.

La caractérisation phénotypique des cellules iNKT est complexe, compte tenu de l'hétérogénéité de cette population, très minoritaire parmi les cellules T circulantes. Des variations phénotypiques sont également observées en fonction de l'espèce. Cependant, la littérature est relativement pauvre sur le sujet, exception faite de l'homme et de la souris chez lesquels les cellules iNKT matures peuvent être divisées en deux sous-populations :  $CD4^+CD8^-$  et  $CD4^-CD8^-$ . Néanmoins, une sous-population iNKT  $CD4^-CD8^+$  existe chez l'homme et non chez la souris.

Les cellules iNKT expriment également des marqueurs de cellules NK, tel que CD16, CD56 et/ou CD161 chez l'homme. Chez la souris, les marqueurs de cellules NK CD49b, NKG2A, NKG2C ou encore NK1.1 peuvent être exprimés par les cellules iNKT. Il est important de noter que les lymphocytes iNKT sont maintenus à l'état activé par leurs ligands endogènes et expriment donc à l'état basal le marqueur d'activation précoce CD69. Enfin, les cellules iNKT ont préférentiellement un phénotype mémoire ( $CD44^+CD62L^-$  chez la souris et  $CD45RO^+CD45RA^-$  chez l'homme).

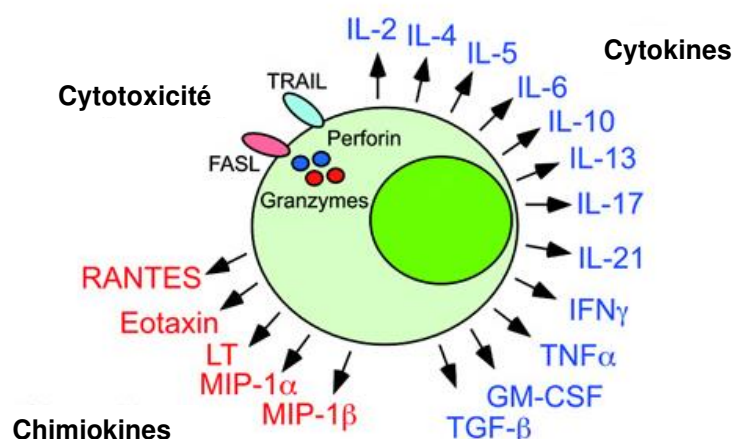
Bien que ces marqueurs soient insuffisants, certaines cellules iNKT ne les exprimant pas, l'association  $CD3^+NK1.1^+$  a été utilisée pour identifier les cellules iNKT. Les deux méthodes les plus spécifiques d'identification des cellules iNKT chez l'homme sont le marquage à l'aide de l'anticorps monoclonal 6B11, spécifique de la séquence  $V\alpha24-J\alpha18$  du TCR et le tétramère CD1d, chargé par  $\alpha$ -GC (147). Chez la souris, en l'absence d'anticorps clonotypique, le tétramère CD1d- $\alpha$ -GC couplé à un fluorochrome est l'outil de référence pour identifier en cytométrie en flux chez l'animal cette population minoritaire.

Décrit récemment, le facteur de transcription PLZF (pour « promyelocytic leukaemia zinc finger ») joue chez l'homme comme chez la souris un rôle important dans la maturation des cellules iNKT. Il est en effet nécessaire à l'expansion intra-thymique et à l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes iNKT (148). L'expression de PLZF n'est pas spécifique des lymphocytes iNKT puisqu'elle est décrite pour d'autres populations T non conventionnelles : lymphocytes  $NKT\gamma\delta$  et MAIT (pour « mucosal associated invariant T cells »). Néanmoins l'étude de l'expression intra-cytoplasmique de PLZF par les lymphocytes iNKT, telle une « signature transcriptionnelle », peut être utile pour caractériser cette population.

La propriété la plus remarquable des lymphocytes iNKT est leur capacité à produire dans les heures qui suivent l'engagement du TCR, un large panel de cytokines dont la nature peut varier suivant l'espèce (homme, souris...), la localisation (thymus, sang circulant...) ou le phénotype ( $CD4^+$  ou  $CD4^-$ , ...). Les cytokines produites pourraient également être en lien avec l'intensité du signal délivré au TCR. Ainsi chez l'homme et la souris, le GM-CSF et l'IL-13 sont produits pour de « faibles doses » d' $\alpha$ -GC, alors que ce même ligand à dose plus élevée induit la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  et à très fortes doses de l'IL-2 (149).

D'une manière générale, les cellules iNKT sont capables de produire des cytokines de type pro-Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) comme pro-Th2 (IL-4, IL-10, IL-13). Les lymphocytes iNKT produisent également des chimiokines, des facteurs de croissance et ont un potentiel cytotoxique. Ce large spectre d'action a fait qualifier les cellules iNKT de « couteau suisse » de l'immunité illustré par la Figure n°12, et traduit leur pléiotropie d'action (150).

Récemment décrite chez la souris, une sous-population de lymphocytes iNKT très tôt différenciée, est capable de produire l'IL-17 en grande quantité (NKT-IL-17 $^+$ ), une cytokine pro-inflammatoire (151). Ces cellules se caractérisent également par leur phénotype  $CD4^-$  NK1.1 $^-$  et leur différenciation dépend du facteur de transcription ROR $\gamma$ t, de manière identique aux cellules T  $CD4^+$  qui produisent l'IL-17 (T<sub>H</sub>17). Ces cellules NKT-IL-17 $^+$  sont plus particulièrement présentes au sein des ganglions périphériques et de la peau.



**Figure 12 : Les cellules iNKT activées: le « couteau-suisse » du système immunitaire.**

Les cellules iNKT exercent une forte activité cytotoxique et libèrent rapidement un panel impressionnant de cytokines et chimiokines qui modulent de nombreuses cellules du système immunitaire inné et adaptatif (d'après Matsuda, 2008).

---

### LES LYMPHOCYTES iNKT : UNE CIBLE DE L'IL-33

---

Nous avons rappelé ci-dessus la capacité des lymphocytes iNKT à être activés par des cytokines comme l'IL-12 dans un contexte infectieux, pour produire de l'IFN- $\gamma$ , indépendamment du TCR. Des données récentes suggèrent également que les lymphocytes iNKT peuvent être ciblés par une alarmine comme l'IL-33. Les travaux du groupe d'A. Herbelin montrent que l'IL-33 induit un effet pro-Th1 sur les cellules iNKT et NK (123), contrairement à l'effet uniquement pro-Th2 et pro-inflammatoire de l'IL-33 sur les cellules de l'immunité innée, aussi rapporté dans la littérature (152). Ainsi, en ciblant les cellules iNKT concomitamment à leur stimulation du TCR, l'IL-33 favorise leur production d'IFN- $\gamma$ . De plus, indépendamment du TCR, en association à l'IL-12, l'IL-33 amplifie également la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT ou NK. Cependant, *in vitro* chez la souris, l'IL-33 seule n'est pas capable d'activer les cellules iNKT, qui requièrent une activation préalable, via leur TCR ou non.

Ces données ont été corroborées chez l'homme où l'IL-33 induit la production de cytokines pro-Th1 (IFN- $\gamma$ ) et pro-Th2 (IL-4) par les cellules NK et iNKT (124). Par ailleurs, plusieurs équipes dont la nôtre, ont montré que les cellules iNKT humaines et murines, expriment constitutivement le récepteur ST2 de l'IL-33 et sont biologiquement réactives à cette cytokine (123) (124).

Ces travaux suggèrent l'existence d'un axe biologique IL-33/iNKT, lequel est mis en jeu dans un modèle d'asthme chez la souris (123). Cet axe suggère la capacité du système immunitaire inné à générer une réponse pro-Th1, après libération de l'alarmine IL-33. Cependant, cet axe n'avait pas été investigué dans le contexte de l'IR, en dépit du rôle joué par les lymphocytes iNKT.

---

### LYMPHOCYTES iNKT : UN ROLE CLEF DANS L'IR

---

Les lésions histologiques d'un organe transplanté consécutives à l'IR sont caractérisées par un infiltrat inflammatoire, constitué de cellules mononucléées et de polynucléaires, associées à des phénomènes d'apoptose et de nécrose cellulaire. Ces lésions sont très précoces, dans les heures qui suivent la reperfusion, suggérant l'implication d'effecteurs de l'immunité innée. Plusieurs travaux expérimentaux chez la souris, dans des modèles d'IR rénal ou hépatique, ont ainsi confirmé l'implication des lymphocytes iNKT ( $CD3^{+/int}NK1.1^+CD69^+$ ) et des cellules NK ( $NK1.1^+CD3^-$ ) (153)(154). Dès 30 mn après la reperfusion, le rein est le siège d'un infiltrat de cellules  $CD4^+$  activées ( $CD69^+$ ), et d'une proportion de cellules NKT- $IFN-\gamma^+$  majorés par rapport au contrôle. Le rôle des lymphocytes iNKT est ensuite démontré dans ce modèle par le fait que des souris dépourvues des cellules NK1.1 sont protégées des lésions d'IR et que le blocage de la présentation antigénique aux lymphocytes iNKT par un anticorps anti-CD1d prévient l'apparition de ces lésions (153).

Concernant les cellules iNKT, qui constituent une population très minoritaire au sein des lymphocytes circulants, leur cinétique d'infiltration du rein après IR n'est pas précisément connue. En revanche, leur rôle est mieux établi dans l'IR hépatique. Après clampage de la veine porte pendant 30 mn puis reperfusion, Shimamura *et al.* observent chez la souris une proportion de lymphocytes iNKT présents dans le foie significativement augmentée, avec un pic à 12 heures après reperfusion (155). De plus, dans ce travail, les souris déficientes en lymphocytes iNKT ( $CD1d^{-/-}$ ) ont moins de lésions hépatiques d'IR.

Des résultats similaires sont rapportés dans un autre modèle murin d'IR hépatique dans lequel les foies des souris déficientes en lymphocytes B et T ( $RAG-1^{-/-}$ ) sont protégés des lésions d'IR, alors que le transfert de lymphocytes iNKT les induit. En revanche, le transfert de lymphocytes iNKT provenant de souris déficientes en  $IFN-\gamma$  n'induit pas de lésion histologique (154). L'ensemble de ces résultats suggère que les lymphocytes iNKT jouent un rôle déterminant dans l'apparition précoce des lésions histologiques, en rapport avec leur capacité à produire de l' $IFN-\gamma$ . De plus, dans ce modèle, le recrutement des PNN est sous la dépendance des lymphocytes iNKT activés et de leur reconnaissance de CD1d.

Plus récemment, le groupe d'Okusa a montré, toujours dans l'IR rénale chez la souris, que l'activation des lymphocytes iNKT au cours de l'IR est liée à la présentation d'Ag

glycolipidiques par CD1d, en présence d'un signal de co-stimulation CD40-CD40L. De plus, l'activation des lymphocytes iNKT et leur production d'IFN- $\gamma$  sont modulées par l'IL-12 et l'IL-23. Enfin, la capacité des PNN à produire de l'IFN- $\gamma$  est dépendante de leur sécrétion d'IL-17, après leur recrutement induit par les cellules iNKT (33). Dans ce modèle, la contribution des lymphocytes iNKT reste à déterminer.

---

## LYMPHOCYTES INKT ET REJET DE GREFFE

---

La transplantation d'organe allogénique s'associe à une activation des lymphocytes iNKT (156). Cependant, la nature des signaux activateurs demeure très méconnue. De plus, le rôle précis des lymphocytes iNKT dans l'induction de tolérance, ou à l'inverse dans le processus de rejet, demeure débattu. En effet, au-delà du rôle clef joué par les lymphocytes iNKT dans l'IR, plusieurs équipes ont tenté d'établir leur place dans les mécanismes de tolérance et de rejet de greffe. Ainsi dans un modèle de greffe d'îlots de Langerhans perfusés dans la veine porte, chez des souris déficientes en lymphocytes iNKT, la survie des greffons est doublée par rapport aux souris sauvages (157). Le même groupe a montré que ce rejet dépendait des lymphocytes iNKT, du recrutement de PNN et de leur production d'IFN- $\gamma$  (158).

En revanche, dans un modèle murin de greffe cardiaque, les cellules iNKT, grâce à la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10, protègent le greffon du rejet (159)(160). De même, la survie d'une greffe de peau est plus courte chez la souris déficiente pour CD1d par rapport à la souris sauvage. Le transfert adoptif de cellules iNKT restaure une survie comparable à celle du groupe contrôle, d'une manière indépendante de l'expression de CD1d par les cellules du donneur, mais dépendante de la production d'IL-10 (161). Ces résultats suggèrent également que dans ce modèle, l'action tolérogène des lymphocytes iNKT n'est pas liée à la présentation d'un Ag glycolipidique par les DCs du donneur. Dans ce contexte, se pose alors la question d'une activation par les cytokines, soit par une action directe sur la cellule iNKT, soit associée à une présentation d'un ligand glycolipidique du soi. Cependant, cette hypothèse n'est pas complètement satisfaisante dans la mesure où l'activation iNKT est moindre en situation syngénique qu'allogénique (156)(161). Un élément de réponse pourrait être apporté par le travail récent de Jukes *et al.* qui montre *in vitro* comme *in vivo*, chez la souris, qu'une

activation des cellules iNKT est possible en présence d'IL-2, produite par des lymphocytes T allo-réactifs (162). Cette activation des lymphocytes iNKT se traduit par leur prolifération et leur production d'IFN- $\gamma$ .

Le mode d'action des lymphocytes iNKT dans l'induction de tolérance pose également la question de leur coopération avec les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Un travail mené dans un modèle de myasthénie auto-immune chez la souris suggère que les cellules iNKT activées par  $\alpha$ -GC, via leur production d'IL-2, permettent l'expansion des lymphocytes T régulateurs et modulent leur activité suppressive (163). De même, un travail récent montre dans un modèle d'induction de tolérance chez la souris après greffe combinée de moelle osseuse et de cœur, une interaction entre lymphocytes iNKT et Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Dans ce modèle, la tolérance induite par les lymphocytes Tregs de l'hôte dépend de leur production d'IL-10. Celle-ci est elle-même dépendante de la production d'IL-4 par les lymphocytes iNKT (164).

En conclusion, l'activation des cellules iNKT dans les suites d'une allogreffe d'organe module la réponse allogénique. Les modalités de cette activation ne sont pas précisément établies tandis que les données de la littérature sur leur rôle dans l'induction de tolérance sont contradictoires et dépendent tant du modèle que de l'organe transplanté. Enfin, en l'absence à ce jour de données convaincantes publiées chez l'homme, l'impact des lymphocytes iNKT en transplantation d'organe reste difficile à établir.

## **Résultats**

**Identification of invariant natural killer T cells in porcine peripheral blood**

A. Thierry, A. Robin, S. Giraud, S. Minouflet, A. Barra, F. Bridoux, T. Hauet,

G. Touchard, A. Herbelin, J-M. Gombert

Veterinary Immunology and Immunopathology

2012, Volume 149, pages 272–279.

Les premières descriptions phénotypiques et fonctionnelles des cellules iNKT, notamment par le groupe de Bendelac, ont été réalisées chez la souris et remontent au début des années 1990. Depuis, leur description n'a eu cesse de s'affiner, dans différentes espèces, y compris chez l'Homme. Leur caractérisation a été facilitée par l'utilisation de leur ligand spécifique synthétique  $\alpha$ -GC, qui couplé au tétramère CD1d permet l'identification des cellules iNKT en cytométrie en flux.

Chez l'Homme, la perte de fonction ou l'activation inappropriée des cellules iNKT a une influence physiopathologique significative dans de nombreuses maladies inflammatoires ou néoplasiques.

En transplantation d'organe solide, les modèles murins suggèrent un rôle clef des cellules iNKT dans le recrutement des PNN et la genèse des lésions inflammatoires d'IR.

Le modèle porcin est un modèle préclinique unique à partir duquel la réalisation d'auto-transplantation rénale est possible, permettant une lecture dissociée des effets de l'IR et de l'immunité adaptative sur le transplant. Cependant, la question de l'implication de l'axe biologique alarmines/iNKT ne pouvait pas être abordée sans une description préalable des cellules iNKT circulantes dans ce modèle animal.

Notre travail identifie chez le porc une faible proportion de cellules circulantes CD3<sup>+</sup>, marquées par le tétramère murin CD1d- $\alpha$ -GC et correspondant aux cellules iNKT. Celles-ci présentent un phénotype mémoire (CD45RA<sup>-</sup>) activé (SLA-DR<sup>+</sup>), à l'instar de la souris. L'état d'activation est ici évalué par l'expression de la molécule de classe II du CMH, en raison de l'absence d'anticorps disponible dirigé contre la molécule CD69 chez le porc.

Nous avons également mis en évidence l'expression de PLZF par les cellules iNKT du porc. Ce facteur de transcription, exprimé également par les cellules iNKT chez l'homme et la souris, est associé au développement thymique des cellules T non conventionnelles dont les iNKT. Il est également impliqué dans le maintien des propriétés fonctionnelles des cellules iNKT.

Ces propriétés se caractérisent notamment par l'expression d'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation *in vitro* associant PMA/ionomycine, suggérant qu'elles puissent contribuer aux réponses inflammatoires mettant en jeu l'IFN- $\gamma$ , telle qu'observées au cours du phénomène d'IR rénale.

Enfin, nous montrons qu'après stimulation par le ligand de synthèse  $\alpha$ -GC, la réponse proliférative des cellules iNKT du porc est majorée en présence d'IL-33 humaine, en comparaison à l'association IL-2+IL-15. Ce résultat nous permet de valider que l'IL-33 humaine croise avec le porc et de confirmer l'hypothèse que cette cytokine/alarmine cible les cellules iNKT dans ce modèle. Il suggère aussi que le porc est un modèle pertinent pour l'étude de la mise en jeu d'un axe biologique IL-33/iNKT après IR rénale.





Short communication

# Identification of invariant natural killer T cells in porcine peripheral blood

A. Thierry<sup>a,b</sup>, A. Robin<sup>b</sup>, S. Giraud<sup>b,c</sup>, S. Minouflet<sup>b</sup>, A. Barra<sup>d,f</sup>, F. Bridoux<sup>a</sup>, T. Hauet<sup>b,c,e</sup>, G. Touchard<sup>a,b</sup>, A. Herbelin<sup>g,h</sup>, J.-M. Gombert<sup>d,e,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Nephrology and Transplantation, CHU of Poitiers, 86021 Poitiers, France

<sup>b</sup> Inserm U1082, 86021 Poitiers, France

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, CHU of Poitiers, 86021 Poitiers, France

<sup>d</sup> Inserm U935, 86034 Poitiers, France

<sup>e</sup> Université de Poitiers, 86034 Poitiers Cedex, France

<sup>f</sup> Laboratory of Immunology, CHU of Poitiers, 86021 Poitiers, France

<sup>g</sup> Inserm U935, 94802 Villejuif, France

<sup>h</sup> Université de Paris-Sud 11, 91400 Orsay, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 15 March 2012

Received in revised form 20 June 2012

Accepted 29 June 2012

### Keywords:

Swine  
iNKT cells  
T cells

## ABSTRACT

The pig is a relevant preclinical model for numerous pathologies used to validate therapeutic strategies for translation to human. Although invariant natural killer T (iNKT) lymphocytes are a component of innate immunity implicated in many pathological processes, little is known on their characterization in swine. By addressing this issue using mouse  $\alpha$ -galactosylceramide-loaded CD1d tetramers ( $\alpha$ -GC-CD1dTT), which are commonly used to track iNKT cells, we were able to unequivocally identify CD3<sup>+</sup> $\alpha$ -GC-CD1dTT<sup>+</sup> cells in porcine peripheral blood, hereafter referred to as swine iNKT cells. These lymphocytes are enriched in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, harbor an activated-memory phenotype (SLA-DR<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), express the intracellular promyelocytic-leukemia-zinc-finger (PLZF) transcription factor and are significantly enriched in IFN- $\gamma$ -producing cells after *in vitro* activation in comparison with conventional T cells. Importantly, in presence of IL-2 and IL-15, the iNKT cell ligand  $\alpha$ -GC induces selective expansion of CD3<sup>+</sup> $\alpha$ -GC-CD1dTT<sup>+</sup> cells, confirming the reactivity of swine iNKT cells against  $\alpha$ -GC. When associated with  $\alpha$ -GC, IL-33, an alarmin of IL-1 family recently described to target iNKT cells, leads to a greater expansion of CD3<sup>+</sup> $\alpha$ -GC-CD1dTT<sup>+</sup> cells than IL-2 and IL-15. Altogether, our results provide the first phenotypic and functional description of swine iNKT cells allowing to further study the critical role of iNKT cells in porcine models of organ injury.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:**  $\alpha$ -GC,  $\alpha$ -galactosylceramide;  $\alpha$ -GC-CD1d TT,  $\alpha$ -galactosylceramide-loaded CD1d tetramers; DC, dendritic cell; IRI, ischemia-reperfusion injury; MFI, mean fluorescence intensity; iNKT, invariant natural killer T (cell); PLZF, promyelocytic-leukemia-zinc-finger; CD1d TT, CD1d tetramers.

\* Corresponding author at: Department of Immunology, University Hospital La Milétrie, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers Cedex, France. Tel.: +33 05 49 45 49 93; fax: +33 05 44 42 36.

E-mail address: [j.m.gombert@chu-poitiers.fr](mailto:j.m.gombert@chu-poitiers.fr) (J.-M. Gombert).

0165-2427/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.06.023>

## 1. Introduction

Knowledge of the experimental porcine model immune system constitutes an important target of research. Indeed the pig is more closely related to human when compared to mice, with immunological similarities such as the cellular distribution (Giraud et al., 2011). Understanding of the porcine immune system has progressed with the description of innate immune cells as CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>NK cells (Saalmüller et al., 1994; Denyer et al., 2006). More recently, the heterogeneous group of porcine dendritic cells (DC)

**Table 1**Directly conjugated primary antibodies used in this study for surface marker, intracellular IFN- $\gamma$  and PLZF analysis.

| Target             | Clone      | Isotype               | Source                   |
|--------------------|------------|-----------------------|--------------------------|
| Isotype control    | X40        | Mouse IgG1            | BD-Pharmingen            |
| Isotype control    | X39        | Mouse IgG2a, $\kappa$ | BD-Pharmingen            |
| Isotype control    | 27-35      | Mouse IgG2b, $\kappa$ | BD-Pharmingen            |
| Anti-CD3           | BB238E68C8 | Mouse IgG2a, $\kappa$ | BD-Pharmingen            |
| Anti-CD4 $\alpha$  | 74-12-4    | Mouse IgG2b, $\kappa$ | BD-Pharmingen            |
| Anti-CD5           | 1H6/8      | Mouse IgG2a           | AbD serotec              |
| Anti-CD8 $\alpha$  | 76-2-11    | Mouse IgG2a, $\kappa$ | BD-Pharmingen            |
| Anti-CD16          | G7         | Mouse IgG1            | AbD serotec              |
| Anti-CD45RA        | MIL13      | Mouse IgG1            | AbD serotec              |
| Anti-IFN- $\gamma$ | P2G10      | Mouse IgG1, $\kappa$  | BD-Pharmingen            |
| Anti-PLZF          | D-9        | Mouse IgG1            | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-SLA-DR        | 2E9/13     | Mouse IgG2b           | AbD serotec              |

including conventional DC and plasmacytoid DC has been characterized (Summerfield and McCullough, 2009).

By linking innate and adaptive immunity, invariant natural killer T (iNKT) cells represent a small but important subset of T lymphocytes with characteristics of both T and NK cells, regulating a broad range of immune responses (Godfrey et al., 2000). iNKT cells constitute a distinctive subpopulation of mature  $\alpha\beta$ -T cells bearing an invariant TCR  $\alpha$ -chain together with NK cell receptors (Kronenberg and Gapin, 2002; Bendelac et al., 2007). They recognize glycosphingolipid antigens presented by CD1d, a non-classical class I-like Ag-presenting molecule and respond rapidly to TCR stimulation with the prototypical ligand  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GC) by generating a number of cytokines, particularly IFN- $\gamma$  and IL-4 that are produced concomitantly (Kronenberg and Gapin, 2002; Bendelac et al., 2007). In mice, monkeys and humans, the iNKT cell population has been identified by flow cytometric analysis using fluorescently labeled CD1d tetramers loaded with  $\alpha$ -GC ( $\alpha$ -GC-CD1d TT), which interact with the iNKT cell TCR (Benlagha et al., 2000).

The analysis of the porcine CD1 gene cluster identified the CD1d gene (Eguchi-Ogawa et al., 2007) and the presence of the CD1d transcript has been reported (Looringh van Beeck et al., 2009). Moreover Looringh van Beeck et al. (2009) reported a homogenous sequence of NKT CDR3 $\alpha$  between human, mice and pig and finally predicted that the CDR1 $\alpha$  and CDR3 $\alpha$  loops from pig would be able to interact with  $\alpha$ -GC-CD1d complex. However phenotypic and functional properties of swine iNKT cells are not yet fully investigated (Renukaradhya et al., 2011). Taking advantage of  $\alpha$ -GC-CD1d TT which are well known to stain with murine and human iNKT cells in a species cross-reactive manner, the purpose of this study was to identify porcine iNKT cells and further characterize these rare cells at both phenotypic and functional levels in PBMCs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Pigs

Large White male pigs, aged from 12 to 15 week-old, obtained from IBiSA platform (Institut National de la Recherche Agronomique, Le Magneraud, Surgères, France), were used in this study. Animal-derived materials were

obtained and collected according to the regulations of the Animal Ethical Society.

### 2.2. Preparation of porcine PBMCs

Blood samples were collected from pigs. PBMCs from heparinized peripheral blood were separated by gradient centrifugation (Ficoll-PAA, Austria) at 1000  $\times$  g for 30 min. Then PBMCs were resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco, France) containing 10% fetal calf serum (Gibco).

### 2.3. Flow cytometry

Flow cytometry analysis was performed to differentiate between T lymphocyte subpopulations among PBMCs and to measure intracellular IFN- $\gamma$  expression using a FACS Canto II<sup>TM</sup> and FACS Diva<sup>TM</sup> software (Becton Dickinson, Mountain View, CA), and data were reanalyzed with FlowJo<sup>TM</sup> (version 7.5.5, Treestar, Ashland, OR). Directly conjugated primary antibodies targeting surface markers, IFN- $\gamma$ , intracellular BTB-ZF transcription factor promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) as well as their isotype controls are listed in Table 1.

APC-labeled CD1d  $\alpha$ -GC-CD1d TT was a generous gift of the National Institutes of Health Tetramer Facility (Atlanta, GA). PLZF was coupled in our laboratory with Alexa Fluor 647 with a kit from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). For *in vitro* experiments, cell viability was evaluated by the LIVE/DEAD<sup>®</sup> Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). At least 10<sup>5</sup> viable cell events were acquired in the peripheral blood lymphocyte gate (assessed by forward and side scatter parameters). Positive staining for each marker was determined by comparison to appropriate isotype-matched negative controls or non-loaded CD1d TT.

### 2.4. Cytokine analysis

To determine the intracytoplasmic expression of IFN- $\gamma$ , PBMCs were cultured for 5 h in presence of 1 ng/mL PMA, 0.5  $\mu$ g/mL calcium ionophore (all from Sigma-Aldrich) and Golgistop<sup>TM</sup> (1:1500 dilution, BD Biosciences, San Diego, CA). Cells were then permeabilized and stained with the anti-porcine IFN- $\gamma$  antibody

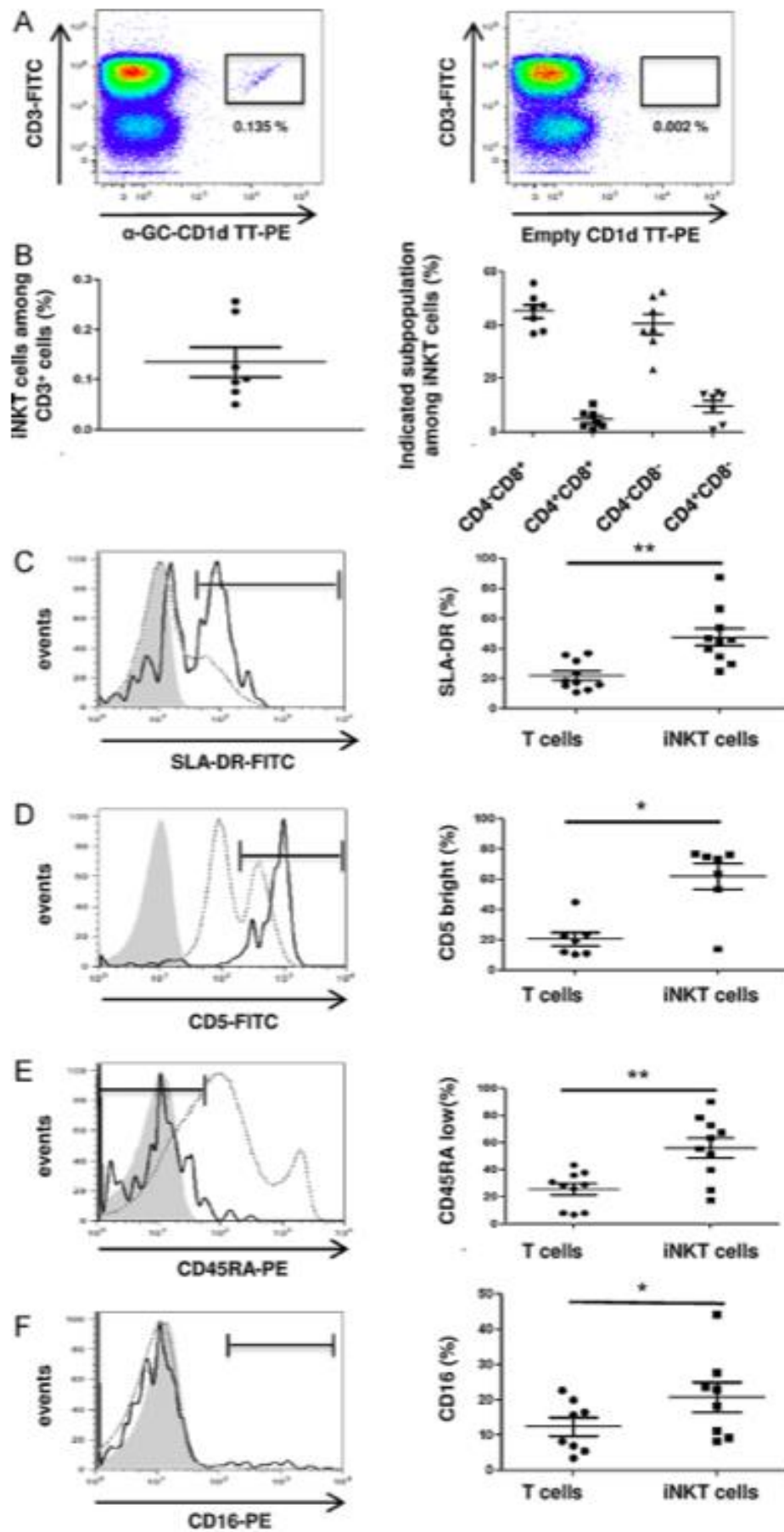
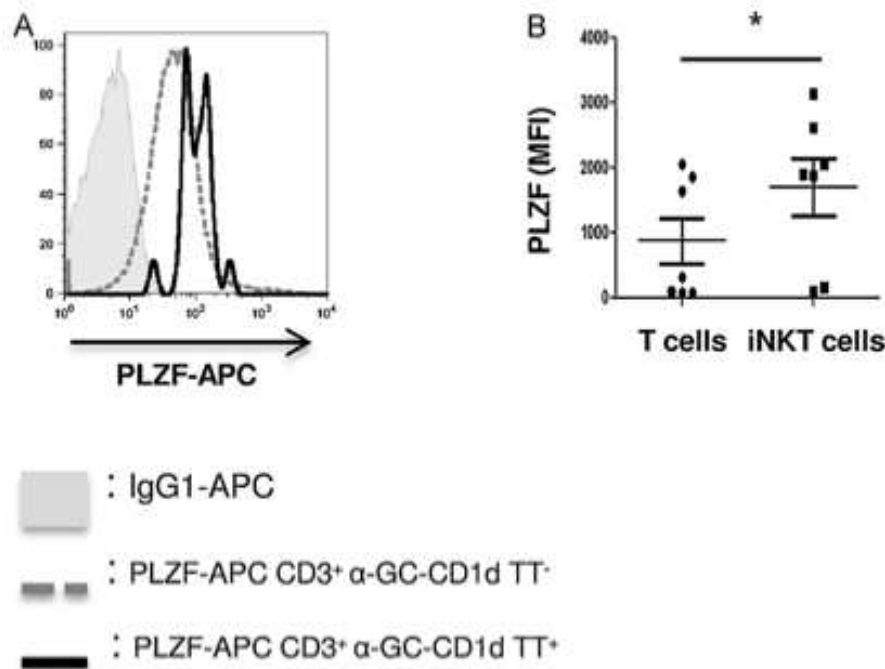


Fig. 1.



**Fig. 2.** Porcine iNKT cells express more PLZF than conventional T cells. Pig PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3 mAb and  $\alpha$ -GC-CD1d TT, fixed and permeabilized, as described in Section 2. (A) Expression of PLZF on iNKT (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup>) cells (bold line) relative to conventional T (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>-</sup>) cells (thin line). The filled histogram shows isotype control. One representative histogram plot out of seven is shown and (B) mean fluorescence intensity of PLZF among iNKT cells and conventional T cells are shown. Each symbol corresponds to an individual. The difference between T cells and iNKT cells is statistically significant (\* $p < 0.05$  by Wilcoxon signed rank test).

or its isotype-matched negative control, using the BD Biosciences Cytofix/Ctoperm™ kit.

## 2.5. Cell cultures

Cells were cultured in humidified 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C in 96-well round-bottomed microplates (Nunc, Roskilde, Denmark), at 20 × 10<sup>4</sup> per well (200  $\mu$ L final volume), in duplicate, in the presence of human rIL-2 (20 ng/mL, Novartis, Bâle) and porcine rIL-15 (0.5 ng/mL, BioSource, Camarillo, CA) or human rIL-33 (20 ng/mL, R & D Systems, Abingdon, UK).  $\alpha$ -GC (KRN 7000) (100 ng/mL) was provided by the Pharmaceutical Research Laboratory of Kirin Brewery (Gunma, Japan). Fold expansion was calculated by dividing the number of CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup> cells recovered from a 7-day culture with  $\alpha$ -GC by their number recovered from cultures without ligand.

## 2.6. Statistical analysis

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were made using GraphPad Prism® software (San Diego, CA). Mean differences between experimental groups were evaluated by Wilcoxon test. For *in vitro* expansion studies, Wilcoxon or Mann-Whitney test, as appropriate were used.  $p$  values under 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Identification of porcine iNKT cells using $\alpha$ -GC-CD1d TT and anti-CD3 mAb

The first piece of evidence supporting a functional iNKT/CD1d system in pig has been obtained from the identification of CD1d and NKT cell invariant  $\alpha$  chain transcripts

**Fig. 1.** Phenotypic analysis of porcine iNKT cells in peripheral blood. (A) Gating strategy to define iNKT (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup>) cells in peripheral blood. Pig PBMCs were membrane-labeled with anti-CD3 mAb and  $\alpha$ -GC-CD1d TT (left panel) or with anti-CD3 mAb and an empty CD1d TT (without  $\alpha$ -GC) to validate the staining of the  $\alpha$ -GC-CD1d TT (right panel). Numbers in gates indicate the percentage of cells of interest among PBMCs. One representative case is shown. (B) iNKT (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup>) cell frequency in PBMCs from pigs (left panel) and proportions of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> iNKT cells (right panel). Each symbol corresponds to an individual. (C–F) comparative analysis of the expression profiles of SLA-DR, CD5, CD45RA and CD16 cell surface markers on iNKT (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup>) cells (bold lines) and conventional T (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>-</sup>) cells (dotted lines). The filled histograms show staining with isotype control antibodies. Representative histograms are shown (left panels). Each symbol corresponds to an individual (right panels).  $p$  was established by Wilcoxon signed rank test. (C) the frequency of SLA-DR<sup>+</sup> cells in iNKT cells and conventional T cells (expressed as mean  $\pm$  SEM: 47.7  $\pm$  5.7% versus 22.0  $\pm$  3.0%, respectively; \* $p < 0.01$ ). (D) the frequency of CD5<sup>high</sup> cells in iNKT cells and conventional T cells (expressed as mean  $\pm$  SEM: 62.0  $\pm$  8.5% versus 20.7  $\pm$  4.5%, respectively; \* $p < 0.05$ ). (E) the frequency of CD45RA<sup>low</sup> cells in iNKT cells and conventional T cells (expressed as mean  $\pm$  SEM: 48.4  $\pm$  1.2% versus 21.8  $\pm$  2.7%, respectively; \* $p < 0.01$ ) and (F) the frequency of CD16<sup>+</sup> cells in iNKT cells and conventional T cells (expressed as mean  $\pm$  SEM: 20.8  $\pm$  4.2% versus 12.5  $\pm$  2.5%, respectively; \* $p < 0.05$ ).

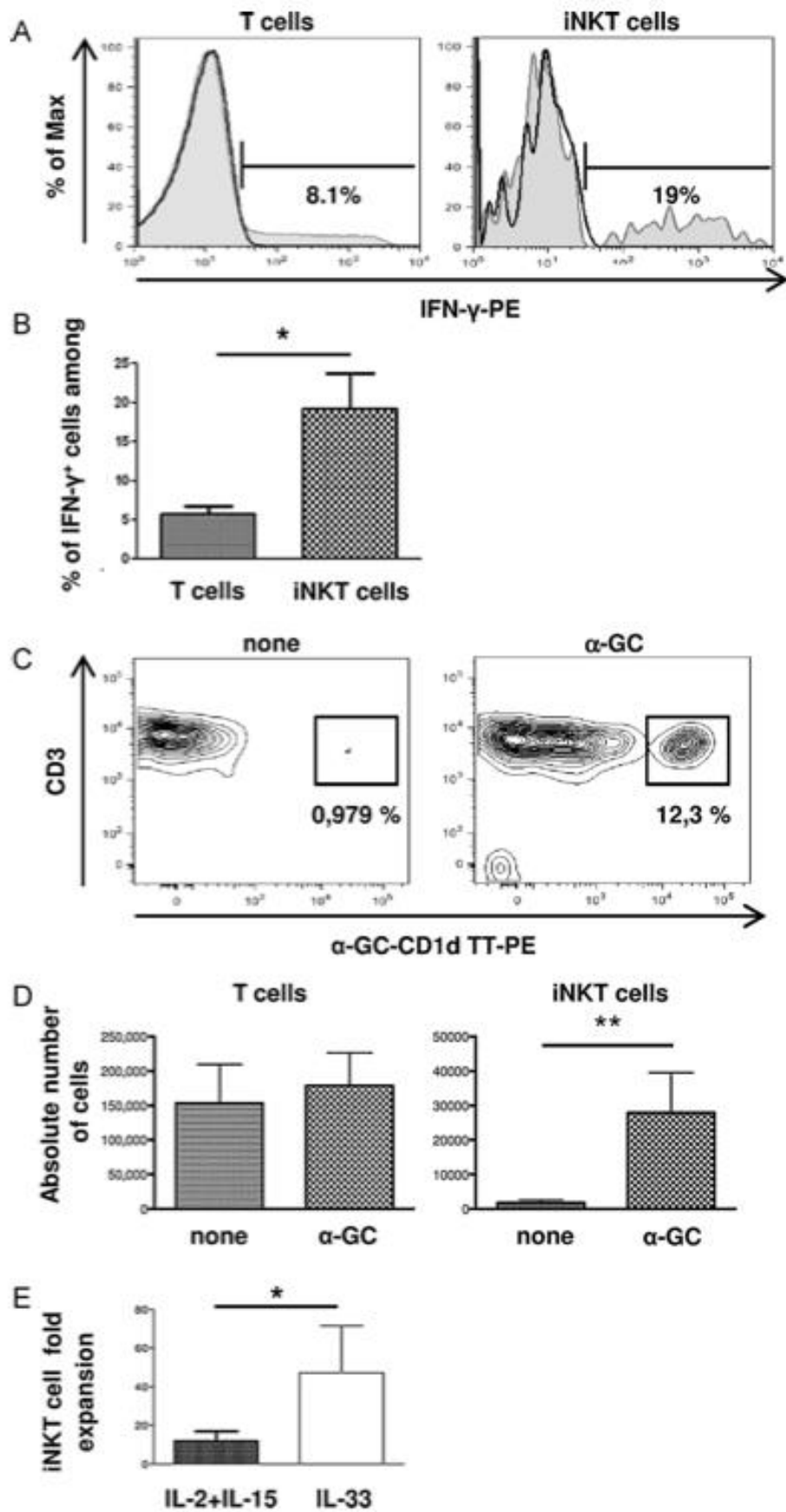


Fig. 3.

in this specie. Thus, molecular modeling predicted that porcine invariant TCR  $\alpha$  chain/porcine CD1d/ $\alpha$ -GC form complexes that are highly homologous to the human complex (Looringh van Beeck et al., 2009). The study of iNKT cells has become technically simpler in recent years with the use of  $\alpha$ -GC-CD1d TT: these tetramers have been used with success on mouse, macaque, and human samples (Matsuda et al., 2000).

Porcine PBMCs were stained by mouse  $\alpha$ -GC-CD1d TT and anti-CD3 mAb, and iNKT cells were then defined by gating on CD3 lymphocytes that bound to  $\alpha$ -GC-CD1d TT (Fig. 1A). Gating on viable leukocytes was sufficient to identify CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup> cells, representing  $0.10 \pm 0.02\%$  (mean  $\pm$  SEM; range: 0.04–0.18) of total PBMCs (Fig. 1A, left panel, and data not shown). Importantly, we verify that unloaded CD1d tetramers invariably stain only 0.001–0.003% CD3<sup>+</sup> cells (Fig. 1A, right panel). Therefore, CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup> cells that we detected in swine PBMCs define iNKT cells, also known as type I NKT cells, which express in human and mouse the invariant V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 and V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 TCR  $\alpha$ -chains, respectively. Thus, as expected, porcine iNKT cells failed to express the  $\gamma\delta$  TCR (Supplementary Figure). Among CD3<sup>+</sup> T cells, a large range of peripheral blood iNKT cell levels in pigs was observed, ranging from 0.05 to 0.25% of lymphocytes, with a mean level of  $0.14 \pm 0.04\%$  (Fig. 1B, left panel), a value that does not significantly differ from those reported in peripheral blood of healthy human donors (range from 0.01 to 0.5%) (Pasquier et al., 2005) and mice (range from 0.2 to 0.5%) (Berzins et al., 2011). Thus, as their human equivalents, porcine iNKT cells represent a rare lymphocyte subset with highly variable frequencies in peripheral blood.

The fact that  $\alpha$ -GC-CD1d TT recognizes porcine iNKT cells in a species cross-reactive manner was expected since mouse CD1d tetramers are also well known to stain human iNKT cells (Benlagha et al., 2000). Moreover, our identification of iNKT cells in porcine PBMCs is consistent with that previously reported in pig lungs, using the same tetramer strategy (Renukaradhya et al., 2011).

In humans, iNKT cells can be subdivided into three main subsets: CD4<sup>+</sup>, double negative and CD8<sup>+</sup>. By counter-stained cells with CD4 and CD8 staining, we were able to identify all three iNKT cell subsets in pig. Although the CD4<sup>+</sup>

iNKT cell subset was reduced in comparison to its human equivalent ( $18.4 \pm 3.6\%$  versus  $31.1 \pm 7.2\%$ ),  $45.5 \pm 3.6\%$  of porcine iNKT cells were CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and  $35.9 \pm 3.5\%$  of them were CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (Fig. 1B, right panel), a phenotypic distribution that is similar in humans ( $42.14 \pm 6.02\%$  and  $36.57 \pm 6.42\%$ , respectively, personal data). The fact that the CD4<sup>+</sup> iNKT cells are underrepresented in pig is an interesting point, keeping in mind that iNKT cells display functionally distinct profiles based on CD4 expression in both mouse and human (Lee et al., 2002; Crowe et al., 2005). Lastly, consistent with the existence in pig of a substantial fraction of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the blood (Saalmüller and Bryant, 1994), 1–10% blood iNKT cells in the animals tested were CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Supplementary Figure).

Because human and mouse iNKT cells are characterized by a memory-activated phenotype, we next determined whether porcine blood iNKT cells also showed signs of activation. As depicted in Fig. 1C, a significantly larger proportion of porcine blood iNKT cells expressed MHC-class II SLA-DR, a molecule which in swine seems associated with an activating status of T cells (Saalmüller et al., 1991), as compared to conventional CD3<sup>+</sup> T cells ( $47.7 \pm 5.7\%$  versus  $22.0 \pm 3.0\%$ , respectively;  $p = 0.002$ ). Such a constitutive activated phenotype was also supported by their consistent levels of CD5 expression (mean fluorescence intensity (MFI):  $13,763 \pm 2346$  versus  $4468 \pm 436$  in iNKT cells and conventional CD3<sup>+</sup> T cells, respectively,  $p = 0.031$ ), which has been reported to be maintained through high intensity of TCR recognition during intrathymic positive selection of iNKT cells (Azzam et al., 1998). As elevated expression of CD5 was also associated with T cell self-reactivity (Tarakhovskiy et al., 1995), our findings are consistent with the view that swine iNKT cells, as their mouse and human equivalents, are chronically stimulated by self-antigens (Brennan et al., 2011).

Studies in mouse indicated that activation differentially regulates iNKT cell distribution and phenotype (Matsuda et al., 2000). Furthermore, in steady state conditions, thymus- and spleen-derived iNKT cells in mice have been described as activated/memory phenotype-positive cells, whereas lymph node-derived mouse iNKT cells preferentially displayed a naive phenotype (Milpied et al., 2011). Whether this view can be extended to the pig remains to be

**Fig. 3.** Porcine iNKT cells produce IFN- $\gamma$  and proliferate in response to their cognate ligand  $\alpha$ -GC and cytokines. (A and B) Pig PBMCs were incubated for 5 h with or without PMA/ionomycin in the presence of monensin. Cells were then membrane-labeled with anti-CD3 mAb and  $\alpha$ -GC-CD1d TT, permeabilized, and stained with anti-IFN- $\gamma$ . Intracellular expression of IFN- $\gamma$  was analyzed after gating on conventional T (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>-</sup>) cells and iNKT (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup>) cells. (A) Expression of IFN- $\gamma$  by PMA/ionomycin-stimulated (thin lines) conventional T cells (left panel) or iNKT cells (right panel) relative to the corresponding non-stimulated cells (bold lines). One representative experiment out of six is shown. (B) The difference between T cells and iNKT cells (mean  $\pm$  SEM:  $19.3 \pm 4.4\%$  versus  $5.7 \pm 0.9\%$ ) is statistically significant ( $p < 0.05$  by Wilcoxon signed rank test). Data are from six individuals (C and D). Porcine iNKT cells specifically expand in response to their cognate ligand  $\alpha$ -GC. Pig PBMCs were cultured for 7 days with or without  $\alpha$ -GC in the presence of IL-12 and IL-15. Cells were then membrane-labeled with anti-CD3 mAb and  $\alpha$ -GC-CD1d TT. (C)  $\alpha$ -GC-stimulated PBMCs (left panel) relative to non-stimulated PBMCs (right panel). Numbers indicate percentages of  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup> cells among CD3<sup>+</sup> cells. One representative experiment out of six is shown. (D) Expansion of porcine conventional T (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>-</sup>) cells (left panel) and iNKT (CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup>) cells (right panel) in the presence or not of  $\alpha$ -GC. Numbers represent the absolute number of cells per well. Conventional T cells (mean  $\pm$  SEM):  $167,163 \pm 43,735$  versus  $143,370 \pm 50,769$  in the presence and absence of  $\alpha$ -GC, respectively. iNKT cells (mean  $\pm$  SEM):  $27,884 \pm 11,681$  versus  $1717 \pm 764$  in the presence and absence of  $\alpha$ -GC, respectively;  $p < 0.01$  by Wilcoxon signed rank test. Data are from six individuals. (E) When added together with  $\alpha$ -GC, IL-33 leads to a further greater expansion of iNKT cells among pig PBMCs than IL-2 + IL-15. Mean  $\pm$  SEM:  $65.8 \pm 33.4$ -fold expansion versus  $11.89 \pm 4.9$ -fold expansion, in the presence of IL-33 and IL-2 + IL-15, respectively;  $p < 0.05$  by Mann-Whitney test. Fold expansion was calculated by dividing the number of  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup> cells recovered with  $\alpha$ -GC by their number recovered from cultures without ligand, in the presence of IL-2 + IL-15 or IL-33. Data are from four and nine experiments with IL-2 + IL-15 and IL-33, respectively.

specified and iNKT cell distribution needs to be extensively studied in this specie.

Lastly, porcine blood iNKT cells displayed weak expression of CD45RA illustrative of a memory-like status, relative to the naïve CD45RA<sup>+</sup> phenotype of their mainstream T cell counteract ( $25.6 \pm 4.2\%$  versus  $56.3 \pm 7.3\%$ , respectively;  $p = 0.002$ ) (Fig. 1E). Together, these results indicate that peripheral blood porcine iNKT cells exhibit an activated/memory phenotype (CD5<sup>bright</sup> SLA-DR<sup>bright</sup> CD45RA<sup>low</sup>) as reported for human peripheral blood iNKT cells (Lee et al., 2002) and spleen-derived rhesus macaque iNKT cells (Gansuvd et al., 2003).

Beside their activated/memory phenotype, iNKT cells also share phenotypic similarities with NK cells, and they usually express the surface markers CD16 (FcγRIII) in humans. As shown in Fig. 1F, frequency of blood iNKT cells expressing CD16 in pig was only slightly higher than that of conventional CD3<sup>+</sup> T cells ( $20.8 \pm 4.2\%$  versus  $12.5 \pm 2.5\%$ , respectively;  $p = 0.039$ ), indicating that CD16 cannot be used as a NK marker for iNKT cells in pig. Lastly, according to a previous review article (Gerner et al., 2009), a significant proportion of pig iNKT cells expressed CD11b, and this marker was virtually absent on conventional T cells (Supplementary Figure).

### 3.2. Porcine NKT cells express the transcriptional factor PLZF.

On the basis of recent studies showing that both mouse and human iNKT cells express PLZF and, importantly, are dependent upon PLZF for their development (Savage et al., 2008), we surmised that porcine iNKT cells also harbor PLZF. As depicted in Fig. 2, we found that it was the case. Thus, iNKT cells expressed high levels of PLZF (mean MFI  $\pm$  SEM) relative to conventional CD3<sup>+</sup> T cells ( $1697 \pm 1159$  versus  $880 \pm 926$ , respectively;  $p = 0.015$ ). These findings extend to pig the notion that PLZF expression is associated with the ability of iNKT cells to constitutively exhibit an activated/memory phenotype in mice (Kovalovsky et al., 2010). In addition to iNKT cells, PLZF has also been reported to be expressed in  $\gamma\delta$  T cells in mouse and human and in a large percentage of CD8<sup>+</sup> T cells in human (Eidson et al., 2011). Therefore, whether PLZF expression is restricted to iNKT cells, or on the contrary affects a wide variety of innate-like T lymphocytes in pig remains to be determined.

### 3.3. Porcine iNKT cells express IFN- $\gamma$ and proliferate in response to their cognate ligand $\alpha$ -GC and cytokines.

iNKT cells are typically a potent source of cytokines, and, confirming this activity in swine, iNKT cells expressed high levels of IFN- $\gamma$  when stimulated *in vitro* (Fig. 3A). Thus, after PMA/ionomycin stimulation, porcine iNKT cells were significantly enriched in IFN- $\gamma$ -producing cells in comparison with conventional CD3<sup>+</sup> T cells ( $19.3 \pm 4.4\%$  versus  $5.7 \pm 0.9\%$ , respectively;  $p = 0.031$ ) (Fig. 3A and B). To date, both in mice, monkeys and humans,  $\alpha$ -GC reactivity against T lymphocytes has been shown exclusively in the iNKT cell subset. Accordingly, in presence of IL-2 + IL-15, porcine CD3<sup>+</sup> $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup> cells but not CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>-</sup>

cells were capable to expand *in vitro* in response to  $\alpha$ -GC, with a 1.8–45.2-fold increase of the proliferation rate of iNKT cells relative to that measured without ligand, thus confirming the selective reactivity of swine iNKT cells to this glycolipid Ag (Fig. 3C and D). When associated with  $\alpha$ -GC, IL-33, a cytokine of IL-1 family recently described to target iNKT cells (Smithgall et al., 2008; Bourgeois et al., 2009), led to a greater expansion of CD3<sup>+</sup>  $\alpha$ -GC-CD1d TT<sup>+</sup> cells than IL-2 + IL-15 ( $47.2 \pm 24.2$ -fold expansion versus  $13.1 \pm 6.6$ -fold expansion, respectively;  $p = 0.031$ ) (Fig. 3E). The fact that IL-33 contributes directly to iNKT cell expansion without significant effect on mainstream T cells (data not shown) has been previously reported *in vitro* and *in vivo* in mice model (Bourgeois et al., 2009). This particular reactivity of porcine iNKT cells to IL-33 makes sense, bearing in mind that IL-33 may behave as an endogenous danger signal to alert the immune system after endothelial or epithelial cell damage, similarly to the prototype alarmin high mobility group box 1, and our recent demonstration of a biological IL-33/iNKT cell axis controlling local innate-mediated inflammation processes (Bourgeois et al., 2011). In a more general way, our data highlight a new way for the investigation of iNKT cells in preclinical situations, as large white pig is used to validate therapeutic strategy useful for human. In this regard, the porcine model merits a particular attention to further study the critical role of iNKT cells in ischemia-reperfusion injury, which has been recently demonstrated in mouse models (Li et al., 2007).

In conclusion, iNKT cells have been known in humans and mice for 15 years, and several studies led to a detailed knowledge on their phenotype and functions (Godfrey et al., 2010). Furthermore, we and others have credited iNKT cells with key regulatory functions in several mouse models of inflammatory diseases (Bourgeois et al., 2011; Liu et al., 2011). In swine, research is still at its beginning, and our present study comprehensively analyzes peripheral blood iNKT cells in healthy large white pigs, including basic information regarding their phenotype as well as their functions. Considering that iNKT cells are rare cell types within the lymphocyte populations, the large size of the pig and the availability of large volumes of blood together with repeated samplings offer an advantage allowing considerable immunological investigations, especially in preclinical situations.

### Acknowledgements

This study was funded by AREN-PC (Association pour la Recherche en Néphrologie-Poitou-Charentes), Inserm, Région Poitou Charentes, Conseil général de la Vienne and CHU de Poitiers. None of the authors have any conflicts relating to the experiments described in the paper.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.06.023>.

## References

- Azzam, H.S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E.W., Love, P.E., 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* 188, 2301–2311.
- Bendelac, A., Savage, P.B., Teyton, L., 2007. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 297–336.
- Benlagha, K., Weiss, A., Beavis, A., Teyton, L., Bendelac, A., 2000. *In vivo* identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 191, 1895–1903.
- Berzins, S.P., Smyth, M.J., Baxter, A.G., 2011. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 131–142.
- Bourgeois, E., Van, L.P., Samson, M., Diem, S., Barra, A., Roga, S., Gombert, J.-M., Schneider, E., Dy, M., Gourdy, P., Girard, J.-P., Herbelin, A., 2009. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN- $\gamma$  production. *Eur. J. Immunol.* 39, 1046–1055.
- Bourgeois, E.A., Levescot, A., Diem, S., Chauvineau, A., Bergès, H., Milpied, P., Lehen, A., Damotte, D., Gombert, J.-M., Schneider, E., Girard, J.-P., Gourdy, P., Herbelin, A., 2011. A natural protective function of invariant NKT cells in a mouse model of innate-cell-driven lung inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41, 299–305.
- Brennan, P.J., Tatituri, R.V.V., Brigl, M., Kim, E.Y., Tuli, A., Sanderson, J.P., Gadola, S.D., Hsu, F.-F., Besra, G.S., Brenner, M.B., 2011. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat. Immunol.* 12, 1202–1211.
- Crowe, N.Y., Coquet, J.M., Berzins, S.P., Kyriakoudis, K., Keating, R., Pellicci, D.G., Hayakawa, Y., Godfrey, D.L., Smyth, M.J., 2005. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets *in vivo*. *J. Exp. Med.* 202, 1279–1288.
- Denyer, M.S., Wileman, T.E., Stirling, C.M.A., Zuber, B., Takamatsu, H.-H., 2006. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 279–292.
- Eguchi-Ogawa, T., Morozumi, T., Tanaka, M., Shinkai, H., Okumura, N., Suzuki, K., Awata, T., Uenishi, H., 2007. Analysis of the genomic structure of the porcine CD1 gene cluster. *Genomics* 89, 248–261.
- Eidson, M., Wahlstrom, J., Beaulieu, A.M., Zaidi, B., Carsons, S.E., Crow, P.K., Yuan, J., Wolchok, J.D., Horsthemke, B., Wleczorek, D., Sant'Angelo, D.B., 2011. Altered development of NKT cells,  $\gamma\delta$  T cells, CD8 T cells and NK cells in a PLZF deficient patient. *PLoS One* 6, e24441.
- Gansuud, B., Hubbard, W.J., Hutchings, A., Thomas, F.T., Goodwin, J., Wilson, S.B., Exley, M.A., Thomas, J.M., 2003. Phenotypic and functional characterization of long-term cultured rhesus macaque spleen-derived NKT cells. *J. Immunol.* 171, 2904–2911.
- Gerner, W., Käser, T., Saalmüller, A., 2009. Porcine T lymphocytes and NK cells – an update. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 310–320.
- Giraud, S., Favreau, F., Chatauret, N., Thuillier, R., Maiga, S., Hauet, T., 2011. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 5321–5327.
- Godfrey, D.L., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J., Baxter, A.G., 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 21, 573–583.
- Godfrey, D.L., Stankovic, S., Baxter, A.G., 2010. Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* 11, 197–206.
- Kovalovsky, D., Alonzo, E.S., Uche, O.U., Eidson, M., Nichols, K.E., Sant'Angelo, D.B., 2010. PLZF induces the spontaneous acquisition of memory/effector functions in T cells independently of NKT cell-related signals. *J. Immunol.* 184, 6746–6755.
- Kronenberg, M., Gapin, L., 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 557–568.
- Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L., Bendelac, A., 2002. Distinct functional lineages of human V( $\alpha$ )24 natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 195, 637–641.
- Li, L., Huang, L., Sung, S.J., Lobo, P.J., Brown, M.G., Gregg, R.K., Engelhard, V.H., Okusa, M.D., 2007. NKT cell activation mediates neutrophil IFN- $\gamma$  production and renal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol.* 178, 5899–5911.
- Liu, Y., Teige, A., Mondoc, E., Ibrahim, S., Holmdahl, R., Issazadeh-Navikas, S., 2011. Endogenous collagen peptide activation of CD1d-restricted NKT cells ameliorates tissue-specific inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 249–264.
- Loorling van Beeck, F.A., Reinink, P., Hermesen, R., Zajonc, D.M., Laven, M.J., Fun, A., Troskie, M., Schoemaker, N.J., Morar, D., Lenstra, J.A., Vervelde, L., Rutten, V.P.M.G., van Eden, W., Van Rhijn, I., 2009. Functional CD1d and/or NKT cell invariant chain transcript in horse, pig, African elephant and guinea pig, but not in ruminants. *Mol. Immunol.* 46, 1424–1431.
- Matsuda, J.L., Naldenko, O.V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C.R., Koezuka, Y., Kronenberg, M., 2000. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 192, 741–754.
- Milpied, P., Massot, B., Renand, A., Diem, S., Herbelin, A., Leite-de-Moraes, M., Rubio, M.-T., Hermine, O., 2011. IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression. *Blood* 118, 2993–3002.
- Pasquier, B., Yin, L., Fondanèche, M.-C., Relouzat, F., Bloch-Queyrat, C., Lambert, N., Fischer, A., de Saint-Basile, G., Latour, S., 2005. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J. Exp. Med.* 201, 695–701.
- Renukaradhy, G.J., Manickam, C., Khatri, M., Rauf, A., Li, X., Tsuji, M., Rajashekar, G., Dwivedi, V., 2011. Functional invariant NKT cells in pig lungs regulate the airway hyperreactivity: a potential animal model. *J. Clin. Immunol.* 31, 228–239.
- Saalmüller, A., Bryant, J., 1994. Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 45–52.
- Saalmüller, A., Hirt, W., Maurer, S., Weiland, E., 1994. Discrimination between two subsets of porcine CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. *Immunology* 81, 578–583.
- Saalmüller, A., Weiland, F., Reddehase, M.J., 1991. Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility antigen. *Immunobiology* 183, 102–114.
- Savage, A.K., Constantinides, M.G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., Bendelac, A., 2008. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 29, 391–403.
- Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.-R.P., Kaufman, D., Armitage, R., Smith, D.E., 2008. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int. Immunol.* 20, 1019–1030.
- Summerfield, A., McCullough, K.C., 2009. The porcine dendritic cell family. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 299–309.
- Tarakhovskiy, A., Kanner, S.B., Hombach, J., Ledbetter, J.A., Müller, W., Killeen, N., Rajewsky, K., 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 269, 535–537.

**The alarmin concept applied to human renal transplantation: evidence for a differential implication of HMGB1 and IL-33**

A. Thierry, S. Giraud, A. Robin, A. Barra, F. Bridoux, V. Ameteau, T. Hauet, J-P. Girard,  
G. Touchard, J-M. Gombert, A. Herbelin

Manuscrit soumis pour publication

La mise en jeu de l'axe biologique IL-33/iNKT au cours de l'IR en transplantation rénale n'est pas documentée à ce jour. Le rôle de l'alarmine HMGB1 dans l'IR suscite un vif intérêt, à partir de résultats obtenus principalement dans des modèles murins, alors que le rôle de l'IL-33 est peu connu, excepté quelques données en transplantation hépatique.

Chez la souris, des modèles expérimentaux de différentes pathologies, hors du champ de l'IR, ont suggéré un axe biologique IL-33/iNKT. Néanmoins, celui-ci est difficile à mettre en évidence dans les modèles animaux d'IR post-transplantation. En particulier, on rappellera la difficulté technique de réaliser une transplantation rénale chez la souris ainsi que la pauvreté des « outils immunologiques » disponibles dans le modèle porcin (cf Manuscrit n°1).

Afin de mettre en évidence la libération des alarmines HMGB1 et IL-33 précocement après transplantation rénale et de dégager des arguments en faveur d'un axe IL-33/iNKT, nous avons mené une étude prospective chez les patients transplantés dans le service de Néphrologie-Hémodialyse-Transplantation rénale du CHU de Poitiers

Nous avons tout d'abord détecté la libération d'HMGB1 dans le sang et les urines et d'IL-33 dans les urines des patients transplantés, précocement après la reperfusion. De plus, les taux sériques d'IL-33, contrairement à ceux d'HMGB1, sont corrélés à la durée d'ischémie froide. La libération d'IL-33 s'accompagne d'une variation significative des valeurs sériques et urinaires de ST2s avec une augmentation dès 3h après reperfusion par rapport aux valeurs pré-greffe ( $p < 0,001$ ). Puis celles-ci diminuent significativement à J1 et J3 ( $p < 0,005$ ) pour rejoindre des valeurs comparables à celles observées en pré-greffe.

Cette production d'alarmines induit une réponse systémique comme en témoigne l'augmentation de l'activité transcriptionnelle pour les récepteurs des deux alarmines TLR2, TLR4 et ST2L, au sein des leucocytes périphériques.

Nous avons ensuite modélisé *in vitro* l'effet de l'IR sur la production d'alarmines. Nous avons observé dans le surnageant de culture des cellules endothéliales veineuses ombilicales humaines, une augmentation des concentrations d'HMGB1 et d'IL-33 après hypoxie ( $p < 0.05$ ). En revanche, après réoxygénation, seule l'IL-33 est libérée.

Afin de déterminer si le relargage d'alarmines s'accompagne d'une activation du système immunitaire, nous avons également étudié le niveau d'expression de CD69 des lymphocytes T et iNKT. Nous avons observé une augmentation significative, précoce et transitoire des lymphocytes iNKT, 3 heures après la reperfusion. De manière intéressante, *in vitro*, les cellules iNKT sont activées en présence d'IL-33 et non d'HMGB1.

Ces données apportent la démonstration *princeps* en transplantation rénale chez l'homme, d'une production précoce d'HMGB1 et d'IL-33 après IR. La présence d'IL-33 détectable uniquement dans les urines suggère une production rénale de l'alarmine. Les expressions sérique et urinaire de ST2s et l'activation précoce des lymphocytes iNKT suggèrent l'implication de la voie IL-33/ST2 après IR. Enfin, les données *in vitro* confirment la production d'alarmines suite à un stress cellulaire majeur tel que l'hypoxie réoxygénation.

# **The alarmin concept applied to human renal transplantation: evidence for a differential implication of HMGB1 and IL-33**

**A. Thierry<sup>a,b,c,d\*</sup>, S. Giraud<sup>b,c,d\*</sup>, A. Robin<sup>b,c</sup>, A. Barra<sup>b,d,e,f</sup>, F. Bridoux<sup>a,b,d</sup>, V. Ameteau<sup>b,c</sup>,  
T. Hauet<sup>b,c,d,g</sup>, J-P. Girard<sup>h,i,j</sup>, G. Touchard<sup>a,b,c</sup>, J-M. Gombert<sup>b,d,e,f\*\*</sup>, A. Herbelin<sup>b,c,d\*\*</sup>**

*<sup>a</sup>Department of Nephrology and Transplantation, 86021 Poitiers, France*

*<sup>b</sup>CHU of Poitiers, 86021 Poitiers, France*

*<sup>c</sup>Inserm U1082, 86021 Poitiers, France*

*<sup>d</sup>University of Poitiers, 86034 Poitiers, France*

*<sup>e</sup>Inserm U935, 86034 Poitiers, France*

*<sup>f</sup>Laboratory of Immunology, 86021 Poitiers, France*

*<sup>g</sup>Department of Biochemistry, 86021 Poitiers, France*

*<sup>h</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 31077 Toulouse, France*

*<sup>i</sup>CNRS UMR5089, Toulouse, 31077 Toulouse, France*

*<sup>j</sup>Université de Toulouse and UPS, 31077 Toulouse, France*

\*A.T. and S.G. have contributed equally to this work.

\*\*A.H. and J.M.G. are co-senior authors.

**Corresponding authors and reprint requests:**

Jean-Marc GOMBERT, MD, PhD  
Department of Immunology  
Pôle Biologie Santé  
1, rue Georges Bonnet BP 633  
86022 Poitiers, France  
Phone: +33 (0) 5 49 45 49 93  
Fax: +33 (0) 5 49 44 40 95  
E-mail: [j.m.gombert@chu-poitiers.fr](mailto:j.m.gombert@chu-poitiers.fr)

André HERBELIN, PhD  
INSERM U1082  
Pôle Biologie Santé  
1, rue Georges Bonnet BP 633  
86022 Poitiers, France  
Phone: +33 (0) 5 49 45 43 41  
Fax: +33 (0) 5 49 44 40 95  
E-mail: [andre.herbelin@inserm.fr](mailto:andre.herbelin@inserm.fr)

**Running Title:** The alarmins HMGB1 and IL-33 and human kidney transplantation

**Key words:** alarmin, renal transplantation

## **Abbreviations**

|               |                                                           |
|---------------|-----------------------------------------------------------|
| AKI           | Acute kidney injury                                       |
| DAMP          | Damage-Associated Molecular Pattern                       |
| eGFR          | Estimated Glomerular Filtration Rate                      |
| ELISA         | Enzyme Linked Immunosorbent Assay                         |
| FBS           | Fetal Bovine Serum                                        |
| HMGB1         | High Mobility Group Box 1                                 |
| HUVEC         | Human Umbilical Vein Endothelial Cells                    |
| IFN- $\gamma$ | Interferon-gamma                                          |
| IRI           | Ischemia Reperfusion Injury                               |
| PBMC          | Peripheral Blood Mononuclear Cell                         |
| PBS           | Phosphate-Buffered saline                                 |
| POD           | Post Operative Day                                        |
| RPL19         | Ribosomal Protein L19                                     |
| RPLP0         | Ribosomal Protein, Large, P0                              |
| RPS9          | Ribosomal Protein S9                                      |
| RT-Q PCR      | Real Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction          |
| sST2          | Interleukin-1 Receptor Like 1 (IL-1RL1) soluble fraction  |
| ST2L          | Interleukin-1 Receptor Like 1 (IL-1RL1) membrane fraction |
| TLR           | Toll-like receptor                                        |
| UW            | University of Wisconsin solution                          |

## ABSTRACT

The endogenous molecules high mobility group box 1 (HMGB1) and interleukin-33 (IL-33) have been identified as alarmins, capable of mediating danger signals during tissue damage. Here, we address their possible role as innate-immune mediators in ischemia-reperfusion injury (IRI) following human kidney transplantation. Urinary HMGB1 and IL-33 levels were significantly increased as soon as 30 min after reperfusion, as compared to those before treatment. Moreover, both serum and urinary IL-33 (but not HMGB1) increase was positively correlated with cold ischemia time, from 30 min to 3 days post-transplantation. *In vitro*, human umbilical vein endothelial cells subjected to hypoxia conditions released both HMGB-1 and IL-33, while only the latter was further increased upon subsequent re-oxygenation. Finally, we postulate that leukocytes from renal recipient patients are targeted by both HMGB1 and IL-33, as suggested by increased transcription of their respective receptors (TLR2/4 and ST2L) shortly after transplantation. Consistent with this view, we found that iNKT cells, an innate-like T cell subset involved in IRI and targeted by IL-33 but not by HMGB1 was activated 1 hour post-transplantation. Altogether, these results are in keeping with a potential role of IL-33 as an innate-immune mediator during kidney IRI in humans.

## Introduction

Even though new immunosuppressive regimens have greatly reduced the incidence of acute allograft rejection after renal transplantation and enhanced short-term graft survival, further improvements are still looked-for (1). Major contributors to kidney graft loss are interstitial fibrosis and tubular atrophy, which are the result of cumulative allograft damages of immunologic and non-immunologic origin (2)(3)(4). Ischemia-reperfusion injury (IRI) contributes to the development of these graft damages (5). It has been established that inflammation together with oxidative stress are involved in kidney IRI, resulting in cell necrosis and apoptosis. Such an inflammatory process is independent of donor-specific alloreactivity and involves both innate and adaptive immune responses (6)(7). Countering the early immune IRI events could be beneficial for long-term allograft survival (1), notably for organs from extended criteria donors, that are more prone to IRI (8). To this purpose, the mechanisms underlying inflammation mediated by innate immunity during kidney IRI need to be better understood.

Damage-associated molecular pattern (DAMP) molecules, including alarmins, which mediate “danger” signals, leading to the propagation of inflammatory reactions and the initiation of adaptive immune responses are released by cells that have been damaged by IRI (9)(10). The prototype DAMP, a chromatin-associated non-histone protein, high-mobility group box 1 (HMGB1), is widely expressed in mammalian cells with dual functions as both nuclear factor and as pro-inflammatory cytokine, released from the necrotic cells (11). HMGB1 is also recognized as an alarmin defined as an endogenous molecule that signals tissue and cell damage by initiating rapidly innate immune responses. It has been implicated in early loss of transplanted islets (12) or in liver IRI (13) in mouse models. Initiating the early inflammatory response, HMGB1 contributes also to kidney IR in mice, while its neutralization protects renal cells from this injury (14)(15). Both of the most widely studied DAMP

receptors, Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4, whose expression by tubular epithelial cells can be modulated by hypoxia (16) and oxidative stress (17), respectively, are multi-ligand receptors that bind HMGB1. However, while TLR2 and TLR4 mediate kidney IR injury in mice (15)(18), little is known about HMGB1 release and its putative interaction with TLR2 and TLR4 receptors in the context of human kidney transplantation (19).

The recently identified IL-33 is the ligand of ST2L, a member of the IL-1 receptor superfamily (20). Its signaling pathway can be negatively regulated by sST2 (the soluble form of ST2) that lacks the transmembrane domain and potentially acts as a decoy receptor for IL-33 (21). Since its first description, important roles have been ascribed to IL-33, both as a conventional cytokine and as an alarmin (22)(23). Recently, IL-33 has been implicated in acute and chronic kidney diseases in humans (24)(25). In mice, Sakai *et al.* reported that IL-33 and ST2L expression was increased early after hepatic IR injury, suggesting that IL-33 may act as an endogenous regulator of liver IR (26). However, a role of the IL-33/ST2L axis has not previously been described in IRI after kidney transplantation. Knowing on the one hand that endothelial cells and tubular epithelial cells are potential sources of IL-33 (22) and on the other hand that IL-33 is released passively in active forms into the intracellular milieu during necrosis to target the innate immune response, we hypothesized that IL-33 might play a part in renal IRI.

In the present study, we addressed the role of both HMGB1/TLR and IL-33/ST2 alarmin pathways early after human kidney transplantation. Our findings support the concept that IL-33 and HMGB1 act during kidney IR as alarmins whose release is induced *in vitro* by hypoxia and/or reoxygenation conditions as well as *in vivo* in serum and/or urine within 0.5-3 hours after transplantation. Remarkably, a correlation between IL-33 (but not HMGB1) levels and

IRI duration was found, thus providing evidence for a close connection between cell injury and IL-33 release.

## **Materials and Methods**

### ***Patients***

A PROSPECTIVE COHORT study was conducted on 27 consecutive kidney transplant patients at the Transplant Unit of the University Hospital of Poitiers between December 1, 2009 and October 30, 2010. Adult recipients (18-70 years) of a first or second kidney transplant were eligible for enrollment. All recipients received immunosuppressive treatment based on an induction therapy (either Basiliximab or Thymoglobulin), a calcineurin inhibitor (either cyclosporine or tacrolimus) and a secondary agent (either mycophenolate mofetil or enteric-coated mycophenolate sodium). The steroid was administered at a dose of 500 mg on day 0 for all patients. Twenty out of 27 received steroid treatment at 0.5 mg/kg/day from day 1 to day 7 post-transplantation, followed by a progressive decrease. The local ethic committee approved the study and informed consent was obtained from each patient.

### ***Sample collection***

Peripheral blood was collected by venipuncture at day 0 (D0) before kidney transplantation and within 0.5 hour (h) (H0.5) and 3h (H3) from the recipients after kidney transplantation, typically on transfer to the post-anesthesia unit and in the morning of the first and third post-operative day (POD). Urine samples were collected at the same time points and centrifuged at 5000 g to remove cellular debris. For flow cytometry and mRNA analysis, blood was recovered in tubes containing heparin as an anti-coagulant. For serum samples, blood was collected without anticoagulant. PBMCs were separated by performing a density gradient centrifugation on Ficoll-Paque and cryopreserved prior flow cytometry analysis. Blood leukocytes were isolated by centrifugation followed by red blood-cell depletion by lysis, and

total RNA was extracted and stored at -80°C prior to mRNA analysis. Serum and urine samples were stored at -80°C prior to protein quantification by ELISA.

### ***Real-Time Quantitative PCR***

Total RNAs from blood leukocytes and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were extracted with TRIzol (Invitrogen, Saint-Aubin, France) and a commercial kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France), respectively. Genomic DNA was removed using DNA-free kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Saint Aubin, France) and first-strand reverse transcription (Applied Biosystems) was performed. Real-Time PCR assays were performed on a RotorGene Q (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's recommendations. Human DNA primers were designed using OligoPerfect™ (Invitrogen), QuantPrim (Universität Potsdam, Max-Planck-Gesellschaft) and OligoAnalyser (Integrated DNA Technologies, Inc) with the sequences detailed in Table 1. mRNA expression levels in the samples relative to expression in day 0 were determined with the Pfaffl method (expressed as Relative Fold Change), using ribosomal L19, S9 and RPLPO genes as internal controls. mRNA sST2 levels were assessed using sST2/ST2L ratio (sST2 primer detected a common region of soluble and membrane ST2 while ST2L primer detected only the membrane region).

### ***Soluble protein quantification***

HMGB1 (Uscn, Life Science Inc, Euromedex, Strasbourg, France), IL-33 (R&D Systems, Lille, France) and soluble ST2 (sST2) (R&D Systems, France) were assessed in serum, urine and culture cell supernatants using ELISA kits according to the manufacturer's instructions. The optical density was determined using a microplate reader set to 450 nm (Victor3, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). HMGB1, IL-33 and ST2s levels in urine

samples were also expressed as HMGB1/creatinine, IL-33/creatinine and sST2/creatinine ratios in order to correct for differences in dilution.

### ***In Vitro Cellular “Ischemia-Reperfusion” Model***

Normal primary HUVEC up until passage 4 were cultured in Medium 200 + Low Serum Growth Supplement containing 2% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Saint Aubin, France) in a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C. Cellular “ischemia” was achieved by incubating cells in a hermetic chamber containing an hypothermic (4°C) and hypoxic atmosphere: 0% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% N<sub>2</sub> (Bactal 2 gaz, Air Liquide, Puteaux, France) during 16h, in University of Wisconsin solution (UW, Bristol Meyers Squibb, Rueil-Malmaison, France). At the end of the conservation period (H16h), “normothermic reoxygenation” was performed by replacing UW conservation solution by Medium 200 + 2% FBS for 1h or 3h incubation at 37°C in a humidified atmosphere 20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 75% N<sub>2</sub>. Culture supernatants were collected, centrifuged to removed cells, and stored at -80°C prior to soluble protein quantification. In the same times, monolayer cells were collected for RNA analysis.

### ***PBMC culture***

PBMCs from healthy individuals were plated at 2x10<sup>6</sup> cells/ml in complete RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 3h, 6h or 24h at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> in medium alone or in presence of rhHMGB1 (350 ng/ml, R&D Systems) or rhIL-33 (10 ng/ml, R&D Systems). Then, cells were harvested and stained for flow cytometry analysis, as described below.

### ***Flow cytometry***

Cells were stained with membrane antibodies diluted in PBS containing 2% FBS and fixed. For *in vitro* experiments, cell viability was evaluated by the LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Stain Kit (Invitrogen). Membrane antibodies FITC mouse anti-human CD3, PE mouse

anti-human iNKT cell (clone 6B11) and PerCP/Cy5.5 mouse anti-human CD69 were provided by BD Biosciences (San Jose, CA). Appropriate isotype control was used for each marker. Cells were analysed by FACS Canto II<sup>TM</sup> and FACS Diva<sup>TM</sup> software (BD, Franklin Lakes, NJ) and data were analysed using FlowJo<sup>TM</sup> software (version 7.5.5 Treestar, Ashland, OR). CD69 expression was analysed gating on CD3(+)6B11(+) cells, defined as iNKT cells.

### ***Statistical analysis***

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. HMGB1, IL-33 and sST2 levels in serum and urine samples, and mRNA expression levels in peripheral leucocytes were compared using the two-tailed Wilcoxon's test. For the correlation analysis between serum IL-33 levels and duration of cold ischemia, the Spearman's test was used. For experiments with HUVEC, statistical data were generated using the one-tailed Mann-Whitney test. Comparison between the mean fluorescence intensity (MFI) values of CD69 expression levels were also performed using the two-tailed Wilcoxon's test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . All statistical analyses were performed using the GraphPadPRISM 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA).

## Results

### *Patients included in the study*

This single-center study enrolled a total of 27 consecutive Caucasian renal transplant recipients. Characteristics of recipients and renal transplant allograft donors are listed in Table 2. All patients received a kidney graft from deceased donors, except one from a living donor. Among these, 7 (31%) were preemptively transplanted.

### *Early release of alarmins after renal transplantation*

To investigate the effect of renal IRI on HMGB1 and IL-33 release, we analyzed their serum levels in peripheral blood from patients before and after kidney transplantation, at H0.5, H3 and POD1 and POD3 of reperfusion by ELISA. HMGB1 was detected before treatment and increased significantly as soon as 30 min after reperfusion ( $480.9 \pm 81.5$  pg/ml at H0.5 vs  $208.7 \pm 59.2$  pg/ml at D0,  $p < 0.05$ ), returning to baseline levels within 24 hours (Figure 1A). By contrast, IL-33 was barely detectable in the serum of both healthy donors (unpublished data) and patients before transplantation ( $14.9 \pm 12.5$  pg/ml). Even though the variations after transplantation did not reach statistical significance (Figure 1B), presumably because IL-33 could only be detected in 6 out of 26 patients (23.0%), we found a significant correlation between these serum levels and cold ischemia time from H0.5 to POD3, which was not the case for HMGB1 (Table 3). Inasmuch as severity of tissue injury can be considered a reliable

indicator of cold ischemia, these data support a close relationship between IL-33 release and kidney IRI. Postulating that renal inflammatory injury might be concomitant with local release of alarmins, we further assessed urinary excretion of HMGB1 and IL-33, expressed as alarmin/creatinine ratios to correct for dilution. As shown in Figure 1C and Figure 1D, urinary levels of both HMGB1 and IL-33 were significantly higher at H3 than before transplantation ( $707.3 \pm 26.4$  vs  $267.7 \pm 90.1$  pg/ml,  $p < 0.001$  and  $15.9 \pm 9.5$  vs 0 pg/ml,  $p < 0.05$ , respectively). The similar expression profiles, whether alarmin levels were normalized against urinary creatinine or not (Figure 1E and Figure 1F), point to renal tubular epithelial cells as main cellular origin of HMGB1 and IL-33, as the increase cannot be explained simply by changes in glomerular filtration rate. Lastly, correlations between urinary levels of the two alarmins and cold ischemia time were positive early after reperfusion, although statistical significance was reached only for HMGB1 on POD1 (Table 4). Here again, as for serum levels, a significant positive correlation between urinary IL-33 levels and cold ischemia duration appeared later, on POD3. Altogether, these data provide additional support to the proposal that IL-33 and HMGB1, which are released early after kidney transplantation, are potential players in IRI.

### ***Hypoxia/re-oxygenation-induced release in vitro of HMGB1 and IL-33***

To find out whether the early increase in serum and urinary alarmin levels after kidney transplantation originated directly from cell stress during IR, we took advantage of the HUVEC *in vitro* model of hypoxia/re-oxygenation that is widely recognized for mimicking *in vivo* conditions after IR. To this end, HUVEC were exposed for 16 hours to hypothermic hypoxia. As shown in Figure 2, THIS TREATMENT led to a marked increase of both HMGB1 ( $8.2 \pm 0.5$  vs control conditions:  $2.1 \pm 0.6$  pg/ml;  $p < 0.05$ ) and IL-33 ( $4.5 \pm 1.2$  vs control conditions:  $0.7 \pm 0.7$  pg/ml,  $p < 0.05$ ) in supernatants from oxygen-deprived cells, supporting the

assumption that cold ischemia is sufficient to promote HMGB1 and IL-33 release. We assessed further whether reperfusion contributed likewise to alarmin increase by subjecting HUVEC for 16 hours to hypothermic hypoxia followed by washing at 1 and 3 hours of normothermic re-oxygenation. This procedure resulted in additional release of IL-33 (Figure 2B), in clear contrast with HMGB1 (Figure 2A), which remained close to control values.

As both alarmin and cytokine functions have been attributed to IL-33, we investigated whether the selective and sustained release of IL-33 during the re-oxygenation sequence *in vitro* was in part due to neosynthesis. We found that *IL-33* mRNA levels were significantly increased after the hypoxia sequence and maintained after reperfusion (Figure 3B). By contrast, neither hypoxia nor re-oxygenation affected *HMGB1* transcription (Figure 3A).

#### ***Upregulation of HMGB1 and IL-33 receptor expression in peripheral blood leukocytes from kidney graft recipients***

The early release of HMGB1 and IL-33 *in vivo* after kidney reperfusion along with enhanced secretion by HUVEC in response to hypoxia/re-oxygenation conditions *in vitro* led us to address the possible role of these two alarmins as innate-immune mediators during IRI. To this purpose, we determined whether in our kidney graft recipient cohort HMGB1 and IL-33 release was accompanied by increased transcription of their specific receptors, namely TLR2 (Figure 4A), TLR4 (Figure 4B), and ST2L (Figure 4C) in blood leukocytes, using real-time RT-qPCR. While none of these transcripts could be reliably detected before transplantation, a positive signal for *TLR2*, *TLR4* and *ST2L* mRNA appeared as soon as 30 min after reperfusion, although statistical significance was reached only for *TLR2* and *TLR4*. At POD1, all three receptor transcripts increased significantly over pre-transplantation levels, reaching a

peak for *TLR4* and *ST2L* and dropping to near baseline levels at POD3 for all three. These results confirm previous evidence for increased HMGB1 receptor transcription in peripheral blood leukocytes during IR (19) and extends this observation to the specific IL-33 receptor ST2L. We next analyzed sST2 levels, which are commonly considered a functional signature of IL-33 *in vivo* (27)(28). A transient increase occurred within 3 hours ( $545.7 \pm 141.6$  pg/ml) after reperfusion, reaching a peak at POD1 ( $1586.5 \pm 161.8$  pg/ml) compared to D0 ( $109.3 \pm 24.7$  pg/ml) ( $p < 0.001$ ) and declining thereafter between POD1 and POD3 ( $708.9 \pm 130.7$  pg/ml) (Figure 5A). Note that in urine samples kinetic profiles were similar, whether they were expressed as sST2/Cr ratios (Figure 5B) or as such, without correction for dilution (Figure 5C). These overlapping patterns along with the fact that sST2 levels are more than 10-fold higher in serum than in urine are consistent with a major systemic production of this potential decoy receptor. This hypothesis is supported by the early increase of sST2 transcripts in PBMCs, at H0.5 (Supplementary Figure 1).

### ***Early activation of iNKT cells after renal transplantation: a role for the alarmin IL-33?***

Previous reports have shown that iNKT cells are activated rapidly during experimental renal IRI. Indeed, these innate-like cells are among the FIRST to INFILTRATE the kidney after IR onset in mice (29). Moreover, mouse and human iNKT cells express ST2L and can be activated *in vitro* and *in vivo* by IL-33 (30)(31)(32). To assess whether in our clinical setting IL-33 released during IRI could actually target iNKT cells, we analyzed the early activation marker CD69. As shown in Figure 6A and B, peripheral blood iNKT cells were promptly and transiently activated after reperfusion, in terms of CD69 surface expression which was upregulated 3 hours after transplantation and declined thereafter. In the same line of evidence, we addressed the question whether HMGB1 and/or IL-33 contributed directly to iNKT-cell

activation during IR, by exposing PBMCs from healthy donors *in vitro* to each of the two alarmins. Exogenous IL-33 increased CD69 expression within only 3 hours, similarly to the kinetics obtained during IR (Figure 6C), whereas HMGB1 had no such effect (Figure 6D). It can therefore be concluded that IL-33 is a potential innate-immune mediator during kidney IRI in humans.

## Discussion

A number of animal studies (15)(33)(34) designate HMGB1 and IL-33 as putative endogenous molecules triggering sterile inflammatory signals associated with IRI in humans. However, to our knowledge, IL-33 has not yet been investigated during renal transplantation in humans, while only a single study has been carried out on HMGB1 (19).

Here we show that both HMGB1 and IL-33 are significantly increased in the urine of kidney graft recipients within only 3 hours post-transplantation, which suggests that they are generated by events initiated by IR. Furthermore, we provide evidence that this early release of alarmins causes prompt activation of leukocyte populations belonging to THE first line of defense of the immune system. Indeed, we found that *TLR2*, *TLR4* and *ST2L* mRNA levels were rapidly increased in leukocytes after reperfusion, consistent with a DAMP-mediated danger signal acting at the systemic level. This increase occurred concomitantly with IL-33 release and activation of iNKT cells in terms of CD69 upregulation, suggesting that this leukocyte population is targeted by IL-33 in patients having received a kidney graft. This conclusion is in agreement with our *in vitro* data, which establish that exogenous IL-33 can

activate iNKT cells from healthy individuals. It concurs likewise with our previous evidence in mouse models showing that IL-33 can target iNKT cells *in vivo* (32).

These results raise the question of the cellular origin of HMGB1 and IL-33. The overlapping profiles of HMGB1 production in serum and urine are consistent with a passive release from necrotic tubular and epithelial cells, as described in mouse models (15). Moreover, HMGB1 expression has been reported in tubular cells from implantation biopsies of deceased donors only, suggesting a relationship with hypoxic cell damage (19). Similarly to HMGB1, urinary excretion of IL-33 occurred rapidly upon transplantation, arguing in favor of a release by ischemic tubular cells, although a possible contribution of vascular endothelial cells cannot be excluded. Indeed, in a mouse model of acute kidney injury (AKI), sharing the occurrence of cell damage with kidney IRI, immunofluorescence staining revealed IL-33 expression on the endothelial surface of blood vessels, as well as in glomeruli and in peritubular capillaries (24).

The involvement of HMGB1 in renal IRI is supported by studies in both animal models and clinical situations. TLR2 and TLR4 have been reported for being upregulated by ischemic AKI in renal tubular as well as endothelial cells of mice (35)(36) and for mediating kidney IRI in humans (15)(18). Moreover, the capacity of HMGB1 to activate the innate immune system early after transplantation depends on these two TLRs (12)(15)(37). Following human kidney transplantation, tubular expression of TLR4 was higher in kidneys from deceased than from living donors, suggesting a control by ischemic stress intensity (19). Conversely to HMGB1, the consequences of IL-33 release during kidney injury have not been investigated so far, excepting one study in which administration of sST2 was shown to protect from cisplatin-induced AKI, indicating that in this model it behaved like a decoy receptor to neutralize endogenous IL-33 (24). In the same line of evidence, acquired even before IL-33 was

identified as ST2 ligand, administration of sST2-Fc fusion protein in mice was shown to attenuate inflammation in intestinal ischemia reperfusion (38), in support of the alarmin function of IL-33 during IRI. Our evidence for high circulating levels of soluble ST2 during renal transplantation suggests that the IL-33/ST2 axis can also mediate the systemic inflammatory reaction after renal IR, as reported in a variety of diseases (39). Lastly, in accordance with the alarmin concept, one may speculate that IL-33 release could promote the recruitment of neutrophils and/or CD4(+) T cells within the graft, as in the AKI model (24). This hypothesis deserves particular attention, knowing that IL-33 promotes rapid activation of iNKT cells (figure 6D) (30)(31), which are widely acknowledged for their capacity to recruit neutrophils during experimental kidney IRI (29).

It remains to be established whether alarmins could become instrumental as predictive biomarkers of IRI in the context of solid transplantation remains. Although HMGB1 release reportedly reflected the extent of ischemic injury in a rat model of liver transplantation (40), its prognostic value for the outcome of human solid organ grafts is still uncertain. The correlation between cold ischemia duration and blood IL-33 levels, 30 min after reperfusion, suggests a close link between alarmin release and intensity of renal cell damage. The failure to detect IL-33 in more than 50% of the sera analyzed could be a consequence of the autocrine/paracrine functions of this alarmin, which is locally produced and more frequently detected in peripheral fluids from bronchoalveolar, peritoneal (41) and synovial cavities (42). In accordance with this view, urinary IL-33 was detected in 90% of graft recipients, by contrast with its virtual absence in healthy donors (unpublished data). This observation suggests that the production of IL-33 could be restricted to kidney transplantation, which would be an asset as a biomarker for renal IRI.

Since prolonged cold ischemia is associated with delayed graft function and graft loss (43), the development of new prognostic indicators for the follow up of ischemia, such as IL-33 and/or sST2 is worthwhile and should be evaluated in an extensive study based on our preliminary results.

Although the respective impact of IL-33 and HMGB1 on renal IR remains to be delineated *in vivo*, our *in vitro* model of hypothermic/hypoxic cellular stress, reveals that the kinetics and mode of release are not quite the same. Thus, IL-33 is increased during both hypoxia and reperfusion sequences, while HMGB1 is only induced during hypoxia, a difference that could result from selective induction of IL-33 transcription. As a corollary *in vivo*, IL-33 release was maintained for 1-3 days after transplantation, presumably due to further synthesis during the reperfusion sequence. Hence, we postulate that IL-33 may act both as an alarmin and a conventional multi-function cytokine during human kidney transplantation (22). For this reason, it is actually difficult to predict whether it exerts a deleterious or a beneficial effect on renal transplantation. Recently, Sakai *et al.* (26) reported that the early release of IL-33 during liver IR in mice was protective, as it reduced hepatocyte cell death by promoting the expression of anti-apoptotic genes, such as B-cell lymphoma 2 and cyclin D1. Moreover, in a mouse model of cardiac transplantation, IL-33 was found to prolong allograft survival, potentially via a Th2 immune deviation (44)(45). Lastly, Turnquist *et al.* reported the capacity of IL-33 to expand functional Foxp3<sup>+</sup> Tregs in murine cardiac allograft (46). Altogether, these results are consistent with dual functions of IL-33 in solid organ transplantation.

In summary, this study reveals an impact of IRI on HMGB1 and IL-33 alarmin release in human renal transplantation and provides evidence in favor of the concept that kidney IR can be assimilated to an alarmin-mediated inflammatory response. Whether alarmin signaling

pathways are a potential therapeutic target to neutralize the innate inflammatory cascade in renal IRI remains to be investigated.

**Disclosure**

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

**Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the contributions made by all physicians and site study staff. This study was funded by AREN-PC (Association pour la Recherche en Néphrologie-Poitou-Charentes), Inserm, Université de Poitiers, Région Poitou-Charentes, Conseil général de la Vienne and CHU de Poitiers.

The authors are especially indebted to Elke Schneider for critically reviewing the manuscript. We also thank Stéphanie Ragot, Maité Jacquard, Magalie Diviné, Dr Raphaël Thuillier and Dr Frederic Favreau for their excellent technical support.

**Table 1:** Primers used for real-time RT-PCR in human blood leucocytes

| Target | Primer Sequence |                                    |
|--------|-----------------|------------------------------------|
| RPL19  | Forward primer  | 5'- TGGCAAGAAGAAGGTCTGG -3'        |
|        | Reverse primer  | 5'- TCGAGCCCCGGAATG -3'            |
| RPLPO  | Forward primer  | 5'- CAGGGCGACCTGGAAGT -3'          |
|        | Reverse primer  | 5'- TCTGCTTGGAGCCCACA -3'          |
| RPS9   | Forward primer  | 5'- TGCTGACGCTTGATGAGAAG -3'       |
|        | Reverse primer  | 5'- CGCAGAGAGAAGTCGATGTG -3'       |
| sST2   | Forward primer  | 5'-AAATTTATTGTCCTACCATTTGACCTC -3' |
|        | Reverse primer  | 5'-TGACTTGTGCGCCCTGT -3'           |
| ST2L   | Forward primer  | 5'- TGCCTGCTGTGATGTGCAAAGG -3'     |
|        | Reverse primer  | 5'- CCAGCTAGGAGAAGTCAGGAAAGC -3'   |
| TLR2   | Forward primer  | 5'- GCCTCTCCAAGGAAGAATCC -3'       |
|        | Reverse primer  | 5'- TCCTGTTGTTGGACAGGTCA -3'       |
| TLR4   | Forward primer  | 5'- AAGCCGAAAGGTGATTGTTG -3'       |
|        | Reverse primer  | 5'- CTGAGCAGGGTCTTCTCCAC -3'       |
| IL-33  | Forward primer  | 5'- GAAAATCCCAACAGAAGGCCA -3'      |
|        | Reverse primer  | 5'- GCCTTTTGGTGGTTTCTCTCCT -3'     |
| HMGB1  | Forward primer  | 5'- AAAGCGGACAAGGCCCGTTAT -3'      |
|        | Reverse primer  | 5'- AAGAGGAAGAAGGCCGAAGGAG -3'     |

**Table 2:** Baseline demographic and clinical characteristics of recipients and donors

| Variables                         |                                           | n=27        |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|-------------|
| <b>Recipient characteristics</b>  |                                           |             |
| Age (year)                        |                                           | 51.4 ± 5.2  |
| Gender (%)                        | Male                                      | 17 (62.9%)  |
| BMI <sup>(1)</sup>                |                                           | 24,6 ± 4,3  |
| Initial nephropathy (%)           | Polycystic kidney                         | 7           |
|                                   | Glomerulopathy                            | 8           |
|                                   | Nephroangiosclerosis                      | 2           |
|                                   | Other                                     | 10          |
| ECD <sup>(2)</sup> (%)            |                                           | 41          |
| <b>Donor characteristics</b>      |                                           |             |
| Age (year)                        |                                           | 51,0 ± 10,1 |
| Gender (%)                        | Male                                      | 15 (56%)    |
| Cause of death (%)                | Cardio vascular accident                  | 17          |
|                                   | Brain trauma                              | 5           |
|                                   | Other                                     | 4           |
| <b>Transplant characteristics</b> |                                           |             |
|                                   | Preemptive transplantation                | 7           |
|                                   | Cold ischemia time (h)                    | 14.5 ± 4,2  |
|                                   | Warm ischemia time (min)                  | 42,1 ± 14,7 |
|                                   | Human HLA antibodies                      | No 56%      |
|                                   |                                           | Yes 44%     |
|                                   | Total HLA mismatch (n)                    | 5.1 ± 1.5   |
|                                   | CMV status (%)                            |             |
|                                   | D+/R-                                     | 11.1%       |
|                                   | D-/R+                                     | 18.5%       |
|                                   | D+/R+                                     | 29.6%       |
|                                   | D-/R-                                     | 40.8%       |
|                                   | Delayed graft function <sup>(3)</sup> (%) | 7.4%        |

(1) Body Mass Index (2) Expanded Criteria Donors (3) DGF was defined by patients who required dialysis during the first week after transplantation

**Table 3:** Correlation of serum alarmin levels with cold ischemia time

| <i>Time</i> | <i>HMGB1</i> |                 | <i>IL-33</i> |                 |
|-------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
|             | <i>r</i>     | <i>p</i> -value | <i>r</i>     | <i>p</i> -value |
| D0          | 0,12         | 0,56            | 0,4          | 0,57            |
| H0.5        | -010         | 0,63            | <b>0,51</b>  | <b>0,02</b>     |
| H3          | -0,04        | 0,85            | <b>0,53</b>  | <b>0,01</b>     |
| POD1        | 0,29         | 0,14            | <b>0,56</b>  | <b>&lt;0,01</b> |
| POD3        | 0,14         | 0,49            | <b>0,58</b>  | <b>&lt;0,01</b> |

POD: Post Operative Day. The correlation coefficient (*r*) is calculated by the non-parametric Spearman's rank correlation test. A *p*-value<0.05 was considered significant.

**Table 4:** Correlation of urinary alarmin levels with cold ischemia time

| <i>Time</i> | <i>HMGB1</i> |                 | <i>IL-33</i> |                 |
|-------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
|             | <i>r</i>     | <i>p</i> -value | <i>r</i>     | <i>p</i> -value |
| D0          | 0,05         | 0,89            | ND           | ND              |
| H0.5        | 0,39         | 0,39            | 0,03         | 0,93            |
| H3          | 0,14         | 0,59            | 0,42         | 0,06            |
| POD1        | <b>0,54</b>  | <b>0,02</b>     | 0,38         | 0,08            |
| POD3        | 0,08         | 0,74            | <b>0,58</b>  | <b>&lt;0,01</b> |

POD : Post Operative Day. The correlation coefficient (*r*) is calculated by the non-parametric Spearman's rank correlation test. A *p*-value<0.05 was considered significant.

## Figure Legends

**Figure 1: Increased levels of HMGB1 and IL-33 in serum and urine shortly after renal IRI.** HMGB1 and IL-33 levels were quantified by ELISA in serum and urine of kidney graft recipients before transplantation (D0) as control time, and 30 minutes (H0.5), 3 hours (H3), day 1 (POD1) and day 3 (POD3) after transplantation. (A) Serum HMGB1 levels (n=27). (B) Serum IL-33 levels (n=27). Note that serum samples from only 6 out of 26 transplanted patients contained measurable amounts of IL-33. (C) Urine HMGB1 levels corrected for urine creatinine levels (expressed as HMGB1/creatinine ratio) (n=18). (D) Urine IL-33 levels corrected for urine creatinine levels (expressed as IL-33/creatinine ratio) (n=26). (E) Urine HMGB1 levels (n=27) and (F) urine IL-33 levels (n=27). Data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Wilcoxon test. ns, no significant.

**Figure 2: Early release of HMGB1 and IL-33 by HUVEC in response to *in vitro* hypoxia/reoxygenation.** Confluent ( $\approx$ 95%) monolayer HUVEC were exposed to sixteen hours hypothermia/hypoxia in UW solution (H16h) followed by 1 hour (R1h), or 3 hours (R3h) of reoxygenation in a new culture medium (Medium 200) at 37°C in 20% O<sub>2</sub>. Confluent ( $\approx$ 95%) monolayer HUVEC were used as controls (Ctl). HMGB1 (A) and IL-33 (B) in cell culture supernatants were quantified by ELISA. Data are expressed as means  $\pm$  SEM and are representative of three separate experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs Ctl by Mann-Whitney test.

**Figure 3: Increase of IL-33 but not HMGB1 mRNAs in HUVEC in response to *in vitro* hypoxia/reoxygenation.** Confluent ( $\approx$ 95%) monolayer HUVEC were exposed to sixteen hours hypothermia/hypoxia in UW solution (H16h) followed by 1 hour (R1h), or 3 hours

(R3h) of reoxygenation in a new culture medium (Medium 200) at 37°C in 20% O<sub>2</sub>. Confluent (≈95%) monolayer HUVEC were used as controls (Ctl). Total RNA was extracted from monolayer HUVEC at the indicated time points and expression of IL-33 (A) and HMGB1 (B) mRNAs was quantified by RT-qPCR. Data are expressed as means ± SEM of fold change relative to D0 and are representative of three separate experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs Ctl by Mann-Whitney test.

**Figure 4: Up-regulation of alarmin-receptor mRNAs in leucocytes after renal IRI.**

Patient peripheral blood was recovered before transplantation (D0) as control time, and 30 minutes (H0.5), 3 hours (H3), day 1 (POD1) and day 3 (POD3) after transplantation. Total RNA was extracted from leucocytes at the indicated time points and expression of TLR2 (n = 24) (A), TLR4 (n = 26) (B) and ST2L (n = 14) (C) mRNAs was quantified by RT-qPCR. Results are expressed as means ± SEM of fold change relative to D0. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs D0 by Wilcoxon test. ND: not done.

**Figure 5: Increased levels of sST2 in serum and urine after renal IRI.**

sST2 levels were quantified by ELISA in serum and urine of kidney graft recipients before transplantation (D0) as control time, and 30 minutes (H0.5), 3 hours (H3), day 1 (POD1) and day 3 (POD3) after transplantation. (A) Serum sST2 levels (n=26). (B) Urine sST2 levels corrected for urine creatinine levels (expressed as sST2/creatinine ratio) (n=18). (C) Urine sST2 levels (n=18). Data are expressed as means ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs D0 by Wilcoxon test.

**Figure 6: Early activation of iNKT cells after renal IRI: a role for IL-33?** PBMCs from kidney graft recipients recovered before transplantation (D0), and 3 hours (H3) and day 3 (POD3) after transplantation (A, B) or PBMCs from healthy adult individuals cultured for 3, 6 or 24 hours with or without HMGB1 (C) or IL-33 (D), were membrane-labelled with anti-CD3-FITC, anti-iNKT-PE 6B11 clonotype, and anti-CD69-PerCP/Cy5.5. CD69 analysis was performed by flow cytometry gating on CD3(+)6B11(+) cells, defined as iNKT cells. (A) Flow cytometry plot showing expression profiles of surface marker CD69 on iNKT cells *ex vivo* from one representative patient at D0 (filled histogram), H3 (bold line) and POD3 (dotted line). Numbers indicate MFI of CD69 expression on iNKT lymphocytes. (B) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of CD69 expression on iNKT lymphocytes from the patient cohort (n=17 at D0, H3, and POD3). (C, D) MFI of CD69 expression on iNKT lymphocytes from healthy donor PBMCs (n=6) cultured in medium alone (white columns) or supplemented with HMGB1(C) or IL-33 (D) for 3, 6 or 24 hours of culture. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by Wilcoxon test.

**Supplementary data S1: Up-regulation of sST2 mRNAs in PBMCs after renal IRI.**

Human PBMCs were recovered before transplantation (D0) as control time, and 30 minutes (H0.5), 3 hours (H3), day 1 (POD1), and day 3 (POD3) after transplantation. Total RNA was extracted from PBMCs at the indicated time points and expression of sST2 mRNAs was quantified by RT-qPCR. Results are expressed as means  $\pm$  SEM (N=23) of fold change relative to D0. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs D0 by Wilcoxon test.

## References

1. Meier- Kriesche H, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of Improvement in Renal Allograft Survival Despite a Marked Decrease in Acute Rejection Rates Over the Most Recent Era. *American Journal of Transplantation*. 2004;4(3):378–383.
2. Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic Renal Allograft Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005;16(10):3015–3026.
3. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *American Journal of Transplantation*. 2007;7(3):518–526.
4. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RDM. Calcineurin Inhibitor Nephrotoxicity: Longitudinal Assessment by Protocol Histology. *Transplantation*. 2004;78(4):557–565.
5. Nankivell B, Chapman J. Chronic Allograft Nephropathy: Current Concepts and Future Directions. *Transplantation*. 2006. 2006;81(5):643–654.
6. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*. 2011;17(11):1391–1401.
7. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical Immunology*. 2007;123(1):7–13.
8. Bon D, Chatauret N, Giraud S, Thuillier R, Favreau F, Hauet T. New strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation. *Nature Reviews Nephrology*. 2012;8(6):339–347.
9. Rao DA, Pober JS. Endothelial injury, alarmins, and allograft rejection. *Crit. Rev. Immunol*. 2008;28(3):229–248.
10. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology*. 2001;13(1):114–119.
11. Müller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *Journal of Internal Medicine*. 2004;255(3):332–43.
12. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, et al. High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(3):735–743.
13. Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4-dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med*. 2007;204(12):2913–2923.
14. Li J, Gong Q, Zhong S, Wang L, Guo H, Xiang Y, et al. Neutralization of the extracellular HMGB1 released by ischaemic-damaged renal cells protects against renal ischaemia–reperfusion injury. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2011;26(2):469–478.
15. Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U, Wyburn KR, et al. HMGB1 Contributes to Kidney Ischemia Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;21(11):1878–1890.
16. Kuhlicke J, Frick JS, Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Eltzschig HK. Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 Coordinates Induction of Toll-Like Receptors TLR2 and TLR6 during Hypoxia. *PLoS ONE*. 2007;2(12):e1364.
17. Powers KA, Szási K, Khadaroo RG, Tawadros PS, Marshall JC, Kapus A, et al. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med*. 2006;203(8):1951–1961.
18. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJD, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest*.

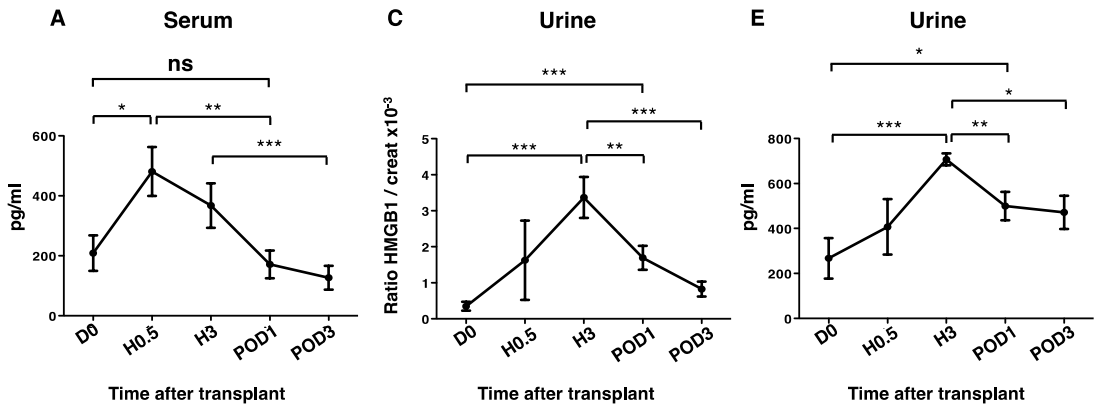
2005;115(10):2894–2903.

19. Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3390–3395.
20. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005;23(5):479–490.
21. Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(47):18660–18665.
22. Moussion C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel ‘Alarmin’? *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3331.
23. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Küchler AM. Interleukin-33 – cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends in Immunology*. 2009;30(5):227–233.
24. Akcay A, Nguyen Q, He Z, Turkmen K, Won Lee D, Hernando AA, et al. IL-33 Exacerbates Acute Kidney Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(11):2057-2067.
25. Bao Y-S, Na S-P, Zhang P, Jia X-B, Liu R-C, Yu C-Y, et al. Characterization of Interleukin-33 and Soluble ST2 in Serum and Their Association with Disease Severity in Patients with Chronic Kidney Disease. *J Clin Immunol*. 2012;32(3):587–594.
26. Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology*. 2012; 56(4):1468-78.
27. Wagenaar JFP, Gasem MH, Goris MGA, Leeftang M, Hartskeerl RA, Van der Poll T, et al. Soluble ST2 Levels Are Associated with Bleeding in Patients with Severe Leptospirosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2009;3(6):e453.
28. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1538–1549.
29. Li L, Huang L, Sung SJ, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, et al. NKT Cell Activation Mediates Neutrophil IFN- $\gamma$  Production and Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *The Journal of Immunology*. 2007;178(9):5899 –5911.
30. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro- Th2 cytokine IL- 33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-  $\gamma$  production. *European Journal of Immunology*. 2009;39(4):1046–1055.
31. Smithgall MD, Comeau MR, Park Yoon B-R, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. *International Immunology*. 2008;20(8):1019–1030.
32. Bourgeois EA, Levescot A, Diem S, Chauvineau A, Bergès H, Milpied P, et al. A natural protective function of invariant NKT cells in a mouse model of innate- cell- driven lung inflammation. *European Journal of Immunology*. 2011;41(2):299–305.
33. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine*. 2007;13(9):1050–1059.
34. Oboki K, Ohno T, Kajiwarra N, Arae K, Morita H, Ishii A, et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *PNAS*. 2010;107(43):18581–18586.

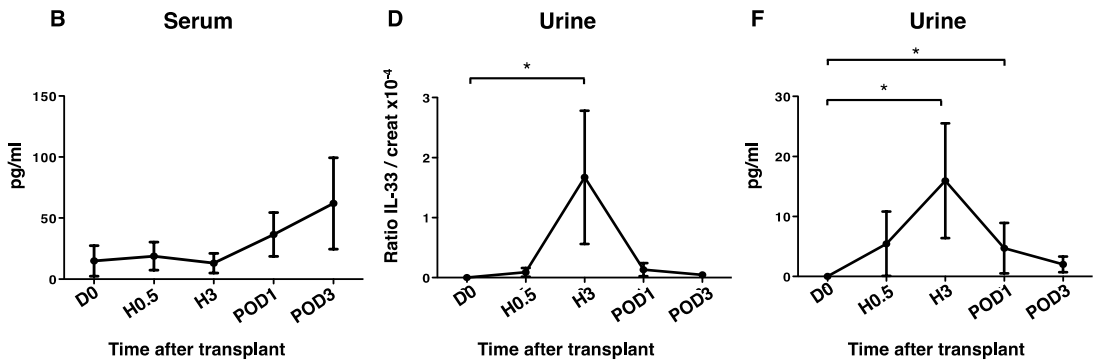
35. Wolfs TGAM, Buurman WA, Schadewijk A van, Vries B de, Daemen MARC, Hiemstra PS, et al. In Vivo Expression of Toll-Like Receptor 2 and 4 by Renal Epithelial Cells: IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  Mediated Up-Regulation During Inflammation. *J Immunol.* 2002;168(3):1286–1293.
36. Chen J, John R, Richardson JA, Shelton JM, Zhou XJ, Wang Y, et al. Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney International.* 2011;79(3):288–299.
37. Krüger B, Yin N, Zhang N, Yadav A, Coward W, Lal G, et al. Islet-expressed TLR2 and TLR4 sense injury and mediate early graft failure after transplantation. *European Journal of Immunology.* 2010;40(10):2914–24.
38. Fagundes CT, Amaral FA, Souza ALS, Vieira AT, Xu D, Liew FY, et al. ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion. *J Leukoc Biol.* 2007;81(2):492–499.
39. Mirchandani AS, Salmond RJ, Liew FY. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends in Immunology.* 2012;33(8):389–396.
40. Liu A, Jin H, Dirsch O, Deng M, Huang H, Bröcker-Preuss M, et al. Release of Danger Signals during Ischemic Storage of the Liver: A Potential Marker of Organ Damage? *Mediators of Inflammation.* 2010;2010:1–11.
41. Goffic RL, Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Delmas B, Piquet-Pellorce C, et al. Infection with Influenza Virus Induces IL-33 in Murine Lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011;45(6):1125–1132.
42. Matsuyama Y, Okazaki H, Hoshino M, Onishi S, Kamata Y, Nagatani K, et al. Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1 $\beta$  signaling and a poor clinical response. *Rheumatol. Int.* 2012;32(5):1397–1401.
43. Salahudeen AK, Haider N, May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney International.* 2004;65(2):713–718.
44. Yin H, Li X-Y, Jin X-B, Zhang B-B, Gong Q, Yang H, et al. IL-33 Prolongs Murine Cardiac Allograft Survival Through Induction of TH2-Type Immune Deviation. *Transplantation.* 2010;89(10):1189–1197.
45. Brunner SM, Schiechl G, Falk W, Schlitt HJ, Geissler EK, Fichtner-Feigl S. Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. *Transplant International.* 2011;24(10):1027–1039.
46. Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, Liu Q, Castellaneta A, Isse K, et al. IL-33 expands suppressive CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>int</sup> and regulatory T cells (Treg), including ST2L<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells, and mediates Treg-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol.* 2011;187(9):4598–4610.

Figure 1

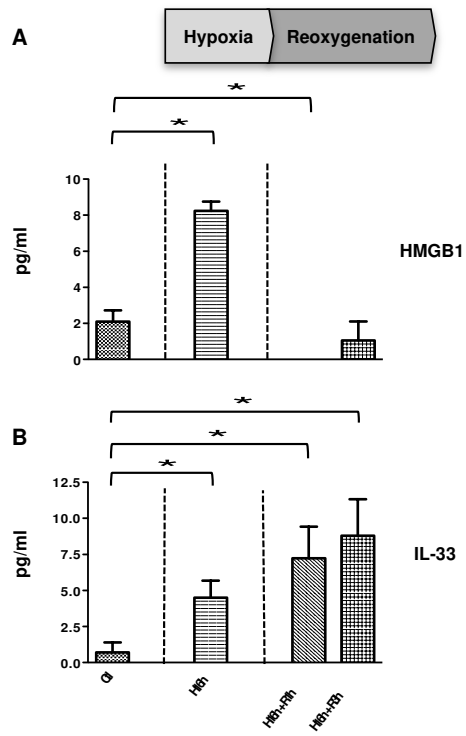
HMGB1



IL-33



**Figure 2**



**Figure 3**

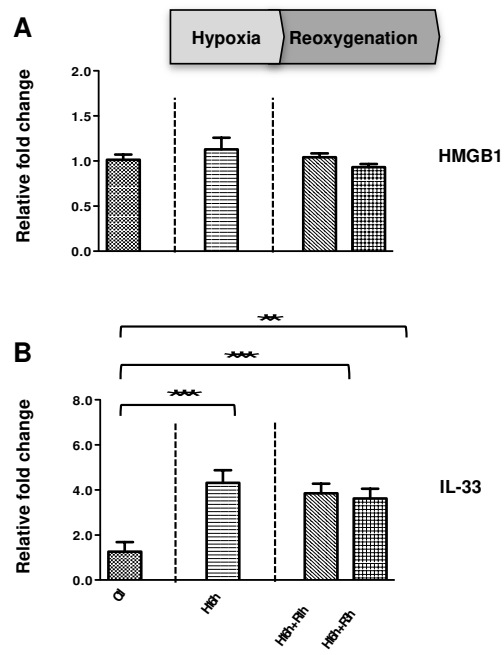


Figure 4

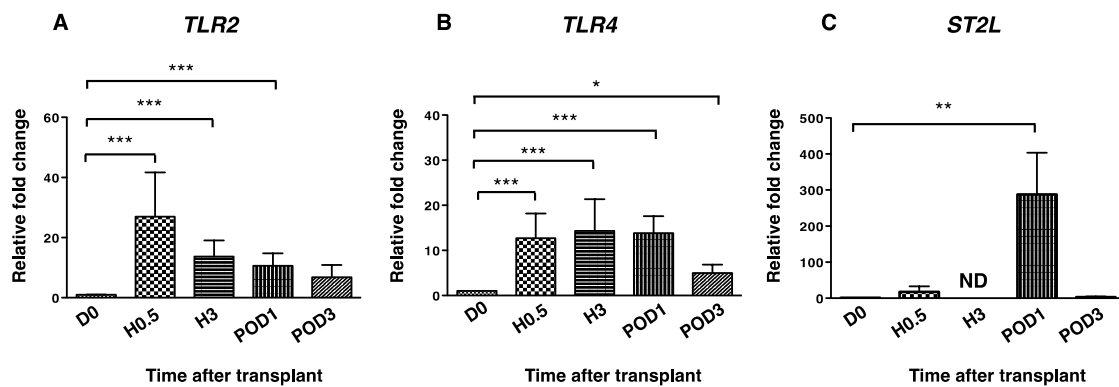


Figure 5

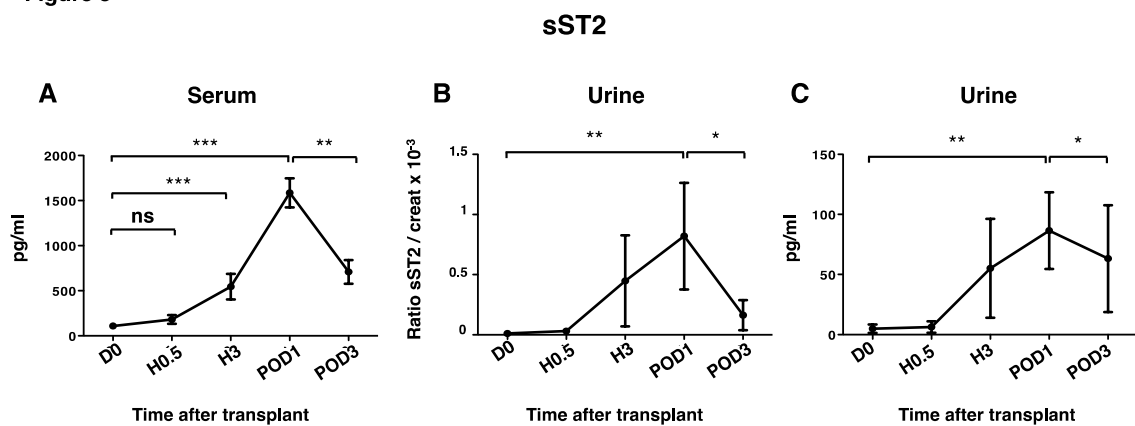
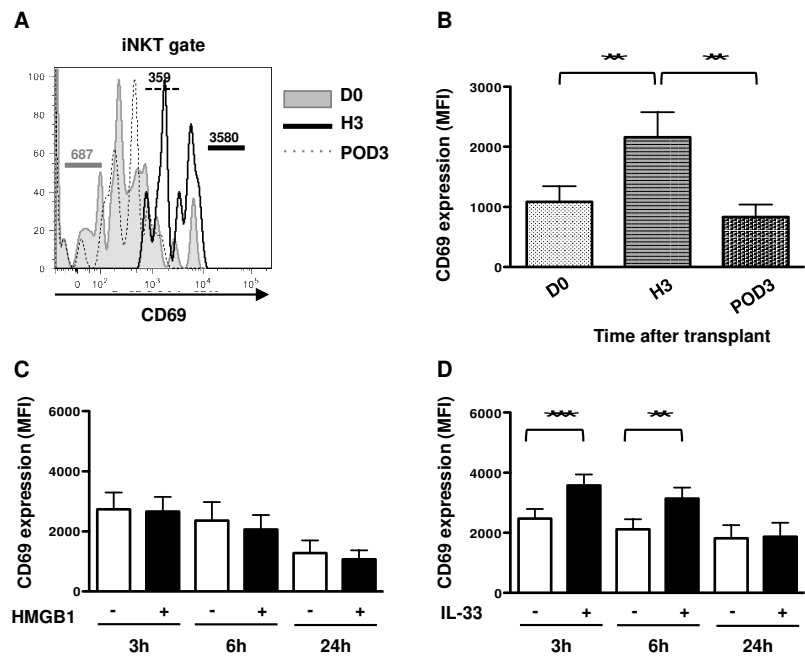
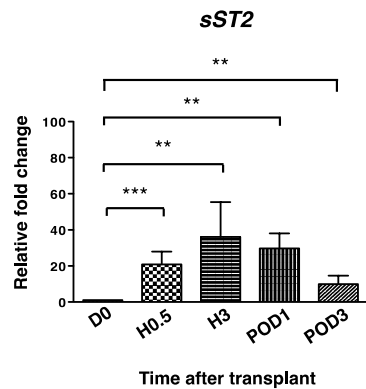


Figure 6



Supplementary data S1



## ***Discussion***

La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent le phénomène d'IR constitue un enjeu important en transplantation d'organe. Compte tenu de la pénurie d'organe, l'utilisation croissante de greffons provenant de donneurs plus âgés ou de donneurs à cœur arrêté les expose particulièrement aux lésions d'IR. Les conséquences en terme de durée de vie de l'organe sont connues, notamment pour des greffons déjà fragiles.

En 2008, l'Inserm, à la demande de l'Agence de la biomédecine, a conduit une expertise sur les connaissances scientifiques et médicales en transplantation d'organes solides. Cette expertise a analysé des domaines de recherche prioritaires pour améliorer les résultats de la greffe et a rendu public ses conclusions en 2009. Parmi les recommandations du groupe d'experts, notons l'acquisition d'une meilleure connaissance des lésions du greffon liées au prélèvement et à son implantation chez le receveur et une meilleure compréhension des mécanismes de tolérance, avec le développement de nouveaux marqueurs de surveillance.

Notre travail, qui a eu pour objectif de mettre en évidence des voies d'activation de l'immunité innée après IR en transplantation, s'intègre dans cette problématique. En effet, la caractérisation du rôle des alarmines vise à une meilleure compréhension de la genèse des lésions d'IR et permet de dégager trois perspectives principales.

La première perspective de recherche que permet d'envisager nos résultats concerne la connaissance de la genèse des lésions d'IR secondairement à l'activation de l'immunité innée après expression d'un signal danger. Dans ce domaine, les modèles animaux et murins en particulier sont imparfaits. En effet, les travaux qui s'intéressent à la production des alarmines HMGB1 et IL-33 après IR sont menés sur des modèles murins, en dehors du champ de la transplantation. Leur méthodologie repose sur des expériences de clampage/déclampage du pédicule rénal pour le rein ou du tronc porte (artère hépatique, veine porte et canal biliaire) pour le foie. Ces travaux modélisent le phénomène d'IR au cours de l'insuffisance rénale aigüe ou de l'insuffisance hépatique. Cependant, notre connaissance de l'IR en transplantation est principalement le fruit d'extrapolations à partir de ces modèles et non de données directement obtenues chez des animaux transplantés.

De plus, en transplantation d'organe chez l'homme, les données en faveur de l'existence d'un signal danger porté par les alarmines sont peu nombreuses et n'ont pas d'application clinique à ce jour.

Nos résultats apportent des éléments de réponse quant au rôle joué par les alarmines en transplantation rénale chez l'homme. Ainsi nous mettons en évidence une production précoce dans le sang et les urines d'HMGB1 dont l'origine provient probablement du greffon rénal. Cette production « locale » s'accompagne d'effets systémiques comme en témoigne l'augmentation des messagers des TLRs dans les leucocytes circulants. La modélisation *in vitro* suggère que l'ischémie est responsable de la production d'HMGB1, dont la source est ici l'endothélium veineux.

*In vivo*, nos travaux ne permettent pas d'identifier la (les) source(s) cellulaire(s) d'HMGB1. Si l'endothélium vasculaire est une source très probable, nous ne pouvons pas exclure une production par les cellules épithéliales tubulaires en nécrose post-ischémique. Chez l'homme en effet, le travail de Krüger déjà cité (99) met en évidence, sur des biopsies préimplantatoires, l'expression d'HMGB1 dans l'épithélium tubulaire rénal de donneur décédé et non de donneur vivant (Figure n°8A). De plus, un modèle murin montre qu'HMGB1 est produite au cours d'une séquence d'IR rénale puis libérée dans la veine rénale. Cette expression d'HMGB1 est liée à une translocation de l'alarmine du noyau vers le cytoplasme, au niveau des cellules endothéliales vasculaires, des cellules épithéliales tubulaires et des capillaires péri-tubulaires (165).

L'ensemble de ces données suggère une expression puis une libération « one-shot » d'HMGB1, déclenchées directement par l'hypoxie plutôt que par la séquence complète d'IR. Il s'agit alors d'une libération passive, après rupture des membranes cellulaires. Cette hypothèse pourrait être testée par l'étude de la production tubulaire d'HMGB1 chez la souris et/ou l'homme *in vitro* à partir du dosage d'HMGB1 dans le surnageant de cellules épithéliales tubulaires en culture primaire, soumises à des séquences de durée variable d'hypoxie-réoxygénation.

Néanmoins, l'absence de corrélation entre les taux sériques d'HMGB1 et la durée d'ischémie froide dans notre étude mérite discussion car nous ne pouvons pas exclure une simple production liée au stress mécanique du clampage/déclampage vasculaire, indépendante de l'ischémie. Une étude avec des dosages sanguins et urinaires d'HMGB1 chez des patients bénéficiant d'une chirurgie vasculaire comportant un clampage/déclampage artériel comme

par exemple une endartériectomie carotidienne paraît judicieuse. Les résultats permettraient de mettre en évidence une éventuelle contribution de l'agression chirurgicale dans la production d'HMGB1.

La durée d'ischémie froide est un facteur majeur qui influence non seulement la reprise de fonction rénale mais aussi le devenir du greffon à long terme. Quelle est alors la signification physiopathologique de la libération d'HMGB1 chez nos patients ? En d'autres termes, quelle est la place d'HMGB1 dans l'orage cytokinique qui accompagne l'IR : une alarmine intervenant très en amont dans le processus ou une cytokine libérée parmi d'autres ?

Cette question se heurte à l'absence de modèle d'IR chez la souris déficiente pour *HMGB1* dans la mesure où celle-ci n'est viable que quelques heures après la naissance. Cependant, les études d'IR réalisées à partir des souris *TLR4<sup>-/-</sup>* ou *RAGE<sup>-/-</sup>* révèlent l'importance de l'interaction d'HMGB1 avec ses récepteurs dans la genèse des lésions. De plus, le blocage de la libération d'HMGB1 par l'éthyle pyruvate après IR chez la souris protège partiellement des lésions d'IR et de la fibrose interstitielle évaluée à deux mois, indiquant le rôle clef de cette alarmine dans la constitution des lésions (165).

Une autre question se pose sur le potentiel « effet-dose » de la libération d'HMGB1. En effet, le pic précoce d'HMGB1 observé après IR est-il corrélé à l'importance du recrutement cellulaire tel que les monocytes/macrophages et/ou les PNN dans le greffon ? Une étude clinique prospective chez des patients transplantés rénaux à haut risque de reprise différée de fonction, avec dosages itératifs d'HMGB1 pendant les 7 premiers jours associés à des biopsies du greffon « protocole » préimplantatoires puis à 7 jours en cas de reprise différée de fonction et à 3 mois apporterait sans doute des éléments de réponse. Une corrélation pourrait être recherchée entre le taux d'HMGB1 au pic et la reprise de fonction rénale ou entre le pic d'HMGB1 et l'évolution de la fibrose interstitielle, évaluée par mesure automatisée, au cours des trois premiers mois. Cette dernière corrélation, si elle se confirmait, serait particulièrement intéressante, dans la mesure où HMGB1 serait alors un marqueur prédictif de la fibrose du greffon.

Alors que le rôle de l'IL-33 dans des situations d'IR hépatique et myocardique a été étudié, il n'existe pas d'étude de l'axe IL-33/ST2 au cours de l'IR associée à la transplantation rénale. La littérature portant sur l'implication de la voie IL-33/ST2 en pathologie rénale fait état de quelques travaux, mais uniquement dans des modèles d'insuffisance rénale aigüe chez la souris (131).

De ce fait, les résultats qui montrent une libération d'IL-33 et de ST2 soluble dans les urines précocement après la reperfusion et une corrélation entre les taux sériques d'IL-33 et la durée d'ischémie froide sont intéressants. De plus les résultats *in vitro* suggèrent que l'ensemble de la séquence d'IR induit la production d'IL-33 par l'endothélium veineux, avec en particulier une synthèse d'IL-33 induite par l'hypoxie et maintenue après la réoxygénation.

A propos de la source cellulaire d'IL-33, nos résultats suggèrent qu'elle puisse être intra-rénale. En effet, les données *in vitro* montrent une production endothéliale d'IL-33. De plus, le pic urinaire observé dès 3 heures après la reperfusion suggère une libération dans la lumière tubulaire d'IL-33 issue des cellules épithéliales tubulaires nécrotiques. Cependant, on ne peut exclure que d'autres types cellulaires contribuent à la production d'IL-33, son expression étant constitutive chez l'homme dans les noyaux des cellules glomérulaires et endothéliales vasculaires rénales (Figure n°8C). Pour répondre sur ce point, une étude visant à détecter en immunohistochimie l'expression intra-rénale d'IL-33 sur des biopsies préimplantatoires et/ou de déclantage serait utile. Cette expression serait également à corréler avec la durée d'ischémie froide et la nature du donneur (vivant ou décédé).

La problématique de la source cellulaire d'IL-33, en particulier par les cellules tubulaires et/ou endothéliales vasculaires agressées, rejoint celle d'HMGB1 et pourrait relever de stratégies communes d'investigation. Ainsi la modélisation de la production d'IL-33 pourrait être également menée dans des modèles d'hypoxie-réoxygénation de culture primaire de cellules épithéliales rénales et la production d'IL-33 recherchée après chirurgie vasculaire.

Il est important ici de souligner les deux différences notables avec HMGB1 à savoir la corrélation avec la durée d'ischémie froide et la néosynthèse après réoxygénation, observées uniquement pour l'IL-33. Il en découle que l'IL-33 pourrait s'avérer constituer une signature moléculaire plus fine de l'IR rénale qu'HMGB1. C'est pourquoi la question d'un impact plus large et à plus long terme de la production de l'IL-33 mérite d'être soulevée. Ainsi une étude prospective multicentrique permettrait de rechercher une corrélation entre le pic d'IL-33 et/ou de ST2 soluble et la fibrose interstitielle évaluée par biopsie du greffon à 3 mois, l'incidence du rejet aigu, voire la fonction rénale à un an.

Après transplantation rénale chez l'homme, nous avons mis en évidence *in vivo* une activation précoce (dès la 3<sup>ème</sup> heure post-transplantation) et temporaire des cellules iNKT, concomitante du pic d'excrétion urinaire d'IL-33.

*In vitro*, chez le donneur sain, nous avons objectivé une activation des cellules iNKT en présence d'IL-33 seule, et non en présence d'HMGB1.

Ces résultats sont à mettre en perspective avec ceux obtenus par plusieurs équipes chez la souris, dans le poumon (123) et le foie (166), qui ont montré que l'IL-33 ciblait les lymphocytes iNKT en induisant leur production rapide d'IFN- $\gamma$ . Il est important de rappeler que l'IR rénale chez la souris, induit le recrutement des PNN, sous le contrôle des cellules iNKT et de leur production des cytokines IFN- $\gamma$  et IL-17 (33). Au final, ces éléments (nos données et la littérature) suggèrent un scénario où l'IR induit l'IL-33, qui active les lymphocytes iNKT, qui eux-mêmes infiltreront le greffon rénal et contribuent au recrutement des cellules constituant l'infiltrat inflammatoire.

De plus, cette activation des cellules iNKT et/ou leur capacité de produire de l'IFN- $\gamma$ , pourraient être corrélées à la libération des alarmines et à l'intensité des lésions d'IR. Cette corrélation mériterait d'être recherchée dans le cadre d'une étude prospective multicentrique, malgré la difficulté liée à la nécessité de centraliser l'analyse en cytométrie de flux du phénotype et de l'état d'activation des cellules iNKT.

Enfin, il nous faut conforter les données suggérant que la voie IL-33/ST2, mise en jeu après IR rénale, cible les cellules iNKT.

La première étape sera chez les souris sauvages, après un clampage/déclampage de 30 minutes du pédicule vasculaire rénal, l'analyse à différents temps (0h, 3h, 24h et 72h) de l'intensité des lésions tissulaires. Le nombre de cellules iNKT et leur phénotype d'activation dans la rate et le rein seront également analysés. Une fois le système calibré chez les souris sauvages en terme de sévérité des lésions, ce modèle sera utilisé pour déterminer le rôle de l'axe IL-33/iNKT dans l'IR rénale chez la souris.

Des souris sauvages et invalidées pour les gènes codant *IL-33*, *ST2*, *Ja18* seront soumises à des cycles d'IR par clampage/déclampage de l'artère rénale, puis la fonction rénale, la sévérité de l'atteinte histologique ainsi que le nombre des lymphocytes iNKT et leur l'état d'activation seront étudiés aux différents temps après induction de l'IR. Nous postulons sur la base des travaux de Okusa, que les lésions d'IR seront moins sévères ou absentes chez les souris *Ja18*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages. Enfin en nous basant sur nos travaux chez

l'Homme, il est plausible que nous observions une activation iNKT par l'expression augmentée de CD25 ou de CD69. Si l'axe IL-33/ST-2 est mis en jeu dans l'IR rénale chez la souris, les lésions d'IR devraient être moins sévères, ou même absentes chez les souris IL-33<sup>-/-</sup> et chez les souris ST-2<sup>-/-</sup>. Dans l'hypothèse où l'activation des cellules iNKT est principalement dépendante de l'IL-33, un défaut d'activation iNKT des souris IL-33<sup>-/-</sup> et ST2<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages devrait être observé.

Nous réaliserons ensuite des expériences de transfert pour démontrer le rôle d'un axe IL-33/iNKT au cours du phénomène d'IR rénale chez la souris. Nous reconstituerons des souris J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> par des cellules iNKT de souris sauvages ou de souris ST2<sup>-/-</sup>, puis nous réaliserons une IR rénale telle que nous l'avons décrit précédemment. Si notre hypothèse d'une voie IL-33/iNKT est juste, la sévérité des lésions d'IR devrait être comparable à celle des souris sauvages quand les souris J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> auront été reconstituées avec des cellules iNKT de souris sauvages mais pas de souris ST2<sup>-/-</sup>.

Confrontés à la pratique clinique, ces modèles murins ont de nombreuses limites : absence des effets liés à la mort encéphalique, absence d'ischémie froide, ischémie chaude plus ou moins courte, et enfin ni modulation de l'effet allogénique par l'IR ni sommation des effets de l'IR par les immunosuppresseurs.

Ces limites sont l'une des raisons pour lesquelles notre équipe a développé depuis plusieurs années un modèle d'auto-transplantation rénale chez le porc. Celui-ci présente des similitudes anatomiques avec l'homme et permet la réalisation de biopsies rénales itératives après transplantation, sans sacrifier l'organe. Une étude en immunohistochimie dans ce modèle permettrait d'étudier les variations d'expression intra-rénale des alarmines HMGB1 et IL-33 et de leurs récepteurs après reperfusion.

Bien que certains aspects du système immunitaire porcin soient bien caractérisés, les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cellules de l'immunité innée telle que les cellules iNKT n'étaient pas clairement établies. Il était donc difficile d'appréhender la problématique de l'implication de l'immunité innée et des cellules iNKT en particulier dans l'IR dans ce modèle animal. Notre travail confirme l'existence chez le porc de lymphocytes iNKT, qui présentent comme chez la souris et chez l'homme, un phénotype mémoire/activé. De façon intéressante, ils sont sensibles à l'action de l'IL-2, de l'IL-15 et l'IL-33 semble un excellent facteur de costimulation. Cette caractérisation des cellules iNKT porcines permet

l'étude du rôle de ces cellules après IR dans ce modèle animal, grâce à des biopsies rénales précoces et répétées. Celle-ci mériterait d'être complétée à l'aide d'autres marqueurs d'activation. En l'absence d'Ac dirigés contre le marqueur d'activation CD69 porcin, la validation de CD25 et de SLA-DR comme marqueurs d'activation substitutifs pourra être recherchée en comparant leur niveau d'expression avant et après activation par le ligand  $\alpha$ -GC des cellules iNKT. Pour mémoire, le marquage par le tétramère utilisé pour identifier les cellules iNKT circulantes ne permet pas de marquer les cellules iNKT sur lames, en immunohistochimie ou en immunofluorescence. Compte tenu de la taille des prélèvements biopsiques, il est peu probable qu'une suspension suffisante de cellules composant l'infiltrat puisse être obtenue pour des analyses en cytométrie en flux. Pour résoudre le problème de l'étude semi-quantitative des lymphocytes iNKT dans l'infiltrat interstitiel, nous utiliserons donc une technique de RT-PCR quantitative spécifique de la chaîne  $\alpha$  invariante des lymphocytes iNKT.

L'absence de réactifs permettant le dosage sanguin de l'IL-33 et de ST2s chez le porc limite actuellement les investigations. Nous envisageons à terme de mettre au point ces dosages. Quant à l'étude de l'expression d'IL-33 en immunohistochimie dans les greffons porcins, les résultats préliminaires de l'équipe de JP Girard à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale à Toulouse montrent une réaction croisée avec l'Ac anti-IL-33 humain qui devrait permettre cette analyse.

Ces différentes mises au point nous permettront d'envisager plusieurs travaux à partir du modèle d'auto-transplantation rénale. Ainsi la fréquence et le phénotype activé ou non des cellules iNKT circulantes, à différents temps après IR, associés aux dosages d'IL-33 sanguine et urinaire seront étudiés. Une étude fonctionnelle de la réponse proliférative des cellules iNKT à ces différents temps pourra être réalisée après stimulation par l' $\alpha$ -GC, en présence d'IL-2 et IL-15 ou d'IL-33. Cette étude permettra de tester l'hypothèse d'une désensibilisation, en déterminant si l'IL-33 agit en « one shot » ou si son action sur les cellules iNKT persiste à distance de la reperfusion.

Enfin le modèle porcin d'auto-transplantation devrait permettre une analyse *in situ* de l'expression d'IL-33, en fonction de différentes conditions d'IR. L'infiltrat inflammatoire sera étudié. L'analyse de la présence de lymphocytes iNKT pourra être réalisée par une étude de l'expression de leur TCR semi-invariant par la technique de RT-PCR, rapportée à celle d'une RT-PCR spécifique de CD3, ceci à partir des biopsies rénales précoces et répétées. En effet, l'augmentation de la quantité de transcrits correspondant au TCR invariant après une

autogreffe serait un argument pour le recrutement *in vivo* des lymphocytes iNKT dans le rein soumis à une séquence d'IR.

Au final, l'ensemble de ces travaux devrait nous permettre de confirmer le rôle des alarmines dans le phénomène d'IR rénale et de mieux documenter le rôle de l'axe biologique IL-33/ST2L/iNKT, en montrant notamment que le recrutement et l'activation des cellules iNKT après IR sont dépendants de l'IL-33.

Le deuxième axe de recherche que permettent d'envisager nos résultats concerne l'utilisation des alarmines et/ou de leurs récepteurs en tant que biomarqueurs des lésions d'IR. Leurs niveaux d'expression au niveau génique ou protéique dans des échantillons biologiques pourraient constituer un indicateur biologique du statut du greffon après IR. Le principe que le taux plasmatique d'une alarmine chez l'homme puisse avoir une valeur pronostique n'est pas nouveau. Ainsi, dans la mesure où la nécrose cellulaire s'accompagne de la libération d'HMGB1, une concentration plasmatique élevée de cette dernière est considérée comme un biomarqueur et ou un facteur pronostique péjoratif de nombreuses pathologies cancéreuses (hépatocarcinome, cancer bronchique, cancer de l'ovaire...).

Dans le contexte des pathologies associées à un phénomène d'IR, la littérature est plus modeste. Citons un travail très récent portant sur plus de 300 patients pris en charge pour un accident vasculaire cérébral ischémique ; chez ces patients, un taux plasmatique élevé d'HMGB1 au diagnostic est corrélé avec la gravité initiale de l'accident et constitue un facteur de risque indépendant de décès durant la première année. Les auteurs concluent à la valeur de biomarqueur d'HMGB1 dans cette pathologie (167).

En transplantation chez l'homme à ce jour, seule une étude pilote (20 patients transplantés hépatiques) montre une libération très précoce d'HMGB1 par le greffon hépatique, avec un pic observé dans la circulation périphérique 10 mn après le déclampage de l'artère hépatique (168). De plus, ce pic sérique d'HMGB1 est corrélé avec l'augmentation post-opératoire des transaminases. Les auteurs concluent qu'HMGB1 est un marqueur de la souffrance hépatique après transplantation. Cependant, cette étude n'analyse pas l'impact du taux d'HMGB1 sur la fonction ou la survie du greffon à distance de la greffe et n'évalue donc pas la valeur pronostique d'HMGB1.

Ces différents résultats sont en faveur de l'idée qu'HMGB1 est un marqueur de la sévérité du processus ischémique. Quelles en sont les conséquences en ce qui concerne l'IR rénale ?

Dans un modèle d'ischémie par clampage du pédicule rénal chez la souris, Rabadi *et al.* montrent que la libération d'HMGB1 dans la veine rénale est d'autant plus élevée que la durée d'ischémie est longue. Ces résultats suggèrent qu'HMGB1 pourrait être une alarmine candidate comme biomarqueur de l'IR en transplantation rénale. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence chez l'homme de corrélation entre le taux d'HMGB1 plasmatique et la durée d'ischémie froide. De plus, l'activité transcriptionnelle d'HMGB1 n'est pas modifiée ou induite par la séquence d'IR, comme en attestent nos résultats *in vitro* sur les cellules endothéliales. Au final, cette différence avec les résultats de Rabadi pourrait être liée au fait que le paramètre testé n'est pas strictement le même : une durée d'ischémie froide dans notre étude et une durée d'ischémie chaude -sans ischémie froide- dans le travail de Rabati.

Nos données, bien qu'obtenues sur une faible cohorte, suggèrent que le pic sérique et/ou urinaire d'HMGB1 observé après transplantation rénale puisse être un facteur pronostique indépendant de reprise différée de fonction, et/ou de la fibrose interstitielle à 3 mois ou encore de la fonction rénale à un an. A nouveau, une large étude prospective multicentrique avec biopsie systématique à 3 mois et un an post-greffe pour rechercher ces corrélations nous paraît pertinente.

Ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour l'IL-33. En effet, nous avons corrélié le taux sérique d'IL-33 avec la durée d'ischémie froide et *in vitro*, la libération d'IL-33 comme son activité transcriptionnelle sont stimulées dès la phase d'hypoxie et persistent après la réoxygénation. Cependant à ce jour, l'IL-33 n'est pas considérée comme un biomarqueur et dans notre propre expérience, peu de patients ont une augmentation de la production d'IL-33 détectable dans le sérum après la greffe. Des corrélations entre le pic sérique et/ou urinaire d'IL-33 et des marqueurs plus tardifs de la dysfonction rénale (degré de fibrose à 3 mois, fonction rénale à un an...) méritent néanmoins d'être recherchées. Il conviendra de s'assurer que l'IL-33 est un facteur de risque indépendant de la durée d'ischémie froide.

En revanche, la mise en jeu de la voie IL-33/ST2 peut être détectée par le dosage du récepteur soluble ST2s. Celui-ci s'est avéré être un biomarqueur particulièrement intéressant pour apprécier la sévérité de pathologies cardiovasculaires, indépendamment du marqueur habituel, le *Brain Natriuretic Peptide* (169). Un taux sérique élevé de ST2s au diagnostic d'accident coronarien est ainsi un facteur de mauvais pronostic. Ce « decoy » récepteur neutralise en effet l'action de l'IL-33 alors que celle-ci a un effet protecteur pour le

cardiomyocyte, en réduisant notamment la fibrose et l'hypertrophie ventriculaire dans plusieurs modèles chez la souris.

Nos résultats révèlent quant à eux une augmentation du taux sérique, de l'excrétion urinaire et de l'activité transcriptionnelle dans les leucocytes circulants de ST2s après IR. L'absence de corrélation avec la durée d'ischémie froide dans notre étude suggère que ST2s représente plus un témoin de l'activation de la voie plutôt qu'un potentiel biomarqueur.

Si HMGB1 n'a pas de récepteur soluble qui puisse être dosé dans le sang circulant, l'étude du polymorphisme et du niveau d'expression de son récepteur membranaire TLR4 a fait l'objet de plusieurs travaux en transplantation.

Le polymorphisme qui implique la mutation d'un seul acide aminé (Asp299Gly) et induit une perte de fonction du récepteur, est fréquent dans la population générale. Ducloux *et al.* le mettent en évidence chez 11,3% des receveurs de greffe rénale. Les auteurs montrent qu'il est associé significativement à moins de rejets aigus, à moins d'événements cardiovasculaires, mais à plus d'événements infectieux (114). Dans le travail déjà cité de Krüger, ce même polymorphisme lorsqu'il s'accompagne d'un second (Thr399Ile), est associé à moins de reprise différée de fonction rénale (99).

Notons cependant qu'Andrade Oliveira *et al.* objectivent une relation entre un faible niveau d'expression du transcrite de *TLR4* dans les leucocytes circulants 24 heures après la greffe et la survenue d'une reprise différée de fonction (110). Pour expliquer ces résultats, les auteurs suggèrent dans le contexte de reprise différée de fonction, une migration intra-rénale des cellules circulantes exprimant fortement TLR4, tels que les PNN et les monocytes.

Ces différents résultats ainsi que les nôtres qui montrent une augmentation précoce des transcrits de *TLR2* et *TLR4* dans les leucocytes circulants précocement après IR suggèrent l'intérêt pronostique potentiel du niveau d'expression de ces gènes. Une évaluation du profil transcriptomique de ces gènes sur des biopsies préimplantatoires et/ou systématiques à 3 mois ou encore en cas de reprise différée de fonction fait l'objet d'études ancillaires de futurs protocoles d'immunosuppression.

Précisons à ce stade que la validation des alarmines et de leurs récepteurs en tant que biomarqueurs de l'IR serait à établir en distinguant la nature de l'organe transplanté et son origine, selon qu'il provienne d'un donneur vivant ou cadavérique. Notons également que les informations obtenues par une telle étude pourraient être utiles à d'autres situations cliniques

impliquant une IR rénale, telle que l'insuffisance rénale aiguë d'origine pré-rénale ou fonctionnelle.

Enfin, nos travaux suggèrent que les cellules iNKT et leur état d'activation pourraient être un biomarqueur de l'IR. D'une manière plus générale, cette question se pose pour préciser le diagnostic, le pronostic ou le traitement de processus pathologiques qui impliquent les cellules iNKT. Bien que chez l'Homme il y ait des situations où les variations quantitatives de cellules iNKT soient associées à des pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé, la faible proportion et la grande variabilité interindividuelle des lymphocytes iNKT circulants expliquent que la détermination de leur fréquence ne soit pas un biomarqueur utilisable en clinique.

La troisième perspective, plus lointaine, que permet d'envisager la connaissance du signal danger et de ses cibles a trait au développement de thérapeutiques innovantes, capables d'agir sur le système immunitaire pour atténuer les lésions d'IR.

Les modèles murins d'IR ont permis de révéler de nombreux mécanismes protecteurs des lésions d'IR, en ciblant des molécules impliquées dans les programmes de mort cellulaire, dans la coagulation ou encore l'activation de la cascade du complément. En revanche, les essais cliniques, ciblant une molécule particulière et dont le rationnel provenait des résultats obtenus chez la souris, se sont souvent avérés décevants. Citons à titre d'exemple l'essai conduit chez l'homme pour le syndrome coronarien, où l'inhibition de l'activation du complément à l'aide d'un Ac monoclonal anti-C5 (pexelizumab) s'est révélé n'avoir aucun effet bénéfique pour le patient (170). L'administration trop tardive du pexelizumab est suspectée ici pour interpréter ces résultats décevants.

Pour expliquer les discordances entre certains résultats prometteurs obtenus chez la souris et ceux des essais cliniques chez l'homme, rappelons l'existence de voies d'activation redondantes chez l'homme, nécessitant souvent plusieurs blocages pour mettre en évidence un effet biologique. Un autre point tient au modèle murin qui, s'il se rapproche de la pathologie étudiée, n'en est au mieux qu'une variante. C'est la difficulté déjà évoquée de disposer d'un modèle d'IR chez l'animal en situation de transplantation allogénique. Chez la souris, seules quelques équipes dans le monde maîtrisent la transplantation rénale et ont rapporté leurs travaux sur l'IR (112).

La disparité des systèmes immunitaires entre l'homme et la souris constitue une autre limite, dans la mesure où le phénotype d'une même population lymphocytaire peut faire l'objet d'une grande variabilité entre les deux espèces.

Dans ce contexte, le modèle porcin qui permet la réalisation de transplantations rénales autologues ou allogéniques, est pertinent, notamment pour des interventions thérapeutiques ciblant l'IR (171). Les similitudes anatomiques et immunologiques avec l'homme constituent un atout essentiel (172). Nous avons par exemple établi que les cellules iNKT du porc sont sur le plan phénotypique plus proche de celles de l'homme que de la souris.

Or la modulation de certaines populations du système immunitaire et des lymphocytes iNKT en particulier pourrait s'avérer utile pour atténuer les lésions d'IR rénale. Ainsi les propriétés fonctionnelles des cellules iNKT au cours de l'IR pourraient être modulées en ciblant les DCs. Chez la souris, Li *et al.* ont récemment montré que des DCs rendues tolérogènes par un agoniste du récepteur A<sub>2A</sub> à l'adénosine, le regadenoson, administré avant IR, atténuent les lésions d'IR. Cet effet tolérogène est dépendant de l'IL-10 et de la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes iNKT (153).

Une étude préclinique chez le porc évaluant l'effet du regadenoson sur les lésions d'IR, associée à une étude fonctionnelle des lymphocytes iNKT circulants serait particulièrement intéressante.

La libération des alarmines et d'HMGB1 en particulier, observée dans différents modèles animaux et chez l'homme précocement après IR, suggère également qu'elles puissent être la cible d'un traitement neutralisant. L'action des Ac anti-HMGB1 est rapportée dans de nombreux modèles expérimentaux de pathologies très diverses, telles que le choc septique, l'accident vasculaire cérébral ou encore la colite inflammatoire. Dans différents modèles d'IR chez la souris, l'administration d'un Ac neutralisant HMGB1 réduit les lésions d'IR rénale, hépatique ou cardiaque (96)(98)(173). Rappelons également l'effet bénéfique de l'éthyle pyruvate qui en bloquant la libération d'HMGB1 au cours de l'IR, réduit la fibrose rénale (165). Malheureusement ces différents modèles ne concernent pas l'IR de la transplantation.

La société de biotechnologie Abnova travaille actuellement à la mise au point d'un Ac monoclonal humanisé anti-HMGB1. Un essai clinique, chez l'homme atteint de sepsis grave, devrait débuter en 2015. En fonction du profil de tolérance, cet Ac monoclonal pourrait également faire l'objet d'un essai thérapeutique en transplantation rénale.

Les récepteurs d'HMGB1 et les TLRs en particulier constituent également des cibles thérapeutiques prometteuses pour atténuer les lésions d'IR. La molécule TAK-242 (resatorvid) bloque la transduction du signal transmis par TLR4 en interagissant avec les molécules adaptatrices du récepteur. Le resatorvid, qui fait actuellement l'objet d'un développement par le laboratoire Takeda, a été testé chez l'homme contre placebo dans deux études de phase 3 pour le traitement du sepsis sévère. Les résultats sont en attente mais la molécule pourrait également être évaluée dans le domaine de l'IR. Une autre stratégie repose sur l'utilisation des petits fragments d'ARN interférents *siRNA* (pour « small interfering RNA ») qui permettent de réduire voire de stopper l'expression d'un gène cible. Une équipe sino-canadienne a récemment montré chez la souris qu'en empêchant l'expression de TLR4 au sein des hépatocytes à l'aide d'un *siRNA*, on protégeait le foie des lésions d'IR et limitait la réaction inflammatoire (174). Malgré les limites pour une application chez l'homme, telles que la difficulté de cibler un type cellulaire particulier ou encore la quantité de *siRNA* nécessaire, cette approche constitue une piste intéressante.

Le récepteur TLR2 constitue également une cible thérapeutique potentielle. L'OPN-305 est un Ac monoclonal humanisé bloquant TLR2 et qui a montré des résultats positifs quant à sa capacité à réduire la taille de l'infarctus après IR cardiaque chez le porc (175). L'OPN-305 est actuellement évalué dans une étude de phase 2 en transplantation rénale chez l'homme avec pour objectif principal la réduction de la reprise différée de fonction rénale.

La voie IL-33/ST2 dont l'implication dans l'IR est récente, ne fait pas -encore- l'objet d'essai thérapeutique chez l'homme. Rappelons néanmoins les études évoquées dans le Chapitre 2 (5.4) de l'Introduction dans lesquelles l'utilisation chez la souris d'une molécule de fusion purifiée sST2-Fc a montré des résultats intéressants dans la prévention de l'IR hépatique et intestinale.

L'IL-33 peut également être neutralisée chez la souris par l'utilisation d'un Ac polyclonal anti-IL-33. D'une manière intéressante, dans un modèle d'insuffisance hépatique induite par la concanavaline A, le blocage d'IL-33 par cet Ac inhibe l'activation des cellules iNKT (112). Une telle approche constitue ici encore une piste thérapeutique potentielle ciblant l'IR et qui demande à être validée.

Enfin, d'autres approches thérapeutiques ciblant l'IR sont en développement, en modulant par exemple certaines sous-populations lymphocytaires T. Citons le recrutement intra-rénal de lymphocytes Tregs induit par un agent pharmacologique dans un modèle d'IR chez la souris. L'infiltrat riche en Tregs exerce un effet néphroprotecteur à l'égard de l'IR (176). Cependant, il s'y associe un infiltrat riche en cellules T effectrices, rendant cette stratégie inapplicable en l'état à la prévention des lésions d'IR en transplantation rénale.

## Conclusion

La compréhension des mécanismes immunologiques qui interviennent au cours de l'IR constitue un formidable enjeu scientifique et thérapeutique, bien au-delà du seul domaine de la transplantation. Cette compréhension confronte plusieurs théories (la théorie du danger et la théorie du soi et du non-soi), et fait appel à de nouveaux concepts (les alarmines...).

En amont du processus, la connaissance des signaux danger mis en jeu au cours de l'IR est un élément essentiel pour un jour espérer les moduler à des fins thérapeutiques. En « bout de chaîne », les cellules de l'immunité dont le recrutement et l'activation au cours de l'IR constituent également des cibles thérapeutiques potentielles.

L'exemple de l'axe biologique IL-33/cellules iNKT illustre ce chemin qui commence avec l'hypoxie et s'achève avec les lésions tissulaires du greffon.

Dans la première partie de notre travail (Manuscrit n°1), nous avons décrit les principales caractéristiques des cellules iNKT du porc et confirmé que ces cellules étaient ciblées par l'IL-33. Cette description est utile à l'étude de la mise en jeu de l'immunité innée dans le modèle porcin de transplantation d'organe.

La seconde partie (Manuscrit n°2, soumis) a permis de mettre en évidence la production des alarmines HMGB1 et IL-33 chez l'homme après transplantation rénale. Nous avons également montré l'activation précoce des cellules iNKT, celle-ci étant objectivée également *in vitro* en présence d'IL-33.

L'ensemble de notre travail permet de confirmer et de proposer au niveau épithélial comme au niveau endothélial la mise en jeu des voies d'activation de l'immunité innée par les alarmines (**Figure n°13**)

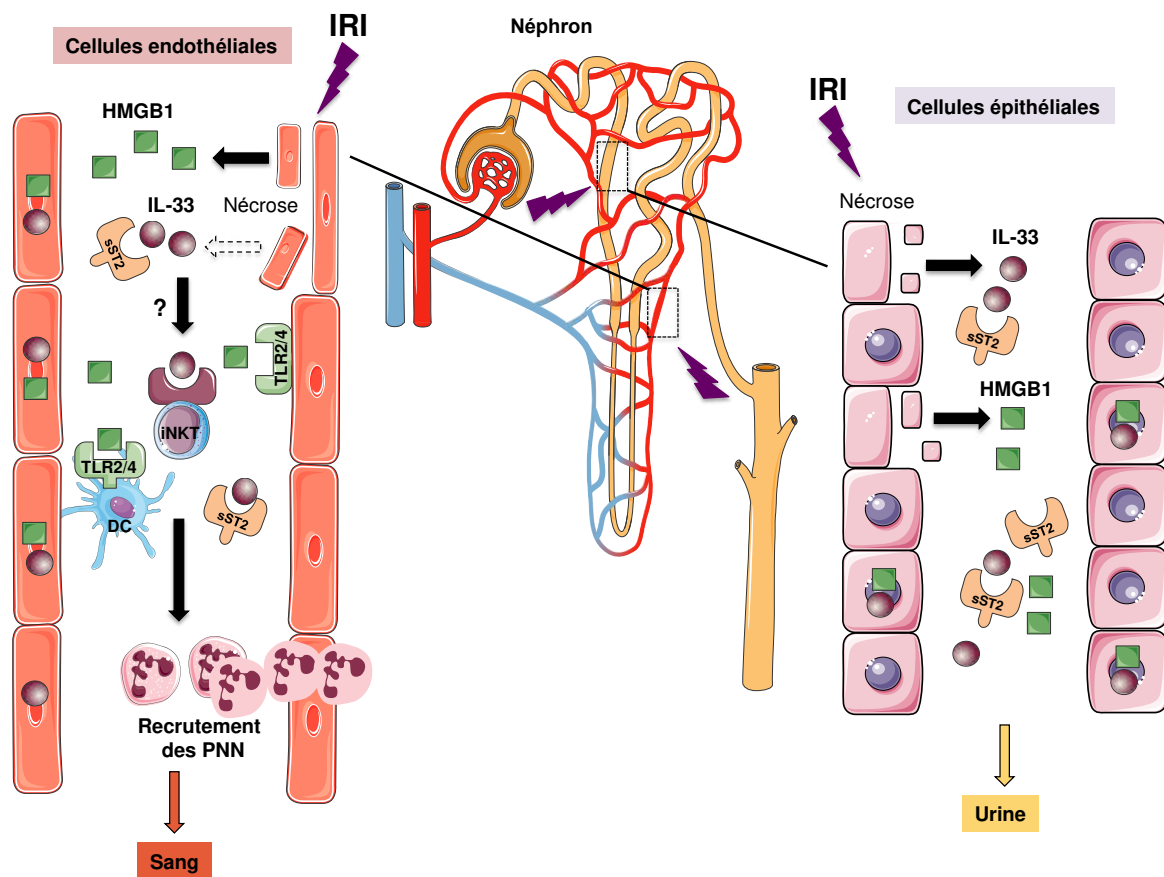


Figure n°13 : représentation schématique et hypothétique de la mise en jeu des alarmines HMGB1 et IL-33 et des cellules de l'immunité innée dans le néphron, au cours de l'IR.

Néanmoins, de nombreux points restent cependant à établir comme : 1) L'intensité et la gravité des lésions tissulaires de l'IR sont-elles corrélées au taux d'alarmines libérées ? En d'autres termes, l'IL-33 est-elle une signature moléculaire de l'IR et un potentiel biomarqueur ? 2) Les alarmines et l'IL-33 en particulier sont-elles à l'origine de l'activation des cellules iNKT, indépendamment de l'antigène ?

Par son atteinte de l'homéostasie, l'IR met en jeu les mécanismes d'immunosurveillance de l'intégrité tissulaire dont au premier chef les cellules de l'immunité innée. Connaître l'implication du système immunitaire permet d'envisager de moduler sa réponse comme de respecter certains aspects de l'inflammation. *In medio stat virtus...*

## Bibliographie

1. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine*. 2007;357(11):1121–1135.
2. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*. mai 2011;53(5):1662–1675.
3. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 10 sept 2009;461(7261):282–286.
4. Thakar CV, Zahedi K, Revelo MP, Wang Z, Burnham CE, Barone S, et al. Identification of thrombospondin 1 (TSP-1) as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia. *J. Clin. Invest.* déc 2005;115(12):3451–3459.
5. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Kato H, Yamashita T, Sakiyama A, et al. Protective Role of Hypoxia-Inducible Factor-2 $\alpha$  against Ischemic Damage and Oxidative Stress in the Kidney. *JASN*. 4 janv 2007;18(4):1218–1226.
6. Hill P, Shukla D, Tran MGB, Aragonés J, Cook HT, Carmeliet P, et al. Inhibition of Hypoxia Inducible Factor Hydroxylases Protects Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *JASN*. 1 janv 2008;19(1):39–46.
7. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 18 avr 2008;283(16):10892–10903.
8. Jiang M, Wei Q, Dong G, Komatsu M, Su Y, Dong Z. Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury. *Kidney International*. 2012;82(12):1271–1283.
9. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF $\kappa$ B activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 28 nov 2006;103(48):18154–18159.
10. Chen L-W, Egan L, Li Z-W, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. The two faces of IKK and NF- $\kappa$ B inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat. Med.* mai 2003;9(5):575–581.
11. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*. 7 juill 2011;17(7):796–808.

12. Pacher P, Szabo C. Role of the Peroxynitrite-Poly(ADP-Ribose) Polymerase Pathway in Human Disease. *The American Journal of Pathology*. juill 2008;173(1):2–13.
13. Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, et al. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 3 janv 1992;262(3):C546–C554.
14. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *Journal of Clinical Investigation*. 15 févr 1996;97(4):1056–1063.
15. Oh D-J, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, et al. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1 janv 2008;294(1):F264–F271.
16. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Journal of Clinical Investigation*. 1 nov 2011;121(11):4210–4221.
17. Moser M, Bauer M, Schmid S, Ruppert R, Schmidt S, Sixt M, et al. Kindlin-3 is required for  $\beta 2$  integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nature Medicine*. 2009;15(3):300–305.
18. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, et al. Platelet Polyphosphates Are Proinflammatory and Procoagulant Mediators In Vivo. *Cell*. 11 déc 2009;139(6):1143–1156.
19. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney International*. 2007;72(2):151–156.
20. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 8 janv 2003;285(2):F191–F198.
21. Yamamoto T, Tada T, Brodsky SV, Tanaka H, Noiri E, Kajiya F, et al. Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 6 janv 2002;282(6):F1150–F1155.
22. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*. 2010;11(9):785–797.
23. Diepenhorst GMP, van Gulik TM, Hack CE. Complement-Mediated Ischemia-Reperfusion Injury. *Annals of Surgery*. juin 2009;249(6):889–899.
24. He S, Atkinson C, Qiao F, Cianflone K, Chen X, Tomlinson S. A complement-dependent balance between hepatic ischemia/reperfusion injury and liver regeneration in mice. *J. Clin. Invest*. août 2009;119(8):2304–2316.
25. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science*. 30 juill 2009;325(5940):612–616.

26. Bamboat ZM, Ocuin LM, Balachandran VP, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. *J. Clin. Invest.* févr 2010;120(2):559–569.
27. Kreisel D, Sugimoto S, Tietjens J, Zhu J, Yamamoto S, Krupnick AS, et al. Bcl3 prevents acute inflammatory lung injury in mice by restraining emergency granulopoiesis. *J. Clin. Invest.* janv 2011;121(1):265–276.
28. Shen X, Wang Y, Gao F, Ren F, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, et al. CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without de novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* nov 2009;50(5):1537–1546.
29. Kuboki S, Sakai N, Tschöp J, Edwards MJ, Lentsch AB, Caldwell CC. Distinct contributions of CD4+ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* mai 2009;296(5):G1054–1059.
30. Day Y-J, Huang L, Ye H, Li L, Linden J, Okusa MD. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4+ T cells and IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 1 mars 2006;176(5):3108–3114.
31. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* août 2009;15(8):946–950.
32. Sharma AK, LaPar DJ, Zhao Y, Li L, Lau CL, Kron IL, et al. Natural killer T cell-derived IL-17 mediates lung ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1 juin 2011;183(11):1539–1549.
33. Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- $\gamma$ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation.* 4 janv 2010;120(1):331–342.
34. Gandolfo MT, Jang HR, Bagnasco SM, Ko G-J, Agreda P, Satpute SR, et al. Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney International.* 2009;76(7):717–729.
35. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nature Medicine.* 2009;15(2):192–199.
36. Feng M, Wang Q, Zhang F, Lu L. Ex vivo induced regulatory T cells regulate inflammatory response of Kupffer cells by TGF- $\beta$  and attenuate liver ischemia reperfusion injury. *Int. Immunopharmacol.* janv 2012;12(1):189–196.
37. Perrot M de, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia–Reperfusion–induced Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 15 févr 2003;167(4):490–511.

38. Mikhalski D, Wissing KM, Ghisdal L, Broeders N, Touly M, Hoang A-D, et al. Cold Ischemia is a Major Determinant of Acute Rejection and Renal Graft Survival in the Modern Era of Immunosuppression. *Transplantation*. avr 2008;85(Supplement):S3-S9.
39. Salahudeen AK, Haider N, May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney International*. 2004;65(2):713-718.
40. Quiroga I, McShane P, Koo DDH, Gray D, Friend PJ, Fuggle S, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol. Dial. Transplant*. juin 2006;21(6):1689-1696.
41. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand*. avr 2009;53(4):425-435.
42. Van der Hoeven JAB, Molema G, Ter Horst GJ, Freund RL, Wiersema J, van Schilfgaarde R, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int*. nov 2003;64(5):1874-1882.
43. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JAB, Fekken S, Wiersema-Buist J, Leuvenink HGD, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation*. 15 oct 2004;78(7):978-986.
44. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schumouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation*. 15 avr 1997;63(7):968-974.
45. Kwon O, Hong S-M, Ramesh G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. janv 2009;296(1):F25-33.
46. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*. août 2004;66(2):480-485.
47. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. juill 2002;62(1):237-244.
48. Bataille A, Abbas S, Semoun O, Bourgeois É, Marie O, Bonnet F, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in kidney transplantation and early renal function prediction. *Transplantation*. 15 nov 2011;92(9):1024-1030.
49. Niemann-Masanek U, Mueller A, Yard BA, Waldherr R, van der Woude FJ. B7-1 (CD80) and B7-2 (CD 86) expression in human tubular epithelial cells in vivo and in vitro. *Nephron*. 2002;92(3):542-556.
50. Li L, Okusa MD. Macrophages, Dendritic Cells, and Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. *Seminars in Nephrology*. mai 2010;30(3):268-277.

51. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* avr 2007;71(7):619–628.
52. Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, Ascon M, Savransky V, Colvin RB, et al. Phenotypic and Functional Characterization of Kidney-Infiltrating Lymphocytes in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *J Immunol.* 9 janv 2006;177(5):3380–3387.
53. Zhang Z-X, Wang S, Huang X, Min W-P, Sun H, Liu W, et al. NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol.* 1 déc 2008;181(11):7489–7498.
54. Zhang Z-X, Shek K, Wang S, Huang X, Lau A, Yin Z, et al. Osteopontin Expressed in Tubular Epithelial Cells Regulates NK Cell-Mediated Kidney Ischemia Reperfusion Injury. *J Immunol.* 15 juill 2010;185(2):967–973.
55. Ascon DB, Ascon M, Satpute S, Lopez-Briones S, Racusen L, Colvin RB, et al. Normal mouse kidneys contain activated and CD3+CD4- CD8- double-negative T lymphocytes with a distinct TCR repertoire. *J. Leukoc. Biol.* déc 2008;84(6):1400–1409.
56. Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, Haq M, Saba SR, Keane W, et al. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* sept 2000;279(3):F525–531.
57. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, et al. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J. Clin. Invest.* nov 2001;108(9):1283–1290.
58. Ascon M, Ascon DB, Liu M, Cheadle C, Sarkar C, Racusen L, et al. Renal ischemia-reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector-memory T lymphocytes. *Kidney International.* 17 déc 2008;75(5):526–535.
59. Kinsey GR, Sharma R, Huang L, Li L, Vergis AL, Ye H, et al. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* août 2009;20(8):1744–1753.
60. Burne-Taney MJ, Ascon DB, Daniels F, Racusen L, Baldwin W, Rabb H. B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *J. Immunol.* 15 sept 2003;171(6):3210–3215.
61. Renner B, Strassheim D, Amura CR, Kulik L, Ljubanovic D, Glogowska MJ, et al. B Cell Subsets Contribute to Renal Injury and Renal Protection after Ischemia/Reperfusion. *The Journal of Immunology.* 1 sept 2010;185(7):4393–4400.
62. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* déc 2010;10(12):826–837.
63. Cheung KP, Kasimsetty SG, McKay DB. Innate immunity in donor procurement. *Current Opinion in Organ Transplantation.* janv 2013;1.

64. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* janv 2007;81(1):1–5.
65. Arumugam TV, Okun E, Tang S-C, Thundiyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock.* juill 2009;32(1):4–16.
66. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* avr 2008;8(4):279–289.
67. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, et al. High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J. Clin. Invest.* mars 2010;120(3):735–743.
68. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 15 mai 2002;168(10):5233–5239.
69. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* nov 2000;12(11):1539–1546.
70. Nace G, Evankovich J, Eid R, Tsung A. Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *J Innate Immun.* 2012;4(1):6–15.
71. Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today.* janv 1992;13(1):11–16.
72. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology.* 1 févr 2001;13(1):114–119.
73. Pradeu T, Cooper EL. The danger theory: 20 years later. *Front. Immun.* 2012;3:287.
74. Matzinger P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology.* 1994;12(1):991–1045.
75. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* nov 1999;5(11):1249–1255.
76. Shields AM, Panayi GS, Corrigan VM. Resolution-associated molecular patterns (RAMP): RAMPs defending immunological homeostasis? *Clin. Exp. Immunol.* sept 2011;165(3):292–300.
77. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol.* 9 janv 2009;86(3):573–576.
78. Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J. Exp. Med.* 26 nov 2007;204(12):2913–2923.

79. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 11 juill 2002;418(6894):191–195.
80. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 9 juill 1999;285(5425):248–251.
81. Yang H, Lundbäck P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, et al. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol. Med*. 2012;18:250–259.
82. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh C-W, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol*. 9 juin 2010;190(5):881–892.
83. Tang D, Kang R, Cheh C-W, Livesey KM, Liang X, Schapiro NE, et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene*. 23 sept 2010;29(38):5299–5310.
84. Tesar BM, Jiang D, Liang J, Palmer SM, Noble PW, Goldstein DR. The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists. *Am. J. Transplant*. nov 2006;6(11):2622–2635.
85. Shirali AC, Goldstein DR. Activation of the innate immune system by the endogenous ligand hyaluronan. *Curr Opin Organ Transplant*. févr 2008;13(1):20–25.
86. Shen H, Song Y, Colangelo CM, Wu T, Bruce C, Scabia G, et al. Haptoglobin activates innate immunity to enhance acute transplant rejection in mice. *J. Clin. Invest*. 3 janv 2012;122(1):383–387.
87. Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J. Immunol*. 15 févr 2008;180(4):2531–2537.
88. Schiraldi M, Raucci A, Muñoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, et al. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med*. 3 déc 2012;209(3):551–563.
89. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol*. 9 janv 2009;86(3):573– 576.
90. Dumitriu IE, Baruah P, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol*. juill 2005;35(7):2184–2190.
91. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J. Immunol*. 1 juill 2004;173(1):307–313.
92. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc. Biol*. janv 2007;81(1):59–66.

93. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* oct 2007;117(10):2847–2859.
94. Chen J, John R, Richardson JA, Shelton JM, Zhou XJ, Wang Y, et al. Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* févr 2011;79(3):288–299.
95. Li J, Gong Q, Zhong S, Wang L, Guo H, Xiang Y, et al. Neutralization of the extracellular HMGB1 released by ischaemic damaged renal cells protects against renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* févr 2011;26(2):469–478.
96. Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz TM, Panchapakesan U, Wyburn KR, et al. HMGB1 Contributes to Kidney Ischemia Reperfusion Injury. *JASN.* 11 janv 2010;21(11):1878–1890.
97. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, et al. High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J. Clin. Invest.* mars 2010;120(3):735–743.
98. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* 4 avr 2005;201(7):1135–1143.
99. Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 3 mars 2009;106(9):3390–3395.
100. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJD, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J. Clin. Invest.* oct 2005;115(10):2894–2903.
101. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* oct 2007;117(10):2847–2859.
102. Rusai K, Sollinger D, Baumann M, Wagner B, Strobl M, Schmaderer C, et al. Toll-like receptors 2 and 4 in renal ischemia/reperfusion injury. *Pediatr. Nephrol.* mai 2010;25(5):853–860.
103. Gao Q, Ma LL, Gao X, Yan W, Williams P, Yin DP. TLR4 mediates early graft failure after intraportal islet transplantation. *Am. J. Transplant.* juill 2010;10(7):1588–1596.
104. Kuhlicke J, Frick JS, Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Eltzschig HK. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia. *PLoS ONE.* 2007;2(12):e1364.
105. Wolfs TGAM, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MARC, Hiemstra PS, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J. Immunol.* 1 févr 2002;168(3):1286–1293.

106. Zhai Y, Shen X, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J. Immunol.* 15 déc 2004;173(12):7115–7119.
107. Peng Y, Gong J-P, Liu C-A, Li X-H, Gan L, Li S-B. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft. *World J. Gastroenterol.* 1 oct 2004;10(19):2890–2893.
108. Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, Büchler M, Schemmer P, Müller M. Ischemia/Reperfusion Injury in Liver Surgery and Transplantation: Pathophysiology. *HPB Surgery.* 2012;2012:1–8.
109. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am. J. Transplant.* août 2011;11(8):1563–1569.
110. Andrade-Oliveira V, Campos EF, Goncalves-Primo A, Grenzi PC, Medina-Pestana JO, Tedesco-Silva H, et al. TLR4 mRNA levels as tools to estimate risk for early posttransplantation kidney graft dysfunction. *Transplantation.* 27 sept 2012;94(6):589–595.
111. Leventhal JS, Schröppel B. Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. *Kidney Int.* mai 2012;81(9):826–832.
112. Wu H, Noordmans GA, O'Brien MR, Ma J, Zhao CY, Zhang GY, et al. Absence of MyD88 signaling induces donor-specific kidney allograft tolerance. *J. Am. Soc. Nephrol.* oct 2012;23(10):1701–1716.
113. Zhang N, Krüger B, Lal G, Luan Y, Yadav A, Zang W, et al. Inhibition of TLR4 signaling prolongs Treg-dependent murine islet allograft survival. *Immunol. Lett.* 4 janv 2010;127(2):119–125.
114. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int.* juin 2005;67(6):2454–2461.
115. Testro AG, Visvanathan K, Skinner N, Markovska V, Crowley P, Angus PW, et al. Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-like receptor 4. *J. Gastroenterol. Hepatol.* janv 2011;26(1):155–163.
116. Wang S, Schmaderer C, Kiss E, Schmidt C, Bonrouhi M, Porubsky S, et al. Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling. *Dis. Model. Mech.* 1 janv 2010;3(1-2):92–103.
117. Braudeau C, Ashton-Chess J, Giral M, Dugast E, Louis S, Pallier A, et al. Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 15 juill 2008;86(1):130–136.

118. Methe H, Zimmer E, Grimm C, Nabauer M, Koglin J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation*. 15 nov 2004;78(9):1324–1331.
119. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen F-E, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular Characterization of NF-HEV, a Nuclear Factor Preferentially Expressed in Human High Endothelial Venules. *The American Journal of Pathology*. juill 2003;163(1):69.
120. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an Interleukin-1-like Cytokine that Signals via the IL-1 Receptor-Related Protein ST2 and Induces T Helper Type 2-Associated Cytokines. *Immunity*. nov 2005;23(5):479–490.
121. Moussion C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel ‘Alarmin’? Unutmaz D, éditeur. *PLoS ONE*. 6 oct 2008;3(10):e3331.
122. Cayrol C, Girard J-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2 juin 2009;106(22):9021–9026.
123. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur. J. Immunol.* avr 2009;39(4):1046–1055.
124. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon B-RP, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int. Immunol.* août 2008;20(8):1019–1030.
125. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J. Biol. Chem.* 7 sept 2007;282(36):26369–26380.
126. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, et al. Suppression of Interleukin-33 Bioactivity through Proteolysis by Apoptotic Caspases. *Immunity*. 17 juill 2009;31(1):84–98.
127. Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. Interleukin-33 Is Biologically Active Independently of Caspase-1 Cleavage. *J. Biol. Chem.* 17 juill 2009;284(29):19420–19426.
128. Bae S, Kang T, Hong J, Lee S, Choi J, Jhun H, et al. Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity. *J. Biol. Chem.* 9 mars 2012;287(11):8205–8213.
129. Lefrançois E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard J-P, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 31 janv 2012;109(5):1673–1678.

130. Mousson C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-Like Cytokine IL-33 Is Constitutively Expressed in the Nucleus of Endothelial Cells and Epithelial Cells In Vivo: A Novel 'Alarmin'? PLoS ONE. 6 oct 2008;3(10):e3331.
131. Akcay A, Nguyen Q, He Z, Turkmen K, Lee DW, Hernando AA, et al. IL-33 Exacerbates Acute Kidney Injury. JASN. 11 janv 2011;22(11):2057–2067.
132. Bao Y-S, Na S-P, Zhang P, Jia X-B, Liu R-C, Yu C-Y, et al. Characterization of Interleukin-33 and Soluble ST2 in Serum and Their Association with Disease Severity in Patients with Chronic Kidney Disease. J Clin Immunol. 1 juin 2012;32(3):587–594.
133. Bruneau S, Le Berre L, Hervé C, Valanciuté A, Kamal M, Naulet J, et al. Potential Role of Soluble ST2 Protein in Idiopathic Nephrotic Syndrome Recurrence Following Kidney Transplantation. American Journal of Kidney Diseases. sept 2009;54(3):522–532.
134. Yin H, Huang B, Yang H, Huang Y, Xiong P, Zheng F, et al. Pretreatment with soluble ST2 reduces warm hepatic ischemia/reperfusion injury. Biochemical and Biophysical Research Communications. 29 déc 2006;351(4):940–946.
135. Fagundes CT, Amaral FA, Souza ALS, Vieira AT, Xu D, Liew FY, et al. ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion. J Leukoc Biol. 2 janv 2007;81(2):492–499.
136. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, et al. Interleukin-33 Prevents Apoptosis and Improves Survival After Experimental Myocardial Infarction Through ST2 SignalingCLINICAL PERSPECTIVE. Circ Heart Fail. 11 janv 2009;2(6):684–691.
137. Rui T, Zhang J, Xu X, Yao Y, Kao R, Martin CM. Reduction in IL-33 expression exaggerates ischaemia/reperfusion-induced myocardial injury in mice with diabetes mellitus. Cardiovasc Res. 5 janv 2012;94(2):370–378.
138. Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 Is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. Hepatology. 2012;56(4):1468–78.
139. Liu Q, Turnquist HR. Implications for Interleukin-33 in solid organ transplantation. Cytokine. 27 mars 2013;
140. Yin H, Li X-Y, Jin X-B, Zhang B-B, Gong Q, Yang H, et al. IL-33 Prolongs Murine Cardiac Allograft Survival Through Induction of TH2-Type Immune Deviation. Transplantation. mai 2010;89(10):1189–1197.
141. Brunner SM, Schiechl G, Falk W, Schlitt HJ, Geissler EK, Fichtner-Feigl S. Interleukin-33 prolongs allograft survival during chronic cardiac rejection. Transplant International. 2011;24(10):1027–39.

142. Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, Liu Q, Castellana A, Isse K, et al. IL-33 Expands Suppressive CD11b+ Gr-1int and Regulatory T Cells, including ST2L+ Foxp3+ Cells, and Mediates Regulatory T Cell-Dependent Promotion of Cardiac Allograft Survival. *J Immunol.* 11 janv 2011;187(9):4598–4610.
143. Bendelac A, Schwartz RH. CD4+ and CD8+ T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature.* 5 sept 1991;353(6339):68–71.
144. Wingender G, Rogers P, Batzer G, Lee MS, Bai D, Pei B, et al. Invariant NKT cells are required for airway inflammation induced by environmental antigens. *Journal of Experimental Medicine.* 30 mai 2011;208(6):1151–1162.
145. Brennan PJ, Tatituri RVV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, et al. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nature Immunology.* 30 oct 2011;12(12):1202–1211.
146. Brigl M, Tatituri RVV, Watts GFM, Bhowruth V, Leadbetter EA, Barton N, et al. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *Journal of Experimental Medicine.* 9 mai 2011;208(6):1163–1177.
147. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang C-R, et al. Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using Cd1d Tetramers. *The Journal of Experimental Medicine.* 5 sept 2000;192(5):741.
148. Savage AK, Constantinides MG, Han J, Picard D, Martin E, Li B, et al. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity.* 19 sept 2008;29(3):391–403.
149. Wang X, Chen X, Rodenkirch L, Simonson W, Wernimont S, Ndonge RM, et al. Natural killer T-cell autoreactivity leads to a specialized activation state. *Blood.* 15 nov 2008;112(10):4128–4138.
150. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the ‘Swiss-Army knife’ of the immune system. *Current Opinion in Immunology.* juin 2008;20(3):358–368.
151. Coquet JM, Chakravarti S, Kyriakoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 12 août 2008;105(32):11287–11292.
152. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* févr 2010;10(2):103–110.
153. Li L, Huang L, Sung SJ, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol.* 1 mai 2007;178(9):5899–5911.

154. Lappas CM, Day Y-J, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J. Exp. Med.* 27 nov 2006;203(12):2639–2648.
155. Shimamura K, Kawamura H, Nagura T, Kato T, Naito T, Kameyama H, et al. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. *Cellular Immunology.* mars 2005;234(1):31–38.
156. Jukes J-P, Jones ND. Immunology in the Clinic Review Series; focus on host responses: invariant natural killer T cell activation following transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* janv 2012;167(1):32–39.
157. Toyofuku A, Yasunami Y, Nabeyama K, Nakano M, Satoh M, Matsuoka N, et al. Natural killer T-cells participate in rejection of islet allografts in the liver of mice. *Diabetes.* janv 2006;55(1):34–39.
158. Yasunami Y, Kojo S, Kitamura H, Toyofuku A, Satoh M, Nakano M, et al. Valpha14 NK T cell-triggered IFN-gamma production by Gr-1+CD11b+ cells mediates early graft loss of syngeneic transplanted islets. *J. Exp. Med.* 3 oct 2005;202(7):913–918.
159. Seino KI, Fukao K, Muramoto K, Yanagisawa K, Takada Y, Kakuta S, et al. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 27 févr 2001;98(5):2577–2581.
160. Jiang X, Kojo S, Harada M, Ohkohchi N, Taniguchi M, Seino K-I. Mechanism of NKT cell-mediated transplant tolerance. *Am. J. Transplant.* juin 2007;7(6):1482–1490.
161. Oh K, Kim S, Park S-H, Gu H, Roopenian D, Chung DH, et al. Direct regulatory role of NKT cells in allogeneic graft survival is dependent on the quantitative strength of antigenicity. *J. Immunol.* 15 févr 2005;174(4):2030–2036.
162. Jukes J-P, Wood KJ, Jones ND. Bystander activation of iNKT cells occurs during conventional T-cell alloresponses. *Am. J. Transplant.* mars 2012;12(3):590–599.
163. Liu R, La Cava A, Bai X-F, Jee Y, Price M, Campagnolo DI, et al. Cooperation of invariant NKT cells and CD4+CD25+ T regulatory cells in the prevention of autoimmune myasthenia. *J. Immunol.* 15 déc 2005;175(12):7898–7904.
164. Hongo D, Tang X, Dutt S, Nador RG, Strober S. Interactions between NKT cells and Tregs are required for tolerance to combined bone marrow and organ transplants. *Blood.* 9 févr 2012;119(6):1581–1589.
165. Rabadi MM, Ghaly T, Goligorsky MS, Ratliff BB. HMGB1 in renal ischemic injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 15 sept 2012;303(6):F873–F885.
166. Chen J, Duan L, Xiong A, Zhang H, Zheng F, Tan Z, et al. Blockade of IL-33 ameliorates Con A-induced hepatic injury by reducing NKT cell activation and IFN- $\gamma$  production in mice. *J. Mol. Med.* déc 2012;90(12):1505–1515.

167. Huang J-M, Hu J, Chen N, Hu M-L. Relationship between plasma high-mobility group box-1 levels and clinical outcomes of ischemic stroke. *Journal of Critical Care* 2012 (in press).
168. Ilmakunnas M, Tukiainen EM, Rouhiainen A, Rauvala H, Arola J, Nordin A, et al. High mobility group box 1 protein as a marker of hepatocellular injury in human liver transplantation. *Liver Transpl.* oct 2008;14(10):1517–1525.
169. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* oct 2008;7(10):827–840.
170. Martel C, Granger CB, Ghiteanu M, Stebbins A, Fortier A, Armstrong PW, et al. Pexelizumab fails to inhibit assembly of the terminal complement complex in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. Insight from a substudy of the Assessment of Pexelizumab in Acute Myocardial Infarction (APEX-AMI) trial. *Am. Heart J.* juill 2012;164(1):43–51.
171. Thuillier R, Favreau F, Celhay O, Macchi L, Milin S, Hauet T. Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy. *Transplantation.* 27 sept 2010;90(6):612–621.
172. Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;2011:5321-27.
173. Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, Funke B, Eichberger SN, Kaya Z, et al. High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation.* 24 juin 2008;117(25):3216–3226.
174. Jiang N, Zhang X, Zheng X, Chen D, Zhang Y, Siu LKS, et al. Targeted gene silencing of TLR4 using liposomal nanoparticles for preventing liver ischemia reperfusion injury. *Am. J. Transplant.* sept 2011;11(9):1835–1844.
175. Arslan F, Houtgraaf JH, Keogh B, Kazemi K, de Jong R, McCormack WJ, et al. Treatment with OPN-305, a humanized anti-Toll-Like receptor-2 antibody, reduces myocardial ischemia/reperfusion injury in pigs. *Circ Cardiovasc Interv.* avr 2012;5(2):279–287.
176. Lai L-W, Yong K-C, Lien Y-HH. Pharmacologic recruitment of regulatory T cells as a therapy for ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* mai 2012;81(10):983–992.

## **Annexe**

DIET-INDUCED INCREASE IN PLASMA OXIDIZED LDL PROMOTES EARLY FIBROSIS  
INVOLVING LOX-1 IN A RENAL PORCINE AUTO-TRANSPLANTATION MODEL

Chatauret N<sup>1</sup>, Giraud S<sup>1,4</sup>, Thierry A<sup>1</sup>, Rossard L<sup>1</sup>, Hebrard W<sup>2</sup>, Joffrion S<sup>1,4</sup>, Cau J<sup>1</sup>, Lerman LO<sup>3</sup>, Hauet T<sup>1,2,4</sup>, Favreau F<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> INSERM, U1082, Ischémie-reperfusion en transplantation rénale ; Université de Poitiers, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Poitiers, 86000, France; <sup>2</sup> INRA, Plate-forme IBiSA Le Magneraud, Surgères, 17700, France ; <sup>3</sup> Mayo Clinic, Division of Nephrology and Hypertension, Rochester, Minnesota, 55905, USA ; <sup>4</sup> CHU de Poitiers, Laboratoire de biochimie, Poitiers, 86000, France.

**Corresponding author:** Pr Thierry Hauet, Inserm U1082, 2 rue de la Milétrie, BP577, 86021 Poitiers Cedex, France ; email : [t.hauet@chu-poitiers.fr](mailto:t.hauet@chu-poitiers.fr)

**Running Title:** Hypercholesterolemia and kidney graft outcome

**Keywords:** Hypercholesterolemia, oxidized LDL, Ischemia Reperfusion, Kidney transplantation, LOX-1.

**Abbreviations:** BMP7: Bone Morphogenetic protein 7; CTGF: Connective Tissue Growth Factor; HAEC: Human aortic endothelial cell; HD: High-fat diet; IκBα: NFκB inhibitor α; IRI: Ischemia-reperfusion injury; LOX-1: Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor type I; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; MMP2: Matrix Metalloproteinase 2; ND: Normal Diet; NFκB: Nuclear Factor κ B; OxLDL: oxidized low density lipoprotein; PAEC: Porcine renal artery endothelial Cell, PBS: Phosphate Buffered Saline; ROS: Reactive Oxygen Species; TGFβ: Transforming growth factor β; Tx::Transplantation.

## Abstract

Hypercholesterolemia is increasingly present in kidney transplantation. This study aimed to characterize the effects of hypercholesterolemia on renal graft outcome, investigating the role of oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) and its receptor:lectin-like OxLDL receptor-1 (LOX-1). *In vitro*, we used primary renal artery endothelial cells subjected to hypoxia-reoxygenation to demonstrate that OxLDL induced LOX-1 expression and cellular death. *In vivo*, pigs underwent renal auto-transplantation 2 months after starting either a normal (n=6) or a hyperlipidemic diet (n=5). Kidney function and OxLDL levels were monitored as well as fibrosis, LOX-1 and TGF $\beta$  signaling pathways. Hyperlipidemic diet induced an increase in plasma OxLDL levels at the time of surgery associated with a greater graft fibrosis development and activations of renal LOX-1 and TGF $\beta$  signaling pathways. These data suggest a direct involvement of OxLDL in the hyperlipidemic diet -induced activation of the pro-fibrotic TGF $\beta$  pathway *via* LOX-1 signaling supported by a direct relationship between LOX-1 and TGF $\beta$  secretion observed in endothelial cells exposed to OxLDL. These results involve OxLDL and LOX-1 in the hyperlipidemic diet -induced fibrosis in transplanted kidneys, points towards LOX-1 as a potential therapeutic target and reinforce the need to control cholesterol levels in both the donor and recipient of kidney transplants.

## Introduction

In kidney transplantation, hypercholesterolemia is a co-morbidity factor more and more present due to the increasing use of marginal donors in response to organ shortage as well as the hyperlipidemic effects of immunosuppressors (1, 2). In general, hypercholesterolemia is associated with increased circulating levels of oxidized low density lipoproteins (OxLDL)(3). These modified lipoproteins are involved in endothelial cell dysfunctions(4), the first cell type subjected to ischemia and reperfusion injury (IRI) in organ transplantation.

In atherosclerosis, the lectin-like OxLDL receptor-1 (LOX-1) plays a direct role in plaque formation(5). This scavenger receptor is expressed on endothelial cells(6), smooth muscle cells and macrophages(7). In these cells, binding of OxLDL to LOX-1 leads to reactive oxygen species (ROS) generation combined with NF $\kappa$ B activation(8) leading to oxidative stress and endothelial activation(9). In addition to atherosclerosis, OxLDL and LOX-1 have been implicated in other pathological conditions. In cardiac fibroblasts, LOX-1 activation has been linked to collagen synthesis *via* an interaction between LOX-1-NADPH oxidase-TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) leading to an activation of the Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway(10) establishing a possible link between the OxLDL signaling pathway and tissue fibrosis. In the kidney, hyperlipoproteinemia and their subsequent oxidation are associated with glomerular capillary dysfunction in rodents and severe glomerulosclerosis in dyslipidemic patients due to lipid deposits in glomeruli(11, 12). Both LOX-1 and TGF $\beta$  have been involved in glomerulosclerosis(13, 14). Experimental studies in pigs have demonstrated that diet-induced hypercholesterolemia led to renal endothelial dysfunction associated with vascular and microvascular remodeling, inflammation, and kidney fibrosis(15, 16). Thus, hypercholesterolemia can affect endothelial cell function and induce tissue remodeling in the kidney.

In normocholesterolemic renal transplantation, endothelial activation is involved in inflammation and fibrosis development(17). Despite the known deleterious effects of hypercholesterolemia on endothelial cell function and the importance of this cell type in ischemia reperfusion injury (IRI), very few data are available on the consequences of hypercholesterolemia during organ transplantation(18). In living-donor kidney transplantation, donor hypercholesterolemia is associated with a reduction in the 2-year renal graft function(19). In deceased-donor transplantation, pre-transplant hypercholesterolemia in the recipient increases the rate of acute rejections(20) and the risk of late graft loss(21), whereas post-transplantation hypercholesterolemia is associated with chronic allograft dysfunction(22). Bosmans et al. have previously suggested a role of OxLDL in poor renal allograft outcome in hyperlipidemic recipients(23) indicating the possible involvement of OxLDL in kidney IRI in hypercholesterolemic conditions.

Although, dyslipidemia is recognized as a non-immunologic factor negatively affecting early and long-term graft function(20), the mechanisms involved remain to be clarified. In this study, we hypothesized that a high-fat diet (HD), started before transplantation and maintained after surgery, increased circulating levels of OxLDL and activated LOX-1 in renal endothelial cells leading to an increase in interstitial fibrosis development in auto-transplanted porcine kidneys.

## Materials and Methods

Fully detailed methods are presented in supplementary data.

***In vitro hypoxia reoxygenation model of primary porcine renal endothelial cells.*** In normoxic conditions, porcine artery cell cultures enriched in endothelial cells (PAEC) were treated for 2, 4, 8, 12 and 24 hours in culture medium supplemented with PBS -or – porcine OxLDL isolated by sequential ultracentrifugation and oxidized by UV-C irradiation. In hypoxia-reoxygenation conditions, cells in the OxLDL group were treated with OxLDL (125 µg/mL) for 24 hours, and then preserved in hypoxic conditions achieved by replacing the OxLDL-containing medium with unsupplemented University of Wisconsin preservation solution (UW, Viaspan®), for 24h at 4 °C in a hypoxic chamber. Cells were harvested either at the end of the hypoxia period (time: 0h) or after 2, 4, 8, 12 and 24 hours incubations in OxLDL-supplemented medium at 37°C in a humidified atmosphere. Cells in normoxic condition without OxLDL exposure as defined as CTL group. Lactate dehydrogenase (LDH) release was assayed by quantification of LDH activity in the medium (automatic analyzer Modular, Roche Diagnostic, France).

***In vitro incubation of OxLDL on human aortic endothelial cells: effect of LOX-1 antibody.*** For the time course of 24h, OxLDL's effects on LOX-1 and TGF β protein expressions (Western Blot) were evaluated in human aortic endothelial cells (HAECs) treated with either OxLDL (25 µg/mL) or culture medium. We evaluated TGFβ secretion in culture medium with a Duoset Elisa kit from R&D System (France) after incubation of HAEC with OxLDL supplemented or not with LOX-1 antibody (R&D System) at 0.2 or 2 µg/ml.

***RT-qPCR.*** Total mRNA from the different experimental groups was extracted using the Nucleospin® RNA XS columns (Macherey Nagel, Hoerd, France). Genomic DNA was removed on-column using a recombinant DNase and first-strand reverse transcription (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) was performed. Real-Time PCR assays

were performed on an ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) with porcine primers (supplementary methods). LOX-1 mRNA expression was normalized to RPLPO mRNA expression using the Pfaffl's mathematical model of relative quantification(24) (n=5 in each group).

***Animal model and Surgical procedures.*** Male Large White pigs were fed a standard (ND) or a high-fat diet (HD, standard diet + 20% Lard and 2% cholesterol) immediately after weaning and maintained until euthanasia(15). The renal auto-transplantation model was performed when the animals reached 37-46kg (2 months after weaning) as previously described according to regional ethical committee(17). Briefly, the left kidney was removed, flushed with 300 ml of UW preservation solution and preserved at 4°C in the same solution in static conditions for 24 hours. On the day of transplantation, the right kidney was removed and the left kidney grafted mimicking the nephron mass in transplanted situation. Four experimental groups were studied: ND: right kidneys removed before transplantation from ND-fed animals (n=7), HD: right kidneys removed before surgery from HD-fed animals (n=7), ND+Tx: transplanted kidneys removed from ND-fed animals 3 months after surgery (n=6), HD+Tx: transplanted kidneys removed from HD-fed animals 3 months after surgery (n=5). One transplanted HD pig died before completion of the study due to surgical complications and was not included in data analysis.

Plasma creatinine, cholesterol, LDL cholesterol and urinary proteins were measured using an automatic analyzer (Modular, Roche Diagnostic, France). Plasma renin activity (PRA) and systemic OxLDL (Diasorin, Antony, France), superoxide dismutase (SOD) activity (Cayman, Montigny Le Bretonneux, France) were measured in plasma following manufacturer's instructions.

***Immunohistopathological studies.*** As described previously, the level of tubulo-interstitial fibrosis were investigated using Sirius red staining(25) or tissue remodeling by

immunohistochemical assessment of vimentin expression (1/500, Cell Marque, Rocklin, CA, USA). LOX-1 expression was evaluated by immunohistofluorescence (1/200, Abcam, Paris, France).

**Western blotting procedure.** A standard Western blotting protocol was used as described previously(17, 26). Renal redox status was evaluated by assessing the protein expression of the superoxide anion forming enzymes: NADP(H) oxidase subunit Gp91phox.

**STATISTICAL METHODS.** Results are shown as mean  $\pm$  SEM. For the *in vitro* studies, LDH release, LOX-1 mRNA and proteins levels were compared between control values and between groups by a Mann-Whitney test. In the *in vivo* studies, we used repeated measure ANOVA for the time course experiments or a student T-test for two-group comparisons or a Mann-Whitney test when the variance was not equal between the groups. Correlation studies were performed using linear regression. All statistical analyses were performed using the NCSS Software (Version 07.1.20, Kaysville, UT, USA). Statistical significance was accepted for  $p < 0.05$ .

## Results

*In vitro*, OxLDL induced LOX-1 and promoted hypoxia-reoxygenation-induced cell death in PAECs. First, we confirmed that OxLDL was able to induce LOX-1 expression in PAEC. In these cells, OxLDL induced a time-dependent increase in LOX-1 protein expression ( $p<0.05$ , Figure1A). This increase in LOX-1 protein expression was preceded by increases in LOX-1 mRNA levels as early as 4h after OxLDL exposure ( $p<0.001$ ). LOX-1 mRNA levels remained significantly elevated after 8 and 24h of exposure ( $p<0.001$  and  $p<0.05$  respectively, Figure1B). OxLDL exposure in these normoxic conditions did not lead to a significant LDH release (Figure1C).

Second, we subjected the PAECs to a sequence of hypoxia-reoxygenation with OxLDL or PBS in the incubation medium. Hypoxia-reoxygenation (HR) in the PBS+HR group (mimicking normocholesterolemic donor and recipient) was associated with a tendency towards an increase in LOX-1 protein levels after 2h of reoxygenation ( $p=0.0571$  vs CTL, Figure1D). This tendency towards increased LOX-1 protein levels did not involve a significant change in LOX-1 mRNA levels (Figure1E). In contrast, in the OxLDL+HR group (mimicking hypercholesterolemic donor and recipient), OxLDL pre-treatment led to a significant 3.2-fold up-regulation of LOX-1 protein expression at the end of hypoxia (OxLDL+Hypoxia ;  $p<0.05$  vs CTL and vs PBS+Hypoxia, Figure1D). In the OxLDL+HR group, LOX-1 protein levels remained significantly elevated for up to 8h of reoxygenation with OxLDL in comparison to the CTL group and progressively returned to control values after 24h of reoxygenation with OxLDL (Figure1D). These increases in LOX-1 protein levels were associated with significant increases in LOX-1 mRNA levels at the end of hypoxia (OxLDL+Hypoxia:  $p<0.05$  vs CTL and PBS+Hypoxia) peaking after 2h of reoxygenation (OxLDL+HR R-2h:  $p<0.001$  vs CTL and PBS+HR R-2h, Figure1E).

The tendency towards an increase in LOX-1 protein expression after HR in the PBS+HR group was paralleled by increase in cell death evaluated by LDH release which peaked after 4h of reoxygenation (PBS+HR R-4h:  $p<0.001$  vs CTL, Figure1F). Interestingly, LDH release was significantly more elevated at the end of the hypoxia period in the OxLDL pre-treated cells in comparison to both PBS-pre-treated cells ( $p<0.001$ ) and control cells ( $p<0.001$ , Figure1F). In addition, OxLDL pretreatment followed by 24 hours of HR significantly increased the LDH released after 8, 12 and 24h of reoxygenation in comparison to the PBS+HR group ( $p<0.001$ ).

***In vivo, the high-fat diet promoted increases in plasma OxLDL levels, worsened proteinuria but did not affect creatinine excretion recovery after kidney transplantation.*** Although swine body weights were not significantly different between the groups on the day of surgery, HD animals exhibited a higher body weight at the end of the experiments (Table1,  $p<0.05$ ). After renal transplantation, plasma cholesterol levels were significantly increased in the HD+Tx group after the first week following transplantation ( $p<0.05$ ) and were further elevated 3 months post-transplantation (Figure2A). This was associated with an increase in plasmatic levels of LDL cholesterol ( $p<0.05$ , Table 1). In the HD+Tx animals plasma levels of OxLDL remained statistically more elevated at day 1 and 3 months after surgery in comparison with the ND+Tx animals ( $p<0.05$ , Figure2B and Table1). This enhanced oxidative stress in the HD+Tx group was supported by a concomitant decrease in plasma SOD activity by 3 months ( $p<0.05$ , Figure2C). Plasma renin activity was not different among the groups (Table1).

In terms of kidney function, although serum creatinine increased after transplantation, there was no difference among groups in its peak levels or recovery profile (Figure2D). Similarly, diuresis recovery was not different between the two groups (data not shown). HD pigs exhibited elevated baseline proteinuria, as well as 3 months after reperfusion compared to ND pigs ( $p<0.05$ , Figure2E). Linear regression analysis revealed a significant correlation between the circulating levels of OxLDL measured at day 1 post-surgery and the proteinuria determined at 3 months ( $r^2=0.91$ ,  $p=0.01$ ) in the HD group only (Figure2F).

**HD PROMOTED KIDNEY GRAFT FIBROSIS AND TISSUE REMODELING.** Three months after transplantation, red Sirius staining showed that HD+Tx cortex presented a 3-fold increase in fibrosis in comparison with the ND+Tx animals ( $p<0.001$ , Figure3A). Furthermore, HD+Tx pigs exhibited a higher number of vimentin-positive tubules supporting tissue remodeling (Figure3B) whereas before surgery, HD induced only a tendency towards an increase (supplementary FigureI).

**HD CONCOMITANTLY ACTIVATED LOX-1 AND TGF $\beta$  PATHWAYS.** As mentioned above, HD animals presented elevated plasma OxLDL levels in comparison to ND animals prior to transplantation ( $p<0.05$ , Table1). This increase in circulating levels of OxLDL was accompanied by a significant 2 fold increase in LOX-1 protein expression ( $p=0.029$ ) in the HD group, a concomitant 1.7-fold and 1.75-fold increases respectively in TGF $\beta$  and CTGF protein expressions (respectively  $p=0.028$  and  $p=0.012$ ) in renal tissue before transplantation (Figure4A-B).

Three months after kidney transplantation, circulating levels of OxLDL were further increased in the HD+Tx group in comparison to day 0 ( $p<0.05$ ) and ND+Tx group values ( $p<0.05$ ). Concomitantly to the increased levels of circulating OxLDL in the HD group, levels of both TGF $\beta$  ( $p<0.05$ ) and its downstream effector CTGF ( $p<0.05$ ) proteins were significantly increased in these animals in comparison to the ND+Tx group, whereas BMP-7 protein expression was decreased by 2-fold ( $p<0.05$ , Figure4C). Reduced Pro-MMP2 protein levels ( $p<0.05$ ) were observed in HD+Tx *IN COMPARISON TO ND+TX ANIMALS* (Figure4C).

The increase in circulating OxLDL levels in the HD+Tx group was accompanied by 2 fold- and 1.5- fold- upregulations of LOX-1 and Gp91phox protein levels respectively ( $p<0.05$  vs ND+Tx, Figure4D). This was associated with significant increases in NF $\kappa$ B and P38 protein expressions ( $p<0.05$ ) and a 4-fold decrease in the expression of the NF $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B- $\alpha$  ( $p<0.05$ , Figure4D), all of which have been implicated in the LOX-1 signaling pathway(10).

Immunohistofluorescence experiments revealed that LOX-1 was localized mainly on vascular structures and glomeruli in the kidneys before and after transplantation independently of the diet (Supplementary FigureII). We also observed by confocal analysis a co-localisation of LOX-1 and TGF $\beta$  around peritubular capillaries mainly in the high-fat diet group 3 months after surgery (supplementary FigureIII).

***LOX-1-blocking antibody inhibited the OxLDL-induced TGF  $\beta$  secretion in primary cultures of HAEC.*** To evaluate the direct role of OxLDL in the HD-induced TGF $\beta$  overexpression observed *in vivo*, we treated HAECs with OxLDL. OxLDL treatment led to respectively 1.6- and 3-fold increases in LOX-1 and TGF $\beta$  protein levels in comparison to PBS treated cells ( $p < 0.05$ , Figure5A). This was accompanied by a 1.6-fold increase in TGF $\beta$  levels in the culture medium (Figure5B). In contrast addition of LOX-1-blocking antibody in the medium prior to OxLDL treatment completely prevented the OxLDL-mediated induction of TGF $\beta$  secretion ( $p < 0.05$  vs OxLDL treatment without LOX-1 antibody).

## Discussion

We demonstrated that diet-induced hypercholesterolemia was associated with significant increases in circulating levels of OxLDL and renal LOX-1 expression before and after transplantation. These HD-induced increases were not associated with alterations in kidney function recovery after transplantation but led to a 2.5-fold increase in the interstitial fibrosis extent and enhanced proteinuria 3 months after surgery in the hypercholesterolemic animals. This increased fibrosis extent, in the HD-animals, was linked to concomitant activations of LOX-1 and TGF $\beta$  signaling pathways, suggesting a probable direct implication of the OxLDL-LOX-1 signaling pathway in the activation of the TGF $\beta$  pathway and in tissue fibrosis development. Immunohistochemical studies revealed that LOX-1 expression was mainly found in the vascular compartment, including the endothelium involving endothelial cells in the HD effect. The hypothesis of a direct involvement of the OxLDL-LOX1 signaling pathway in the activation of the TGF $\beta$  signaling pathway in the kidney is supported by *in vitro* results demonstrating that LOX-1 blocking prevented the OxLDL-induced increase in TGF $\beta$  secretion by arterial endothelial cells. Taken together, the increased fibrosis extent and over activation of the LOX1 and TGF- $\beta$  signaling pathways in hypercholesterolemic conditions suggest a poor long-term graft outcome in the HD animals.

Hypercholesterolemia increases LDL susceptibility to oxidation(27) and therefore production of plasmatic OxLDL(28, 29). Diet induced increases in circulating levels of OxLDL have been reported in pigs in the past(30). In this study, we hypothesized that OxLDL could directly exacerbate hypoxia-reoxygenation injury. To assess this hypothesis, we compared *in vitro* the effects of OxLDL exposure before and after hypoxia with PBS- rather than native LDL-treated cells to avoid the confounding effects of hypoxia/reoxygenation-mediated LDL oxidation previously reported in endothelial cells *in vitro*(31). In the present work, exposure of PAEC to OxLDL in normoxic conditions induced LOX-1 protein expression as previously

reported(7, 32) but failed to induced significant cell death in contrast to previous reports using the same dose range of OxLDL(33, 34). This discrepancy may reflect lower LDL oxidation levels obtained with the UV-C protocol used in our study in comparison to the copper sulfate oxidation method used in the other studies. In contrast during HR, OxLDL treatment pre- and post-hypoxia enhanced LDH release and cell death as early as the end of the hypoxic phase. OxLDL-mediated increases in HR-induced apoptosis have previously been reported in human coronary endothelial cells(35). In our study, OxLDL-mediated increase in LDH release was associated with an up-regulation in endothelial LOX-1 expression prior to hypoxia which was sustained during the hypoxia even in the absence of OxLDL. Altogether, these results suggest that hypercholesterolemia may enhance ischemia-reperfusion-induced endothelial injury in kidney transplantation *in vivo* via an increase in plasma OxLDL levels and both LOX-1 expression and signaling.

In order to evaluate this hypothesis *in vivo*, we investigated in pigs, fed with either a normal or a high-fat diet, the levels of plasma OxLDL and LOX-1 expression in renal tissue before and after kidney transplantation. Before transplantation, HD pigs presented significantly elevated levels of circulating OxLDL, proteinuria and increased intrarenal LOX-1, TGF $\beta$  and CTGF protein expressions. Immunofluorescent staining against-LOX-1 revealed a more intense staining in the endothelium of intrarenal arteries in HD as previously shown in hyperlipidemic pig kidneys(36, 37).

After transplantation in normocholesterolemic conditions, pigs exhibited a significant increase in plasmatic OxLDL levels at day 1 and 30 as previously reported for kidney IR in rodents(38) or suggested in human kidney transplantation by the presence of elevated levels OxLDL auto-antibodies(39). These increases in plasma OxLDL levels are in accordance with the well-characterized oxidative stress induced by the ischemia-reperfusion sequence in normocholesterolemic conditions(40). In hypercholesterolemic animals, plasma OxLDL and

SOD levels were further elevated and decreased respectively during the 3 months post-surgery indicating a greater oxidative stress in these animals. Oxidative stress is one of the major deleterious mechanisms involved in IRI and delayed graft function(41), yet HD did not significantly alter kidney function recovery evaluated by creatininemia or diuresis during the 3 month follow-up period. This monitoring window may have been too short to observe significant differences in graft function. Nonetheless, the HD animals presented significantly greater interstitial fibrosis and proteinuria 3 months after surgery in comparison to ND animals. Similar findings have been reported in uninephrectomized animals with a diet-induced hypercholesterolemia(42-44). Interestingly in the HD group, circulating levels of OxLDL, evaluated one day after transplant surgery, were significantly correlated with the proteinuria present 3 months later, suggesting a detrimental role of OxLDL on graft outcome. Plasma OxLDL levels may be a relevant parameter to monitor just before and after transplantation both in the donor and the recipient to predict graft outcome. Also, this suggests that therapeutic interventions aimed at reducing the levels of these modified lipoproteins should be started as soon as possible in the recipient.

Fibrosis is considered to be the major process leading to renal graft loss. In the present study, the HD-associated increase in fibrosis may be linked to the elevated levels of plasma OxLDL. Indeed, Hu et al. have established a link between LOX-1-NADPH oxidase and the TGF $\beta$ -mediated collagen synthesis in cardiac fibroblasts(10). *In vivo*, the direct involvement of LOX-1 in IRI and remodeling has been previously reported in normocholesterolemic mouse hearts(45, 46). In the present work, HD+Tx induced concomitant increases in LOX-1 and TGF $\beta$  signaling pathways represented by NF $\kappa$ B, phospho P38 and the gp91phox NAD(P)H oxidase subunit up-regulations and decreased I $\kappa$ B expression for the LOX-1 signaling pathway and by TGF $\beta$  and CTGF up-regulations as well as BMP-7 and Pro-MMP2 down-regulations for the TGF $\beta$  signaling pathway(47) indicating a reduced capacity for matrix

degradation giving rise to a pro-fibrotic milieu. TGF $\beta$  is a pivotal growth factor involved in several processes linked to IRI and fibrosis. These data suggest that the association between OxLDL, LOX-1 and TGF $\beta$  is present in kidneys of hypercholesterolemic donors and maintained in grafted kidneys in hypercholesterolemic recipients. These results were supported by colocalisation of TGF $\beta$  and LOX-1 expressions in HD+Tx animals around peritubular capillaries. To investigate the direct involvement of LOX-1 in the fibrosis development and TGF $\beta$  expression observed *in vivo*, we used primary human endothelial cells stimulated with human OxLDL. Using a blocking human LOX-1 antibody, we showed a significant decrease in TGF $\beta$  secretion induced by OxLDL in endothelial cells supporting a direct involvement of LOX-1 in the OxLDL-induced activation of the TGF $\beta$  pathways as previously suggested(10). The parallel increases in collagen and vimentin expressions in our study may partially be explained by TGF $\beta$  involvement in vimentin expression, a mesenchymal cell marker, indicating tissue remodeling and dedifferentiation of tubular cells towards mesenchymal cell types leading to fibrosis(48). These observations suggest a poor outcome of kidney graft in high-OxLDL conditions.

The proposed mechanism of diet-induced fibrosis in transplanted kidneys is summarized in Figure 5C. Briefly, in normocholesterolemic conditions, the ischemia-reperfusion associated with transplantation leads to an increase in TGF $\beta$  levels resulting in an increase in vimentin positive tubules and collagen production which are both involved in fibrosis development. In case of a high-fat diet, the increase in plasma OxLDL levels leads to LOX-1 pathway activation which in turn activates the TGF $\beta$  signaling pathway. This activation acts in synergy with the transplantation process to increase fibrosis. This proposed mechanism involving a direct relationship between LOX-1 and fibrosis development following ischemia-reperfusion is supported by recent reports indicating that LOX-1 abrogation reduced tissue remodeling in mice heart(49) and kidneys(50).

Our study was limited by the use of young pigs with a short term high-fat diet started before surgery, and by the relatively short duration of the post-transplant follow-up in comparison to the human disease. In addition, human renal transplantation is not only associated with dyslipidemia but also with immunosuppressor therapy or other concurrent or pre-existing pathophysiological conditions such as hypertension or diabetes which impair the renal microvasculature and likely modulate its response to transplantation. Nevertheless, the renal structure and function in the swine model are similar to human kidneys(51), and our results bear relevance and may shed light on the short-term negative impact of diet-induced increase in OxLDL circulating levels on renal IRI following transplantation. To our knowledge, this study is the first to report, in a large animal model, a link between hypercholesterolemia and fibrosis development in kidney transplantation involving OxLDL and the LOX-1 receptor.

In conclusion, the significant correlation between plasma OxLDL and proteinuria observed in the present work, as well as the concomitant activation of LOX-1 and TGF $\beta$  signaling pathways *in vivo* and the direct interaction between LOX-1 and TGF $\beta$  secretion *in vitro*, implicate OxLDL in the HD-induced fibrosis and tissue remodeling observed as early as 3 months after renal transplantation. Taken together, these results suggest that diet could affect graft outcome, identify LOX-1 as a therapeutic target of interest and emphasize the need to better control either cholesterol or OxLDL levels in both donor and recipient at the early stage of renal transplantation.

**Acknowledgements:**

This work has benefited from the facilities of ImageUP platform (University of Poitiers). We are grateful to Dr. Françoise Maupas-Schwalm, and Dr. Christine Millet for their advices, Dominique Lochon and Yvon Billon for their excellent technical assistance in this study. This study was supported by research grants from Société de Néphrologie (Subvention Amgen), Fondation transplantation, Conseil Général de la Vienne and Conseil Régional Poitou-Charentes. Nicolas Chatauret is a recipient of a FEDER grant (#34474).

**Disclosures:**

All the authors have no conflict of interest to declare.

## Figure Legends:

**Figure 1:** Effects of 2, 4, 8, 12 and 24 hours exposures to oxidized low density lipoprotein in normoxic (A, B and C) and hypoxia-reoxygenation (D, E and F) conditions in porcine renal artery endothelial cell (PAEC) cultures in comparison to PBS treatment (CTL) on LOX-1 protein and mRNA levels and LDH release: A and D) representative pictures and histograms of LOX-1 immunoblots (n=4); B and E) Results of RT-qPCR of LOX-1 mRNA expression; C and F) representative histogram of LDH release. Quantification of LOX-1 protein and mRNA and released LDH are represented by hatched bars for cells treated with OxLDL in normoxic conditions, as well as by grey bars for cells treated with OxLDL and by white bars for cells treated with PBS in hypoxia reoxygenation conditions. Values significantly different from the CTL group for each time point are indicated by †:  $p<0.05$ ; †††:  $p<0.001$  and from the PBS group by \*:  $p<0.05$ ; \*\*\*:  $p<0.001$ .

**Figure 2:** High-fat diet started 2 months before transplantation and maintained for 3 months after surgery led to increases in plasma cholesterol and OxLDL levels and a decrease in plasma superoxide dismutase activity in transplanted pigs. High-fat diet did not change graft function recovery assessed by plasma creatinine level monitoring, but was associated with a greater proteinuria measured 3 months post-surgery. A) Time course evolution of plasmatic total cholesterol levels measured on the day of transplantation (D0) and after surgery, in pigs fed either a normal (white) or a high-fat diet (grey); B) Time course evolution of plasma OxLDL levels C) Time course determination of plasma SOD activity. Values significantly different from the normal diet group are indicated by \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$  and from the D0 time point by †:  $p<0.05$ ; ††:  $p<0.01$ ; †††:  $p<0.001$ . D) Time course evolution of plasmatic creatinine measured on the day of transplantation (D0) and after surgery. E) Proteinuria levels in the two experimental groups at day 0 and 3 months after surgery; Values significantly different from the normal diet group are indicated by \*\*\*:  $p<0.001$ , and from D0 by †:

$p < 0.05$ . F) Linear regression of the plasmatic OxLDL levels measured at D1 and the proteinuria determined at M3 in the normal diet group (Left panel) and the high-fat diet group (Right Panel). The straight line represents the regression curve and dotted lines represent the 95% confidence interval.

**Figure 3:** High-fat diet increased renal interstitial fibrosis extent and the number of vimentin positive tubules in transplanted pigs as demonstrated respectively by Sirius red and vimentin staining 3 months after surgery. Representative pictures (200X) of typical Sirius red staining (A) in transplanted pigs fed a normal or a high-fat diet. Histogram represents the percentage of fibrosis extent between the normal diet (white) and high-fat diet groups (grey). Values significantly different from the normal diet group are represented by \*\*\*:  $p < 0.001$ . B) Representative pictures (200X) of vimentin staining revealed by Diaminobenzidine immunohistochemistry in transplanted pigs fed a normal or a high-fat diet. Arrows indicate glomerulus (Gl), tubules (Tl) and vimentin (Vim) localization. C) Histogram represents the quantification of the number of vimentin-positive tubules. Values significantly different from the normal diet group are represented by \*:  $p < 0.05$ .

**Figure 4:** High-fat diet led to increased LOX-1 and TGF $\beta$  expressions in native porcine kidneys. The diet was started 2 months before kidney recovery. A) Immunoblots and B) densitometric quantification of LOX-1, TGF $\beta$  and CTGF protein levels in kidney cortical samples. \*  $p < 0.05$  vs. Normal diet. High-fat diet concomitantly increased LOX-1 and TGF $\beta$  pathway activations in transplanted kidneys 3 months after surgery in comparison with transplanted animals fed a normal diet. Immunoblots and densitometric quantification reporting, in pigs fed a normal diet (white) and a high-fat diet (grey), protein expressions of: C) TGF $\beta$  signaling (TGF $\beta$ , CTGF, BMP-7) and matrix homeostasis (pro-Matrix MetalloProteinase 2, pro-MMP2); D) LOX-1 intracellular signaling (Gp91phox NADPH oxidase subunit, NF $\kappa$ B-I $\kappa$ B $\alpha$ , PhosphoP38). Values significantly different from the normal

diet group are represented by \*:  $p < 0.05$ .

**Figure 5:** LOX-1 antibody blocked TGF $\beta$  secretion induced by OxLDL *in vitro*. Effects of OxLDL incubation during 24h on human aortic endothelial cells on LOX-1 and TGF  $\beta$  protein expression (A), and on TGF $\beta$  secretion in culture medium with or without neutralizing antibody against LOX-1 (B) (n=3). Values significantly different from the culture medium without OxLDL are indicated by †:  $p < 0.05$ ; and from the culture medium without LOX-1 antibody by \$:  $p < 0.05$ . (C) Proposed mechanism of diet-induced fibrosis in transplanted kidneys. In normocholesterolemic condition, the ischemia-reperfusion associated with transplantation leads to an increase in TGF $\beta$  levels resulting in an increase in vimentin positive tubules and collagen production which are both involved in fibrosis development. Data from this study indicate that high-fat diet increases plasma OxLDL levels leading to LOX-1 pathway activation which in turn activates the TGF $\beta$  signaling pathway. This activation acts in synergy with transplantation to increase fibrosis development.

**Supporting information:**

Additional supporting informations may be found in the online version of this article and include supplemental materials and methods; supplemental Figure SI (High-fat diet tends to increase the number of vimentin-positive tubules in native kidneys before surgery) ; supplemental Figure SII (Immunofluorescence localization of LOX-1 in kidney cortical samples before (D0) and 3 months after transplantation (D90) of animals fed either a normal or a high-fat diet); and supplemental Figure SIII (High-fat diet increased the renal colocalisation of TGF  $\beta$  and LOX-1 expressions in transplanted animals 3 months after surgery).

## References

1. Kohnle M, Pietruck F, Kribben A, Philipp T, Heemann U, Witzke O. Ezetimibe for the treatment of uncontrolled hypercholesterolemia in patients with high-dose statin therapy after renal transplantation. *Am J Transplant* 2006;6(1):205-208.
2. Jardine AG, Holdaas H, Fellstrom B, Cole E, Nyberg G, Gronhagen-Riska C et al. fluvastatin prevents cardiac death and myocardial infarction in renal transplant recipients: post-hoc subgroup analyses of the ALERT Study. *Am J Transplant* 2004;4(6):988-995.
3. Duarte MM, Rocha JB, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clinical biochemistry* 2009;42(7-8):666-671.
4. Raman KG, Gandley RE, Rohland J, Zenati MS, Tzeng E. Early hypercholesterolemia contributes to vasomotor dysfunction and injury associated atherogenesis that can be inhibited by nitric oxide. *J Vasc Surg* 2011;53(3):754-763.
5. Mehta JL, Sanada N, Hu CP, Chen J, Dandapat A, Sugawara F et al. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circulation research* 2007;100(11):1634-1642.
6. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 1997;386(6620):73-77.
7. Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovascular research* 2006;69(1):36-45.
8. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M et al. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(17):12633-12638.

9. Vogel RA. Cholesterol lowering and endothelial function. *The American journal of medicine* 1999;107(5):479-487.
10. Hu C, Dandapat A, Sun L, Khan JA, Liu Y, Hermonat PL et al. Regulation of TGFbeta1-mediated collagen formation by LOX-1: studies based on forced overexpression of TGFbeta1 in wild-type and lox-1 knock-out mouse cardiac fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(16):10226-10231.
11. Grone EF, Walli AK, Grone HJ, Miller B, Seidel D. The role of lipids in nephrosclerosis and glomerulosclerosis. *Atherosclerosis* 1994;107(1):1-13.
12. Takemura T, Yoshioka K, Aya N, Murakami K, Matumoto A, Itakura H et al. Apolipoproteins and lipoprotein receptors in glomeruli in human kidney diseases. *Kidney international* 1993;43(4):918-927.
13. Ding G, van Goor H, Ricardo SD, Orlowski JM, Diamond JR. Oxidized LDL stimulates the expression of TGF-beta and fibronectin in human glomerular epithelial cells. *Kidney international* 1997;51(1):147-154.
14. Nagase M, Kaname S, Nagase T, Wang G, Ando K, Sawamura T et al. Expression of LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, in experimental hypertensive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(10):1826-1836.
15. Chade AR, Mushin OP, Zhu X, Rodriguez-Porcel M, Grande JP, Textor SC et al. Pathways of renal fibrosis and modulation of matrix turnover in experimental hypercholesterolemia. *Hypertension* 2005;46(4):772-779.
16. Chade AR, Rodriguez-Porcel M, Grande JP, Zhu X, Sica V, Napoli C et al. Mechanisms of renal structural alterations in combined hypercholesterolemia and renal artery stenosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003;23(7):1295-1301.

17. Favreau F, Thuillier R, Cau J, Milin S, Manguy E, Mauco G et al. Anti-thrombin therapy during warm ischemia and cold preservation prevents chronic kidney graft fibrosis in a DCD model. *Am J Transplant*;10(1):30-39.
18. Kasiske B, Cosio FG, Beto J, Bolton K, Chavers BM, Grimm R, Jr. et al. Clinical practice guidelines for managing dyslipidemias in kidney transplant patients: a report from the Managing Dyslipidemias in Chronic Kidney Disease Work Group of the National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. *Am J Transplant* 2004;4 Suppl 7:13-53.
19. Issa N, Stephany B, Fatica R, Nurko S, Krishnamurthi V, Goldfarb DA et al. Donor factors influencing graft outcomes in live donor kidney transplantation. *Transplantation* 2007;83(5):593-599.
20. Dimeny E, Tufveson G, Lithell H, Larsson E, Siegbahn A, Fellstrom B. The influence of pretransplant lipoprotein abnormalities on the early results of renal transplantation. *European journal of clinical investigation* 1993;23(9):572-579.
21. Hamar P, Muller V, Kohnle M, Witzke O, Albrecht KH, Philipp T et al. Metabolic factors have a major impact on kidney allograft survival. *Transplantation* 1997;64(8):1135-1139.
22. Wissing KM, Abramowicz D, Broeders N, Vereerstraeten P. Hypercholesterolemia is associated with increased kidney graft loss caused by chronic rejection in male patients with previous acute rejection. *Transplantation* 2000;70(3):464-472.
23. Bosmans JL, Holvoet P, Dauwe SE, Ysebaert DK, Chapelle T, Jurgens A et al. Oxidative modification of low-density lipoproteins and the outcome of renal allografts at 1 1/2 years. *Kidney international* 2001;59(6):2346-2356.
24. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 2001;29(9):e45.

25. Grimm PC, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Stern E, Jeffery J et al. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(6):1662-1668.
26. Favreau F, Zhu XY, Krier JD, Lin J, Warner L, Textor SC et al. Revascularization of swine renal artery stenosis improves renal function but not the changes in vascular structure. *Kidney international* 2010;78(11):1110-1118.
27. Das S, Snehlata, Das N, Srivastava LM. Role of ascorbic acid on in vitro oxidation of low-density lipoprotein derived from hypercholesterolemic patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2006;372(1-2):202-205.
28. Chade AR, Rodriguez-Porcel M, Grande JP, Krier JD, Lerman A, Romero JC et al. Distinct renal injury in early atherosclerosis and renovascular disease. *Circulation* 2002;106(9):1165-1171.
29. Bentley MD, Rodriguez-Porcel M, Lerman A, Sarafov MH, Romero JC, Pelaez LI et al. Enhanced renal cortical vascularization in experimental hypercholesterolemia. *Kidney international* 2002;61(3):1056-1063.
30. Holvoet P, Theilmeier G, Shivalkar B, Flameng W, Collen D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1998;18(3):415-422.
31. Bilenko MV, Khil'chenko AV, Konovalova GG, Lankin VZ. Effect of antioxidant probucol on cell-mediated LDL oxidation in vitro and in vivo. *Bulletin of experimental biology and medicine* 2003;136(2):126-128.
32. Apostolov EO, Basnakian AG, Yin X, Ok E, Shah SV. Modified LDLs induce proliferation-mediated death of human vascular endothelial cells through MAPK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(4):H1836-1846.

33. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobb LJ, Oh YK et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovascular research* 2010;88(2):360-366.
34. Li D, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000;20(4):1116-1122.
35. Li D, Yang B, Mehta JL. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *The American journal of physiology* 1998;275(2 Pt 2):H568-576.
36. Chade AR, Best PJ, Rodriguez-Porcel M, Herrmann J, Zhu X, Sawamura T et al. Endothelin-1 receptor blockade prevents renal injury in experimental hypercholesterolemia. *Kidney international* 2003;64(3):962-969.
37. Chade AR, Bentley MD, Zhu X, Rodriguez-Porcel M, Niemeyer S, Amores-Arriaga B et al. Antioxidant intervention prevents renal neovascularization in hypercholesterolemic pigs. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(7):1816-1825.
38. Kulah E, Tascilar O, Acikgoz S, Tekin IO, Karadeniz G, Can M et al. Oxidized LDL accumulation in experimental renal ischemia reperfusion injury model. *Renal failure* 2007;29(4):409-415.
39. Kandoussi AM, Glowacki F, Duriez P, Tacquet A, Fruchart JC, Noel C. Evolution pattern of auto-antibodies against oxidized low-density lipoproteins in renal transplant recipients. *Nephron* 2001;89(3):303-308.
40. Favreau F, Petit-Paris I, Hauet T, Dutheil D, Papet Y, Mauco G et al. Cyclooxygenase 1-dependent production of F2-isoprostane and changes in redox status during warm renal ischemia-reperfusion. *Free radical biology & medicine* 2004;36(8):1034-1042.

41. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364(9447):1814-1827.
42. Eddy AA. Interstitial fibrosis in hypercholesterolemic rats: role of oxidation, matrix synthesis, and proteolytic cascades. *Kidney international* 1998;53(5):1182-1189.
43. Joles JA, Kunter U, Janssen U, Kriz W, Rabelink TJ, Koomans HA et al. Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(4):669-683.
44. Brown SA, Brown CA, Crowell WA, Barsanti JA, Allen T, Cowell C et al. Beneficial effects of chronic administration of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1998;131(5):447-455.
45. Hu C, Chen J, Dandapat A, Fujita Y, Inoue N, Kawase Y et al. LOX-1 abrogation reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2008;44(1):76-83.
46. Hu C, Dandapat A, Chen J, Fujita Y, Inoue N, Kawase Y et al. LOX-1 deletion alters signals of myocardial remodeling immediately after ischemia-reperfusion. *Cardiovascular research* 2007;76(2):292-302.
47. Boor P, Floege J. Special Series: Chronic Kidney Disease Growth Factors in Renal Fibrosis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*.
48. Burns WC, Thomas MC. The molecular mediators of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) and their role in renal pathophysiology. *Expert reviews in molecular medicine* 2010;12:e17.
49. Lu J, Wang X, Wang W, Muniyappa H, Hu C, Mitra S et al. LOX-1 abrogation reduces cardiac hypertrophy and collagen accumulation following chronic ischemia in the mouse. *Gene Ther* 2012;19(5):522-531.

50. Lu J, Wang X, Wang W, Muniyappa H, Deshmukh A, Hu C et al. Abrogation of lectin-like oxidized LDL receptor-1 attenuates acute myocardial ischemia-induced renal dysfunction by modulating systemic and local inflammation. *Kidney international* 2012;82(4):436-444.
51. Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011;2011:532127.

**Table 1:**

Summary table of kidney function and blood metabolites of transplanted animals fed either a normal or a high-fat diet started 2 months before kidney transplantation (Day 0) and maintained for 3 months after surgery (M3).

|                                    | Day 0       |               | M3          |               |
|------------------------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
|                                    | Normal Diet | High-fat Diet | Normal Diet | High-fat Diet |
| Body weight (Kg)                   | 42.3±1.2    | 40.9±0.9      | 109.3±3.8   | 129.0±2.9 *   |
| Diuresis (ml/24h)                  | 2867±145    | 2567±88       | 3416±487    | 2166±364      |
| Creatinemia,<br>(μmol/L)           | 95±2        | 99±5          | 197±22      | 184±6         |
| LDL cholesterol<br>(g/L)           | 0.42±0.01   | 0.38±0.02     | 0.52±0.10   | 1.33±0.24*    |
| Oxidised LDL<br>(ng/mL)            | 15.6±9.4    | 200.9±113.9*  | 78.0±29.3   | 489.9±150.6†* |
| Plasma renin<br>activity (ng/ml/h) | 0.45±0.15   | 0.80±0.19     | 0.39±0.08   | 0.24±0.06     |
| Plasma SOD<br>activity (U/mL)      | 10.3±3.9    | 10.9±3.0      | 37.9±7.4 †  | 22.2±7.7      |

\*p<0.05 vs Normal diet. †p<0.05 vs Day 0.

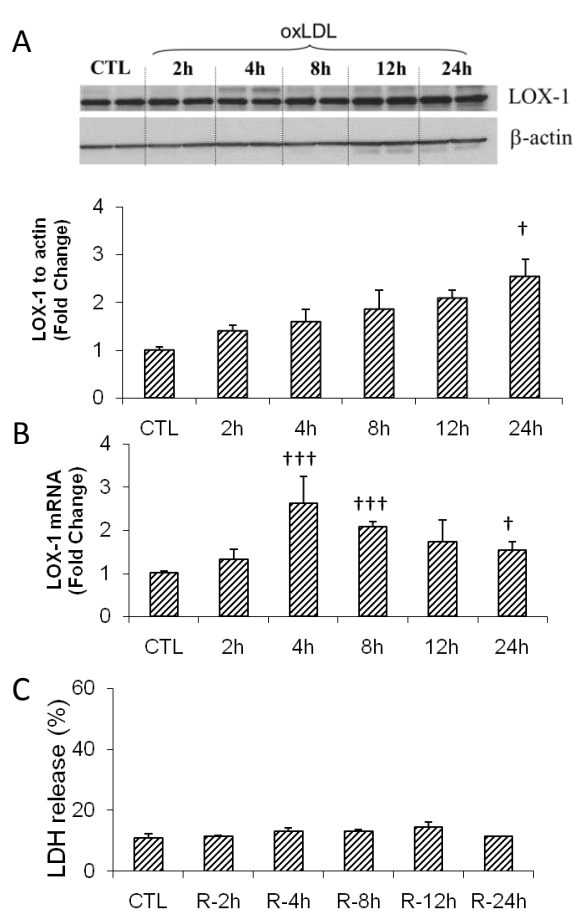
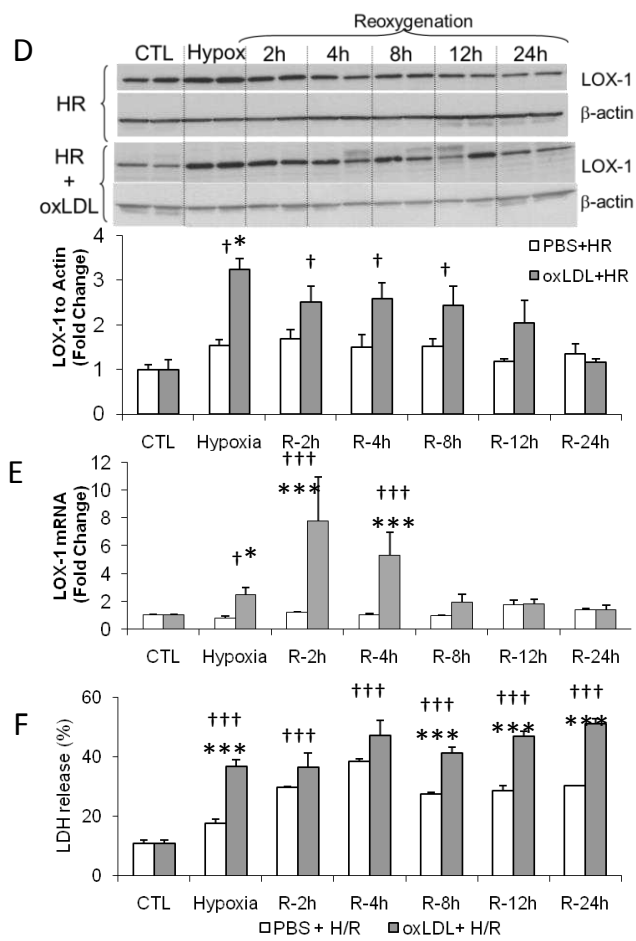


Fig 1



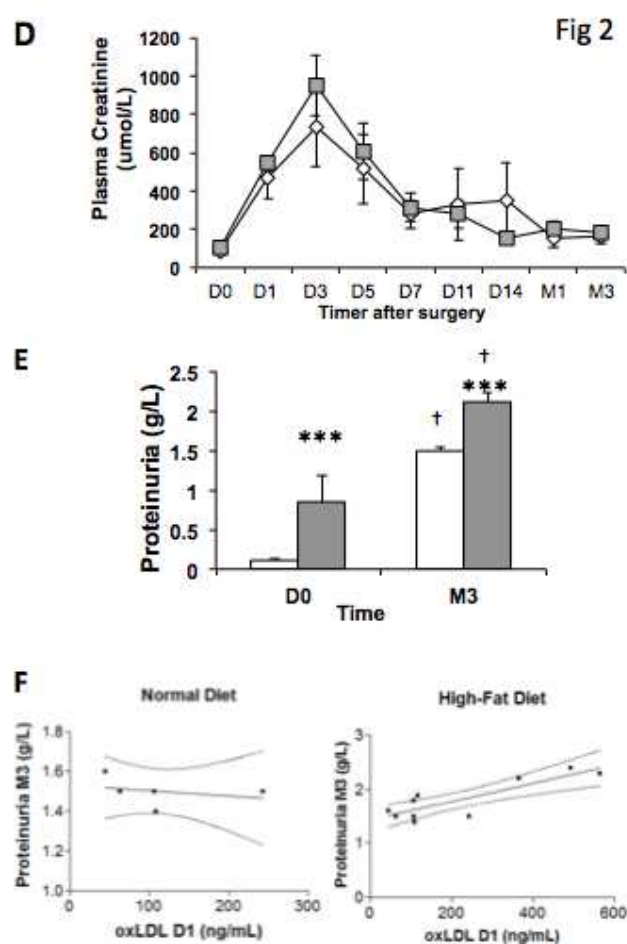
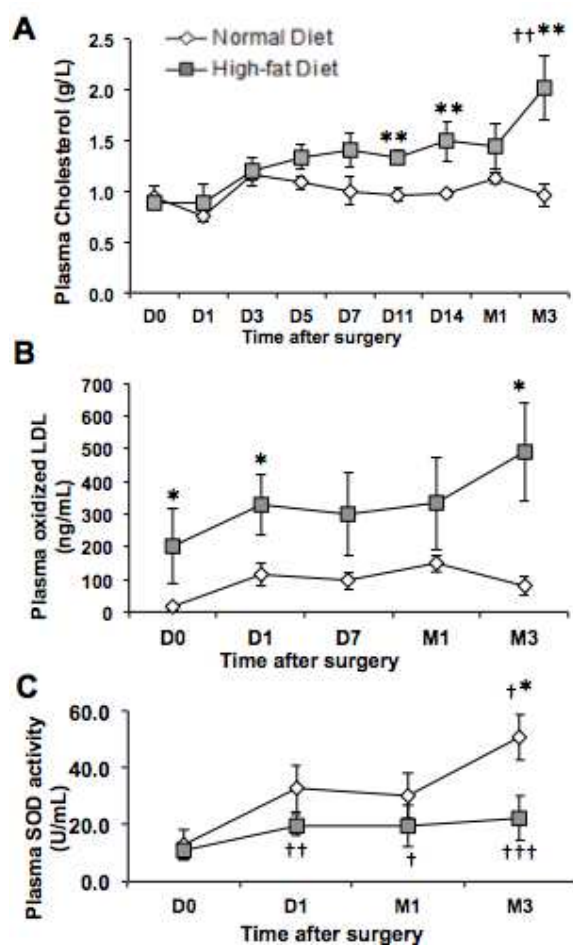
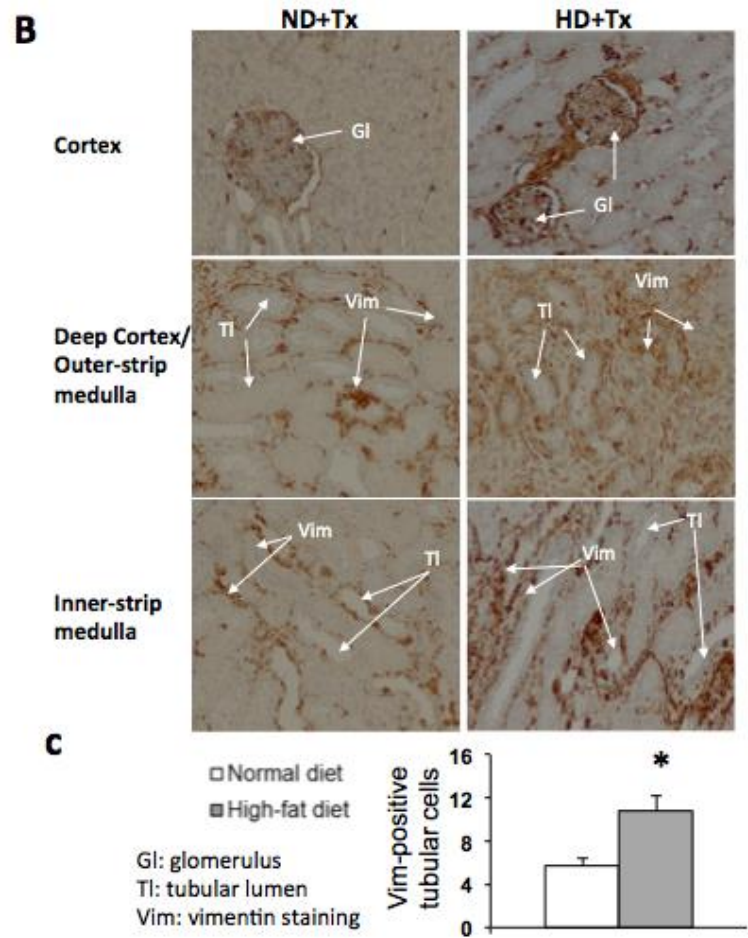
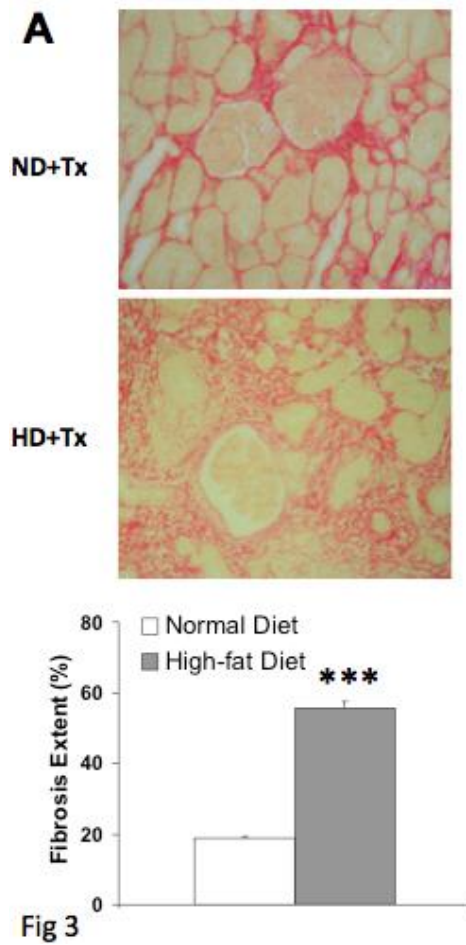


Fig 2



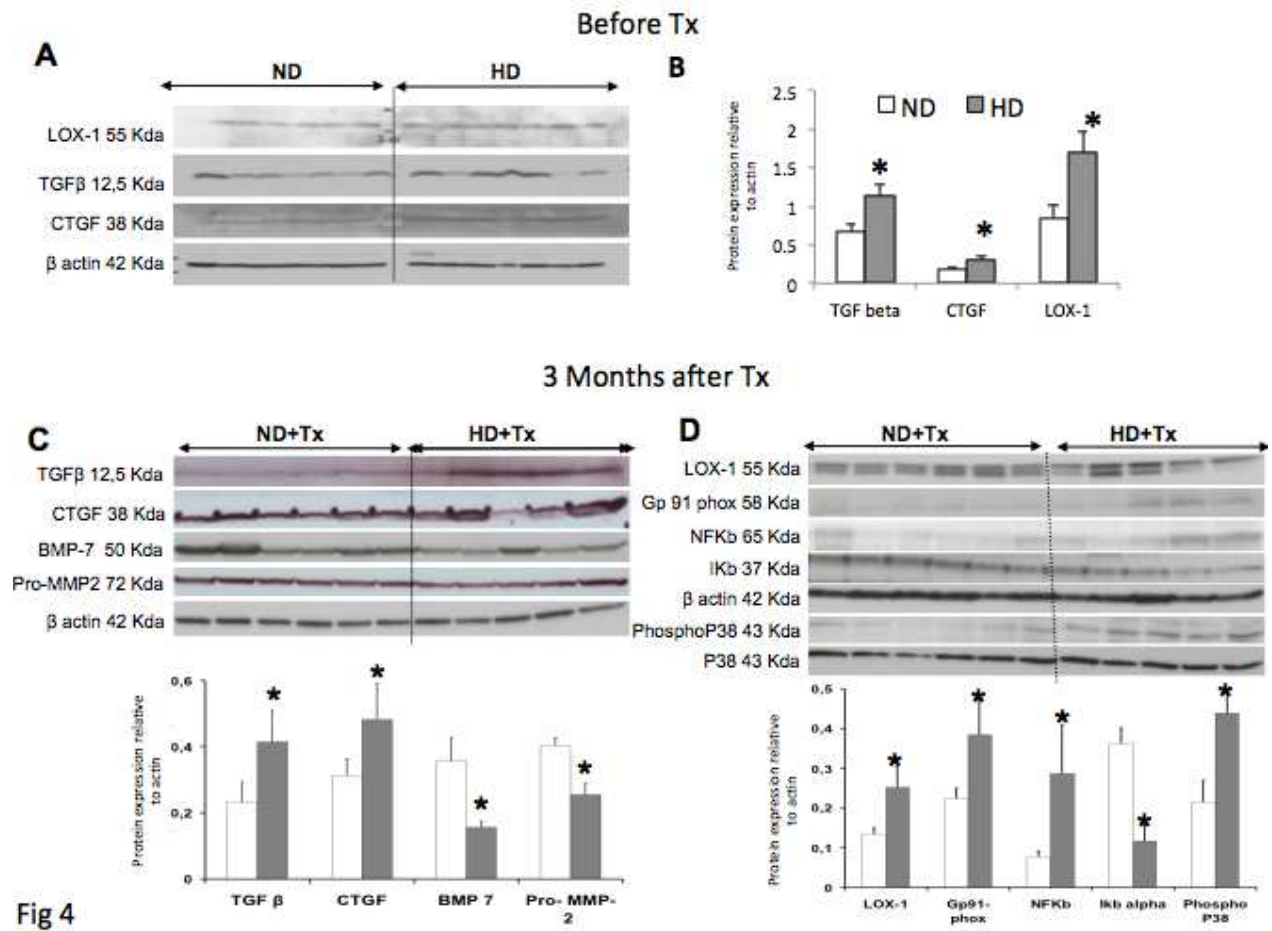
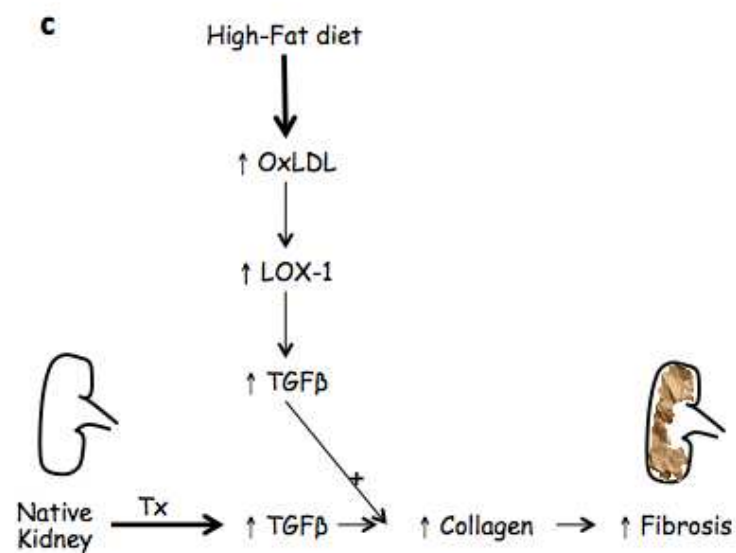
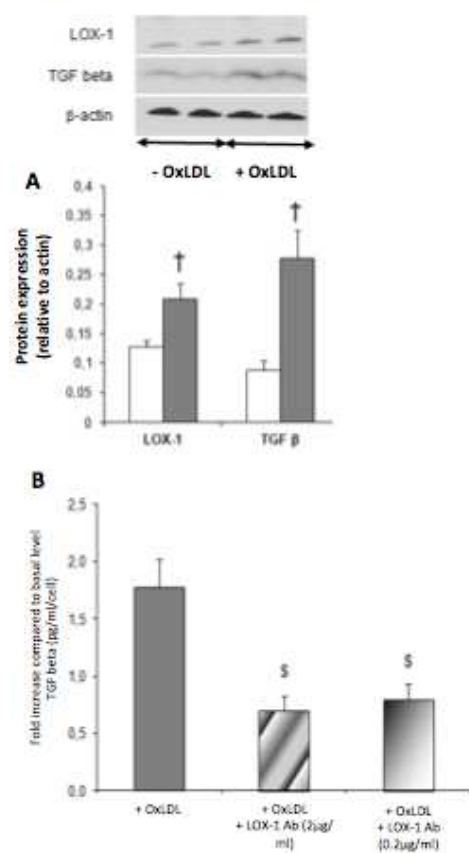
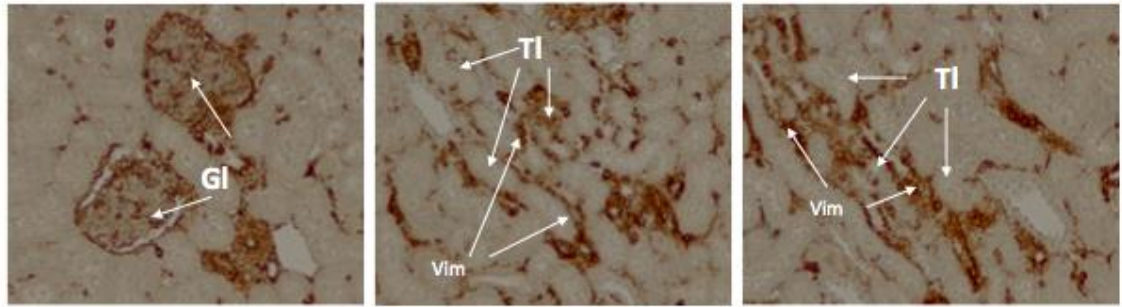
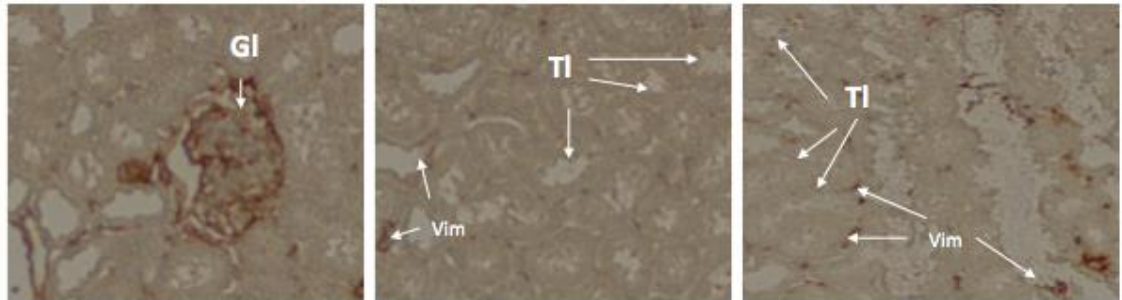


Fig 4

Fig 5

□ Incubation 24h – OxLDL (25 µg/ml)  
 ■ Incubation 24h + OxLDL (25 µg/ml)



**A**High-fat  
dietNormal  
diet

Gl: glomerulus  
Tl: tubular lumen  
Vim: vimentin staining

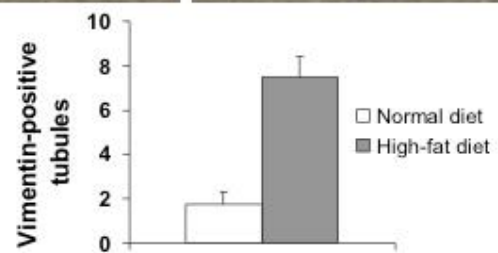
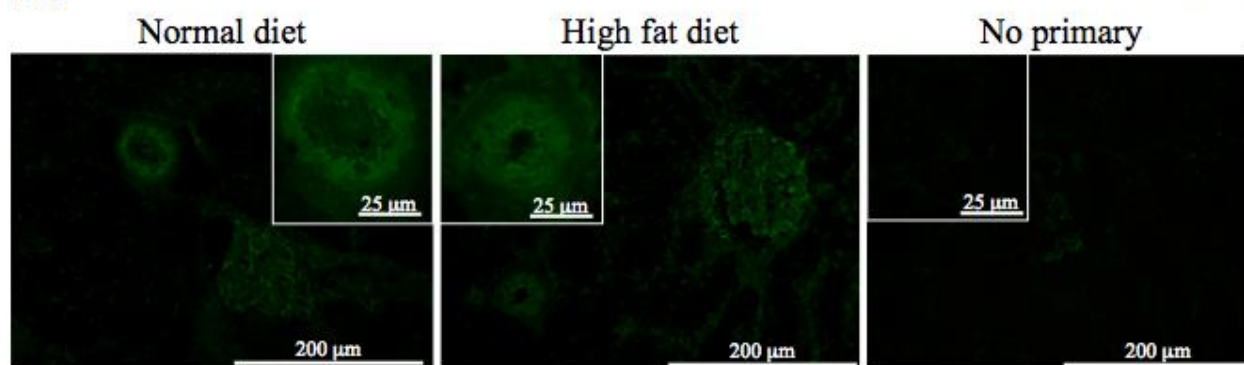
**B**

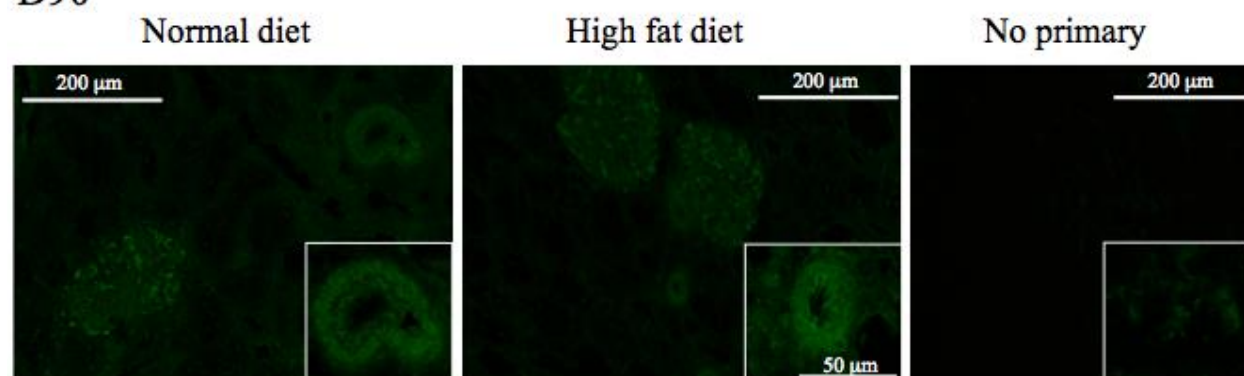
Fig. S1

D0

Fig. SII



D90



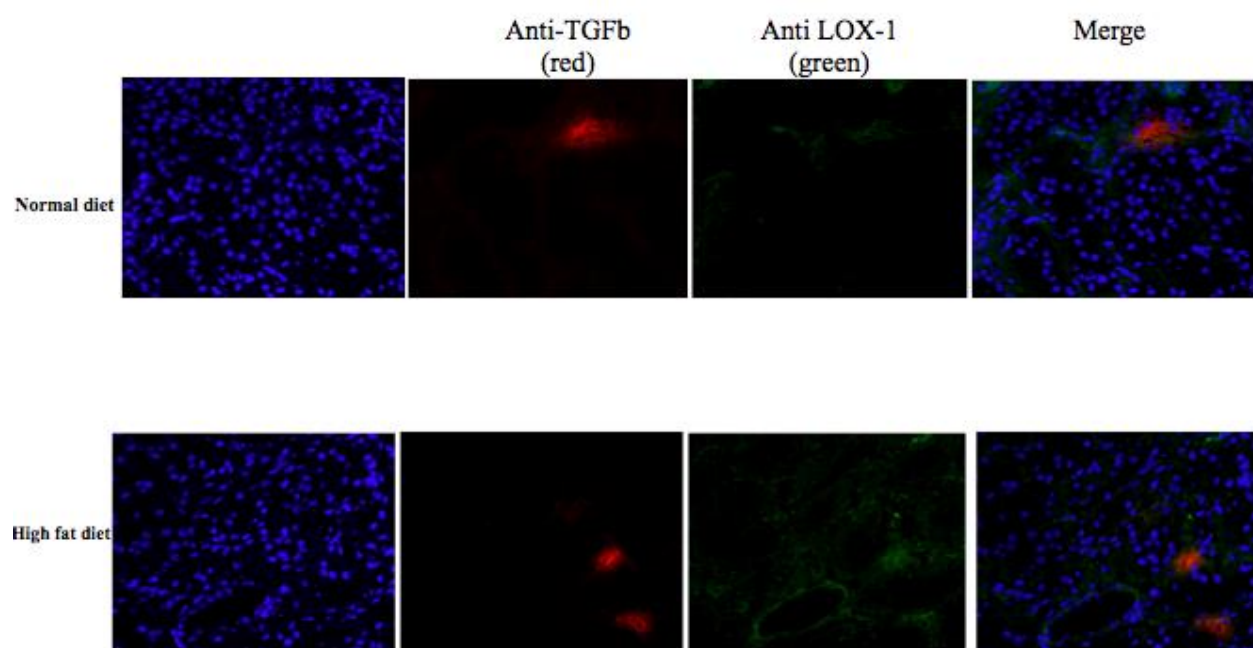


Fig. SIII

## Résumé

### **Implication de l'immunité innée au cours des phénomènes d'ischémie reperfusion: rôle de la voie IL-33/ iNKT**

Les lésions d'ischémie reperfusion (IR) sont indissociables de la transplantation et leur sévérité impacte sur le devenir du greffon. Les mécanismes physiopathologiques de ces lésions restent méconnus. Les molécules HMGB1 et IL-33 sont des alarmines, capables d'initier la réponse inflammatoire et pourraient être de potentiels biomarqueurs de l'IR. Le porc est un modèle pertinent d'IR. Les cellules iNKT étant une composante de l'immunité innée impliquée dans l'IR, nous avons d'abord identifié et caractérisé ces cellules dans le sang périphérique du porc puis montré qu'elles étaient ciblées par l'IL-33. Nous avons ensuite cherché à déterminer le rôle des alarmines après IR en transplantation rénale chez l'homme. Les excrétions urinaires d'HMGB1 et d'IL-33 sont augmentées précocement après la reperfusion et les taux urinaires et sériques d'IL-33 sont corrélés avec la durée d'ischémie froide. *In vitro*, les cellules veineuses ombilicales humaines soumises à une séquence d'hypoxie libèrent de l'HMGB1 et de l'IL-33, alors que seule cette dernière est produite durant la phase de réoxygénation. De plus, nous avons montré que les leucocytes périphériques des receveurs étaient ciblés par HMGB1 et IL-33, comme en témoigne l'augmentation des transcrits de leurs récepteurs. Nous avons enfin mis en évidence que les cellules iNKT, ciblées par l'IL-33 mais pas par HMGB1, étaient activées une heure après transplantation. Ces résultats confortent l'hypothèse d'un rôle de l'IL-33 en tant que médiateur de la réponse immunitaire innée au cours de l'IR rénale chez l'homme.

**Mots clés :** transplantation rénale, immunité innée, alarmines, cellules iNKT.