UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

EA 4245 T2I Transplantation, Immunologie, Inflammation

THÈSE présentée par :

Sally AL HAJJ

soutenue le : **28 Janvier 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Immunologie

Effets des concentrations élevées en Chlorure de Sodium sur les fonctions immunitaires des Cellules Dendritiques

THÈSE dirigée par :

BARON Christophe	Professeur, Université de Tours
HALIMI Jean-Michel	Professeur, Université de Tours

RAPPORTEURS :

BAMOULID Jamal	Professeur, Université de Bourgogne Franche-Comté
DURRBACH Antoine	Professeur, Université de Paris-Sud XI

JURY :

BAMOULID Jamal	Professeur, Université de Bourgogne Franche-Comté
BARANEK Thomas	Maître de Conférences, Université de Tours
DURRBACH Antoine	Professeur, Université de Paris-Sud XI
HALIMI Jean-Michel	Professeur, Université de Tours

MEMBRE INVITÉ :

BARON Christophe	Professeur, Université de Tours

« Dans le régime des âmes, il faut une tasse de science, un baril de prudence et un océan de patience »

Saint François de Sales

Remerciements

Une thèse ne veut pas forcément dire trois ans de recherche, passées de notre vie, ni juste un engagement de rigueur scientifique ou une épreuve, un défi… Au-delà, ma thèse fut un chemin de sagesse, d'intrépidité, une loupe continue de mémoire et d'exercices qui m'a permis de me forger dans ce milieu de recherche ainsi que de côtoyer des encadrants et collègues formateurs et enrichissants. Je tiens à remercier toutes les personnes auprès de qui, j'ai pu accomplir mon travail de thèse.

Chers membres du jury, Pr. Durrbach, Pr. Bamoulid, et Dr. Baranek, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Chers directeurs de thèses : Pr. Christophe Baron, avec qui chaque réunion était un cours approfondi de sciences, de culture, de savoir et surtout de valeurs humaines rarissimes de nos jours, tous mes remerciements pour ton encadrement et accueil généreux au sein du laboratoire T2I, grâce-à toi j'ai appris d'innombrables choses, je te serai toujours reconnaissante. Et Pr. Jean-Michel Halimi, je vous remercie pour votre confiance, votre enthousiasme et vos encouragements durant ces trois dernières années, vous étiez didactique et opérationnel à tous moments.

Je tiens à remercier également Philippe Gatault pour son soutien et sa confiance, ce fut agréable de travailler avec toi, d'avoir pu rencontrer Carole et tes 4 petits daltons; Roxane Lemoine, la chercheuse expérimentée d'une grande rigueur, merci pour tout; Mathias Büchler, merci pour votre bonne humeur et votre valorisation. Stéphanie Chadet, dès mon premier jour au labo tu m'as appris beaucoup de choses, j'ai même des protocoles de manips nommés « d'après Stéphanie », tu ne te rends pas compte combien ton soutien est formateur, tu as beaucoup de valeurs. Audrey, tes post-it décorés vont me manquer, avec ton super talent de dessin, je suis sûr que Sarah et Daniel se sentent aux beaux-arts, ta bienveillance et ton esprit scientifique au labo m'ont apportés beaucoup de support. Fabrice

Ivanes et Denis Angoulvant merci pour votre partage et vos échanges lors des réunions, ainsi que pour votre incitation à élargir mon réseau de recherche.

Je dirais encore merci…

À Nora, la belle fleur de la savane, qui a parfumé mon quotidien à l'essence de douceur et d'empathie; Lucille, la cavalière exemplaire qui confronte sans relâche les impasses de la vie; Marie-May ta présence rapporte des vagues de joie à tout le monde; Wafa ton bonheur m'apaise le cœur; Lauriane, le bébé génie, sérieuse à fond quand il le faut tout en gardant son grain de folie; Roseline, à vrai dire l'encyclopédie du bien-être et du savoir-vivre, nos moments partagés furent pour moi un grand plaisir; Claudie, Yoshi, le turbot qui enchaîne l'enthousiasme au cœur de l'ennui; Marie la schtroumpfette qui ne s'empare pas de son vin rosé; Laura l'ange silencieux tout discret; Ellena merci pour ton soutien aussi; Annabelle qui a un extérieur d'acier mais un cœur en velours; Eloi le maître de scène, tu mets tout le monde à l'aise, Mika, d'après le proverbe l'ami de ton ami est ton ami ainsi tu devins mon ami aussi, Aline, Caroline, Romane, Elodie Standley, Charlotte nouvellement mariée, Claire ma copine de grossesse, Nicolas qui est toujours à l'écoute, Thibaud le chercheur pilote pâtissier, Linda espérant que j'écoute ta musique de violon un jour, Ihab merci pour ton accueil agréable et notre collaboration, l'équipe BCR (Marion, Eric et Julie) toute en dynamisme, équipe GICC (Diana d'amour, Claire, Quentin, Laurie , David…) avec de supers moments passés en congrès et formations, Alexandre de l'équipe CEPR, merci pour ton aide et de toujours prendre de mes nouvelles; Julien et Sonia pour m'avoir apporté votre aide pour la microscopie électronique; Christophe Randier merci pour ton être chaleureux, Bernadette du service de néphrologie, à chaque passage pour récupérer des échantillons tu étais là pour m'accueillir avec ton grand sourire, médecins et infirmières de l'EFS de Tours et Poitiers, ainsi que les chers donneurs de sang sans qui je n'aurais pu réaliser mes expériences; Carole je n'oublierais pas ta gentillesse qui fait partie de ta nature.

Et toute une liste de belles rencontres qui m'ont tellement enrichie.

Mes parents, ma famille, vous étiez ma force motrice au-delà des frontières. Votre soutien et vos encouragements m'ont permis d'atteindre ce niveau d'éducation. Papa merci de croire en moi et de me transmettre ta haute capacité de gestion. Et maman, si j'ai tant d'ambition dans la vie, c'est grâce à ton flux d'énergie.

Ibrahim, mon mari, ma source de joie. Je te remercie mon chéri, pour tes réconciliations, ton encouragement continu, et ta patience pour mes nuits passées au labo. Merci pour le soutien de ta famille qui est devenue la mienne aussi. Je t'aime à l'infini.

Et enfin à Koray mon petit, le plus beau cadeau que m'a offert la vie. Je suis désolée si mes journées de labeur t'ont apporté des ennuis. Dans deux mois après ma soutenance de thèse tu seras parmi nous aussi…

Résumé

En réponse à des apports alimentaires élevés en sodium, de nombreux tissus corporels retiennent les ions Na^+ pendant de longues périodes pour atteindre des concentrations allant jusqu'à 200 mM. Des études récentes suggèrent que le système immunitaire pourrait être un médiateur qui relie l'apport élevé en sodium avec le développement de plusieurs maladies cardiovasculaires ou la progression de certains cancers. Les effets de fortes concentrations de sodium sur les cellules du système immunitaire sont encore mal connus notamment sur les cellules dendritiques (DC) humaines.

Nous avons testé l'effet d'un milieu enrichi en chlorure de sodium sur les propriétés immunitaires de DC humaines. Les DC ont été dérivées de monocytes $CD14^+$ provenant de donneurs sains, puis stimulées par le lipolpolysaccharide (LPS), dans un milieu enrichi ou non en sodium (de 140 à 200 mM) avant d'être analysées.

Les DC cultivées à des concentrations élevées de Na^+ restent viables jusqu'à 200 mM. En réponse au LPS et en présence d'une forte concentration en [Na^+], la maturation, le chimiotactisme vis-à-vis du CCL19, la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS par les DC ont été inhibés. Conformément à ces résultats, nous rapportons que la capacité d'allostimulation des DC était également diminuée. Enfin, nos données indiquent que ces effets sont dépendants de la phosphorylation de SGK1 (Serum and Glucocorticoid induced Kinase-1) et des kinases ERK 1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases).

Ces résultats indiquent que des concentrations élevées en sel inhibent les principales fonctions effectrices des DC humaines et suggèrent que les effets proinflammatoires rapportés antérieurement du sodium sur les cellules T pourraient être contrebalancés par la régulation négative des DC. Ainsi, les effets d'un régime riche en sodium sur la réponse immunitaire apparaissent plus complexes qu'on ne le pensait auparavant.

Mots clés: Concentrations élevées de sodium, cellules dendritiques, fonctions immunitaires, stimulation, maturation.

Abstract

Recent evidence showed that in response to elevated sodium dietary intakes, many body tissues retain Na^+ ions for long periods to reach concentrations up to 200 mM. Recent studies suggested that the immune system might be the bridge linking high sodium intake to several cardiovascular diseases and cancer progression as well. However, the studies about the effects of sodium on immunity brought about contrasted results. So far the effects of sodium on human dendritic cells (DCs) remain unknown.

Considering their central role in the immune response, we tested how sodium chloride-enriched medium influences the immune properties of human DCs. DCs were derived from $CD14^+$ monocytes from healthy donors and then stimulated by LPS, in sodium-enriched medium (from 140 up to 200 mM) and finally analyzed.

We found that DCs cultivated in high Na^+ concentrations remain viable and maintain the expression of DC markers up to 200 mM. In response to LPS, their maturation, their chemotaxis toward CCL19, their production of pro-inflammatory cytokines and ROS were inhibited by high [Na^+]. In line with these results, we report that the T-cell allostimulatory capacity of DCs was also inhibited. Finally our data indicate that these effects were mediated through the phosphorylation of SGK-1 (serum and glucocorticoid induced kinase-1) and ERK1/2 kinases.

Our results raised the possibility that the effects of sodium on T-cells might be counterbalanced by its ability to downregulate DC activation. Therefore the effects of high sodium diet on the immune response might be more complex than previously thought.

Keywords: High sodium concentrations, dendritic cells, immune functions, stimulation, maturation.

Liste des Publications et Communications

PUBLICATION (Travail de thèse) :

Article publié en premier auteur

- **High extracellular sodium chloride concentrations induce resistance to LPS signal in human dendritic cells**. (2023)

Sally Al-Hajj, R. Lemoine, S Chadet , A Goumard, L Legay, E Roxburgh, A Heraud, N Deluce, L Lamendour, Y Gallais, J Burlaud-Gaillard, P Gatault, M Buchler, S Roger, JM Halimi, C Baron. Cellular Immunology. Jan 2023, 384, 104658. **Impact factor: 4.868**

PUBLICATIONS (Autres Travaux) :

Articles publiés

- **CMV-infected kidney grafts drive the expansion of blood-borne CMV-specific T cells restricted by shared class I HLA molecules *via* presentation on donor cells.** (2018)

P Gatault, **S Al-Hajj**, J Noble, E Chevallier, M Piollet, C Forconi, C Gaudy-Graffin, G Thibault, E Miquelestorena-Standley, JM Halimi, M Büchler, R Lemoine, C Baron.

Am J Transplant. 2018 Aug; 18(8):1904-1913. **Impact factor: 6.493**

- **Polymorphism in programmed cell death 1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors.** (2017)

C Forconi, P Gatault, E Miquelestorena-Standley, J Noble, **S Al-Hajj**, R Guillemain, M Stern, Hoffmann T, Prat L, C Suberbielle, E Masson, A Cesbron-Gautier, C Gaudy-Graffin, Goudeau A, Thibault G, Ivanes F, Guibon R, I Kazma, Y Lebranchu, M Büchler, A Magnan, JM Halimi, C Baron. **J Heart Lung Transplant**. 2017 Mar;36(3):315-324. **Impact factor : 7.955**

Article soumis en co-premier auteur

- **$CD4^+$ T-cells preactivated with allogeneic dendritic cells derived from IL10-treated monocytes are devoid of regulatory properties**.

I Kazma, **S Al-Hajj**, W Benakouche, R Guibon, M Büchler, JM Halimu, P Gatault, R Lemoine, and C Baron.

COMMUNICATIONS :

Communications orales

- **High Sodium concentration modulates dendritic cell immune functions**.

Sally Al-Hajj, A Goumard, A Heraud, S Georgault, J Burlaud-Gaillard, C Hoarau, P Gatault, M Buchler, R Lemoine, JM Halimi, C Baron. 28th European meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection: Barcelona, Spain, 2018.

- **Effect of sodium chloride on dendritic cell functions.**

Sally Al-Hajj, R Lemoine, Audrey Heraud, C Lefort, L Lamendour, N Deluce, L Benoist, M Buchler, P Gatault, , JM Halimi, C Baron. 26th European meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection: Paris, France, 2016.

Communications affichées

- **Human dendritic cells behave differently under high sodium concentration**.

S Al-Hajj et al. Annual Meetings of the French Society for Immunology (SFI) and the French Cytometry Association: Reims, France, 2017.

- **Sodium electrolytes change LPS-stimulated dendritic cell immune response.**

S Al-Hajj et al. 11th International Meeting of the French Society of Hypertension: Paris, 2017.

- **L'effet du chlorure de sodium sur les fonctions des cellules dendritiques.**

Effet de concentrations élevées de [NaCl] sur l'orientation de la réponse immunitaire.

S Al-Hajj et al. 29th & 30th Seminar of Biotechnocenter, Seillac Domain,France, 2016 & 2017.

- **Sodium chloride alters dendritic cell polarization towards TH1 cells.**

S Al-Hajj et al. 27th European meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection: Milan, Italy, 2017.

- **Immune response of dendritic cells partially changes with higher sodium chloride concentration in the medium.**

S Al-Hajj et al. Club Francophone des Cellules Dendritiques" (CFCD): Paris, 2016.

28th EUROPEAN MEETING ON HYPERTENSION AND CARDIOVASCULAR PROTECTION
BARCELONA

High Sodium concentration modulates Dendritic Cells immune functions

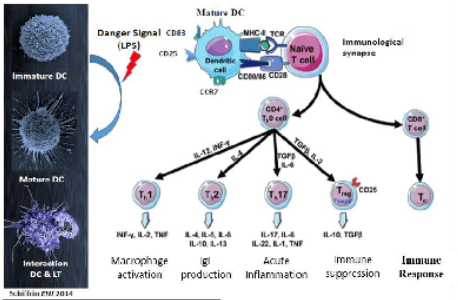
Sally AL-HAJJ[1*], A. GOUMARD[1,2], A. HERAUD[1], S. GEORGEAULT[3], J. BURLAUD-GAILLARD[3], C. HOARAU[1,2], P. GATAULT[1,2], M. BÜCHLER[1,2], R. LEMOINE[4], C. BARON[1,2], J-M. HALIMI[1,2].

[1]EA4245 Dendritic Cells, Immunomodulation & Transplantation, François Rabelais University, Medicine school , 37032 TOURS, FRANCE
[2]Nephrology, clinical immunology service, University Hospital Center Bretonneau, 37032 TOURS, FRANCE
[3]Laboratory of cell biology & electronic microscopy, François Rabelais University, Medicine school , 37032 TOURS, FRANCE

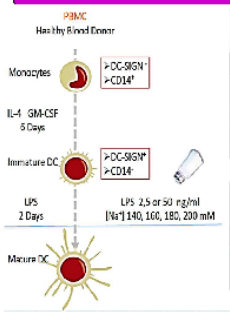
Corresponding author : Sally AL-HAJJ
sally.alhajj@gmaill.com
Research gates Sally Al Hajj
Third year PHD, Immunology, Tours, France.
looking for a potential postdoctoral position.

INTRODUCTION

Excessive Na+ intake is associated with the development of hypertension and increases skin sodium concentration [Na+] (up to 200 mM). The transfer of dendritic cells (DCs) from hypertensive to normotensive animals leads to the development of hypertension. DCs modulate both the innate and adaptive immune response. However, the effect of high [Na+] on DCs remains unclear in humans.



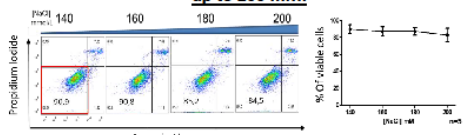
DESIGN & METHODS



DC Viability Annexin V / PI	DC Morphology by electron & confocal microscopy
DC endocytosis by FITC-DE staining	
DC Phenotyping by flow cytometry - Maturation markers CD25,CD83 - Costimulatory molecules CD80, CD86 - Chemokine Receptors CCR7, CCR5	
Migration test CCL19 Transwell Assay	
Cytokines Secretion by ELISA IL-12, IL-10, IL-6, TGF-β, IL-23	
DC ROS production flow cytometry	
Protein production Western Blot p38 P-p37 ERK1/2 & P-ERK1/2; SGK1 & P-SGK1	

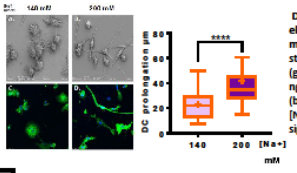
RESULTS

1 DC viability is maintained under High [Na+] up to 200 mM.



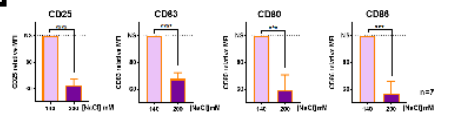
Annexin V / Propidium Iodide staining were analyzed by flow cytometry. Red frame indicates viable cells treated with increasing [Na+].Cells viability were above ≥ 84 % up to 200 mM [Na+].

2 High [Na+] modifies DC cytoskeleton.



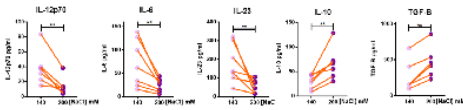
DC morphology was analyzed by electron microscopy and confocal microscopy. (A) Immunofluorescence staining of cores (blue) & actin (green) after DC culture with 2,5 ng/ml of LPS under (a,c) 140 mM and (b,d) 200 mM [Na+]. (B) Under high [Na+] DC extension measures were significantly greater.

3 High [Na+] reduces DC maturation.



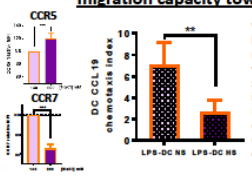
We studied DC expression of CD25, CD83, CD80 & CD86 maturation markers by flow cytometry. DC were stimulated by LPS 2,5 ng/ml during 48 hours under 140 mM or 200 mM of Na+.

4 High [Na+] decreases DC secretion of IL-12, IL-6, IL-23 & increases IL-10 and TGF-B cytokines.



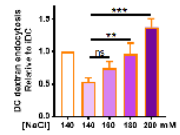
Pro-inflammatory IL-12p70, IL-6, IL-23 & anti-inflammatory IL-10 and TGF-B cytokines secretion was analyzed in the supernatants of LPS-activated DC cultures by ELISA. DC were stimulated by LPS during 48 hours with LPS 2,5 or 50 ng/ml under 140 mM or 200 mM of Na+.

5 High [Na+] decreases CCR7 expression and DC migration capacity towards lymph nodes.



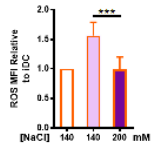
We analyzed DC expression of CCR7 & CCR5 by flow cytometry and determined DC migration capacity by Migration Assay kit with inserts of 8 µm micropores. High [Na+] strongly decreased CCR7 expression but increased CCR5 expression. It also decreased DC CCL19-driven migration capacity, This data suggest that high [Na+] inhibits DC migration towards secondary lymph node to educe a specific immune response .

6 High [Na+] increases DC endocytosis capacity.



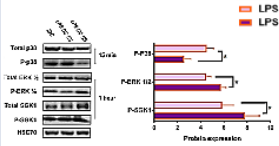
FITC-Dextran staining were analyzed by flow cytometry. DC were stimulated with LPS 50 ng/ml under increasing [Na+] up to 200 mM, then were stained for 1 hour with FITC-Dextran 1 mg/ml to study their endocytosis capacity .

7 DC produce less ROS under High [Na+].



DC ROS production were assessed by flow cytometry. DC were stained for 1 hour with ROS detection reagent then stimulated for another hour with LPS 50 ng/ml under increasing [Na+] up to 200 mM.

8 High [Na+] affects DC MAP Kinase signaling pathways.



DC MAP Kinase & SGK1 protein phosphorylation revealed by western blot. DC were stimulated by LPS 2.5 ng/ml for both 15 minutes and 1 hour under 140 mM or 200 mM of Na+.

CONCLUSION

High [Na+] concentration downregulates pro-inflammatory human DCs immune response to LPS and inhibits their migration towards lymph nodes, through MAP Kinase signaling pathway and SGK1-related mechanisms. However, the implication of these changes in the development of hypertension remains unknown.

Liste des abréviations

Ac : Anticorps
Ag : Antigen pour antigène
BDCA(1-4): Blood Dendritic Cell Antigen (1-4)
CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand
CCR : C-C Chemokine Receptor
CD : Classe de Différenciation
CMF : Cytométrie en Flux
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène
CPD : Common Dendritic Cell Progenitor
CRD: Carbohydrate Recognition Domain pour Domaine de Reconnaissance des Carbohydrates
CREB: cAMP element Response Binding Protein
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4
DAMP : Damaged Associated Molecular Patterns
DC : Dendritic cells utilisé pour Cellules Dendritiques
DC-SIGN: Dendritic Cell Specific Intracellular adhesion molecule Grabbing non-Integrin **EAE:** Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
ELISA : Enzyme Linked Immonosorbant Assay
ERK1/2: Extracellular Signal-Regulated Kinases
Flt3 : FMS-like tyrosine kinase 3
FMI : Fluorescene Mean Intensity pour Intensité Moyenne de Fluorescence
Foxp3 : Forkhead box p3
GITR : Glucocorticoid Induced Tumor necrosis factor Receptor
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GMDP: Granulocyte Macrophage Dendritic Cell Precursor
HS: High Sodium condition
HSC : Hematopoietic Stem Cell pour Cellule Souche Hématopoïétique
HLA: Human Leukocyte Antigen
ICAM : Inter Cellular Adhesion Molecule
ICOS : Inducible T cell CO-Stimulator
IDO : Indoléamine 2,3 Dioxygénase
IFN : Interferon
Ig : Immunoglobuline
IKK: IKB kinase
IL : InterLeukine
ILT3/ILT4 : Immunoglobulin-Like Transcript 3 ou Immunoglobulin-Like Transcript 4
IRAK : Interleukin 1 Receptor Associated Kinase
IRF : Interferon Regulatory Factors
ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
LB: Lymphocyte B
LC: Langerhans Cell utilisé pour cellules de Langerhans
LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LPS : LipoPolySaccharide

LT : lymphocyte T
LTreg : Regulatory lymphocyte T pour Lymphocytes T Régulateurs
MAPK : Mitogen –Activated Protein Kinases
MLR: Mixed Lymphocytes Reaction
moDC: Monocyte derived Dendritic Cell utilisé pour Cellule Dendritique dérivée de Monocytes
MPD: Macrophage Dendritic Cell Precursor
MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene (88)
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-κB : Nuclear Factor κB
NK : Natural Killer
NLR : NOD Like Receptor
NOD : Nucleotide Oligomerization Domain
NS: Normal Sodium condition
OLS : Organe Lymphoïde Secondaire
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells pour cellules mononuclées du sang péripherique
PBS : Phosphate Buffered Saline
pDC : Cellule Dendritique Plasmacytoïde
PDL-1 : Programmed Death 1 Ligand
PI3K : PhosphatidylInositol 3-Kinase
p38 MAPK: p38 Mitogen-Activated Protein Kinases
PRR : Pathogen Recognition Receptor
ROS : Reactive Oxygen Species
SGK1: Serum and Glucocorticoid induced Kinase-1
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF : Serum de Veau Foetal
TAP : Transporter Associated with antigen Processing
TCR : T Cell Receptor
TFH : T Follicular Helper lymphocyte
TGF-β : Transforming Growth Factor β
Th : T helper / T auxiliaire
TolDC : Tolerogenic Dendritic Cell pour Cellules Dendritiques Tolérogènes
TIR : Toll/IL-1R interaction
TLR : Toll Like Receptor
TNF-α : Tumor Necrosis Factor α

Table des matières

Table des matières

Remerciements 7
Résumé 11
Abstract 13
Liste des Publications et Communications 15
Liste des abréviations 19
Table des matières 23
Table des matières 24
Liste des tableaux 29
Liste des figures 30
Introduction 35
Chapitre -I- Répartition physiologique du sodium & les pathologies associées 38
1. Répartition physiologique du sodium 40
1.1. Compartiments liquidiens de l'organisme 40
1.2. Osmolarité globale 41
1.3. Le sodium : un constituant des compartiments Extra et Intracellulaires 42
1.3.1. *Sodium : composant essentiel des milieux extracellulaires* 42
1.3.2. *Concentrations ioniques intracellulaires* 43
1.4. Maintien de la composition ionique du compartiment intracellulaire et du potentiel membranaire 44
1.5. Échanges entre compartiment sanguin et milieu interstitiel 45
1.6. Régulation du volume de liquide extracellulaire 46
1.6.1. *Rappel anatomique sur le rein* 47
1.6.2. *Système afférent de régulation* 48
1.6.3. *Système efférent de régulation* 49
2. Pathologies associées au sodium 54
2.1. Hypertension et maladies cardio-vasculaires associées au sodium 54
2.1.1. *Sel et hypertension* 54
2.1.2. *Sel et hypertrophie ventriculaire gauche (HVG)* 57

2.1.3. *Sel, dysfonctionnement endothélial et rigidité vasculaire* ... 58
2.1.4. *Sel, morbidité et mortalité cardiovasculaires* ... 59
2.1.5. *Essais cliniques : maladies cardiovasculaires et apports sodés* ... 60
2.2. Lien entre NaCl et tumeur ... 61
2.2.1. *Relation entre régime alimentaire riche en sel et survenue du cancer* ... 62
2.2.2. *Dommages à l'ADN, réparation et sel* ... 62
2.2.3. *Radicaux libres d'oxygène (ROS) et sel* ... 63
2.2.4. *Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et sel* ... 63
2.2.5. *Métabolisme de Warburg induit par le sel dans les cellules cancéreuses* ... 64
Chapitre -II- Le système immunitaire ... 66
1 Généralités sur le système immunitaire ... 69
2 L'immunité innée ... 71
2.1 Les cellules de l'immunité innée ... 71
2.2 Les récepteurs de l'immunité innée ... 76
2.3 Inflammation ... 80
2.3.1 *Inflammation induite par les récepteurs de l'immunité innée* ... 80
2.3.2 *Les inflammasomes* ... 81
2.3.3 *Recrutement et activation des leucocytes* ... 83
3 L'immunité adaptative ... 85
4 Interactions entre l'immunité innée et adaptative : la DC et la synapse immunitaire ... 88
4.1 Activation des cellules dendritiques ... 88
4.2 Présentation antigénique par les DC et activation des lymphocytes T ... 91
4.3 Polarisation de la réponse immunitaire des lymphocytes T par les DC ... 92
Chapitre -III- Le système immunitaire : un médiateur possible de certains effets pathogènes du sel ... 101
1. Les effets du sodium sur les cellules du système immunitaire ... 104
1.1 Effets du sel sur le système mono-phagocytaire ... 104
1.2 Effets du sel sur les lymphocytes T ... 106
1.3 Voies de signalisation mobilisées par le sodium dans les cellules du système immunitaire 107
2. Le système immunitaire : un médiateur du sel en pathologie ... 109
2.1 Sodium et maladies auto-immunitaires ... 109

2.2 Sodium et environnement pro-cancérigène 110
2.3 Sodium et réponse allo-immunitaire (GvH aigüe et rejet aigu en transplantation) 110
2.4 Le système immunitaire : médiateur des effets du sodium sur l'hypertension 111
2.4.1 *Hypertension sensible au sel (SS) et inflammation rénale* 111
2.4.2 *Rôle des DC dans les effets du sodium sur l'hypertension artérielle* 112
2.4.3 *Rôle des lymphocytes dans les effets du sodium sur l'hypertension artérielle* 114
Objectifs 119
Matériels & méthodes 125
1 Génération et stimulation des cellules dendritiques dérivées de monocytes 127
2 Etude de la viabilité cellulaire 129
3 Marquage de surface des DC par cytométrie en flux 130
4 Microscopie électronique à balayage 130
5 Microscopie confocale 131
6 Étude de la capacité d'endocytose par le marquage FITC-Dextran 132
7 Étude de la migration *in vitro* 132
8 Analyse des surnageants de culture cellulaire par ELISA 133
9 Analyse de la production d'espèces réactives de l'oxygène 133
10 Réaction lymphocytaire mixte (MLR) 134
11 Test de suppression cellulaire 134
12 Western Blot 134
12 Analyse statistique 135
Résultats 139
Partie -1- Caractérisation phénotypique des DC traitées par le NaCl 142
Résultats 1-1 Une forte concentration en sodium (200 mM) n'altère pas la viabilité des DC 143
Résultats 1-2 Une forte concentration en sodium (200 mM) induit une modification du cytosquelette des DC traitées par le LPS 145
Résultats 1-3 Les DC traitées par le LPS avec de forte concentration de sodium maintiennent l'expression des marqueurs de DC et n'acquièrent pas de marqueurs de macrophages 150
Résultats 1-4 Une stimulation par le LPS à dose élevée et suboptimale induit l'expression des marqueurs de maturation des DC 153

Résultats 1-5 Une forte concentration en sodium n'induit pas la maturation des DC immatures . 155
Résultats 1-6 Une forte concentration en sodium inhibe la maturation des DC traitées par le LPS156
Partie -2- Caractérisation fonctionnelle des DC traitées par le NaCl 159
Résultats 2-1 Une forte concentration en sodium réduit la capacité de migration des DC dépendante de CCL19 et inhibe l'expression de CCR7 160
Résultats 2-2 Une forte concentration en sodium augmente la capacité d'endocytose des DC traitées par le LPS 163
Résultats 2-3 Une forte concentration en sodium diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et augmente la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les DC traitées par le LPS 165
Résultats 2-4 Une forte concentration en sodium inhibe la production de ROS dans les DC traitées par le LPS 167
Partie -3- Polarisation lymphocytaire induite par des DC traitées le NaCl 168
Résultats 3-1 Une forte concentration en sodium inhibe la capacité allostimulatrice des DC et augmente la production d'IL-10 dans les MLR allogéniques 169
Résultats 3-2 Étude de la capacité suppressive des LT $CD4^+$ issus de co-culture avec des DC traitées par de fortes concentration de sodium..... 171
Résultats 3-3 L'activation polyclonale CD3/CD28 des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs à forte concentration de sodium induit la polarisation vers des lymphocytes Th17 ($CCR4^+$ $CCR6^+$)..... 173
Partie -4- Etude des voies de signalisation induites par les DC traitées par le NaCl 175
Résultats 4 Une forte concentration en sodium augmente la phosphorylation de SGK1 et ERK1/2 et inhibe celle de la kinase p38 MAPK dans les DC traitées par le LPS 176
Discussion..... 180
Conclusion & perspectives 188
Annexes 192
Annexe 1 : Manuscrit principal issu des travaux de thèse soumis en premier auteur..... 195
Annexe 2 : Manuscrit d'article soumis en co-premier auteur (travaux collaboratifs)..... 232
Annexe 3 : Manuscrit d'article publié en deuxième auteur (travaux collaboratifs)..... 258
Annexe 4 : Manuscrit d'article publié en cinquième auteur (travaux collaboratifs)..... 274
Bibliographie..... 310

Liste des tableaux

Tableau 1 : Compositions comparées en mM des compartiments liquidiens …….p.42

Tableau 2 : Compositions comparées en mM du liquide plasmatique et du liquide extracellulaire …..p.45

Tableau 3 : Familles des récepteurs de reconnaissance des pathogènes ……p.78

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du néphron ……p.47
Figure 2 : Schéma démonstratif du SRAA ……..p.52
Figure 3 :voies de signalisation associées à l'activation du récepteur TLR4 ……..p.80
Figure 4 : voies de signalisation impliquées dans l'activation de l'inflamasome ……p.83
Figure 5 : Schéma d'orientation des lymphocytes T par les DC ……p.94
Figure 7: Effets du sel sur les fonctions immunitaires des cellules T ……p.107
Figure 8: Mécanismes immunitaires impliqués dans le développement de l'hypertension ……..p.116
Figure 9 : Schéma récapitulatif de la génération et stimulation des Mo-DC à partir du sang humain …..p.128
Figure 10 : Analyse de la survie des DC par le logiciel DIVA de cytométrie en flux …….p.129
Figure 11 : mesure numérique des diamètres et extensions cellulaires à l'aide du microscope électronique Zeiss EM …….....p.131
Figure 12 : schéma d'un transwell, test de migration cellulaire ……p.133
Figure 13 : Schéma récapitulatif des matériels et méthodes utilisés pour l'étude des effets des concentrations élevées du sel sur les cellules dendritiques humaines dérivées des monocytes …….p.136
Figure 14: Le taux élevé de [Na^+] n'a pas modifié de manière significative la viabilité du courant continu jusqu'à 200 mM. ……...p.144
Figure 15 : Augmentation de la taille et granulosité des DC induite par des concentrations élevées de sel ……...p.145

Figure 16 : Le LPS induit la formation de dendrites sur les DC……. p.146
Figure 17: Des concentrations élevées de NaCl étendent le cytosquelette de DC…… p.149
Figure 18 : Absence de modification de morphologie à 200 mM de [NaCl] lié au support de fixation des DC
……...p.149
Figure 19: les DC immatures incubées avec du LPS à une concentration élevée en Na^+ maintiennent l'expression des marqueurs DC et n'acquièrent pas de marqueurs macrophages…….. p.151
Figure 20 : Des doses croissantes de [NaCl] ne modifiaient pas l'expression de DC SIGN…… p.152
Figure 21 : induction des marqueurs de maturation par différentes concentrations de LPS..…… p.154
Figure 22 : Des concentrations élevées de sel n'induisaient pas ou très peu l'expression des marqueurs de maturation sur des DC immatures
…….p.155
Figure 23: Un taux élevé de [Na^+] inhibe la maturation des DC induite par le LPS……. p.158
Figure 24 : Une forte concentration de Na^+ augmente l'expression de CCR5 par les DC traitées au LPS et inhibe la migration de DC induite par CCL19 ainsi que l'expression de CCR7……..p.162
Figure 25: Une forte concentration en sodium augmente la capacité d'endocytose de FITC-DEXTRAN par les DC traitées par le LPS
……..p.129
Figure 26: Une forte concentration en sodium diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-6, IL-23 et augmente la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF-β par les DC traitées par le LPS
……p.166
Figure 27: Inhibition de la production de ROS par les DC traitées au LPS à forte de [Na^+]
……p.167

Figure 28: Une forte concentration en sodium inhibe la capacité allostimulatrice des DC et augmente la production d'IL-10 dans les MLR allogéniques ……p.171

Figure 29 : Les LT $CD4^+$ pré-activés par des DC-Na200 inhibent l'activation polyclonale de LT $CD4^+$ induite par anti -CD3/CD28 ……..p.172

Figure 30 : Le sel favorise l'induction de cellules Th17 ……p.174

Figure 31: Une forte [Na^+] augmente la phosphorylation de SGK1 et ERK1 / 2 et inhibe celle de p38 MAPK dans les DC…….... p.177

Introduction

Chapitre -I-

Répartition physiologique du sodium & les pathologies associées

1. Répartition physiologique du sodium

1.1. Compartiments liquidiens de l'organisme

Dans un organisme vivant complexe on distingue plusieurs « milieux intérieurs » séparés par des membranes. Les membranes cellulaires, semi-perméables au sodium, séparent les milieux intracellulaires et extracellulaires. Parmi ces derniers on distingue les liquides interstitiels qui occupent les espaces entre les cellules, le liquide plasmatique enfermé dans le système vasculaire ainsi que des liquides de certains territoires confinés comme dans les cavités séreuses, les cavités du tube digestif, le liquide cérébro-spinal ou encore le vitré oculaire.

Claude Bernard a mis en évidence l'existence d'une relative stabilité (homéostasie) de ces ‘’milieux intérieurs’’ qui contraste avec la variabilité des apports venus de l'environnement. La peau englobe la totalité des compartiments et elle est relativement imperméable à l'eau.
Les membranes cellulaires, semi-perméables au sodium, séparent des milieux de compositions très différentes : le milieu intracellulaire pauvre en sodium et les liquides interstitiels riches en sodium. La paroi capillaire peu perméable aux protéines sépare les liquides interstitiels du compartiment sanguin comprenant les éléments figurés et le plasma caractérisé par sa richesse en protéines et des concentrations assez stables de Na^+.

La norme des concentrations en sodium des milieux plasmatiques est de 135 à 145 mmol/l à l'opposé de celle du milieu intracellulaire qui ne contient que 5 mmol/l. Concernant les milieux interstitiels, la situation est plus complexe puisque jusqu'à récemment, le dogme dominant dans la communauté scientifique était qu'une augmentation des apports alimentaires en Na^+ était rapidement excrétée par les reins afin de maintenir une homéostasie normale du sodium dans l'ensemble des milieux extracellulaires.

Mais plusieurs études ont remis en cause ce dogme en montrant que de nombreux tissus corporels (peau, muscle squelettique, érythrocytes et autres tissus) peuvent stocker les ions Na^+ avec des concentrations pouvant atteindre 200 mM en réponse à des apports alimentaires élevés en Na^{+}[1,2].

1.2. Osmolarité globale

La pression osmotique d'une solution contenant un soluté non diffusible correspond à la pression hydrostatique à appliquer à cette solution afin d'empêcher la diffusion hydrique de part et d'autre d'une membrane semi-perméable.L'eau n'existe pas dans l'organisme à l'état pur. Tous les liquides de l'organisme comprennent des substances osmotiquement actives de nature différente selon le compartiment. Pour préciser les caractères des liquides il est nécessaire de connaître précisément les substances et tout particulièrement les petites molécules responsables de la pression osmotique.

Le Sodium et le Chlore sont les principaux déterminants de l'osmolarité du milieu extracellulaire. Le poids atomique du Sodium étant égal à 23 et celui du Chlore égal à 35, le poids moléculaire du Chlorure de Sodium est donc approximativement égal à 60. L'osmolarité plasmatique est stable (320mosm/l)[3]. En revanche, des données récentes ont montré que l'osmolarité des liquides interstitiels, n'est pas aussi constante qu'on ne le pensait (nous en reparlerons au paragraphe suivant). On sait qu'une cellule, placée dans un liquide hypotonique, tend à augmenter de volume et, inversement, à se rétracter dans une solution hypertonique. Les modifications d'osmolarité qui affectent le compartiment extracellulaire sont nécessairement suivies d'échanges hydriques osmotiques aboutissant à un équilibre dynamique d'osmolarité entre le compartiment intra et extra cellulaire.

Tableau 1 : Compositions comparées en mM des compartiments liquidiens.

	Compositions des compartiments liquidiens (mM)	
	Extracellulaire	Intracellulaire
Na^+	140	5
K^+	4,5	140
Ca^{2+}	2,5	0,5
Mg^{2+}	1	12,5
Cl^-	105	4
HCO_3^-	30	10
HPO_4^-	1	20
Protides	0,5 (205 g)	65 (300 g)

1.3. Le sodium : un constituant des compartiments Extra et Intracellulaires

1.3.1. Sodium : composant essentiel des milieux extracellulaires

À l'état homéostatique les apports et les pertes de NaCl s'équilibrent et varient de 4 à 27 g par jour selon les régions du monde (4 g/j chez les esquimaux et 27 g/j chez les japonais du nord) et environ 10g/j chez les américains du nord. Les apports peuvent être inférieurs aux pertes en cas de diarrhée, de vomissements, d'insuffisance surrénale. Les pertes peuvent être inférieures aux apports en cas de maladie cardiaque, rénale, hépatique.Le sodium corporel total chez une personne moyenne de 70 kg est d'environ 4 200 mmol (~ 100 g), dont 40% se trouvent dans l'os et 60% dans les liquides surtout à l'extérieur des cellules. Le chlorure corporel total est en moyenne de 2 310 mmol (~ 82 g), dont 70% sont distribués dans le liquide extracellulaire et le reste se trouve lié au collagène du tissu conjonctif.
L'osmolarité physiologique du sang (285–295 mOsm) est maintenue dans une gamme restreinte *via* des mécanismes régulateurs[3].

Des études qui ont mesuré directement l'osmolarité des espaces interstitiels tissulaires ont démontré une hyperosmolarité physiologique dans les OLS (atteignant 330-340 mOsm)[4], dans la medulla du rein (exposée à un gradient physiologique d'osmolarité atteignant des valeurs> 1000 mOsm), dans le disque intervertébral et le tissu cartilagineux articulaire (variant entre 430 mOsm et 496 mOsm) ainsi que la peau et les muscles [2,1,5].

La majorité de cette hyperosmolarité est attribuée aux variations de teneurs en Na^+. Titze et ses collègues ont montré qu'un régime riche en sel est associé à une augmentation de la concentration interstitielle dermique en Na^+ chez le rat et entraine le recrutement de macrophages et de DC sous-cutanés[6]. Des mécanismes multiples agissent de concert pour réguler les concentrations de sodium dans les différents compartiments de l'organisme. Ainsi on distingue le sodium « échangeable » osmotiquement actif face aux membranes plasmiques (représentant les 2/3 du capital sodé) dans les liquides extracellulaires et le sodium « non échangeable » représentant essentiellement le Sodium fixé dans les os et aux protéines. Une certaine partie de ce sodium osseux est cependant échangeable et peut, en cas de besoin, être mobilisée pour rétablir un bilan déséquilibré.

1.3.2. Concentrations ioniques intracellulaires

Généralement, les mesures de concentrations ioniques intracellulaires ont été déterminées par des technologies (photométrie à émission de flamme, analyse par absorption atomique, microanalyse par rayons X) nécessitant une pénétration de la paroi cellulaire avec un risque de contamination des données due à la présence d'ions extracellulaires. Néanmoins, une technologie (appelée 23NaMRI) développée par FW Cope entre 1965-1970 permet des mesures précises de concentration ionique intracellulaire dans les tissus musculaires, cérébraux et rénaux sans perturber membranes cellulaires et sans contamination de la teneur en ions intracellulaires par des ions du liquide extracellulaires[7]. Malheureusement, les possibilités de cette technologie ont été largement méconnues par les physiologistes cellulaires jusqu'au début des années 1980, quand finalement des chercheurs ont commencé à examiner les concentrations de Na^+ intracellulaire dans les cellules cancéreuses en utilisant

23NaMRI comme méthode de détermination non invasive et non destructive du sodium intracellulaire dans les cellules et tissus viables[8].

La première étude visant à étudier les concentrations de sodium intracellulaire (*via* 23NaMRI) a été réalisée en 1994 par Resnick et ses collègues[8] : des sujets hypertendus et normaux ayant reçu des régimes riches en sel (200 mEq/jour) pendant deux mois, ont montré une augmentation significative des concentrations intracellulaires de Na^+ dans les érythrocytes.
Des études spécifiques de la charge saline chez l'homme et des mesures précises (23NaMRI) des concentrations intracellulaires de Na^+ et K^+ dans divers tissus humains seraient encore à venir.

1.4. Maintien de la composition ionique du compartiment intracellulaire et du potentiel membranaire

Les propriétés des membranes plasmiques permettent le maintien d'une différence de potentiel (DP). Ce potentiel de membrane est une caractéristique universelle des cellules vivantes mais est de valeur variable selon le type cellulaire. La bicouche lipidique et certaines protéines membranaires comme les canaux et les pompes ioniques permettent le maintien de cette DP. Les propriétés propres des bicouches phospholipidiques comme l' imperméabilité qui permet de maintenir les différences de concentration de part et d'autre de la membrane, et donc un gradient chimique ainsi qu'une haute résistance électrique qui permet de maintenir une différence de potentiel, donc un gradient électrique. Les propriétés propres de certaines protéines membranaires de type canaux sélectifs et des pompes ioniques sont essentielles : les canaux potassium de fuite sont responsables d'une perméabilité sélective de la membrane ne laissant passer que les ions potassium et les pompes potassium/sodium transportent activement les ions sodium vers l'extérieur et les ions potassium vers l'intérieur (3 Na^+ pour 2 K^+). Le potassium (K^+) est le principal ion chargé positivement (cation) à l'intérieur des cellules, tandis que le sodium est le principal cation du liquide extracellulaire. Les concentrations de potassium sont environ 30 fois plus élevées et celles de sodium sont plus de 10 fois inférieures dans les cellules qu'à l'extérieur. Il existe ainsi de part et d'autre de la membrane plasmique un gradient électrochimique appelé potentiel membranaire. Les canaux potassium membranaires, sont les seuls à être ouverts à l'état basal ce qui tend à dissiper le gradient chimique de potassium[9]. Il faut noter que la DP

transmembranaire met en jeu une quantité négligeable d'ions par rapport au nombre de charge totale contenues dans la cellule (10.10^{-6}). Ainsi l'électro-neutralité des deux compartiments n'est pas strictement respectée à proximité de la membrane. Le champ électrique ainsi créé s'oppose à la sortie des ions potassium. La séparation de charge résultante crée la différence de potentiel électrique mesurée. Même si la membrane plasmique est relativement imperméable au Na^+ celui-ci a tendance à entrer dans la cellule ce qui tend à annuler la DP transmembranaire. La pompe appelée Na^+/K^+ ATPase permet de maintenir le gradient de concentration sodique transmembranaire. Ces pompes Na^+/K^+ ATPase utilisent de l'ATP (énergie) pour pomper le sodium hors de la cellule en échange de potassium. On estime que leur activité représente 20% à 40% de la dépense énergétique au repos chez un adulte. Notons par ailleurs qu'un contrôle étroit du potentiel de membrane des cellules excitables est essentiel pour la transmission de l'influx nerveux, la contraction musculaire et la fonction cardiaque[10,11].

1.5. Échanges entre compartiment sanguin et milieu interstitiel

Alors que les échanges d'eau entre milieux intra et extracellulaires sont dominés par la présence de sodium dans le milieu extracellulaire, les échanges entre compartiment interstitiel et plasmatique sont liés à la présence de protéines dans le plasma (pression oncotique).

Tableau 2 : Compositions comparées en mM du liquide plasmatique et du liquide extracellulaire.

	Compositions des compartiments liquidiens (mM)	
	Extracellulaire	Plasmatique
Na^+	140	140
Cl^-	105	95
HCO_3^-	30	30
Ca^{2+}	2,5	2,5
K^+	4,5	4,5
Protides	0,5 (2,5 g)	16 (75 g)

Au pH du plasma, les protéines sont chargées négativement et se lient avec le sodium pour former des protéinates de sodium.

1.6. Régulation du volume de liquide extracellulaire

Les compartiments liquidiens sont sensibles aux modifications de volume et/ou d'osmolarité du plasma. Les solutés et l'eau en excès dans notre organisme sont éliminés par le rein. Inversement le déficit liquidien s'accompagne d'une réduction de l'élimination rénale. Cet ajustement des pertes aux apports nécessite la mise en jeu de systèmes régulateurs impliquant un bras afférent et efférent[12]. Le système afférent regroupe quatres familles de capteurs de volume, qui servent de senseurs et moniteurs des changements dans le fonctionnement circulatoire: barorécepteurs de faible pression, barorécepteurs de forte pression, senseurs intrarénaux et senseurs du système nerveux hépatique et central. Le système efferent agissant sur le rein implique des phénomènes physiques (balance de starling, l'autorégulation rénale, et la balance glomérulotubulaire), humoraux (le système rénine angiotensine aldostérone SRAA, l'hormone antidiurétique ADH, les cathécolamines et les prostaglandines…) et système nerveux autonome (SNA sympathique).

1.6.1. Rappel anatomique sur le rein

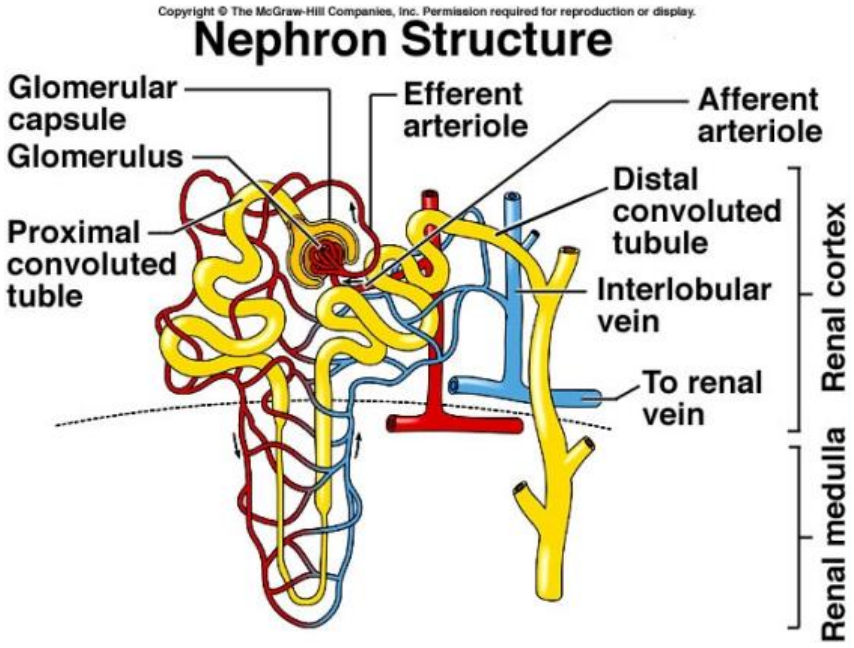


Figure 1 : Anatomie du néphron.

Le rein est constitué par l'agrégation d'environ 1 000 000 d'unités plus élémentaires appelées néphrons[13].

Chaque néphron comporte :

- un glomérule au niveau duquel se produisent les phénomènes de filtration des liquides,
- un tubule qui est le siège des phénomènes de sécrétion et de réabsorption.

Le tubule est divisé en quatre parties :

- le tubule contourné proximal (proche du glomérule),
- l'anse de Henlé avec : une branche descendante mince
  une branche ascendante large,
- le tube contourné distal,
- le tube collecteur.

1.6.2. Système afférent de régulation

Un certain nombre de mécanismes physiologiques régulent le volume sanguin et donc la pression artérielle en ajustant la teneur en sodium de l'organisme. Dans le système circulatoire, les récepteurs de pression (barorécepteurs) détectent les modifications de la pression artérielle et envoient des signaux excitateurs ou inhibiteurs au système nerveux et/ou aux glandes endocrines pour affecter la régulation du sodium par les reins[12,13].

Les barorécepteurs de faible pression, localisés dans la partie veineuse du système circulatoire, captent les changements de pression induites par le volume intra-thoracique, désignés à la défense contre l'expansion du volume du fluide extracellulaire qui peut avoir des conséquences délétères au niveau pulmonaire. Ces barorécepteurs incluent les récepteurs de l'atrial cardiaque et cardiopulmonaires.

Les barorécepteurs de forte pression, localisés dans le corps du sinus carotidien et l'arc aortique, captent la pression dans la circulation artérielle, désignés pour maintenir cette pression à un niveau stable et protège le cerveau des fluctuations des pressions de perfusion. Leur stimulation par un faible volume artériel induit le centre vasomoteur du cerveau qui transmet un signal au rein pour la rétention du sodium et de l'eau ainsi que l'activation du système nerveux sympathique augmentant le rythme cardiaque et la résistance artérielle médiés par la réponse des catécholamines aux sécrétions de noradrénaline et d'endothéline. La résistance artérielle favorise le transfert fluidique de l'interstitium au compartiment vasculaire. Une détection de grand volume par ces barorécepteurs engendre l'opposé, résultant d'une diminution de la réponse liée aux catécholamines et d'un accroissement de la natriurèse.

Les barorécepteurs intra-rénaux, formés par la partie juxtaglomérulaire, lors d'une contraction volumique ils induisent la sécrétion de la rénine dans le plasma qui déclenche l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (détaillé en amont) favorisant ainsi la vasoconstriction.

1.6.3. Système efférent de régulation

Les mécanismes efferents majeurs régulant le volume du fluide extracellulaire regroupent des facteurs physiques (balance de starling, l'autorégulation rénale, et la balance glomérulotubulaire), des facteurs humoraux (le SRAA, l'ADH, cathécolamines les prostaglandines entre autre) ainsi que les nerfs sympathiques rénaux.

1.6.3.1. Facteurs physiques du système efférent

La filtration glomérulaire : dans le rein humain, plus que 1000 mmol (23g) de sodium sont filtrés par heure, dont 990 mmol (22.8g) sont réabsorbés par les tubules rénaux. Par conséquence, toute fluctuation du taux de filtration rénale (TFR) affecte la prise en charge du sodium par le rein. Le passage du fluide à travers les parois capillaires est gouverné par les gradients de pression hydrostatique et les gradients des pression oncotique du plasma, exprimés par l'équation de Starling :

$$J_v = K_f \, (\Delta P - \Delta \pi)$$

J_v est le taux de fluide transféré entre les capillaire et les compartiments interstitaux, il est déterminé par le K_f (le coefficent de l'ultrafiltration des capillaire glomérulaire) qui représente la perméabilité des parois capillaire pour l'eau, et par ΔP,la différence de pression hydrostatique et par $\Delta\pi$ qui est la différence de pression oncotique entre les fluides capilaires et interstitiaux. La composition protéique du plasma affecte le TFR, déterminant le flux plasmatique à travers le gloméruli.

L'autorégulation rénale : un phénomène qui permet la maintenance d'un TFR constant face aux de perturbations inducteurs de sa variation. Par exemple, la constriction de l'artère rénal peut induire de modeste altération de la pression de perfusion rénale néanmoins sans causer l'altération du TFR ainsi le flux de sang rénal.

La balance glomérulotubulaire : une propriété fondamentale du rein. En effet, les changements du TFR induisent automatiquement un changement proportionnel dans le taux de réabsorbtion tubulaire proximale du sodium. Ainsi, l'excretion fractionnelle du sodium est maintenue constante face à toutes augmentations ou baisse du TFR.

1.6.3.2. Facteurs humoraux du système efférent (SRAA, ADH, SN)

En général, la rétention de sodium entraîne une rétention d'eau et la perte de sodium entraîne une perte d'eau[14]. Plusieurs mécanismes contribuent à cette homéostasie entre autre le système rénine angiotensine SRA, l'hormone antidiurétique ADH, le système nerveux autonome et les prostaglandines. Ces mécanismes de régulation sont particulièrement importants pour le contrôle du transport du sodium ou de l'eau dans divers segments du néphron (unité structurale basique du rein).

1.6.3.2.1 Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)

Le Na^+ est réabsorbé tout le long du tubule rénal jusqu'au tubule contourné distale. Le tubule contourné proximale TCP est le plus actif de tous les segments du tubule. 65% du Na^+ est réabsorbé au niveau du TCP. La réabsorption du Na^+ (25%) dans la branche ascendante de l'anse de Henlé est responsable de la formation du gradient cortico-capillaire (système de concentration à contre-courant) permettant l'excrétion d'une urine très concentrée quand cela est nécessaire. Ainsi la concentration en Osm peut atteindre 1200 mOsm dans la partie médullaire profonde de l'anse de Henlé. Enfin environ 10% du Na^+ est réabsorbé dans le TCD, cette quantité varie sous l'influence de la concentration en aldostérone.

Facteurs de régulation de la production d'aldostérone : ce fonctionnement élémentaire impliquant l'aldostérone vis-à-vis de la rétention de sodium et la libération de potassium est soumis à des mécanismes régulateurs. La diminution du taux de sodium dans le sang augmente la sécrétion d'aldostérone. Inversement l'augmentation de la natrémie diminue cette sécrétion. La diminution de

volume plasmatique (par hémorragie, augmentation excessive de la diurèse, ou même passage du liquide plasmatique des capillaires vers le milieu interstitiel) provoque l'accroissement de l'activité du SRAA. Inversement, l'augmentation de volume plasmatique par ingestion, injection ou rétention excessive de liquides provoque son inhibition.

Action directe du sodium plasmatique sur la production d'aldostérone : cette action est démontrée par le dosage de l'aldostérone dans la veine surrénale lors d'injection des solutions de chlorure de sodium de concentrations différentes dans l'artère surrénale. Il s'agit d'une régulation en boucle : les cellules corticosurrénales sécrétant l'aldostérone dans le plasma, hormone de la rétention sodée, sont sensibles aux taux de sodium plasmatique.

Régulation enzymatique du SRAA par la rénine : en pathologie, en réponse à une diminution significative du volume sanguin ou de la pression sanguine (par exemple, une perte de sang grave ou une déshydratation), les reins libèrent de la rénine dans la circulation. La rénine est une enzyme qui sépare un petit peptide (angiotensine I) d'une protéine plus grande (l'angiotensinogène) produite par le foie. L'angiotensine I est divisée en un peptide plus petit (angiotensine II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), une enzyme présente à la surface interne des vaisseaux sanguins et dans les poumons, le foie et les reins entre autre. L'angiotensine II stimule la constriction des petites artères, entraînant une augmentation de la pression artérielle. L'angiotensine II est également un puissant stimulateur de la synthèse de l'aldostérone par les glandes surrénales[15].

L'aldostérone est un stéroïde, une hormone, qui agit sur les cellules principales du tube contourné distale du rein pour augmenter la réabsorption du sodium et l'excrétion du potassium. La rétention du sodium par les reins augmente la rétention d'eau, entraînant une augmentation du volume sanguin et de la pression artérielle[16]. Un tel mécanisme explique que dans certaines malformations de l'artère rénale provoquant des goulots d'étranglement, la diminution de pression qui survient en aval de la striction provoque un accroissement constant de la sécrétion de rénine et une hypertension consécutive.

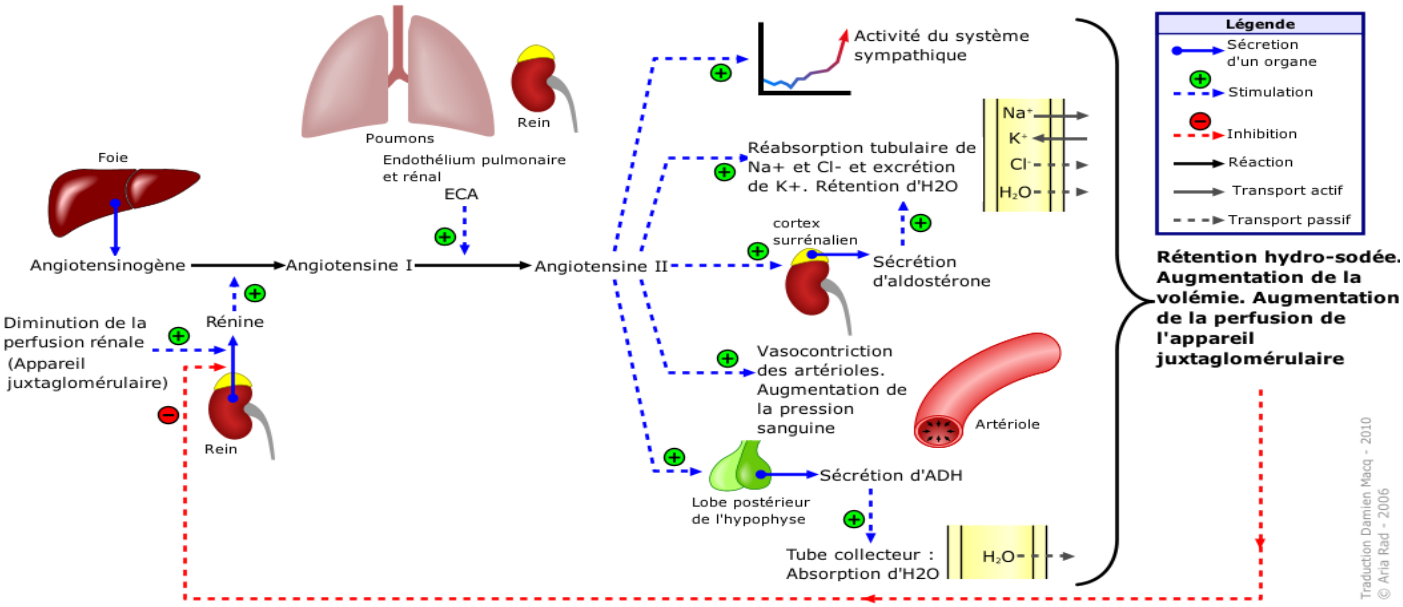


Figure 2: Schéma démonstratif du SRAA

1.6.3.2.2 L'hormone antidiurétique (ADH)

L'hormone antidiurétique (ADH; également connue sous le nom d'arginine vasopressine [AVP]) est sécrété par les cellules neuroendocrines de l'hypothalamus en réponse à une hyper-osmolarité ou une hypovolémie. L'ADH, en se liant à son récepteur V2 situé au pôle baso-latérale des cellules du tube collecteur rénal, provoque la Trans localisation de l'aquaporine 2 vers le pôle apical (luminal) induisant ainsi une augmentation de la réabsorption de l'eau[3].

1.6.3.2.3 Le système nerveux

Les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) induisent la réabsorption sodée dans le TCP et l'anse de Henlé. Elles stimulent ainsi le SRAA et sont à l'origine d'une vasoconstriction préférentielle de l'artériole efférente.

La dopamine est produite à partir de L-DOPA dans les tubules rénaux proximaux et agit sur les récepteurs de la dopamine répartis le long des tubules proximaux et sur les membres ascendants épais de la boucle de Henle pour réguler le transport du sodium. La dopamine favorise l'excrétion de sodium (natriurèse) en inhibant l'échangeur Na^+/H^+ et le co-transporteur Na^+/phosphate (Pi) dans les membranes cellulaires apicales et le co-transporteur Na^+/bicarbonate (HCO3-) et Na^+/K^+ ATPase dans les membranes cellulaires basolatérales. L'effet inhibiteur de la dopamine sur Na^+/K^+ ATPase est renforcé par l'hormone natriurétique, le peptide natriurétique auriculaire (ANP), qui est sécrété par les cellules du muscle cardiaque dans la circulation[17].

2. Pathologies associées au sodium

Des données épidémiologiques ont permis d'associer la consommation excessive du sel (NaCl) à des maladies comme l'hypertension et certaines maladies cardiovasculaires mais aussi au risque de cancers.

2.1. Hypertension et maladies cardio-vasculaires associées au sodium

2.1.1. Sel et hypertension

Presque la moitié des hypertendues présentent des changements de pression artérielle en réponse à une déplétion ou à une réplétion sodée ; on les appelle hypertendus sensibles au sel (SS). Une activité atténuée du système endothéline (ET) et du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) a été proposé comme un mécanisme pouvant contribuer à la sensibilité au sel. D'autres mécanismes impliquant le système immunitaire pourraient aussi participer à ces effets du sel sur l'hypertension[18].Des données indiquent que les rats déficients en ET-βR développent une hypertension artérielle sensible au sel lorsqu'ils sont soumis à une diète hyper sodée. Une pression artérielle normale est définie par une pression artérielle systolique inférieure à 120 mm Hg et une pression artérielle diastolique inférieure à 80 mm Hg, souvent notée <120/80 mm Hg[19]. Actuellement, environ le tiers des adultes américains souffrent d'hypertension (pression artérielle ≥ 140/90 mm Hg) et un autre tiers d'hypertension (préhypertension, correspondant à des niveaux ≥ 120/80 mm Hg et <140/90 mm Hg) qui les expose à un risque d'hypertension[20].

L'hypertension chronique endommage le cœur, les vaisseaux sanguins et les reins, augmentant ainsi le risque de maladie cardiaque et d'accident vasculaire cérébral, ainsi que d'insuffisance rénale hypertensive. Dans un certain nombre d'études cliniques, l'apport en sel a été significativement corrélé à l'hypertrophie ventriculaire gauche, un épaississement anormal du muscle cardiaque, associé à une mortalité accrue due aux maladies cardiovasculaires[21].

Plusieurs recherches, menées au cours des dernières décennies, ont mis en évidence une relation entre la consommation de sodium et l'hypertension artérielle. Par exemple, des études de cohorte d'observation, telles (INTERSALT), ont associé un apport excessif en sodium à une augmentation progressive de la pression artérielle avec l'âge[22,23]. De plus, un certain nombre d'études d'intervention, y compris l'essai d'interventions non pharmacologiques chez les personnes âgées, les essais de prévention de l'hypertension et les approches diététiques pour arrêter l'hypertension artérielle ont démontré que la réduction du sodium alimentaire pouvait prévenir efficacement ou améliorer l'hypertension parmi les sous-groupes de population à risque élevé (voir Essais cliniques sur les maladies cardiovasculaires).

Relation pression-natriurèse : le rein a un rôle essentiel dans le contrôle de la pression artérielle à long terme *via* la relation pression natriurèse. Le concept initialement introduit par Dr. Guyton à partir d'observations expérimentales indique que toute augmentation de pression artérielle conduit à l'augmentation de l'excrétion urinaire de sodium permettant de diminuer la volémie, le débit cardiaque. La relation pression-natriurèse est modulable (selon l'activité d'agents vasoactifs : angiotensine II, noradrénaline, aldostérone) et est aussi influencée par l'inflammation rénale (dont le rôle sera abordé plus loin dans ce document). Une altération de cette relation peut être observée en cas de survenue d'hypertension artérielle chronique essentielle. Des lésions des micro-vaisseaux pré-glomérulaires peuvent être à l'origine de l'HTA et d'un déplacement de la courbe de relation pression/natriuèse. Ces lésions sont volontiers associées à une infiltration de l'interstitium rénal par des leucocytes qui pourrait jouer un rôle central dans le déplacement de la courbe ainsi que la survenue d'HTA.

Sensibilité au sel : les réponses de la pression artérielle aux modifications à court terme de l'apport en sodium sont hétérogènes. En effet, certaines personnes ont peu ou pas de changement de pression artérielle en réponse à la manipulation du sodium et sont identifiées comme «résistantes au sel». En revanche, les personnes qui subissent une modification plus importante de la pression artérielle suite à une manipulation alimentaire du sodium sont qualifiées «sensibles au sel»[24]. La plupart des protocoles utilisés dans les études de sensibilité au sel impliquent des manipulations extrêmes de l'apport en sodium (chargement en sodium et appauvrissement en sodium) sur une courte période de

quelques jours ou jusqu'à une semaine. Une intervention iso-calorique contrôlée typique peut comprendre une manipulation diététique du sodium en deux phases, randomisée et croisée, avec une alimentation riche en sodium (6,9 à 8,1 g/jour) et une alimentation très faible en sodium (0,5 g/jour).

La résistance au sel est souvent définie comme un changement de ≤ 5 mm Hg dans la pression artérielle moyenne (PAM) sur 24 h entre un régime riche en sodium et un régime pauvre en sodium. Inversement, la sensibilité au sel est définie par des changements de> 5 mm Hg dans la MAP entre les régimes riches en sodium et ceux à haute teneur en sodium[25]. Environ 26% des sujets normotendus et 51% des hypertendus sont considérés comme sensibles au sel[26]. La sensibilité au sel chez les sujets normotendus s'est avérée prédire une hypertension future[27,28]. Des études de cohorte prospectives à long terme ont également fourni des preuves substantielles suggérant que la sensibilité au sel pourrait être un facteur de risque indépendant de maladie cardiovasculaire[29].

La sensibilité au sel implique une plus forte réabsorption du sodium dans les tubules proximaux du rein et un taux de filtration glomérulaire (TFG) plus élevé dans un régime riche en sodium que la résistance au sel. L'augmentation de la pression artérielle est considérée comme compensant la rétention élevée de sodium et de liquide en provoquant une augmentation de l'excrétion rénale. Inversement, la résistance au sel est associée à une excrétion adéquate de sodium en excès, de sorte que la consommation de grandes quantités de sodium n'augmente pas de manière marquée la pression artérielle.Des observations antérieures ont suggéré que certains sous-groupes de la population, y compris les Afro-Américains, les personnes âgées (> 45 ans) et les patients hypertendus avaient tendance à avoir des réponses moyennes plus élevées à la pression artérielle[29]. Néanmoins, une méta-analyse récente d'essais contrôlés randomisés a révélé des différences ethniques marginales dans la réponse de la pression artérielle à la réduction du sodium (pendant au moins une semaine) par rapport aux données précédemment rapportées[30]. Les recherches sur les bases génétiques de la sensibilité au sel pourraient éventuellement mener à une classification plus fiable des individus pour la sensibilité au sel.

Pourtant, à l'heure actuelle, les analyses des variations communes (appelées polymorphismes) dans la séquence de gènes spécifiques impliqués dans la rétention de sodium par le rein n'ont pas donné de résultats cohérents[31]. Une méta-analyse récente de neuf études d'observation n'a pas permis de montrer des associations significatives entre les polymorphismes géniques spécifiques du système rénine-angiotensine-aldostérone et la réponse de la pression artérielle au sel[32]. D'autres polymorphismes

dans des gènes comme ceux codant pour les récepteurs kinases de type 4 couplés aux protéines G (GRK4) et les canaux épithéliaux sodiques (ENaC) peuvent favoriser la rétention sodée par les reins[31].

Enfin, en plus des prédispositions génétiques, des facteurs tels que la qualité du régime alimentaire (par exemple, le régime DASH) et le poids corporel influent probablement sur la sensibilité de la pression artérielle au sel[29].

2.1.2. Sel et hypertrophie ventriculaire gauche (HVG)

L'hypertrophie ventriculaire gauche est un facteur prédictif important de survenue de maladies cardiovasculaires[33]. L'augmentation de la tension artérielle est un facteur de risque majeur pour l'HVG et le traitement à long terme de l'hypertension a entraîné une régression de l'HVG existante[34]. Une réduction de la consommation de sel réduit la TA et pourrait donc réduire le risque d'HVG. Des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent également que l'absorption de sel pourrait avoir un effet direct sur l'HVG indépendamment de la TA[35,36].

Il a été démontré qu'une réduction de la consommation de sel diminuait la masse VG chez les personnes hypertendues[37,38,39]. Deux autres études (une réduction de la consommation de sel de 5 g/jour pendant un an et l'autre une réduction de la consommation de sel de 2 g/jour pendant 4 ans) ont montré une diminution significative de la masse VG pendant six que la réduction du sel combinée à d'autres modifications du régime alimentaire et du mode de vie ont eu un effet significatif sur la réduction de la masse du VG. La dysfonction diastolique, caractérisée par des anomalies du remplissage ventriculaire, peut être présente chez les personnes hypertendues sans hypertrophie manifeste et peut représenter un marqueur précoce des lésions des organes terminaux. Jusqu'à 50% des personnes hypertendues présentent des signes de dysfonction diastolique[40]. Des essais thérapeutiques ont démontré que la diminution de la tension artérielle améliore la fonction diastolique même chez les personnes souffrant d'hypertension légère et quel que soit le type d'agent antihypertenseur utilisé[41].

Il est intéressant de noter que certaines études transversales ont montré qu'un apport en sel plus élevé (mesuré par la natriurèse des 24h), était associé à une altération de la fonction diastolique chez les

sujets hypertendus[42] et chez les patients atteints de diabète de type II[43]. De toute évidence, d'autres études sont nécessaires, en particulier pour déterminer si une réduction modeste à long terme de la consommation de sel, comme recommandé actuellement, a un effet significatif sur la fonction cardiaque.

2.1.3. Sel, dysfonctionnement endothélial et rigidité vasculaire

Les premières études chez l'animal et chez l'homme ont montré qu'un apport élevé en sel était associé à des altérations pathologiques de la structure et de la fonction des grandes artères élastiques, indépendamment des modifications de la pression artérielle[44]. La dysfonction endothéliale est considérée comme une étape précoce dans le développement de l'athérosclérose. Des altérations de la structure et de la fonction de l'endothélium vasculaire qui tapisse la surface interne de tous les vaisseaux sanguins sont associées à la perte de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, médiée par l'oxyde nitrique (NO). La dysfonction endothéliale entraîne des anomalies de vasoconstriction et de coagulation généralisées.

La fonction endothéliale peut être approchée de manière non-invasive en clinique par la mesure de la vasodilatation médiée par le flux (*flow-mediated dilatation* ou FMD). Cette technique échographique mesure la variation de diamètre de l'artère humérale lors d'une période d'hyperémie réactive suivant une ischémie du membre.Cette mesure de la vasodilatation médiée par le flux (FMD) est maintenant bien standardisée : le patient doit être à jeun et au repos depuis plus de 15 minutes, on mesure le calibre de l'artère humérale à l'état basal, puis on occlue le flux artériel grâce à un brassard gonflé à 200 mmHg pendant 5 minutes. On dégonfle ce dernier et on répète la mesure du calibre de l'artère humérale au même endroit que précédemment. Le résultat normal est une vasodilatation secondaire à une sécrétion physiologique de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales, reflet direct du bon fonctionnement endothélial.La mesure de la dilatation médiée par le flux (FMD) est ainsi souvent utilisée comme marqueur fonctionnel de la fonction endothéliale. Les valeurs de la FMD sont inversement corrélées au risque d'événements cardiovasculaires futurs[45].

Le lien entre l'apport en sodium et les maladies cardiovasculaires a traditionnellement impliqué l'hypertension. Pourtant, des études récentes chez des individus normotendus sensibles au sel ont

rapporté que la charge en sodium alimentaire pouvait altérer la fonction endothéliale indépendamment des variations de la pression artérielle[45,33]. Une étude utilisant des conditions alimentaires sodées contrôlées a également démontré qu'une alimentation riche en sodium (6,9 g/jour pendant une semaine) réduisait la FMD[34]. Chez les adultes normotendus en bonne santé chez qui la FMD a diminué de manière significative après un repas contenant 1,5 g de sodium, une supplémentation en potassium (1,5 g) pouvait limiter la réduction de la FMD induit par le sodium dans l'état postprandial[36,37]. Les améliorations de la pression artérielle et de la fonction endothéliale suggèrent que la restriction sodée pourrait réduire le risque des maladies cardiovasculaires.

2.1.4. Sel, morbidité et mortalité cardiovasculaires

Un apport alimentaire élevé en sodium est un facteur de risque de maladie cardiovasculaire. Une analyse groupée de 13 études de cohorte prospectives portant sur 177 025 participants suivis pendant 3 à 17 ans a révélé de plus grands risques de maladie cardiovasculaire (+ 17%) et d'AVC (+ 23%) avec une différence moyenne de 2 g de sodium (5 g de sel) entre consommation quotidienne plus élevée et plus faible entre les études[40]. Des apports plus élevés en sodium se sont également avérés associés à un risque accru d'AVC (+ 24%) mais pas au risque de maladie cardiovasculaire ou de maladie coronarienne[41].

Une méta-analyse d'études contrôlées et randomisées a examiné l'effet de la réduction du sodium alimentaire sur les événements cardiovasculaires et la mortalité[42]. Les interventions alimentaires visant à réduire l'apport en sodium n'ont pas démontré d'effet sur la mortalité toutes causes confondues chez les sujets hypertendus et non hypertendus. Les preuves actuelles ne permettent pas non plus de réduire la morbidité et la mortalité cardiovasculaires chez les patients hypertendus[42].

De même, le rapport de 2013 de l'OIM sur la consommation de sodium dans les populations (parrainé par les Centers for Disease Control and Prevention, CDC) indiquait que les preuves étaient rares et de qualité médiocre pour déterminer si les apports sodiques inférieurs à 2,3 g/jour prévenaient des maladies, d'accidents vasculaires cérébral et mortalité toutes causes confondues dans la population générale des États-Unis[46]. De plus, le comité de l'IOM, n'a trouvé aucune preuve d'avantages, mais il

existe des preuves d'effets nocifs potentiels sur la réduction de l'apport en sodium à 1,5 g/jour-2,3 g/jour chez les personnes atteintes de diabète, de maladies rénales ou cardiovasculaires[46].

Par conséquent, le comité de l'OIM (institut américaine de médecine) a reconnu la nécessité de mener des études supplémentaires sur l'effet d'une gamme de niveaux de sodium, notamment entre 1,5 g/jour et 2,3 g/jour, sur les effets sur la santé, y compris les accidents cardiovasculaires et la mortalité[46].

2.1.5. Essais cliniques : maladies cardiovasculaires et apports sodés

Les résultats des essais multicentriques à long terme les plus pertinents pour la pratique clinique et la santé publique revêtent une importance particulière. TONE a montré qu'une réduction modeste de l'apport en sodium d'environ 1,0 g/jour (environ 2,5 g/jour de sel) permettait un meilleur contrôle de l'hypertension chez les personnes âgées qui prenaient initialement un médicament contre l'hypertension[47]. TOHP-Phase II (le deuxième des deux essais de prévention de l'hypertension) a montré qu'un taux similaire de réduction du sodium réduisait significativement la pression artérielle systolique (mais non diastolique) de 1,2 mmHg chez les 18% après quatre ans par rapport aux soins habituels (aucune intervention alimentaire)[48].

L'essai DASH-sodium a comparé le régime alimentaire DASH (les fruits, les légumes, les grains entiers, la volaille, le poisson, les noix et les produits laitiers à faible teneur en matières grasses) à un régime américain typique (contrôle) à trois niveaux de consommation de sodium: faible (1,5 g/jour, IA actuelle), intermédiaire (2,3 g/jour, recommandé par les États-Unis comme régime alimentaire) et des niveaux élevés (3,2 g/jour, consommation habituelle aux États-Unis)[49]. À chaque niveau de consommation de sodium, les pressions artérielles systoliques et diastoliques étaient systématiquement inférieures chez les personnes (pré-) hypertendues (pression artérielle> 120/80 mm Hg) consommant le régime DASH par rapport au régime témoin.

La réduction de l'apport en sodium a également réduit de manière significative la pression artérielle chez les consommateurs hypertendus du régime DASH ou du régime américain typique.

Comparativement au régime hyposodé, la pression artérielle moyenne chez les participants (pré-) hypertendus recevant le régime DASH à faible teneur en sodium a diminué de 8,9 à 4,5 mm Hg. Les résultats des essais DASH soutiennent l'idée que la réduction du sodium dans le contexte d'un régime alimentaire sain constitue une approche efficace de la prévention et du traitement de l'hypertension[50].

Une majorité d'essais cliniques randomisés ont examiné l'effet de la réduction du sodium alimentaire sur la tension artérielle chez des personnes (pré-) hypertendues plutôt que normotendues (pression artérielle normale) [51]. Une méta-analyse récente a évalué les résultats d'une réduction modérée du sodium à partir de 22 essais sur 990 participants hypertendus (pression artérielle ≥ 140/90 mm Hg) et 12 essais sur 2 240 participants sans hypertension (pression artérielle <140/90 mm Hg).

Une réduction modérée du sodium de 1,8 g / jour (équivalent à 4,4 g/jour de sel, sur la base d'excrétion urinaire de sodium sur 24 heures) pendant au moins quatre semaines a diminué la pression artérielle systolique et diastolique de 5,4 à 2,8 mm Hg en moyenne chez les sujets avec hypertension et de 2,4 à 1,0 mm Hg chez ceux sans hypertension[52]. L'IOM recommande que les adultes ne consomment pas plus de 2,3 g/jour de sodium (c.-à-d. 5,8 g/jour de sel).

2.2. Lien entre NaCl et tumeur

En général, on distingue cinq stades de développement des tumeurs : 1) initiation, 2) promotion, 3) conversion maligne, 4) invasion et 5) métastase. Dans presque tous les stades de développement du cancer, l'inflammation joue un rôle crucial[53,54,55,56,57]. Bien que de nombreux facteurs génétiques et environnementaux sous-tendent le développement et la progression du cancer, une alimentation riche en sel (NaCl) pourrait agir sur les cinq stades développementaux pour promouvoir et déclencher le cancer, tout d'abord par l'activation du de certaines cellules du système immunitaire favorisant l'inflammation chronique, ainsi que par la production des facteurs de croissance tumoraux et l'action directe sur les cellules tumorales elles-mêmes.

2.2.1. Relation entre régime alimentaire riche en sel et survenue du cancer

Plusieurs références qui datent plus que 20 ans soutiennent la conclusion suivante : « Généralement, un fort ratio de potassium/sodium est associé à la diminution d'incidence du cancer. Conformément, un plus fort ratio de sodium/potassium avec une plus forte concentration absolue de sodium, est associé à un risque élevé de cancer ». Il a été reconnu que des modifications de la surface cellulaire sont impliquées dans les processus oncogéniques et mitogéniques, y compris les changements dans le transport ionique, la perméabilité membranaire, le potentiel transmembranaire et les concentrations en ions intracellulaires.

De plus, Cone et al ont souligné que les événements environnementaux qui réduisent l'activité de la pompe Na^+/K^+ dans la membrane de surface cellulaire initient et soutiennent la mitose. La notion que les concentrations de Na^+ intracellulaire sont élevées dans les cellules cancéreuses, alors que les concentrations de K^+ sont réduites, a été démontrée dans des études tissulaires ainsi que des données in vivo provenant d'une variété d'expériences humaines et animales[58,59,60,61,62].

2.2.2. Dommages à l'ADN, réparation et sel

Les cellules ont développé des mécanismes qui surveillent constamment l'ADN pour détecter tout dommage ou rupture de son intégrité, puis procèdent à la réparation de l'ADN cassé ou endommagé[53]. Les dommages à l'ADN se produisent lors d'une inflammation aiguë et s'accumulent par la suite lors d'une inflammation chronique. Les mécanismes de réparation de l'ADN jouent un rôle important dans la lutte contre les dommages causés à l'ADN, mais ne réussissent pas toujours, entraînant souvent la promotion du cancer[53]. Burg et ses collègues ont démontré qu'un environnement riche en sel augmente le nombre de ruptures d'ADN à la fois dans les cultures cellulaires et *in vivo*[63,64].

Des élévations aiguës de l'osmolalité de 300 (concentration normale dans le plasma) à 500-600 mosmol/kg H2O en ajoutant du NaCl provoquent des ruptures de brins d'ADN au niveau des tissus, des expériences *in vivo,* qui persistent même après que les cellules se sont adaptées aux environnements

riches en sel[63,64]. Les régimes riches en sel peuvent provoquer une augmentation des concentrations intracellulaires de Na^+ dans les tissus (peau, muscle, érythrocyte, cerveau, rein) au-delà des concentrations plasmatiques de Na^+ [2,1,65,66,67,6,68]. En conséquence, tant que les apports élevés en sel sont maintenus, les concentrations élevées de Na^+ trouvées dans les réservoirs tissulaires de Na^+ (peau, muscles, érythrocytes, cerveau et autres tissus) les exposent à un risque potentiellement accru de dommages à l'ADN, d'inflammation et de cancer. la promotion non seulement de l'augmentation des ruptures d'ADN mais aussi de son milieu pro-inflammatoire associé[53].

2.2.3. Radicaux libres d'oxygène (ROS) et sel

La consommation de sel pourrait avoir des effets nocifs sur la santé en induisant la production accrue de ROS qui agit à son tour de manière synergique pour promouvoir les dommages à l'ADN et un microenvironnement pro-inflammatoire propice à la formation du cancer[69,70]. Les ROS (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyles) sont soit formés de manière endogène en tant que produit normal du métabolisme de l'oxygène et ont des rôles importants dans la signalisation cellulaire et l'homéostasie soit formés en grande quantité suite à l'exposition à divers facteurs: alimentation, fumée de tabac, polluants environnementaux, radiations, médicaments et consommation de sel. Ce processus est appelé stress oxydatif et produit une inflammation chronique pouvant mener au cancer[53,71].

2.2.4. Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et sel

L'angiogenèse, la création de nouveaux vaisseaux à partir de la vascularisation établie est cruciale pour la croissance tumorale et les métastases. L'angiogenèse est régulée par de multiples facteurs dont le VEGF (vascular endothelial growth factor, facteur de croissance de l'endothelium vasculaire) joue un rôle principal. Diverses approches pour inhiber la voie de signalisation du VEGF en ciblant directement le VEGF lui-même ou en bloquant ses récepteurs ont été développés et sont devenues des techniques établies pour traiter une grande variété de cancers[72,73,74,75]. Le VEGF provoque l'angiogenèse dans les tumeurs par l'intermédiaire de mécanismes multiples, y compris l'activation de voies de signalisation spécifiques (NFAT5 et AKT/PI3k)[76,77].

Au moins deux études chez l'homme ont démontré des augmentations significatives des concentrations circulantes de VEGF-C suite à la consommation de régimes riches en sel[78,79]. Les données humaines corroborent les expérimentations animales montrant également que les régimes riches en sel augmentent le VEGF-C[80,81]. Il a récemment été démontré que les environnements cellulaires riches en sel induisent directement l'expression du VEGF dans les cellules cancéreuses du sein par un certain nombre de mécanismes, y compris la voie de signalisation NFAT5[76]. Des études chez des patientes atteintes d'un cancer du sein ont montré une forte corrélation entre l'expression génétique de NFAT5 et le développement du cancer du sein[82]. Cette accumulation d'informations indique clairement qu'un environnement riche en sel favorise l'angiogenèse dans les cellules tumorales.

2.2.5. Métabolisme de Warburg induit par le sel dans les cellules cancéreuses

L'une des caractéristiques déterminantes de toutes les cellules cancéreuses, contrairement aux cellules normales, est qu'elles utilisent un métabolisme apparemment inefficace du glucose, produisant de grandes quantités de lactate par opposition à la synthèse de l'ATP.Ce métabolisme anormal du glucose par toutes les cellules cancéreuses est appelé glycolyse en aérobie et a été identifié pour la première fois par Otto Warburg en 1924[83,84] et est donc appelé «l'effet Warburg» des cellules cancéreuses[85,83,84]. Bien que les causes exactes de «l'effet Warburg» de toutes les cellules cancéreuses ne soient pas claires, un stress osmotique élevé dans le microenvironnement de la tumeur solide est considéré comme l'un des facteurs les plus importants[63,64,85].

Comme nous l’avons mentionné, un régime riche en sel augmente transitoirement les concentrations plasmatiques de Na^{+}[8,86] qui provoquent des concentrations élevées de sel dans presque tous les tissus, y compris la peau, les muscles, les érythrocytes, le cerveau et les reins[2,1,68,6,7,66] ce qui serait à l’origine d’un stress osmotique élevé dans ces tissus[63,64]. Amara et ses collègues ont démontré qu'un environnement riche en sel amplifie l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses du sein en augmentant le stress osmotique[85]. En conséquence, le sel alimentaire pourrait agir en favorisant la

prolifération des cellules cancéreuses dans divers tissus en renforçant l'effet Warburg dans les tumeurs en croissance active.

Nous avons vu qu'un apport riche en sodium pourrait contribuer à de nombreuses pathologies comme les maladies cardiovasculaires ainsi que les cancers. Par ailleurs, le système immunitaire est bien connu pour jouer un rôle important dans l'évolution des cancers[87] et plus récemment l'immunité a été impliquée comme un contributeur clé dans la genèse de l'hypertension artérielle et de certaines maladies cardiovasculaire[88,89,90]. De plus des études récentes ont montré l'impact du Na^+ sur les fonctions du système immunitaire tant inné[91,92,93] qu'adaptatif [94,95,96]. Ainsi le système immunitaire pourrait être un médiateur important des effets du Na^+ sur les pathologies précitées. Nous allons donc maintenant présenté plus en détail le système immunitaire puis les effets du Na^+ sur les réponses immunitaires.

Chapitre -II-

Le système immunitaire

1 Généralités sur le système immunitaire

En médecine, les concepts d'immunologie ont de nombreuses applications dans le diagnostic, le traitement, la prévention et la pathogenèse des maladies. Initialement la fonction reconnue du système immunitaire était de restaurer l'homéostasie de l'organisme en détectant et éliminant les antigènes considérés comme « nocifs » ou pathogènes (agents infectieux).

Cependant il est apparu secondairement que le système immunitaire avait un potentiel auto-réactif intrinsèque. Ainsi les fonctions reconnaissance du soi sont importantes aussi bien pour éliminer les cellules en apoptose que pour réguler négativement les risques de réponse auto-immunitaire pathogène. Ainsi il existe deux types de « réponse » immunitaire : la réponse que nous appellerons effectrice (mobilisée contre les agents infectieux par ex) et la réponse tolérogène.

Dans les réponses immunitaires « effectrices » la première ligne de défense d'un organisme est appelée immunité « innée ». Elle est apparue très tôt dans l'évolution des espèces et se conserve au cours de la vie d'un individu. Le terme «inné» fait référence à la capacité de ce système de déclencher une réponse immédiate sans nécessité « d'éducation » (ou d'adaptation). L'immunité « adaptative », quant-à elle est mobilisée secondairement. Les cellules de ce système présentent un répertoire très diversifié de récepteurs spécifiques codés par une région du génome (locus BCR et TCR pour les LB et le LT respectivement) qui subit des recombinaisons génétiques somatiques à l'origine de la diversité. Les cellules les plus « efficaces » pour interagir avec l'antigène sont sélectionnées et subissent une expansion clonale. Cette immunité est capable de développer des lymphocytes « mémoire » à vie longue capables de réagir rapidement en cas de réintroduction de l'antigène. Ce système immunitaire adaptatif a besoin d'une activation préalable de l'immunité innée pour se mobiliser. Ainsi les cellules lymphocytaires du SI adaptatif doivent interagir avec celles du SI inné (notamment les cellules présentatrices d'antigènes dont les dendritiques) pour déclencher leur activation spécifique par l'antigène étranger.

Nous présenterons brièvement l'immunité innée puis les cellules de l'immunité adaptative puis enfin les interactions du SI inné et adaptatif *via* la synapse immunologique entre les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes.

2 L’immunité innée

L’immunité innée comprend des protéines circulantes (le complément, des médiateurs inflammatoires comme les APP, la cascade de la coagulation, la kynine) et aussi plusieurs types cellulaires : les granulocytes, les NK, les ILC (Innate Lymphoid Cells, cells), les mastocytes et le système monophagocytaire (monocytes, macrophages, cellules dendritiques). Toutes les cellules de ce système sont générées à partir de la moelle osseuse.

Dans ce travail nous nous focaliserons tout spécialement sur le système monophagocytaire qui est activé par des «signaux de danger» provenant de divers agents exogènes (comme les motifs des pathogènes; PAMP) ou endogènes (motif DAMP libérés par les cellules nécrosées). Ces cellules peuvent initier la défense de l'hôte et l'inflammation directement *via* la phagocytose, la production de cytokines, de chimiokines, d’autres substances (ROS, enzymes protéolytiques) et aussi indirectement en déclenchant l'activation de la réponse immunitaire adaptative *via* la présentation de l'antigène et participent à la polarisation de cette réponse[97].

2.1 Les cellules de l’immunité innée

Parmi les cellules de l’immunité innée on trouve les granulocytes qui comprennent les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les mastocytes. Leurs granules contiennent des enzymes protéolytiques et libèrent des médiateurs inflammatoires localement après leur recrutement sur le site d’infection.

Les **basophiles** sont responsables des réponses inflammatoires à court terme en libérant de l'histamine et de l'héparine. Cette réponse se traduit par la fusion des granules intracellulaires avec la membrane superficielle et la libération de leur contenu vers l'extérieur par le processus d'exocytose. Les basophiles sont présents en très faible nombre dans la circulation.

La différentiation des **éosinophiles** au sein de la moelle osseuse est dépendante d'IL-15. Ils sont connus pour leur rôle médiateur de la réponse immunitaire des lymphocytes Th2[98]. Ils présentent une certaine activité phagocytaire, mais sont principalement responsables de la destruction extracellulaire des grands parasites qui ne peuvent pas être phagocytés. Les anticorps qui se lient à la surface des parasites amènent les éosinophiles à interagir *via* les récepteurs Fc où ils libèrent le contenu des granules, les peroxydes et les toxines qui tuent le parasite.

Les **neutrophiles** sont le plus grand sous-ensemble de globules blancs. Ils sont très abondants et agissent très rapidement. Les neutrophiles sont les premiers à migrer lors d'un événement inflammatoire. Ils sont attirés sur le site de l'inflammation par des facteurs chimiotactiques pour protéger contre les infections bactériennes et fongiques. Ils peuvent phagocyter les antigènes et les éliminer, leur activation provoque de la nécrose cellulaire, après avoir leur fonction, ils meurent et laissent place à un site purulent. À la suite d'une réponse initiale des neutrophiles, les monocytes et les macrophages arrivent généralement au site de l'inflammation pour nettoyer les neutrophiles en nécrose, les débris cellulaires et les antigènes restants.

Les **lymphocytes NK** « natural killers », les cellules tueuses naturelles, sont les lymphocytes effecteurs classiques du système immunitaire inné[99]. La fonction principale des cellules tueuses naturelles (NK) est de tuer les cellules auto-infectées par le virus. Les cellules NK ne portent pas de récepteur d'antigène. Les cellules NK reconnaissent les auto-cellules normales mais les ignorent tout en tuant les auto-cellules infectées ou malignes. Ils le font en libérant le contenu des granules, comme la perforine et le granzyme, à la surface de la cellule infectée. Les monocytes et les macrophages stimulent les cellules NK pour produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ (interféron-γ), qui aident à protéger les cellules environnantes contre l'infection virale, bien que l'IFN-α et l'IFN-β jouent un rôle plus important. L'IFN-γ peut également favoriser le développement de réponses spécifiques des cellules T dirigées contre les cellules infectées par le virus.

Les **cellules lymphoïdes innées**, une autre population de lymphocytes appartenant à la branche innée du système immunitaire a été identifiée et étudiée ces dernières années. En raison de leur activation indépendante de l'antigène et de leur morphologie lymphoïde, ces cellules ont été appelées «cellules lymphoïdes innées» (ILC). Les cellules NK partagent les caractéristiques des cellules

lymphoïdes innées et sont considérées comme ILC «tueuses». Les cellules NK (ou ILC «tueuses») reconnaissent les cellules stressées et endommagées par un répertoire de récepteurs de cellules NK activateurs et inhibiteurs. Lors de l'activation, les cellules NK exercent des effets cytotoxiques sur les cellules cibles. La famille des ILC «non meurtriers», également appelés ILC «auxiliaires», peut être divisée en trois groupes qui diffèrent par leur production de cytokines, leur utilisation de facteurs de transcription, leur localisation tissulaire et leur caractéristique fonctionnelle[100].

Le **système monophagocytaire** (SMP) comprenant les monocytes et les macrophages et pour certains auteurs les DC qui partagent avec les deux premières de nombreuses caractéristiques communes. Le SMP joue un rôle important dans la réponse innée dans des tous les organes et notamment dans la peau, les intestins et l'épithélium respiratoire largement en contact avec l'extérieur. Une fonction importante des cellules de ce système est de reconnaître les signaux dangers de leur environnement proche *via* des récepteurs appelés PRR. Toutes les cellules du SMP contiennent des PRR ainsi que de nombreux autres types de cellules (les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires, les trophoblastes, les cellules épithéliales et autres). Ces PRR doivent être activés pour initier et propager une réponse immunitaire. Une autre propriété fondamentale est leur capacité d'ingérer des antigènes par différents mécanismes (phagocytose, pinocytose, endocytose etc…). Une autre fonction essentielle est leur capacité à ré-exprimer à leur surface des fragments des antigènes ingérés afin de les présenter au SI adaptatif et de déclencher son activation de manière plus ou moins efficace selon le type cellulaire.

Les **monocytes** se différencient dans la moelle osseuse, ce sont des cellules précurseurs des phagocytes mononuclées (macrophages et certaines sous familles de cellules dendritiques). Leur capacité de phagocytose a été montrée par Ilya Metchnikoff en 1880s pour la première fois, et depuis les monocytes ont été considérés comme indispensables pour les défenses immunitaires notamment contre les pathogènes[101]. Ils expriment CD14, CD16 (Fc gamma RIII), CD64 (Fc gamma RI) et les récepteurs chimiokinques CD192 (aussi appelé CCR2, médiateur de migratrion monocytaire) et CX3CR1 (fractalkine receptor)[102]. Lors d'une infection ou inflammation, les monocytes sont recrutés vers les tissus cibles, où ils acquièrent des propriétés inflammatoires synthétisant et sécrétant des médiateurs inflammatoires et se différentient en macrophages ou éventuellement DC. Les monocytes circulants dans le sang sont dotés aussi de fonctions effectrices, ils participent à la clairance de

microorganismes, virus et bactéries. Les monocytes captent certains pathogènes (*via* différents récepteurs), puis les dégradent grâce à la production de ROS et d'enzymes protéolytiques. Il a aussi été mis en évidence que les précurseurs médullaires des monocytes (promonocytes) ont la capacité de capter des antigènes provenant de cellules apoptotiques (lymphocytes B et neutrophiles) dans la moelle osseuse. Ces monocytes migrent en périphérie pour présenter les antigènes aux LT effecteurs[103].

Les **macrophages** sont impliqués dans l'immunité innée. Les macrophages partagent certaines caractéristiques en commun avec les cellules dendritiques et plusieurs classifications de macrophages sont actuellement utilisées. Une classification utilise le marqueur LysM pour séparer les macrophages résidant dans les tissus et les macrophages inflammatoires. Une autre classification plus commune différencie les sous-types de macrophages M1 et M2[104]. Le sous-type M1 est proinflammatoire et est activé lorsqu'il est exposé à l'IFN-γ et au TNF-α Les macrophages M1 métabolisent l'arginine en NO et la citrulline par l'iNOS, le NO favorise la destruction et l'inflammation bactériennes, tandis que et les macrophages M2 métabolisent l'arginine en ornithine et en urée par l'arginase, l'ornithine favorise la cicatrisation des plaies et la biosynthèse du collagène[105]. Les macrophages M2 produisent le TGF-β, qui est sécrété sous une forme inactive et qui nécessite une activation par un processus dépendant de l'intégrine αVβ8. L'intégrine doit être exprimée sur la même cellule présentant l'antigène, ce qui suggère que seul le TGF-β sécrété par les macrophages et les DC exprimant les intégrines αVβ8 est pertinent pour l'induction des lymphocytes iTreg et Th17[106,107,108].

Les **Cellules Dendritiques** décrites d'abord dans l'épiderme en 1868 par Paul Langerhans, les cellules dendritiques ont d'abord été considérées comme des cellules neurales intradermiques pendant de longues années. C'est en 1973 que Ralph Steinmann et Zanvil Cohn les caractérisent et démontrent leur origine hématopoïétique[109]. En procédant à l'extraction de cellules de rate de souris, les auteurs ont observé des cellules étoilées avec de longs prolongements membranaires nommées cellules dendritiques (DC)[110]. Ces DC spléniques, isolées grâce à leur capacité d'adhérence transitoire aux surfaces plastiques, ont été caractérisées par une forte mobilité, une faible capacité d'endocytose en plus de leurs longs prolongements cytoplasmiques[109]. Contrairement à ce qu'avait suggéré Burnet en 1960 sur la sélection clonale[111], la présence d'un antigène ne suffit pas à elle seule à sélectionner et induire la multiplication de lymphocytes, les DC sont nécessaires à cette activation lymphocytaire. Leur rôle

fondamental dans le contrôle des réponses immunitaires a été ensuite démontré par Banchereau et Steinman[112].

Classification des DC : Les DC constituent une famille très hétérogène de cellules, dont différentes sous-populations sont connues et se distinguent principalement par leur origine hématopoïétique, leur localisation dans l'organisme et leur stade de maturation. Leur phénotype est aussi très variable, il n'existe en effet aucun marqueur commun à toutes les DC. Deux grands types de DC ont d'abord été caractérisées : les DC conventionnelles (cDC), aussi appelées DC myéloïdes et les DC plasmacytoïdes (pDC).

Les DC décrites par Steinman en 1973 appartiennent au groupe des cDC. Elles sont issues de monocytes ou de précurseurs myéloïdes. Leur identification est possible par l'expression de la molécule de surface CD11c. Les cDC sont toutes des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles impliquées dans l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ et CD8+. Elles sont en effet capables d'apprêter et de présenter les antigènes captés, tout en sécrétant une grande quantité d'interleukine 12 (IL-12) et autres cytokines polarisantes.

Les pDC doivent leur nom à leur ressemblance avec les plasmocytes[113]. Elles se différencient des cDC par leur origine plutôt lymphoïde et par leur phénotype CD11c-, $CD123^{high}$ ainsi que par leur capacité à produire de l'interféron-α en grande quantité après activation. Leur expression de TLR 7 et 9 endosomaux font des pDC des médiateurs importants de l'immunité antivirale. Comme les cDC, elles peuvent présenter des antigènes aux LT mais avec une efficacité moindre.

Une autre classification des DC repose sur la capacité migratoire des DC : les DC migratoires ou circulantes et les DC résidentes. Les DC migratoires sont présentes dans la peau, les ganglions lymphatiques, dans les muqueuses et dans les tissus périphériques. Cette catégorie regroupe l'ensemble des DC dermiques, interstitielles et des cellules de Langerhans[114]. Le tissu d'origine auquel elles sont associées permet leur distinction. En cas d'agression d'un tissu de l'organisme, outre les DC résidentes, les DC migratoires circulantes pénètrent le tissu périphérique où elles peuvent internaliser les antigènes de l'agent agresseur et engager le processus de maturation. Ensuite, elles migrent vers les ganglions

lymphatiques pour aller à la rencontre des lymphocytes T pour induire une réponse immunitaire adaptative. Elles jouent ainsi un rôle de sentinelle.

Les DC résidentes retrouvées au sein des organes lymphoïdes avaient été nommées cellules interdigitées suite à l'observation de leurs longs prolongements cytoplasmiques. Elles participent à la mise en place de la tolérance au soi mais peuvent aussi intervenir localement en cas d'infection pour capturer les antigènes et induire une prolifération des LT.

Un modèle *in vitro* de différenciation de DC est aussi connu à partir de monocytes sanguins, il s'agit des « monocytes-derived dendritic cells, moDC ». Leur obtention repose sur la mise en culture pendant 7 jours de monocytes sanguins (CD14+) purifiés dans un milieu supplémenté en Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et en IL-4[115]. Des études ont démontré que les moDC disposent de capacité de présentation antigénique et d'activation lymphocytaire aussi puissantes que les DC conventionnelles. Des travaux indiquent que les moDC induites *in vitro* sont très similaires aux DC inflammatoires.

Une étude a rapporté que les DC dérivées de monocytes cultivés *in vitro* avec du GM-CSF partageaient une signature transcriptomique avec les DC inflammatoires[116]. Ce qui suggérerait que les DCs inflammatoires humaines pourraient être dérivées de monocytes, et non pas de précurseurs de DC[116]. De plus, la récente caractérisation de DC présentent au sein de microenvironnements inflammatoires rapporte que ces cellules humaines équivalent aux DC inflammatoires murines[117].

Une fonction essentielle de toutes les DC est leur capacité à ré-exprimer à leur surface des fragments des antigènes ingérés afin de les présenter au système immunitaire adaptatif notamment aux LT CD4 et de déclencher leur activation efficace et leur polarisation.

2.2 Les récepteurs de l'immunité innée

La réponse immunitaire innée est pivoté par la reconnaissance des signaux de danger, tels les particules associés à des agents pathogènes (PAMP, pathogen-associated molecular patterns), notamment les acides nucléiques viraux, les molécules bactériennes telles que les lipopolysaccharides

(LPS), les lipoprotéines, la flagelline, le peptidoglycane et l'ADN CpG. Outre les PAMP, les signaux de danger non microbiens provenant des cellules hôtes apoptotiques et nécrotiques, appelés particules associés au danger (DAMP, danger associated molecular patterns), déclenchent également des réponses immunitaires innées[118]. Ces PAMP et DAMP sont reconnus par les cellules hôtes *via* les récepteurs de l'immunité innée qui se regroupent sous la nomenclature de récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR, pattern recognition receptors), notamment les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs de type Nod (NLR), les récepteurs de type RIGI (RLR) et les lectines de type C (CLR)[119], (Tableau. 3).

La plupart des PRR peuvent être classés dans l'une des cinq familles en fonction de l'homologie du domaine protéique. Ces cinq familles comprennent les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs de lectine de type C (CLR), le domaine de liaison aux nucléotides, les récepteurs riches en leucine (LRR) contenant (ou de type NOD), les récepteurs RIG-I like (RLR) et les récepteurs de type AIM2 (ALR)[120]. Ces familles peuvent être séparées en deux classes principales: les récepteurs liés aux membranes et les récepteurs intracellulaires non liés. La première classe comprend les TLR et les CLR, qui se trouvent à la surface des cellules ou sur les compartiments endocytaires. Ces récepteurs surveillent la présence de ligands microbiens dans l'espace extracellulaire et dans les endosomes. Les NLR, les RLR et les ALR forment le dernier groupe de PRR situés dans le cytoplasme, activés par la présence de pathogènes intracellulaires.

Un composant majeur de la réponse immunitaire innée induite par le PRR est la transcription, qui conduit à la production de cytokines proinflammatoires; ces messages chimiques sont essentiels pour déclencher des réponses immunitaires innées et adaptatives. L'activation des PRR déclenche également des réponses non transcriptionnelles telles que l'induction de la phagocytose, l'autophagie, la mort cellulaire et le traitement des cytokines[121,122]. Ces réponses immunitaires innées transcriptionnelles et non transcriptionnelles sont liées à la détection microbienne à médiation PRR par des voies de transduction de signal étroitement contrôlées.

Tableau 3 : Familles des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR, pattern recognition receptor)[123].

Family	Members	Shared domains	Receptor locations
TLR	1–10 in humans, 1–9 and 11–13 mice	LRR, TIR	Cell surface, endosomal compartments
CLR	Dectin-1, Dectin-2, … etc. (reviewed in Reference 4)	C-type lectin	Cell surface
NLR	NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2), NLRC3–5, NLRP1–9 and 11–14, NAIP1, -2, -5, -6	Nucleotide binding, LRR	Cytoplasm, plasma, and endosomal membrane associated
RLR	RIG-I, MDA5, LGP2	DExD/H helicase	Cytoplasm
ALR	AIM2, IFI16	PYRIN, HIN-200	Cytoplasm, nucleus (IFI16)

Abbreviations: AIM, absent in melanoma; ALR, AIM2-like receptor; CARD, caspase recruitment domain; CLR, C-type lectin receptor; IFI, interferon, γ-inducible; LGP, laboratory of genetics and physiology; LRR, leucine-rich repeat; MDA, melanoma differentiation gene; NAIP, NLR family, apoptosis inhibitory protein; NLR, nucleotide-binding oligomerization domain receptor; NLRC, NLR family CARD domain containing; NLRP, NLR family PYD domain containing; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; RIG-I, retinoic acid–inducible gene I; RLR, RIG-I-like receptor; TIR, Toll/IL-1 receptor/resistance; TLR, Toll-like receptor.

Famille des TLRs et leur signalisation intracellulaire : Les TLR sont des protéines réceptrices homo- ou hétérodimériques de taille assez grande (780-1100 aa de longueur). Environ 80% de la chaîne polypeptidique se projette au-dessus de la membrane plasmique (pour les TLR 1, 2, 4, 5 et 6) ou dans la vésicule endosomale (pour les TLR 3, 7, 8, 9) et elle est principalement composée de répétitions riches en leucine. Les molécules endogènes capables d'activer la signalisation TLR, (TLR 3, 7, 8 et 9) détectent les acides nucléiques. Notamment, l'ADN de l'hôte peut activer TLR9, et est probablement pertinent pour la pathogenèse de certaines maladies auto-immunitaires dans lesquelles les anticorps contre les composants de la chromatine peuvent aider à internaliser les molécules d'ADN. Le TLR7 joue un rôle important dans la résistance à l'infection grippale. Les bactéries à Gram positif sont gérées par les complexes TLR2. Les TLR agissent souvent dans des complexes avec d'autres protéines[124].

Bien que le **TLR4** soit largement dédié à la détection des bactéries à Gram négatif surtout les lipopolysaccharides LPS, il est également important dans la lutte contre certaines infections virales:

virus syncitiale respiratoire (RSV) et rhabdovirales (virus de la stomatite vésiculeuse; VSV) ainsi que l'herpès[125,126]. TLR 4 a aussi la capacité d'interagir avec certains DAMP, des molécules endogènes notamment les protéines de choc thermique (HSP), l'acide hyaluronique et la β-défensine[127,128,129]. La signalisation TLR4 a été divisée en voies dépendantes de MyD88 et indépendantes de MyD88 (dépendantes de TRIF), (Fig.3). Des études utilisant des macrophages déficients en MyD88 ont montré que la voie dépendante de MyD88 était responsable de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, tandis que la voie indépendante de MyD88 induisait l'induction d'interférons de type I et de gènes inductibles par l'interféron.

Lors de la stimulation par le LPS, MyD88 recrute et active une kinase 4 (IRAK-4) associée au récepteur de l'IL-1. IRAK-4 appartient à la famille IRAK et contient à la fois un domaine de mort (death domain) et un domaine de kinase[130]. Une autre protéine adaptatrice TRAF6 (facteur 6 associé au récepteur TNF) est essentielle pour la voie dépendante de MyD88 en aval d'IRAK4 et IRAK1. TRAF6 forme un complexe avec UBC13 (enzyme de conjugaison d'ubiquitine 13) et UEV1A (enzyme de conjugaison d'ubiquitine E2 variant 1 de l'isoforme A) et active TAK1 (kinase 1 activée de TGF-B)[131,132]. TAK1 active ensuite les voies en aval d'IKK (IkB kinase) et MAPK (protéine kinase activée par le mitogene)[133]. IKKa, IKKb et IKKc forment un complexe et phosphorylent les protéines IkB (inhibiteur de l'amplificateur du gène de la chaîne légère k dans les cellules B). Cette phosphorylation conduit à la dégradation des protéines IkB et la translocation ultérieure du facteur de transcription NF-KB, qui contrôle l'expression des cytokines pro-inflammatoires, en plus d'autres gènes liés au système immunitaire.

La voie indépendante de MyD88 : TRIF est une importante protéine adaptatrice contenant la protéine adaptatrice TIR qui assure la signalisation indépendante de MyD88. Des études utilisant des macrophages déficients en TRIF démontrent que le TRIF joue un rôle clé dans l'activation du facteur de transcription IRF3 et dans l'activation en phase tardive de NFkB et de MAPK. En outre, la suppression de MyD88 et de TRIF entraîne une altération grave de l'activation de NF-kB et de MAPK[134,135].

CD14 participe également à la signalisation de TLR4. L'activation de TLR4 par un lipide en absence de CD14, n'est transduite que par la voie MyD88/TIRAP (et non par la voie

TRIF/TRAM)[136,137,138]. Ces résultats suggèrent que l'organisation moléculaire du complexe TLR4 et la nature du ligand utilisé détermine la voie de signalisation activée en aval. TLR2 dépend également partiellement de CD14 pour la signalisation, que ce soit en complexe avec TLR1 ou TLR6. Et le CD36 se comporte comme un composant accessoire de l'hétérodimère TLR2/TLR6. TLR2 s'associe également à la Dectine-1 lors de détection de certains glycanes. En effet, TLR2 et TLR4 peuvent être activés par de divers ligands.

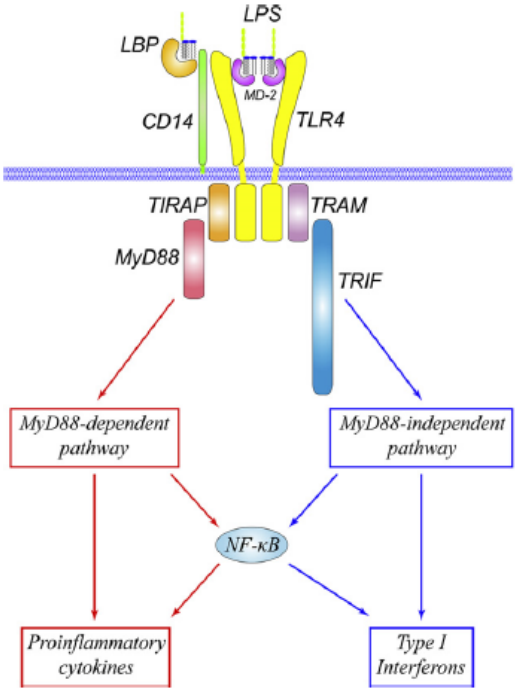


Fig. 1. Overview of LPS/TLR4 signalling LPS recognition is facilitated by LBP and CD14, and is mediated by TLR4/MD-2 receptor complex. LPS/TLR4 signaling can be separated into MyD88-dependent and MyD88-independent pathways, which mediate the activation of proinflammatory cytokine and Type I interferon genes.

Figure 3 :voies de signalisation associées à l'activation du récepteur TLR4 [139]**.**

2.3 Inflammation

2.3.1 Inflammation induite par les récepteurs de l'immunité innée

Les voies de signalisation inflammatoires induites par les TLR activent la réponse immunitaire innée et jouent également un rôle dans l'activation, la maturation et la mise en place de la réponse immunitaire adaptative[140]. Pour initier ces réponses, les facteurs de transcription NF-κB, AP-1 et IRF3-7 jouent un rôle crucial[141,142] en raison de leur capacité à stimuler la production de médiateurs pro-inflammatoires, y compris les cytokines et les IFN. L'importance du facteur de transcription NF-κB est révélée par la longue liste de gènes qu'il est capable d'induire, y compris ceux de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, IL-6 et TNF-α, ainsi que de chimiokines, comme l'IL-8 et RANTES[143].

De plus, NF-κB est responsable de l'augmentation d'expression de plusieurs molécules impliquées dans de nombreux aspects de la réponse inflammatoire en réponse à la reconnaissance d'un agent pathogène, tels les molécules d'adhésion cellulaire (la molécule d'adhésion intercellulaire-1 et la E-sélectine), les immunorécepteurs, les immunoglobulines, les TLR, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) et les molécules de co-stimulation[143,124,144].

Ensemble, ces protéines inductibles par NF-κB participent à l'activation et au recrutement de leucocytes sur des sites d'inflammation, à la phagocytose accrue des microbes, à la lyse cellulaire à médiation par le complément ou les cellules NK et à la présentation d'antigène[143,145]. Des processus inflammatoires sont nécessaires pour éliminer les agents pathogènes, mais de la même manière une inflammation excessive nuit à l'hôte.

2.3.2 Les inflammasomes

La reconnaissance des signaux de danger par des récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) peut conduire à l'activation des voies intracellulaires induisant l'assemblage de complexes activateurs du caspase-1 appelé inflammasomes. Les inflammasomes induisent le traitement et la sécrétion d'un ensemble commun de cytokines pro-inflammatoires qui visent à supprimer l'élément nocif et induisent une forme de mort cellulaire appelée pyroptose[146]. Parmi les PRR, les récepteurs Nod-like, NLR (NLRP1, NLRC4, NLRP3 et AIM2) et les récepteurs Toll like (TLR), exprimés par les lymphocytes T

et B, les monocytes, les cellules dendritiques et d'autres cellules somatiques, telles que les cellules musculaires lisses endothéliales et vasculaires.

Les TLR peuvent engager la voie de l'inflammasome *via* deux signaux. Le signal I est déclenché suite à l'uprégulation de NF-κB, AP-1 et des facteurs régulateurs de l'interféron qui entraînent la transcription des gènes qui contrôlent les composants de l'inflammasome, tels que la molécule de détection NLRP3, procaspase, pro-IL-1 et pro-IL-18. Le signal II consiste en la détection de PAMP et de DAMP par NRLP3, qui à son tour engage un domaine de recrutement de caspases (ASC) et une procaspase qui s'hétérodimérisent pour former des caspases actives. Le rôle de la caspase dans l'inflammasome est de catalyser le traitement intracellulaire de la pro-IL-1β et de la pro-IL-18 en leurs formes biologiquement actives (IL-1β et IL-18), (Fig. 4).

Les formes actives sont libérées dans l'espace extracellulaire et entraînent l'inflammation. En plus d'offrir une réponse de défense immédiate, l'inflammasome favorise une présentation efficace de l'antigène aux cellules T naïves et facilite ainsi une réponse immunitaire acquise ultérieure (adaptative) dirigée spécifiquement vers l'antigène correspondant[147]. La délivrance du signal II pour l'activation de l'inflammasome peut provenir de l'efflux cellulaire d'ions potassium, de la production de ROS mitochondrial ou de la libération de l'ADN mitochondrial et de la déstabilisation lysosomale[148] ainsi que l'augmentation de l'ATP extracellulaire suite à des dommages cellulaires.

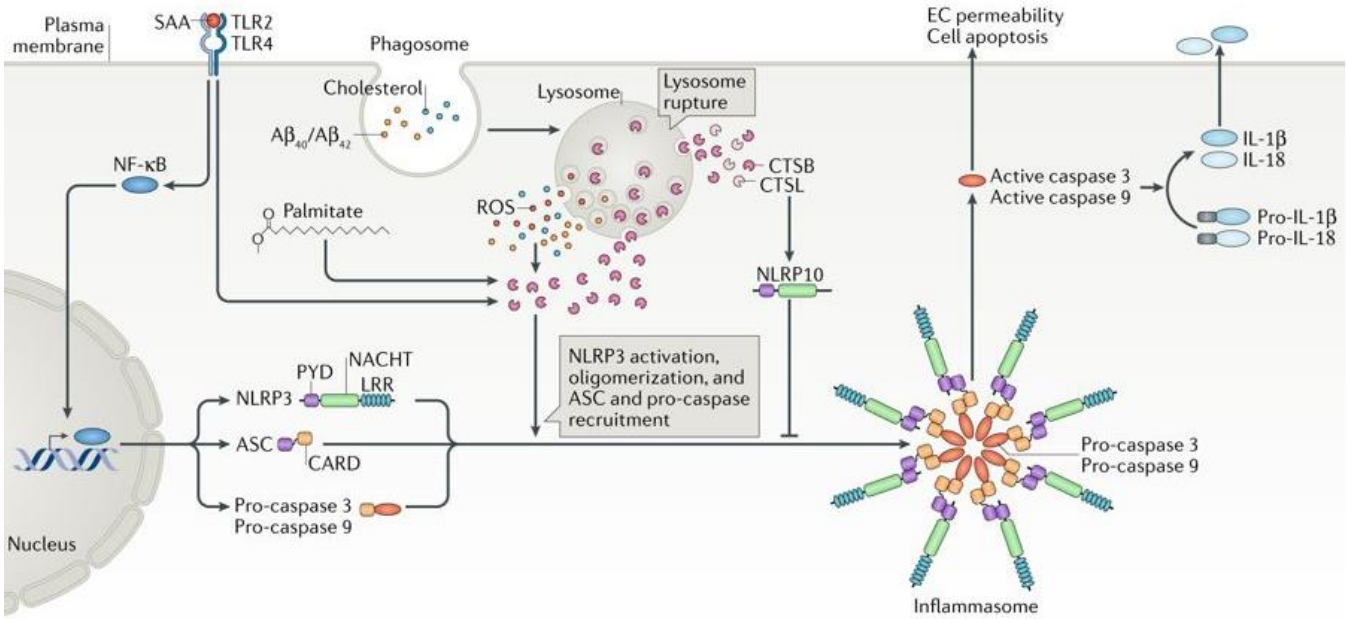


Figure 4 : voies d'activation de l'inflamasome. Nature Reviews Cardiology ISSN 1759-5010

2.3.3 Recrutement et activation des leucocytes

Globalement, la reconnaissance des agents pathogènes par les PRR régule le recrutement des leucocytes aux sites d'infection en activant plusieurs sous-types de cellules, notamment les cellules stromales tissulaires, les cellules innées résidant dans les tissus (notamment les DC et les macrophages) et les leucocytes circulants. Le recrutement des leucocytes est un processus complexe impliquant une série d'interactions avec les intégrines exprimées sur l'endothélium vasculaire. Le roulement, l'adhérence et la migration séquentiels des leucocytes dans le tissu enflammé sont étroitement régulés par l'expression induite de molécules d'adhésion cellulaire et d'intégrines en réponse à l'activation du PRR[149,150,151].

L'infiltrat cellulaire inflammatoire aigu se compose de monocytes, de DC, de neutrophiles et de cellules NK. Parmi ceux-ci, les neutrophiles et les cellules NK sont des cellules effectrices innées critiques protégeant respectivement l'hôte en détruisant les microbes pathogènes et les cellules infectées[152,150]. Alors que les neutrophiles expriment l'ARNm de tous les TLR et peuvent être activés par la plupart des PAMP, les cellules NK semblent être activées principalement par l'IFN de type I produit par les pDC de manière dépendante du TLR. Ces cellules NK activées sécrètent à leur tour l'IFN-γ, augmentant ainsi la clairance des agents pathogènes par les macrophages[153,154]. Malgré le rôle central joué par ces cellules immunitaires innées, la reconnaissance des PAMP par les cellules épithéliales, endothéliales et hématopoïétiques dans différents tissus grâce aux TLR fait également partie de la défense immunitaire innée dans les sites d'infection[150,155].

3 L'immunité adaptative

Il existe deux types d'immunité adaptative, l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire faisant intervenir respectivement les lymphocytes B produisant des anticorps (Ac) et les lymphocytes T qui expriment un TCR (récepteur spécifique de l'antigène). Contrairement au système immunitaire inné, le système immunitaire adaptatif est dirigé contre des antigènes spécifiques très diversifiés. Il exprime donc un répertoire de récepteur très vaste résultant de phénomènes de recombinaisons géniques somatiques spécifique à chaque clone T ou B.

Une réponse immunitaire spécifique (ou adaptative) des LT CD4 requiert une reconnaissance des antigènes présentés par des cellules présentatrices d'antigènes (APC). Les APC présentes dans les tissus périphériques ingèrent par différentes voies les antigènes et les transforment (apprêtent) en courts peptides présentés dans la poche d'un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), l'ensemble [peptide + CMH] étant reconnu par le TCR des LT.
Cette activation T CD4 est nécessaire pour l'activation secondaire des LT CD8 cytotoxiques (coop CD4/CD8) et pour la différenciation des LB en plasmocyte sécréteurs d'immunoglobulines (coopération T/B).

Les cellules de l'immunité adaptative : Les cellules effectrices du système immunitaire adaptatif sont les lymphocytes T et B. Une cellule lymphoïde progénitrice peut donner naissance à des cellules B naïves ou à des cellules T naïves. Les cellules B et T se différencient respectivement dans la moelle osseuse et le thymus. Le rôle du système immunitaire adaptatif ou spécifique est de créer des cellules immunitaires qui ciblent un antigène spécifique. Les cellules B participent à la réponse humorale lorsque l'antigène est sous forme libre dans l'espace extracellulaire et reconnu par les immunoglobulines (Ig) de surface alors que les cellules T participent à la réponse à médiation cellulaire, lorsque l'antigène est présenté sur des cellules présentatrices d'antigènes pour être reconnu par le TCR[156,157].

Les cellules T naïves expriment à leur surface des récepteurs de cellules T (TCR) capables de reconnaître un antigène. Dans le thymus, lorsqu'une cellule T reconnaît à haute affinité un auto-

antigène présenté sur du CMH du soi, cette cellule T sera détruite avant sa maturation (sélection négative). Dans le thymus les cellules T se différencient en lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ et T auxiliaires $CD4^+$. La cellule T $CD8^+$ naïve deviendra une cellule T cytotoxique efficace une fois activée par la présentation d'une CPA présentant le bon complexe antigène-CMH de classe I. Les CMH de type I sont exprimés par les DC et par toutes les cellules nucléées. La destruction directe par les lymphocytes T cytotoxiques est induite par la sécrétion de perforine et de granzyme provoquant l'apoptose des cellules cibles. Les cellules T $CD4^+$ ou T auxiliaire (Th, T helper) deviennent effectrices lorsqu'elles sont activées par une CPA, principalement des DC, qui présentent un antigène étranger dans un complexe CMH de classe II.La fonction des cellules Th est d'améliorer la réponse immunitaire en activant 1) les cellules NK ainsi que les macrophages et autres phagocytes (hypersensibilité retardée), 2) les cellules B (rôle des TFH) et 3) les cellules CD8+. Les cellules $CD4^+$ et $CD8^+$ produisent des cytokines. Il existe 5 principales sous-populations de cellules $CD4^+$ Th: Th1, Th2, Th17, et Th folliculaire Treg et pour certains deux autres sous populations Th9, Th22[158]. La génération de lymphocytes T mémoire nécessite l'interaction de la molécule CD27 dans le lymphocyte T avec la molécule costimulatrice CD70 dans les cellules présentant l'antigène et constitue également une caractéristique centrale de l'immunité adaptative[159]. Les lymphocytes T mémoire sont responsables de la réponse protectrice accélérée lors de la ré-exposition ultérieure à l'antigène.

Les lymphocytes B sont des lymphocytes participant à la réponse immunitaire adaptative. Un lymphocyte B réagi que contre un antigène soluble ou membranaire. Cette spécificité est donnée par le récepteur des cellules B (BCR), un complexe membranaire issu d'une recombinaison V(D)J. Les lymphocytes B naïfs agissent aussi comme une CPA, captent l'antigène libre de l'espace extracellulaire *via* leur BCR, l'apprêtent et le présentent dans la classe II du CMH à une cellule TFH. Une fois qu'un complexe antigène-CMH de classe II a été présenté et reconnu par les LT, les cellules T CD4 sont activées et produisent des cytokines qui induisent le switch isotypique des immunoglobulines et stimulent les réponses immunitaires humorales des cellules B et permettent leur différenciation en plasmocytes et en cellules B mémoire[156]. Les cellules plasmocytaires sécrètent des anticorps spécifiques en grande quantité contre cet antigène, mais n'expriment pas d'anticorps membranaires. Les cellules mémoire B forment la mémoire pour cet antigène spécifique afin de répondre rapidement en cas de réintroduction de l'antigène. Les anticorps peuvent neutraliser un agent pathogène en empêchant

l'adhésion bactérienne, favorisant l'opsonisation et la phagocytose d'un agent pathogène tout en activant la voie classique du système du complément[156].

4 Interactions entre l'immunité innée et adaptative : la DC et la synapse immunitaire

Bien qu'il soit commode de considérer l'immunité innée et adaptative comme distincte, il existe en fait des interactions permanentes entre les deux au travers d'une synapse immunologique qui implique une interaction entre une cellule du système immunitaire inné (APC) principalement la cellule dendritique et une cellule T du système immunitaire adaptatif.

4.1 Activation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont prêtes à échantillonner l'environnement et à transmettre les informations recueillies aux cellules du système immunitaire adaptatif. Les DC influencent non seulement la fonction des cellules T, mais activent également d'autres cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes B et les cellules Natural Killer. La réponse immunitaire innée se produit lorsque les DC reconnaissent des modèles moléculaires associés à des agents pathogènes (PAMP), notamment des acides nucléiques viraux, des molécules bactériennes telles que des lipopolysaccharides (LPS), des lipoprotéines, de la flagelline, du peptidoglycane et de l'ADN CpG. Outre les PAMP, les signaux de danger non microbiens provenant des cellules hôtes apoptotiques et nécrotiques, appelés modèles moléculaires associés au danger (DAMP), déclenchent également des réponses immunitaires innées[118].

Ces PAMP et DAMP sont reconnus par les cellules hôtes *via* des récepteurs de reconnaissance de formes (PRR), notamment les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs de type Nod (NLR) et les récepteurs de type RIGI (RLR)[120]. Il a été démontré que les PRR jouent un rôle central dans l'induction d'une activation immunitaire des DC, établissant ainsi un lien entre le système inné et le système

immunitaire adaptatif. Les antigènes lipidiques sont traités différemment et sont présentés par des molécules non classiques du CMH de la famille CD1[160].

Les études classiques sur la présentation des antigènes ont montré que les antigènes auto et non auto-intracellulaires sont transformés dans le protéasome en peptides reconnus par les cellules $CD8^+$ dans le contexte des complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) de classe I. En revanche, les protéines extracellulaires capturées dans l'environnement sont phagocytées par les APC, traitées dans le lysosome et présentées par les molécules du CMH de classe II aux cellules T $CD4^+$[161].

Les DC traitent aussi des antigènes extracellulaires et les présentent aux cellules T, du CMH de classe I à $CD8^+$, par le biais d'un processus appelé présentation croisée. Les antigènes peuvent également atteindre directement les DC résidant dans les ganglions lymphatiques à travers la lymphe. Des réponses distinctes des cellules T sont générées selon que l'antigène est capturé par les DC dans les tissus périphériques ou directement dans les ganglions lymphatiques. Cette propriété unique fournit au système immunitaire un mécanisme important pour générer une tolérance aux protéines propres ainsi qu'une immunité virale[162].

Les DC non activées (immatures) peuvent présenter des auto-antigènes aux cellules T[163,164], ce qui conduit à une tolérance immunitaire soit par la suppression des cellules T, soit par la différenciation des cellules T régulatrices ou suppressives. Des DC tolérogènes peuvent également être générés *in vitro* en cultivant des monocytes avec de l'IL 10[165] ou avec de la vitamine D3[166]. L'activation des DC par la signalisation médiée par la cadhérine induit également des DC tolérogènes[167].

En revanche, les DC activées (matures) chargées d'antigène peuvent déclencher la différenciation de cellules T spécifiques de l'antigène en cellules T effectrices avec des fonctions spécifiques. Leur activation entraine des changements phénotypiques et fonctionnels. L'acquisition du récepteur CCR7 permet la migration des DC activées vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21. Au cours de ce processus de maturation, la phagocytose, l'expression des molécules co-stimulatrices, la commutation d'expression des récepteurs chimiokiniques et la sécrétion de cytokine sont tous des facteurs importants régulés par la reconnaissance des agents pathogènes *via* les PRR exprimés par les DC[168].

Les DC résidantes dans les ganglions lymphatiques ayant acquis l'antigène directement à partir de la lymphe sont les premiers à présenter des peptides aux lymphocytes T $CD4^+$ naïfs, l'activation des lymphocytes T et la production d'interleukine 2 (IL-2), ce qui facilite la prolifération des lymphocytes T et la prolifération clonale. Par la suite, les DC résidantes dans les tissus ayant capturer l'antigène dans les tissus périphériques migrent vers le ganglion lymphatique et présentent les peptides aux cellules T $CD4^+$ déjà activées, induisant la génération de cellules T effectrices.

Activation de la voie PI3 Kinase : Outre les grandes voies de signalisation mobilisée lors d'activation des DC[169] (exemple TLR4), la voie phosphoinositide 3 kinase (PI3K) semble aussi jouer un rôle important. L'inactivation génétique de p85a, la sous-unité régulatrice de PI3K, renforce la résistance des souris à Leishmania major, un agent pathogène contrôlé par le développement Th1 médié par DC[170]. La PI3K appartient à la voie de signalisation empêchant les réponses proinflammatoires excessives dans les DC.

La signalisation en aval de PI3K comprend la kinase PDK1 (kinase 3-phosphoinositide-dépendante)[171]. Le phénotype des DC dérivées de souris hypomorphes PDK1, exprimant un taux de 10% de cette enzyme par rapport aux souris de type sauvage, manifeste une réduction de macropinocytose induite par les TLR, mais une meilleurs capacité de présentation de l'antigène, ainsi qu'une augmentation d'expression des molécules costimulatrices associée à une production accrue de cytokines et IL-10)[171].

La PDK1 active les kinases en aval telles que la protéine kinase B (PKB/Akt) et les isoformes de sérum et kinase inductible par les glucocorticoïdes (SGK). Le rôle d'Akt1 semble être limité à la promotion de la survie dépendante de Bcl-2 des DC[172]. Akt2 est un régulateur important de la signalisation Ca2 + et de la migration dans les DC[173]. Il a été montré que PI3K régule négativement le NF-KB dans les monocytes, les macrophages et les DC[174,175,176,177]. Ainsi, les inhibiteurs de PI3K augmentent la phosphorylation d'IKB kinase (IKK)-α/β et la dégradation d'IκB-α avec une augmentation de la translocation nucléaire de NF-κB[178].

4.2 Présentation antigénique par les DC et activation des lymphocytes T

Les cellules T naïves sont activées en mettant en contact des cellules présentant l'antigène dans des organes lymphoïdes secondaires. Les cellules dendritiques (DC) sont les cellules présentant l'antigène les plus efficaces pour les cellules T naïves. Lorsqu'ils sont comparés à d'autres APC, tels que les macrophages, les DC sont extrêmement efficaces et peuvent provoquer un plus grand nombre de cellules T répondeurs, expliquant ainsi leur surnom de «APC professionnels»[179]. Dans les tissus périphériques, les DC capturent les antigènes par le biais de plusieurs mécanismes complémentaires.

L'activation des LT naïfs par DC nécessite trois signaux. Le premier (engagement du récepteur des cellules T (TCR) avec un peptide antigénique dans le contexte de MHC-II pour CD4 ou MHC-I pour des cellules T CD8) est la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le récepteur T à l'antigène, le TCR. Des molécules CD4 ou CD8 et des molécules d'adhésion en tant que molécules ICAM (molécule d'adhésion intercellulaire) et LFA (antigène de la fonction des leucocytes) renfort de cette reconnaissance. La synapse immunologique entre le DC et le LT se sont réunies en place.

Le second signal correspond à la costimulation. Les DC mûrit sur l'expérience des molécules de coût telles que CD80 et CD86 qui sont reconnues par les molécules CD28 des LT. Ce second signal contribue à la migration des LT vers la périphérie. En l'absence de co-stimulation, les cellules T subissent une apoptose[180]. La sécrétion de cytokines par les DC est le dernier signal. Ces trois signaux initient la réponse immunitaire adaptative en polarisant les LT. Les différentes cytokines sécrétées par le DC permettent l'engagement des LT vers diverses voies de différenciation.

4.3 Polarisation de la réponse immunitaire des lymphocytes T par les DC

Lors de l'interaction avec les DC, les cellules T $CD4^+$ naïves et les cellules T $CD8^+$ peuvent se différencier en cellules T effectrices spécifiques de l'antigène avec des fonctions différentes. Les cellules T $CD4^+$ peuvent devenir des cellules T helper 1 (TH1), TH2, TH17 ou des cellules T folliculaires (TFH) qui aident les cellules B à se différencier en cellules sécrétant des anticorps, ainsi que des cellules T régulatrices (TReg) régulant négativement les fonctions d'autres lymphocytes (Fig. 5).

Le phénotype Th1 est généré dans l'environnement d'IL-12 et d'interféron IFN -γ et sécrète principalement l'IL-2, le TNF-α et l'IFN-γ. Le phénotype Th2 est généré dans un environnement IL-4 et sécrète principalement l'IL-4 et l'IL-10. Le phénotype Th17 nécessite IL-6, IL-21, IL-23, le facteur de croissance transformant TGF-β et IL-1β; est activé par l'aldostérone; et sécrète IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22. Le phénotype Treg est généré dans l'environnement TGF-β1 avec une faible concentration d'IL-6, et son activité anti-inflammatoire est exercée par la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs tels que l'IL-9, l'IL-10, le TGF-β[181].

Les Lymphocytes Th1 : leur rôle principal est de contrôler les infections bactériennes et virales intracellulaires. Ces cellules T-helper 1 sécrètent de l'interféron-γ et du TNF. La différenciation Th1 est favorisée par l'IL-12 (produite par les cellules immunitaires innées) *via* une voie de signalisation dépendante de STAT4 et par l'IFN-γ (STAT1). Le facteur de transcription déterminant est T-bet, codé par le Gène Tbx21. T-bet inhibe les autres voies de différenciation des cellules T CD4[182]. L'IFN-γ amorce la réponse immunitaire des cellules phagocytaires mononucléées, telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DC) contre de faibles doses de molécules associés à un agent pathogène (PAMP)[183]. Les cellules Th1 activent les macrophages par contact cellulaire et par la sécrétion d'IFN-γ, renforçant ainsi leur capacité de phagocytose et de destruction des microbes intracellulaires et leur expression d'IL-12 et d'IFN-γ. De plus, les cellules Th1 jouent un rôle auxiliaire aux cellules T CD8+. Les cellules T $CD4^+$ productrices d'IFN-γ peuvent augmenter l'expression de l'IL-12 par les cellules présentatrices d'antigène, ce qui renforce la fonction cytotoxique des cellules T CD8+ et établit une boucle de rétroaction paracrine en stimulant une expression accrue de l'IFN-γ[182].

Les réponses Th1 soutiennent la défense à médiation cellulaire de l'hôte contre les agents pathogènes intracellulaires. En favorisant l'activation des macrophages et des cellules T CD8+, leur importance physiologique est illustrée de manière convaincante par un risque accru d'infections mycobactériennes chez les individus à déficience du récepteur IFN-γ ou d'IL-12[184]. En plus de promouvoir la défense de l'hôte à médiation cellulaire, les cellules T $CD4^+$ jouent un rôle moteur dans la différenciation des cellules B et la réponse immunitaire humorale. De plus, l'IFN-γ sécrété par les cellules Th1 conduit à une signalisation STAT1 qui induit l'expression de T-bet dans les cellules B naïves, ce qui active la transcription de la lignée germinale Iγ2a. Ainsi, l'IFN-γ améliore l'induction du changement de classe en immunoglobuline IgG2a neutralisant les particules virales infectieuses[185]. Une infection grave par le virus de la grippe est associée à un déficit en IgG2 et peut être due à une diminution de l'expression de l'IFN-γ[186].

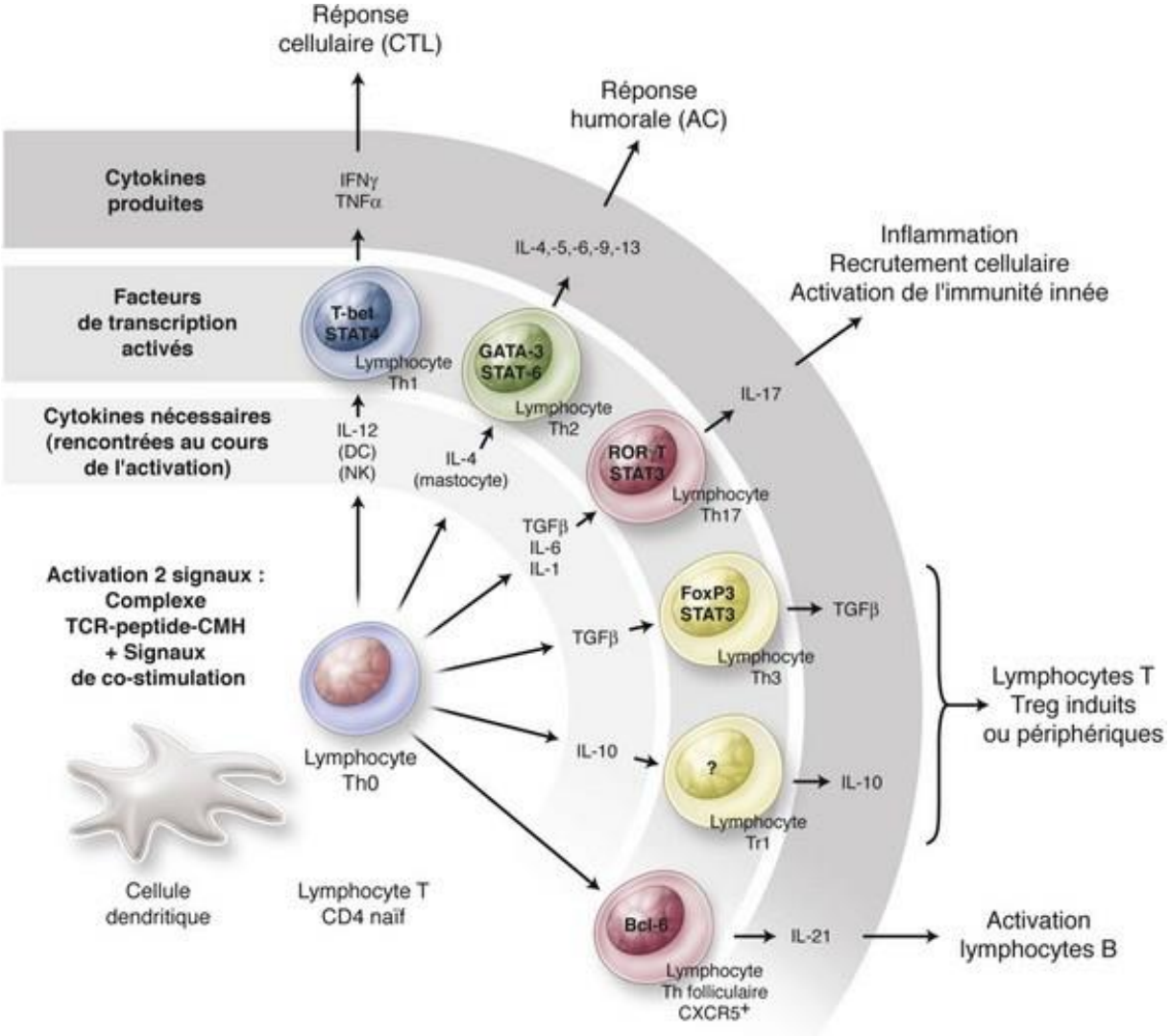


Figure 5 : Schéma d'orientation des lymphocytes T par les DC.

Les lymphocytes Th2 : une sous-population alternative de cellules T $CD4^+$, indispensables à l'immunité de l'hôte contre les parasites extracellulaires, tels que les vers pathogènes[187]. Contrairement aux cellules Th1 qui sont caractérisées par leur expression d'IFN-γ, les cellules Th2 produisent différentes cytokines, notamment IL-4, IL-5 et IL-13. Les cellules T $CD4^+$ naïves se différencient en cellules Th2 en présence d'IL-4 et IL-2. La liaison de l'IL-4 à son récepteur active la Janus kinase 1 (JAK1) avec JAK3 ce qui permet la phosphorylation de STAT6, induisant l'expression du principal facteur de transcription des Th2, GATA-3[182].La différenciation en cellules Th1 ou Th2 a longtemps été considérée comme irréversible et de nombreuses études ont montré que ces cellules effectrices différenciées avaient un phénotype stable. Cependant, récemment, il a été démontré que les cellules Th2 sont dotées d'une certaine plasticité et peuvent être reprogrammées et activer l'expression de T-bet en maintenant GATA-3, devenant ainsi des cellules GATA-3^+/T-bet^+ produisant de l'IL-4 et de l'IFN-γ[188].

De plus, des réactions allergiques à des antigènes normalement inoffensifs, tels que les acariens de la poussière, les pollens ou les allergènes alimentaires, sont associées à la production d'IgE spécifiques par des lymphocytes B[189]. Les cellules Th2 jouent un rôle important en stimulant la production d'anticorps par les cellules B, en particulier les IgE, pour éliminer les parasites extracellulaires. L'IL-4 est responsable de l'activation de STAT6 qui induit le changement de classe de chaînes lourdes d'anticorps dans les cellules B spécifiques de l'antigène afin de favoriser la production d'IgE. Les anticorps IgE se lient à leur récepteur de haute affinité FcεRI sur les mastocytes et les basophiles, ce qui conduit à leur dégranulation. Par conséquent, des médiateurs inflammatoires tels que l'histamine sont libérés par ces cellules immunitaires innées en même temps que plusieurs cytokines, notamment IL-4, IL-13 et TNF-α[182].En plus de favoriser les réponses immunitaires humorales, les cellules Th2 peuvent également activer les phagocytes mononucléés. On pense que les macrophages activés en présence de cytokines Th2 jouent un rôle dans la cicatrisation des plaies[190].

Les lymphocytes Th17 : sont impliquées dans les réponses immunitaires innées et adaptatives, et la polarisation des Th vers les Th17 été associée aux troubles auto-immuns. Les lymphocytes Th17 sont caractérisés par le facteur de transcription RORγT/RORC2 (souris / humain) et la sécrétion de cytokines IL-17A, IL-17-F, IL-21 et IL-22. Ils expériment à leur surface les récepteurs de chimiokines CCR6 et CCR4. Leur développement est inhibé par les cytokines inductrices de Th1-Th2, l'IL-27 et de

l'IFN-γ, et par l'IL-27 (*via* STAT1). Une combinaison des cytokines TFG-β, IL-1β, IL-6 et IL-23, peut induire *in vitro* une différenciation du type de cellules Th17[191]. Chez la souris, IL-6 et IL-21 induisent une phosphorylation de STAT3 qui régule positivement RORγT. Une fois la différenciation initiale induite, IL-21 développe une boucle de rétroaction positive qui est importante pour l'amplification des cellules Th17, alors que l'IL-23 produite par les DC est nécessaire pour stabiliser le sous-ensemble de cellules Th17. Outre le récepteur nucléaire orphelin rétinoïde RORγT/RORC2 (souris / humain), qui est le facteur de transcription principal des cellules Th17, ces cellules Th17 induites par l'IL-23 expriment aussi T-bet. L'IL-17A sécrété par les Th17 induit la production d'IL-6, IL-8, du facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF), ainsi que de l'expression de la prostaglandine E2 (PGE2).

Les cellules Th17 jouent un rôle important dans la prévention des infections fongiques (candidose oropharyngée), comme le suggèrent les modèles d'animaux aux récepteurs IL-17 et IL-17 (IL-17R) inactivés, ainsi que la découverte que les lymphocytes T mémoire spécifiques de Candida Les albicans appartiennent principalement au sous-groupe Th17 chez l'humain. Les souris knock-out IL-17R ont également montré le rôle crucial des cellules Th 17 dans la réponse immunitaire aux infections bactériennes extracellulaires (Neisseria gonorrhoeae, Kleibsiella pneumonia et Porphyromonas gingivalis) des tissus muqueux. Les cellules Th17 exécutent leur fonction antifongique et antibactérienne par recrutement et activation de neutrophiles.

Autre que le rôle des cellules Th17 dans le traitement des infections bactériennes et fongiques, ces cellules jouent également un rôle dans la médiation des maladies auto-immunitaires et inflammatoires. De nouvelles données indiquent que les cellules Th17 pourraient également être responsables de la maladie de Crohn. Des études ont montré que l'IL-23 pouvait jouer un rôle dans la survenue de colites murine[182]. De plus, les cellules Th17 peuvent également jouer un rôle dans les modèles murins EAE, et des taux élevés d'IL-23 ont été observés dans les DC dérivées de monocytes de patients atteints de SEP (sclérose en plaque) comparées DC des donneurs sains. Le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de SEP présente une fréquence plus élevée de cellules Th17 que les témoins, en particulier lors de rechutes ou de symptômes aigus. Cependant, la contribution relative des sous-ensembles de cellules Th17 aux maladies auto-immunes reste incertaine et nécessite des études complémentaires[192,193,194].

Les lymphocytes T régulateurs : une sous-population des lymphocytes T $CD4^+$, ils présentent des propriétés immunosuppressives et sont impliqués dans la limitation de l'inflammation et la prévention de l'auto-immunité. En 1995, il a été constaté que T reg supprimait les maladies auto-immunes, avec une expression constitutive de la chaîne du récepteur α-IL (IL-2Rα) de l'IL-2 (CD25). Le développement des cellules Treg dépend de la signalisation STAT5[195], qui induit directement la régulation positive du facteur de transcription FoxP3 et l'expression du CD25. L'expression des cytokines immunorégulatrices IL-10, TGF-β et IL-35 a été associée au rôle suppresseur des cellules Treg[196]. Il existe deux types de cellules Treg: les cellules Treg naturelles (nTreg) et les cellules Treg inductibles (iTreg). Ils sont tous deux des cellules T $CD4^+/CD25^+$ exprimant FoxP3 et TGF-β et ont une activité suppressive. En présence d'IL-2 et de TGF-β, des cellules nTreg se développent dans le thymus à partir de précurseurs de cellules T CD4+. Le TGF-β est nécessaire au maintien de l'expression de Foxp3 par les Treg et de leur activité de suppression. Le second type, les cellules iTreg, se développe en périphérie à partir de cellules T naïves $CD4^+$/CD25-. Leur développement est favorisé par le TGF-β, mais en absence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6. Seules les cellules Treg naturelles présentent une plasticité substantielle du phénotype. Ainsi, en présence d'IL-6 et en absence de TGF-β exogène, ils peuvent réguler négativement FoxP3 et être subvertis dans le programme de différenciation de Th17 entraînant l'expression d'IL-17[195].

Les cellules T régulateurs peuvent être induites par les DC tolérogènes pour sécréter IL-35, IL-10 et TGF-B. Plus récemment, il a été démontré que CTLA-4 (antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique) exprimé par les cellules Treg peut réguler négativement le récepteur B7 (CD80 et CD86) des DC, inhibant leur capacité d'activation des lymphocytes T effecteurs, permettant d'inhiber hyperproduction d'IgE médié par les LT, et ainsi d'éviter la survenue d'une maladie auto-immune chez la souris[196]. Par ailleurs, une étude a démontré que les cellules Treg perdent leur capacité à supprimer les cellules T effectrices déficientes en B7[197]. De plus, les cellules Treg peuvent moduler la fonction des DC soit par leur TCR associé aux domaines (TIGIT) du motif inhibiteur à base de tyrosine (ITIM) des immunorécepteurs, hautement exprimées par les Treg, induisant l'expression d'IL -10 et TGF-β par les DC, soit par le gène 3 d'activation des lymphocytes transmembranaire (LAG-3) qui interagit avec le CMH II et inhibe l'activation des DC[196].

Les cellules T auxiliaires folliculaires : (TFH, T Follicular Helper) se développent en réponse au ligand ICOS et au CD40. Ils migrent vers les zones des cellules B et apportent une aide essentielle aux cellules B lorsqu'elles se différencient et commutent les isotypes d'anticorps qu'elles sécrètent. Les TFH sont définis par le facteur de transcription Bcl6 et sécrètent la cytokine signature IL-21[181].

Les récepteurs chimiokiniques : les différentes sous familles de CD4 expriment un groupe CCR relativement spécifique ce qui permet de les caractériser. Les récepteurs de référence sont définis comme des molécules de surface cellulaire qui guident le recrutement des cellules T et leur permettent d'interagir avec les cellules endothéliales de tissus et d'organes spécifiques, de migrer à travers la monocouche de cellules endothéliales et la membrane basale et d'infiltrer les tissus en inflammation.

Une variété de récepteurs chimiokiniques s'expriment à la surface des lymphocytes T, parmis lesquelles on distingue :

-CXCR3 et CCR5 dans les cellules Th1
-CCR4 dans les cellules Th2
-CCR6 et CXCR6 dans des cellules Th17
-CCR9 et 10 pour les cellules T qui se dirigent vers le petit et le gros intestin, respectivement CCR7 pour les cellules T naïves et les cellules T de mémoire centrale; tous deux abritant des ganglions lymphatiques.
Les autres récepteurs sont des molécules d'adhésion.
-PSGL-1, une glycoprotéine d'échafaudage qui porte des ligands pour les sélectines.
-La PSGL-1 n'est pas fonctionnelle sur les cellules T naïves, mais devient fonctionnelle lors de l'induction de la fucosyl transférase-VII; une enzyme hautement exprimée dans les cellules Th1[198].
-L'antigène lymphocytaire cutané (ALC) est un ensemble de glycoprotéines pouvant servir de ligands de la E-sélectine et diriger la localisation des cellules Th2 vers la peau.
-La L-sélectine (CD62L) est un récepteur de ciblage des lymphocytes T naïfs et des lymphocytes T centraux de la mémoire, qui s'attachent aux ganglions lymphatiques. Le récepteur de la chimiokine Th1, CXCR3, est induit peu de temps après que les lymphocytes T naïfs découvrent l'antigène[199]. Fait intéressant, l'induction de la plupart des récepteurs de référence est dépendante de T-bet[200].

Comme évoqué précédemment, la teneur en sodium dans le milieu extracellulaire n'est pas toujours identique à celle du plasma du sang (environ 140 mM), mais peut s'élever jusqu'à 200 mM dans certains compartiments, notamment l'interstitium cutané, les organes lymphoïdes secondaires, le médulla du rein ainsi que dans les muscles et les tissus cartilagineux articulaires[2,1,5]. Dans le chapitre suivant, nous ferons le point sur les connaissances actuelles des effets des concentrations élevées du sodium sur le fonctionnement des principales cellules du système immunitaire puis sur le rôle de ces effets immunitaires du sodium dans certaines pathologies.

Chapitre -III-

Le système immunitaire : un médiateur possible de certains effets pathogènes du sel

1. Les effets du sodium sur les cellules du système immunitaire

1.1 Effets du sel sur le système mono-phagocytaire

Le microenvironnement hypertonique apparait comme régulateur des cellules du système mono-phagocytaire[1] (Fig.6). Chez le rat, l'augmentation de la concentration interstitielle dermique en Na^+ engendre le recrutement de macrophages et de DC[92]. Ainsi une forte concentration en sel permet le chimiotactisme des macrophages qui vont s'activer sous l'effet du stress osmotique et libérer des médiateurs pro-inflammatoires inducteurs des inflammasomes tel que l'IL-1β[91].

De plus, l'activation des macrophages en présence de concentrations élevées en NaCl modifie des marqueurs épigénétiques *via* la voie de p38/MAPK dépendant de l'activation de NFAT5. Cette réponse dans un milieu riche en sel entraîne une élévation de la production de NO[201]. Ainsi, le microenvironnement hyper-salé pourrait jouer un rôle de barrière contre l'infection. D'ailleurs, il a été mis en évidence dans un modèle d'infection cutanée par le parasite Leishmaniose une meilleure défense de l'hôte en présence de sodium[68]. Cependant, cet effet pro-inflammatoire du sel, observé sur les macrophages, n'est pas systématiquement retrouvé sur un autre type cellulaire du système mono-phagocytaire comme les DC. Ainsi l'analyse de l'expression génique par micro-array a montré que l'hyper-osmolarité de la médullaire rénale induisait une empreinte transcriptionnelle anti-inflammatoire dans les DC médullaires, ce qui pourrait atténuer l'allo-réactivité locale et expliquer la faible infiltration lymphocytaire de la médulla rénale au cours du rejet aigu[5].

Dans des conditions de culture enrichies en sodium, des DC dérivées de la moelle osseuse et des DC primaires provenant de reins murins sains ou transplantés présentaient des propriétés similaires à celles des macrophages M2 anti-inflammatoires[202]. Une autre étude a montré une inhibition de la capacité de présentation antigénique croisée des DC dérivées de la moelle osseuse lors d'une exposition

à de fortes concentrations en sodium, aboutissant à la suppression de la réponse immunitaire des cellules T spécifiques de l'antigène[5]. En revanche, les DC corticales ainsi que les DC dérivées de la moelle osseuse exposées à un milieu normo-osmotique conservaient une signature pro-inflammatoire, de type M1, ainsi qu'une forte propension à la présentation de l'antigène et à la stimulation des cellules T[202].En opposition avec ces résultats, Kirabo *et al.*, rapporte un effet pro-inflammatoire du sodium sur les DC dans un modèle de souris traitées par l'angiotensine II. Les DC activées par une forte concentration de sodium sécrètent de l'IL-1β, favorisant ainsi la production d'IL-17 et d'INF-γ par les lymphocytes T[203].

Cependant, il n'est pas mentionné dans cette étude si les DC, soumis *in vitro* aux concentrations élevées en sodium, proviennent d'animaux traités par l'angiotensine II ou non. Ceci est extrêmement important puisqu'une étude antérieur de Vinh et al, a montré que le traitement par angiotensine II induit une surexpression du récepteur de costimulation B7, et une activation des DC murines [204]. Par ailleurs, une équipe allemande, rapporte que, sous un régime alimentaire riche en sel, les DC myéloïdes de souris wild type ne montrent aucun signe d'activation pro-inflammatoire lié à la stimulation des TH17[95].

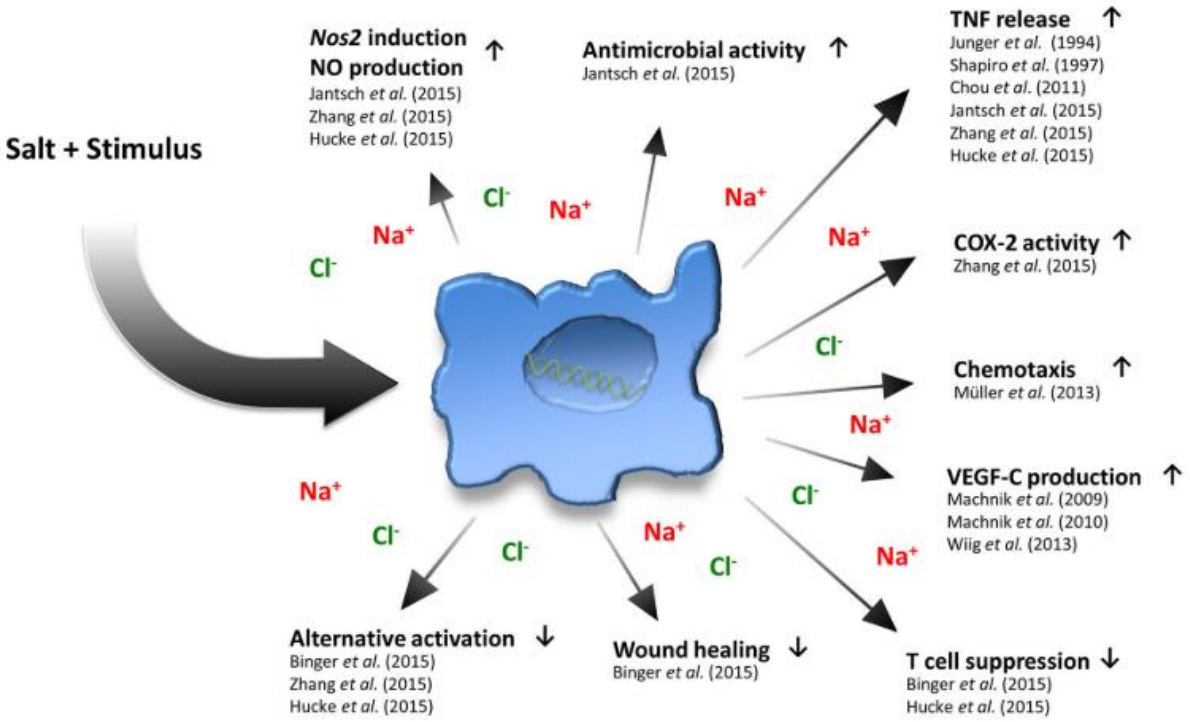


Figure 6: Effets du sel sur les fonctions immunitaires des macrophages. COX-2 Cyclooxygenase-2, NO nitric oxide, Nos2 type-2 NO synthase, TNF tumor necrosis factor, VEGF vascular endothelial growth factor.[205] Elementary immunology: Na^+ as a regulator of immunity par Valentin Schatz.

1.2 Effets du sel sur les lymphocytes T

Des études ont Récemment mis en évidence des effets directs des milieux hyper-sodés sur les lymphocytes T (Fig.7). Kleinewietfeld *et al.*, ont ainsi démontré qu'une concentration élevée en sodium favorise la polarisation vers la voie Th17 induite par les cytokines (IL-1β, IL-6, IL-23, TGF-β) impliquant l'activation de la voie p38 MAPK résultant de l'engagement du facteur de transcription sensible à l'osmolarité (TonEBP/NFAT5) et SGK1[94]. Concernant les lymphocytes T régulateurs exprimant Foxp3 et caractérisées par leurs propriétés immunosuppressives, une étude a montré que l'activation *in vitro* des LT par anti-CD3/CD28, dans un milieu de culture riche en sodium, entraînait une désactivation de FOXO1 médié par SGK1 et ainsi une altération de la fonction suppressive des Treg[96]. Les cellules T auxiliaires folliculaires (Tfh, T follicular helper) jouent un rôle essentiel dans l'auto-immunité, comme le lupus érythémateux systémique (SLE), en stimulant les cellules B. Il a été démontré que des concentrations élevées de chlorure de sodium favorisaient la différenciation des Tfh[206]. Une alimentation riche en sel a nettement accru les caractéristiques de lupus chez les souris. Le mécanisme décrit dans cette étude montre une déméthylation de l'ADN induite par le NaCl *via* le recrutement de l'hydroxytransférase Ten-Eleven Translocation 2 (TET2). À l'inverse, la déplétion de TET2 diminue *in vitro* la polarisation des cellules Tfh induite par le NaCl[206].

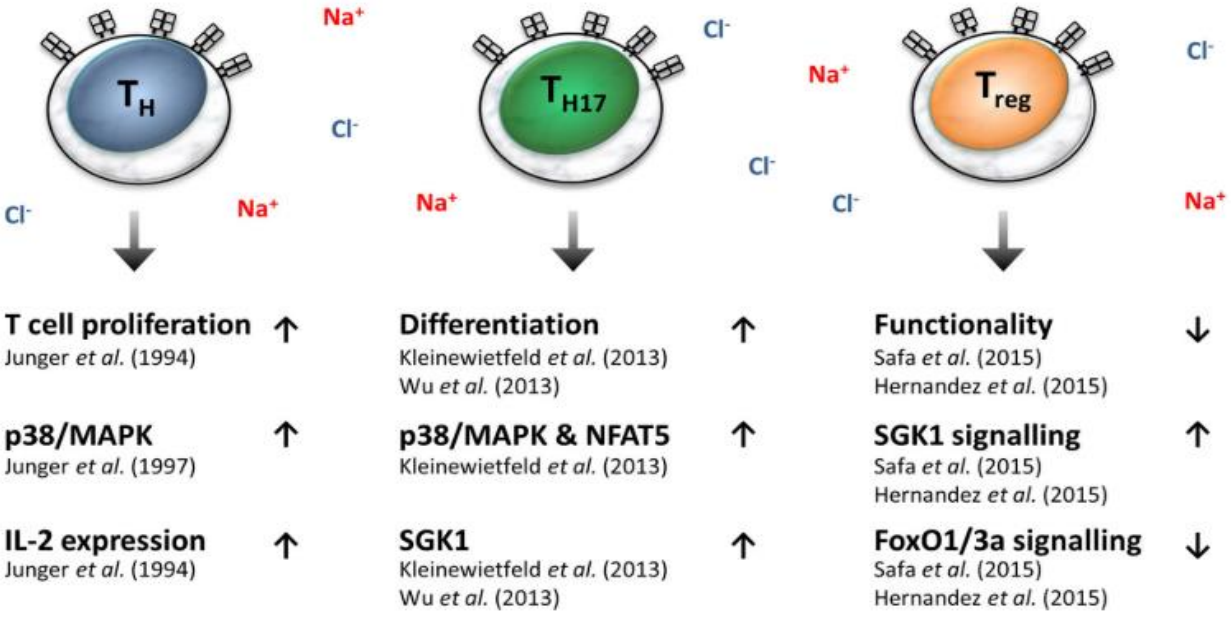


Figure 7: Effets du sel sur les fonctions immunitaires des cellules T. Fox01/3a Forkhead box O3 1/3a, IL-2 interleukin-2, NFAT5 nuclear factor ofactivated T cells, p38/MAPK p38/mitogen-activated protein kinase, SGK1 serum/glucocorticoid-regulated kinase 1

1.3 Voies de signalisation mobilisées par le sodium dans les cellules du système immunitaire

La protéine SGK1 (Serum Glucocorticoide Kinase 1) appartient à la famille des protéines kinase AGC, possède une expression tissulaire ubiquitaire, et est exprimé aussi bien dans les DC que les lymphocytes[207]. Une concentration élevée en sel induit une activation de cette kinase[208]. L'activation de SGK1 se fait *via* la phosphorylation de 2 résidus sérine et thréonine notamment par la voie PI3K. Elle régule des canaux ioniques jouant un rôle dans la survie cellulaire, l'excitation neuronale et l'homéostasie intracellulaire sodique[209]. L'expression de SGK1 augmente l'activité du canal sodique eNaC (epithelial sodium channel)[210]. eNaC joue un rôle crucial dans les flux sodique transmembranaires alors que l'échangeur Na^+/H^+ est important dans le transport actif du Na^{+}[211]. Les DC et les LT expriment à la fois eNaC et l'échangeur Na^+/H^+. Récemment, il a été décrit que la polarisation de la réponse vers Th17 par le NaCl nécessitait l'activation de SGK1 tant *in vitro* qu'*in vivo*[208]. L'augmentation de [NaCl] est associée à une augmentation de la transcription du gène de SGK1, essentielle dans la signalisation de l'IL-23, en régulant l'expression du récepteur IL-23 et en stabilisant le phénotype Th17 par désactivation de FOXO1. De plus, les travaux de l'équipe de Kleinewietfeld sur les LT ont montré que l'activation de SGK1 par le sel était médiée par une phosphorylation de p38/MAPK[212].

Cependant le mécanisme d'induction de cette phosphorylation par des concentrations élevées de sel n'est pas connu. Il est possible que l'activation d'eNaC par le sel participe aux effets de ce dernier sur les LT. Ainsi la régulation des canaux sodiques pourrait jouer un rôle dans la polarisation des LT vers la voieTh17. L'amiloride est un diurétique bloquant principalement eNaC. Il a aussi des effets bloquants de moindre importance sur d'autres canaux tels que l'échangeur Na/H (NHE1). Aucune étude ne s'est intéressée à l'effet du blocage d'eNaC par l'amiloride sur la polarisation directe de Th17 induite par le sel. À l'inverse des LT, une étude a montré que SGK1 inhibait la voie NF-κB dans les

DC. En effet, cette atténuation de signalisation de NF-κB est induite par la phosphorylation de SGK1 sur deux sites différents de NDRG-1 (gène régulé en aval N-myc 1), son substrat[213,214,215]. De plus, l'absence d'expression de SGK1 dans les DC $sgk1^{-/-}$, contribue à la diminution de leur capacité de phagocytose et à une augmentation de l'expression des marqueurs de maturation[207] et favorise l'inflammation médiée par les TLR[216].

2. Le système immunitaire : un médiateur du sel en pathologie

2.1 Sodium et maladies auto-immunitaires

Des études récentes ont démontré que l'excès de sel est un potentiel facteur déclencheur ou aggravant de certaines maladies auto-immunitaires (MAI)[217]. Une étude observationnelle prospective de patients atteints de sclérose en plaques (SEP) a rapporté une relation positive entre la progression de la maladie et le régime sodé[94]. Une confirmation anatomique de cette corrélation a aussi pu être montrée: les patients avec un apport riche en sel avaient plus de risque de développer des lésions démyélinisantes néoformées et d'avoir des lésions inflammatoires[94].

D'autres études ont porté sur les auto-antigènes potentiellement pertinents pour activer le système immunitaire adaptatif. Pons *et al.*[218] ont étudié le rôle de HSP70 dans la réactivité auto-immunitaire dans l'hypertension sensible au sel. Les HSP, en particulier l'HSP70, sont des molécules de stress qui, en plus de servir de protéines chaperonnes et de stimuler la réponse immunitaire aux micro-organismes, jouent un rôle bien connu dans l'auto-immunité en se liant protéines mal repliées. Les cellules T obtenues dans des modèles expérimentaux d'hypertension sensible au sel développent une réaction proliférative lorsqu'elles sont soumises à de l'HSP70[219]. On observe également une surexpression des protéines HSP70 et HSP72 à la fois dans le rein adulte atteint d'hypertension sensible au sel que dans un modèle murin d'hypertension induite par angiotensine ou L-NAME[220,221] .

2.2 Sodium et environnement pro-cancérigène

Les modèles *in vivo* indiquent que des augmentations chroniques de la consommation de sel peuvent avoir des effets nocifs sur la santé en augmentant la production de ROS et sont associés à une forte concentration en sodium dans les tissus interstitiels[71,54]. La production accrue de ROS agit à son tour de manière synergique pour promouvoir les dommages à l'ADN et un microenvironnement pro-inflammatoire propice à la formation du cancer[53]. De plus, Titze *et al.* ont démontré qu'un environnement riche en sel induit la différenciation des cellules T auxiliaires (Th) $CD4^+$ en cellules Th17[94]. Les Th17 sécrètent la cytokine pro-inflammatoire (IL-17) dans le microenvironnement tumoral qui va favoriser l'angiogenèse de la tumeur, augmenter la production de VEGF conduisant alors à une tumorigénicité accrue avec la formation de métastases[205,222].

2.3 Sodium et réponse allo-immunitaire (GvH aigüe et rejet aigu en transplantation)

Les régimes riches en sel ont aussi un impact dans la maladie du greffon contre l'hôte (GvH) et dans le rejet de greffe. Les mécanismes de la GvH chronique sont encore mal compris mais elle pourrait être potentiellement dûe à une diminution de la fonction des lymphocytes T régulateurs (Treg). Un modèle animal de GvH aiguë a permis de mettre en évidence qu'un régime riche en sel entraînait des symptômes plus précoces et plus sévères de GvH chez l'animal et inhibait l'action des Treg[223]. En outre, un modèle murin de transplantation cardiaque a rapporté que le rejet d'allogreffe était accéléré lors d'un régime riche en sel et ce indépendamment de la natrémie et de la pression artérielle[224].

2.4 Le système immunitaire : médiateur des effets du sodium sur l'hypertension

2.4.1 Hypertension sensible au sel (SS) et inflammation rénale

Dans le rein, l'infiltration rénale des cellules immunitaires précède le développement de l'hypertension sensible au sel[225]. L'inflammation rénale est associée à une altération de la réponse pression-natriurèse[226] et l'intensité de l'infiltration des cellules immunitaires dans les reins est corrélée à la sévérité de l'hypertension chez les rats hypertendus sensibles au sel[227] (Fig.8). Dans l'hypertension sensible au sel (SS), les observations effectuées à une pression de perfusion rénale similaire (contrôlée) montrent que l'accumulation de cellules immunitaires est inversement corrélée à l'excrétion fractionnelle de sodium[228]. Un régime riche en sel, (avec ou sans régime riche en protéines), augmente l'infiltration de l'interstitium rénal par des lymphocytes et la production d'espèces réactives de l'oxygène provoquant ainsi une maladie rénale et l'hypertension[229,230]. Dans les autopsies de patients hypertendus on observe également plus souvent une infiltration du parenchyme rénal par des cellules inflammatoires[231].

De plus, la perfusion d'angiotensine II induit de l'HTA ainsi qu'une surexpression de P2X7[232], tout en améliorant le cercle vicieux de l'inflammation et de l'hypertension SS chez le rat Dahl[233]. Le récepteur à l'ATP, P2X7, est un canal ionique qui génère un influx de Na^+ et un efflux de K^+ lorsqu'il est activé avec le recrutement de la protéine pannexine-1 dans la membrane plasmique conduisant à l'activation de l'inflammasome NLRP3[234]. L'urate est également impliqué dans l'activation de l'inflammasome puisque l'hyperuricémie chez le rat conduit au développement d'hypertension[235,236].

En cas d'hypertension artérielle due au DOCA/NaCl, le traitement avec un antagoniste des récepteurs C5a améliore le remodelage cardiaque sans modifier la pression artérielle. Zhou *et al.* ont étudié le modèle d'obstruction urétérale unilatérale et ont montré que la déficience en C3 empêchait l'hypertension et les lésions rénales et a démontré que C3 active le système rénine-angiotensine et joue un rôle central dans la transition épithéliale et la fibrose[237].

Récemment, il a été montré que l'inflammation intra-rénale, le stress oxydatif et l'activité de l'angiotensine rénale participaient au développement de l'HTA sensible au sel[238]. La suppression de l'inflammation intra-rénale (par des immunosuppresseurs inhibiteurs de NF-κB) prévient l'HTA dans ce modèle d'HTA sensible au sel[238]. Des concentrations élevées de NaCl stimulent l'activation de NF-κB dans les cellules tubulaires proximales conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.

L'inflammation interstitielle rénale promeut la rétention de sodium par plusieurs mécanismes intriqués en modifiant la relation pression-natriurèse. L'œdème et les cellules inflammatoires tubulo-interstitielles ont tendance à éloigner les capillaires péritubulaires des tubules mais aussi à détruire ces capillaires réduisant ainsi la réabsorption de sodium[239]. Enfin, il a été montré une corrélation forte entre l'intensité de l'infiltration interstitielle de cellules immunocompétentes (lymphocytes et macrophages) et la gravité de l'HTA sensible au sel[228].

2.4.2 Rôle des DC dans les effets du sodium sur l'hypertension artérielle

En 2014, Kirabo *et al.* ont examiné le rôle des DC dans l'hypertension induite par l'administration d'acétate de déoxycorticostérone et de NaCl chez la souris (modèle DOCA-sel). Les auteurs ont montré que l'administration de NaCl induit le stress oxydatif entraînant la formation de γ-cétoaldéhydes (isokétals) qui se lient aux résidus de lysine et aux protéines de réticulation qui s'accumulent dans les DC, ce qui entraîne la formation des néo-antigènes[240]. Cette formation d'isokétals induit la production d'IL-6, d'IL-1 et d'IL-23 et la surexpression des protéines co-stimulatrices CD80 et CD86 par la DC. Les DC ainsi activées induisent une prolifération des cellules T, en particulier des cellules T $CD8^+$ avec la production d'IFN-γ et d'IL-17A et la survenue d'hypertension. Tous ces événements ont été supprimés avec l'administration du piégeur d'isoketal 2-HOBA. Par ailleurs, le transfert adoptif des DC activées par les isokétals induit une hypertension chez les souris de type sauvage mais pas chez les souris $Rag^{-/-}$ dépourvues de cellules T.

Chez les rats Sprague-Dawley traités par DOCA et NaCl, Machnik *et al.* ont démontré qu'un régime riche en sel induit une hypertonicité des milieux interstitiels de la peau liée à l'augmentation des concentrations en Na^+ qui entraîne une hyperplasie du réseau lymphocapillaire[6]. Les mécanismes sous-jacents à ces effets sur les lymphatiques impliquent l'activation de la protéine TonEBP (Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein) et une augmentation de la production de VEGF par les cellules du système des phagocytes mononuclées (MPS) qui infiltrent l'interstitium de la peau. Une déplétion des macrophages et des DC à l'aide de clodronate ou l'inhibition du VEGF augmente l'hypertonicité interstitielle, diminue l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale et élève la pression artérielle en réponse à un régime riche en sel[241].

Ainsi les macrophages de la peau protègent contre l'augmentation de la tonicité du milieu interstitiel et de la pression artérielle en cas de régime en sel. Notons que l'augmentation supplémentaire de pression artérielle induite par la déplétion en macrophage ne s'est pas accompagnée d'une augmentation de TNF-α dans la peau et n'est donc pas liée à une augmentation de l'inflammation. Ainsi les effets protecteurs des macrophages seraient indépendants de l'inflammation[241]. D'autres études, au contraire, ont évalué les effets de la suppression de l'infiltration des macrophages dans les tissus en inhibant la protéine chimio-attractive des monocytes (MCP-1) ou en bloquant le récepteur 2 de la chimiokine C-C du récepteur MCP-1 (CCR2). Cette suppression a résulté d'une réduction de l'infiltration des macrophages et une réduction de la pression artérielle dans l'hypertension induite par l'angiotensine II[242,243] et le DOCA/NaCl[244].Des chercheurs ont montré que les souris ostéopétrotiques (Op/Op) déficientes en M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) et donc en macrophages étaient protégées de l'hypertension artérielle due à l'angiotensine II et au DOCA et présentaient moins de dysfonctionnement endothélial, de remodelage artériel et de stress oxydatif que les souris hétérozygotes témoins ($Op^{+/-}$) et sauvages[245,246].

Outre les caractéristiques proinflammatoires du macrophage M1, une série d'études a mis en évidence le rôle des macrophages M2 dans le contrôle de l'homéostasie du sodium et de l'eau. Les premières observations du groupe de Titze ont montré que l'interstitium du derme sert de site de stockage de sodium[1]. Des études ultérieures ont ensuite démontré que l'hypertonicité interstitielle stimule la production de protéines liant les amplificateurs (TONEBP) sensibles à la tonicité par les macrophages. La surproduction de VEGF-C stimulée par TONEBP stimule la lymphangiogenèse dans

le derme[6]. L'épuisement des macrophages, la déplétion en TONEBP, le blocage ou la suppression du VEGF ont entraîné une hypertension sensible au sel, démontrant que le système orchestré par les macrophages atténue la réponse hypertensive à la rétention sodique[1]. Des études plus récentes ont démontré que des concentrations élevées en sel ont des effets pro-inflammatoires et stimulent les macrophages M1 en supprimant l'activation des macrophages M2[247].

L'influence de la communication DC-T dans l'hypertension a été examinée par l'usage de l'abatacept, un médicament qui bloque les récepteurs CD80 et CD86 sur les DC[204]. Le fait de bloquer CD80 (qui empêche l'activation et la maturation des lymphocytes T) a atténué l'hypertension induite par le modèle DOCA/sel[204].Plus récemment, l'influence des DC dans l'hypertension sensible au sel a été démontrée dans un modèle de murin L-NAME/régime riche en sel[248]. Les souris sensibles au sel ont présenté une augmentation de l'expression de CD70 à la surface des macrophages et des DCs ainsi qu'une accumulation de cellules T à mémoire effectrice dans le rein et la moelle osseuse. Les souris dépourvues de CD70 n'ont pas développé d'hypertension associée à une absence de cellules T mémoires effectrices rénales[248].

2.4.3 Rôle des lymphocytes dans les effets du sodium sur l'hypertension artérielle

Le rôle des cellules T dans la pathogenèse de l'hypertension expérimentale induite par l'angiotensine II et le DOCA/NaCl a été démontré par Guzik *et al.*[249] en utilisant la souris rag1$^{-/-}$ dépourvue de lymphocytes T et B. L'hypertension induite par l'angiotensine II est associée à une infiltration de cellules T dans le tissu périvasculaire; à un stress oxydatif; à l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1), de RANTES et de TNF-α; et à l'altération de la vasodilatation endothéliale. Toutes ces caractéristiques ont été supprimées chez la souris rag1$^{-/-}$ en association avec une diminution de la pression artérielle en réponse à l'angiotensine II ou au DOCA/NaCl. Le transfert adoptif des cellules T, mais pas des cellules B, a rétabli la réponse à l'angiotensine II, y compris l'hypertension, chez la souris rag1$^{-/-}$.

Le rôle des lymphocytes T chez les rats Dahl SS a ensuite été démontré par Mattson *et al.*[250] qui a mis en évidence une amélioration de l'hypertension induite par le sel en association avec une infiltration réduite des cellules T dans les reins en l'absence de l'expression de la protéine Rag1 dans le thymus.

Plus récemment, Norlander *et al.* ont trouvé qu'une déficience en IL-17 supprime l'activation induite par l'angiotensine du co-transporteur de chlorure de sodium et du canal épithélial de sodium dans le tubule distal rénal. Ils ont également constaté que le déficit en IL-17 était protecteur contre les lésions glomérulaires et tubulaires causées par l'angiotensine II[251]. Amador *et al.* ont montré que l'hypertension induite par le DOCA/sel est associée à l'activation des cellules Th17 et à la régulation négative des Treg dans le cœur et les reins[252].

Les Treg sont connues pour leur effet de suppression de la polarisation des Th vers Th17[253]. La spironolactone (un traitement antihypertenseur) empêche l'activation des lymphocytes Th17 et augmente le nombre de cellules T régulatrices tandis que le traitement par un anticorps anti-IL-17A améliore l'hypertension et les lésions fibreuses du cœur et des reins. Par conséquent, l'IL-17 est un facteur important d'hypertension induite par les minéralocorticoïdes et une altération de l'équilibre Th17/Treg joue un rôle dans l'hypertension induite par le sel DOCA/sel.

De plus, une autre équipe a procédé au remplacement du chromosome 2 (impliqué dans l'hypertension et dans la régulation de la réponse immunitaire) du rat Dahl sensible au sel par celui du rat Brown Norway produisant une nouvelle lignée consomique de rat, le rat SSBN2. Ils ont constaté que ces rats SSBN2 ont une pression artérielle systolique diminuée par rapport à celle des rats Dahl sensibles au sel. De plus, les rats SSBN2 présentaient une inflammation vasculaire aortique réduite et avaient également plus de Treg aortiques produisant de grandes quantités de TGF-β et d'IL-10. Ces résultats suggèrent que les Treg pourraient participer à l'atténuation des effets du sel sur l'hypertension[254].

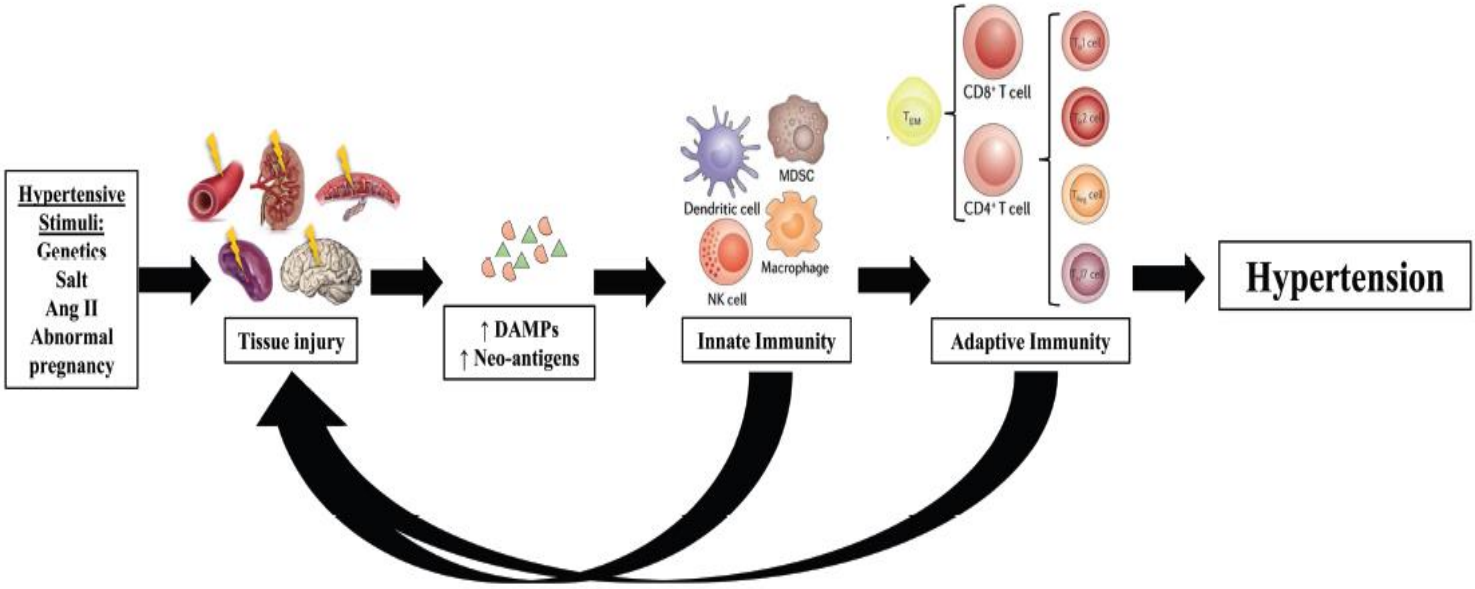


Figure 8: Mécanismes immunitaires impliqués dans le développement de l'hypertension. Abréviations: AngII, angiotensin II; DAMPs, danger associated molecular patterns; NK cell, natural killer cell; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; Tem, effector memory T cell; Th, helper T cell; Treg, regulatory T cell[88]. Recent Advances in Immunity and Hypertension par Lopez *et al.* American Journal of Hypertension 2017.

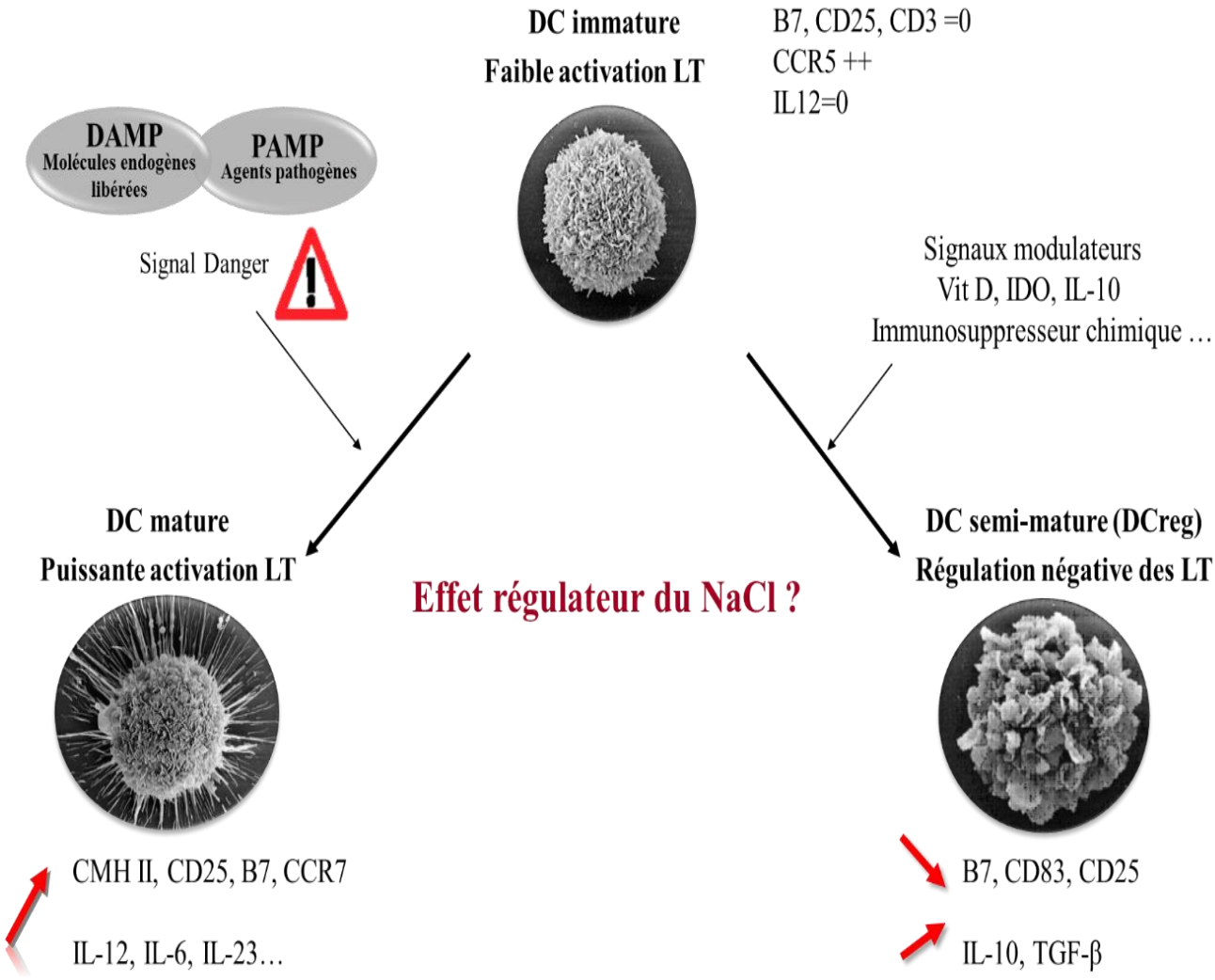
Objectifs

Objectifs

Nous avons vu un certain nombre d'effets liés à des apports excessifs en sel sur l'immunité *in vivo*. *In vitro*, il a été rapporté que des concentrations élevées en chlorure de sodium ont des effets directs pro-inflammatoires sur les LT humains (polarisation vers TH17) mais les effets du NaCl sur les cellules dendritiques humaines n'ont jamais été rapportés.

Au cours de cette thèse, notre objectif était d'étudier les effets de concentrations élevées en chlorure de sodium (140mM à 200 mM) sur les propriétés immunologiques des cellules dendritiques humaines. Nous avons d'abord étudié les effets de concentrations élevées de NaCl sur des DC immatures puis sur la maturation induite par le LPS. Puis, nous avons analysé l'expression des marqueurs de maturation de surface, les grandes voies de signalisation impliquées dans cette maturation, le profil de sécrétion des cytokines des DC et l'activation des LT CD4 allogéniques induits par des DC prétraitées à des concentrations fortes en NaCl

Rappel sur les 3 états des Cellules Dendritiques



Matériels & méthodes

Matériels & méthodes

1 Génération et stimulation des cellules dendritiques dérivées de monocytes

Le sang des donneurs sains a été obtenu auprès de l'Etablissement Français du Sang après un consentement éclairé et selon les directives de l'établissement. Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells) ont été séparées par gradient de densité à l'aide de Ficoll (Eurobio, France) à partir du sang.

Afin de générer des DC dérivées de monocytes immatures, les monocytes ont été isolés à partir d'une fraction de PBMC par sélection positive en utilisant des microbilles magnétiques conjuguées à l'anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Paris, France). La pureté des monocytes CD14+ est vérifiée par cytométrie en flux (supérieure à 95%).

La différenciation des monocytes en DC immatures est réalisée dans un milieu de culture particulier. En bref, des monocytes $CD14^+$ purifiées ont été cultivés pendant 6 jours dans du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Gibco) additionné de 2 mM de L-glutamine, 50 U / ml de pénicilline, 50 mg / ml de streptomycine (Life Technologies, Saint Aubin, France). 25 ng/mL d'IL-4 et 100 ng / ml de GM-CSF recombinant humain (Miltenyi Biotec, France) et 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (SVF; GIBCO).

A la fin de la différenciation, les DC immatures sont récupérées et remises en suspension pour 2 jours supplémentaires dans un milieu de culture en présence d'IL-4 et du GM-CSF, du LPS (lipopolysaccharides d'*Escherichia coli*; Sigma-Aldrich, France) à 2,5 ng / ml ou 50 ng / ml, dans un milieu enrichi en chlorure de sodium (à partir de 140 mM $[Na^+]$ comme contrôle isotonique, jusqu'à 200

mM [Na^+]), (SODIUM chlorure PROAMP 10%), à 37 °C dans une atmosphère à 5% de CO2. La maturation des DC est évaluée 48 heures après.

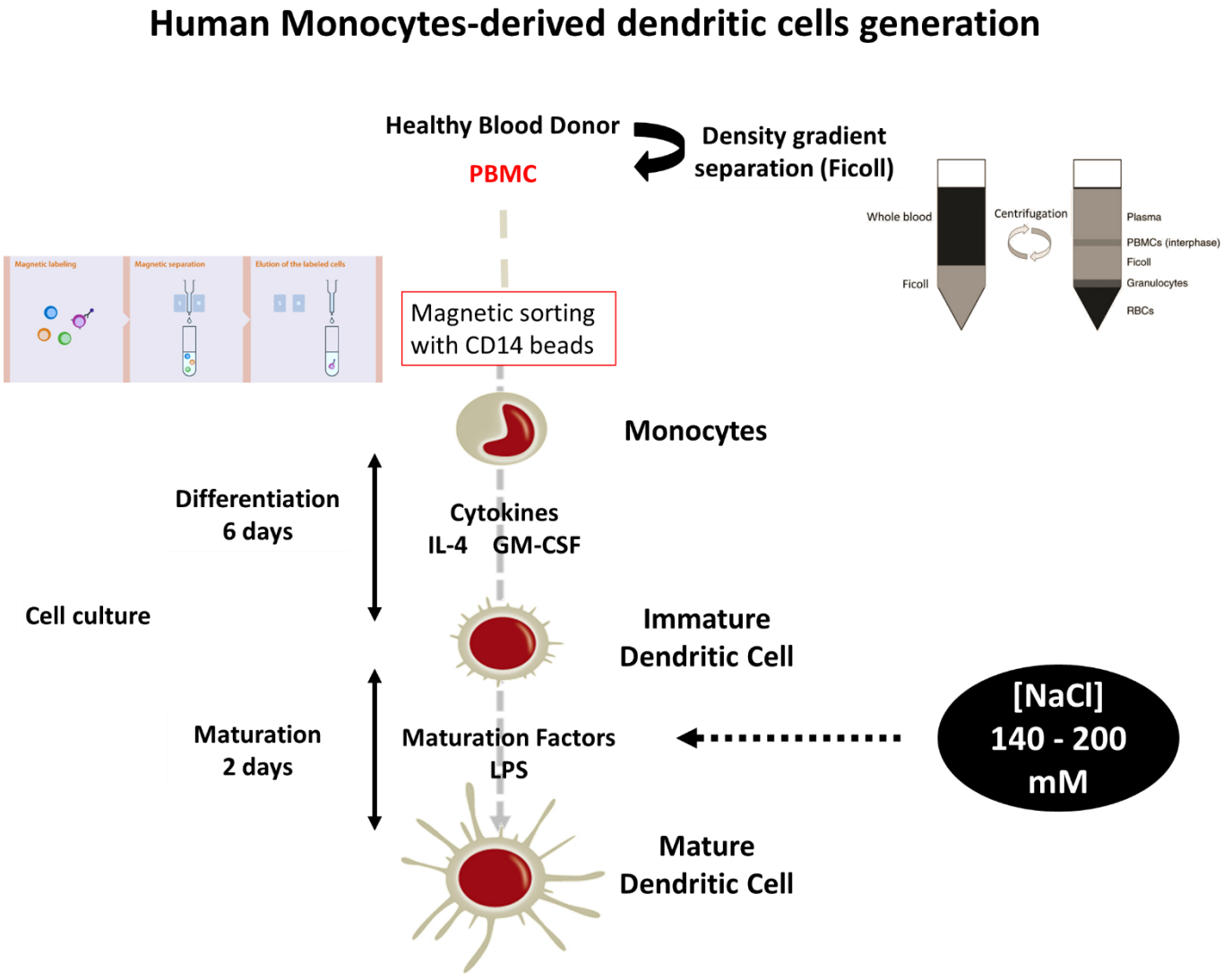
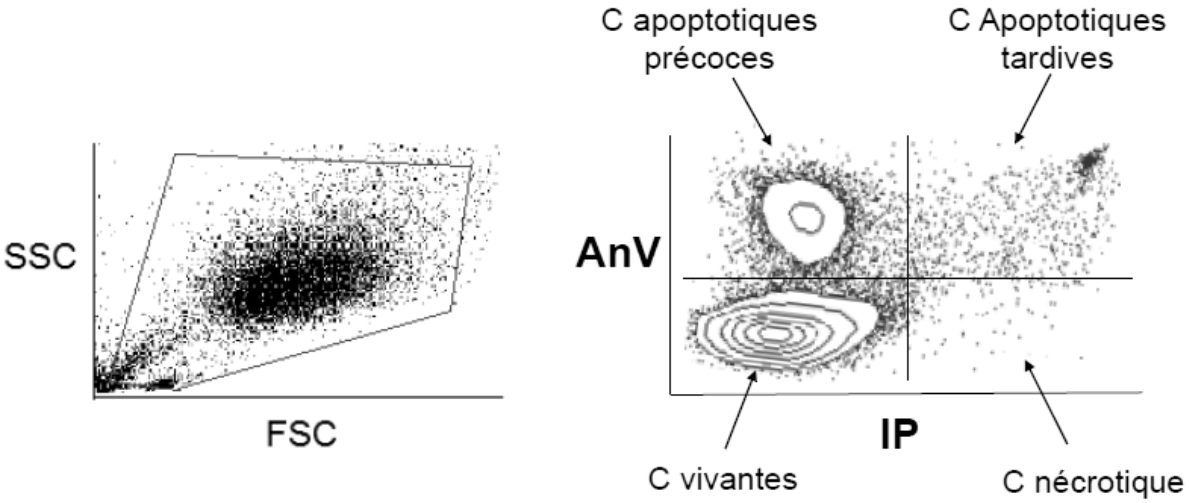


Figure 9 : Schéma récapitulatif de la génération et stimulation des Mo-DC à partir du sang humain.

2 Etude de la viabilité cellulaire

Les DC stimulées pendant 48 h ont été lavées avec du PBS, mises en suspension dans du tampon de liaison (Hepes 0,1 mM, CaCl2 2,5 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) et colorées pendant 15 min avec de l'Annexine V et de l'iodure de propidium (BD Biosciences). Les échantillons ont été immédiatement analysés par cytométrie en flux (FACSCanto II, BD Biosciences, Allemagne).



Annexin V (AnV ; FITC) : Fixe les phosphatidylsérines membranaires délocalisées retournées vers la face externe des cellules pro-apoptotiques.

Iodure de Propidium (IP) : est un agent intercalent marqueur des acides nucléiques (l'ADNou l'ARN) des cellules nécrotiques ayant perdues leur intégrité membranaire.

Figure 10 : Analyse de la survie par cytométrie en flux des DC mises en culture à l'aide du logiciel DIVA.

3 Marquage de surface des DC par cytométrie en flux

La maturation des DC et l'expression des marqueurs de co-stimulations ont été évaluées après 48h de stimulation des DC. Les DC ont été lavées avec du PBS et incubées avec des anticorps monoclonaux conjugués à un fluorophore pendant 30 min à 4 ° C. Nous avons utilisé plusieurs anticorps couplés (Abs): CD83-FITC (clone HB15e), CD25-allophycocyanine (clone M-A251), CD80-PE (clone B7), CD86-PE-Cy5 (clone 2331), CCR7-PE (clone 150503), CD163-PE (clone GHI / 61), tous de BD Biosciences, CD14-PE (clone RMO52), CD209-PE (clone AZND1) de Beckman Coulter, IBA-1 conjugué à Alexa Fluor 488 (Wako chemicals USA) , Richmond) et leurs contrôles isotypiques respectifs.

Après un lavage supplémentaire, les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel DIVA (Becton Dickinson) et FlowJo (Tree Star).

4 Microscopie électronique à balayage

En microscopie à balayage, les images sont obtenues après l'émission d'électrons secondaires induite à la surface de l'échantillon par un faisceau d'électrons accélérés sous une tension de quelques kilovolts (1 à 15 KV). L'échantillon, exposé au bombardement électronique, est également soumis à un vide élevé de l'ordre de 10^{-7} mbar. Pour la microscopie électronique à transmission (MET), les cellules ont été traitées comme suit. Les DC ont été stimulées pendant 48 h à 1.10^6 cellules / ml dans une plaque 24 puits avec au fond des lames de verre (Polyscience; Miles Inc., Kanakee, IL) préalablement coattées avec de la poly-t-lysine (Sigma). Ensuite, les DC ont été fixées avec 2,5% de glutaraldéhyde et 2% de paraformaldehyde (PFA) dans un tampon phosphate 0,1 M; pH 7,4 pendant 2 h à température ambiante. Les cellules ont ensuite été post-fixées avec 1% de tétroxyde d'osmium (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, États-Unis) et 1,5% de ferrocyanure de potassium (Sigma-Aldrich) à température ambiante pendant 1 heure, déshydratées dans dudioxyde et enduit par pulvérisation d'or et palladium (4 nm d'épaisseur).

Les échantillons ont été finalement photographiés et la surface d'étalement de la cellule a été calculée avec le logiciel inclus dans le microscope électronique Zeiss EM 900 à 80 KV (Carl Zeiss, Jena, Allemagne). Les images sont numérisées en ligne avec une résolution de 1024 X 768 pixels.

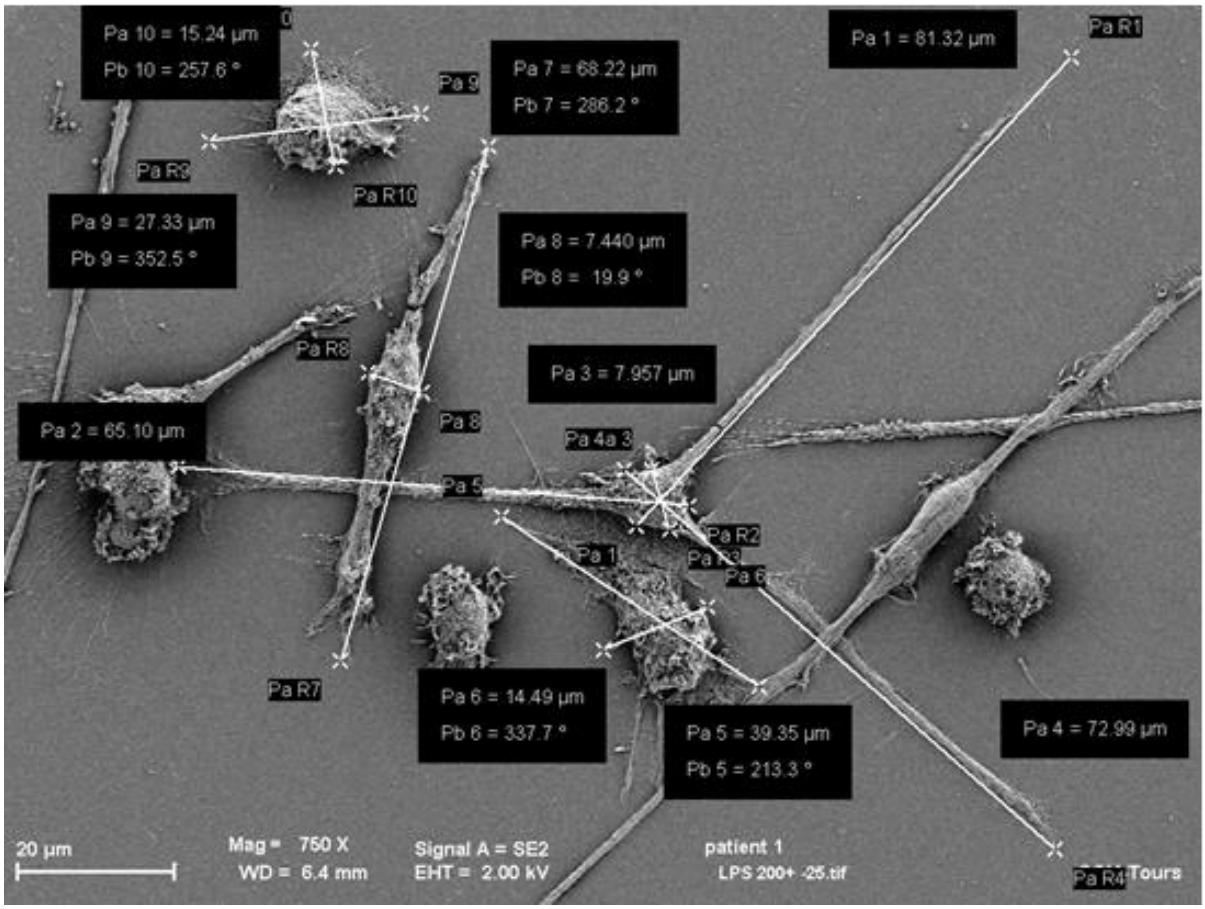


Figure 11 : Mesure numérique des diamètres et extensions cellulaires à l'aide du microscope électronique à balayage Zeiss EM.

5 Microscopie confocale

Les DC ont été stimulées et ensemencées pendant 48 heures dans une lame de chambre LabTek II CC2 à 8 puits (Thermofisher) à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO2. Ensuite, les DC ont été fixées dans 4% de PFA pendant 15 minutes, puis perméabilisées avec 0,1% de Triton 100X pendant 10

minutes. La liaison non spécifique a été bloquée par du FCS à 10% pendant 20 minutes, puis marqué avec la F-actine (Phalloïdine-AF555) combinée au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pour la contre-coloration nucléaire. Pour visualiser la distribution positionnelle relative des deux fluorochromes, les images collectées dans les deux canaux ont été fusionnées. Les images confocales ont été générées à l'aide d'un microscope à balayage laser confocal inversé Leica TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Allemagne).

6 Étude de la capacité d'endocytose par le marquage FITC-Dextran

Les DC stimulées ont été incubées avec du FITC-Dextran (0,1 mg / ml) de Sigma-Aldrich soit à 4 ° C (contrôle d'internalisation) soit à 37 ° C pendant 1 heure. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec un tampon froid contenant 5% de FCS dans du PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco) et analysées par cytométrie en flux.

7 Étude de la migration *in vitro*

Pour les essais de migration, des inserts transwell (VWR, corning) avec un diamètre de pores de 8 µm ont été utilisés. Les transwell ont été placés dans une plaque de culture cellulaire 24 puits contenant un milieu de culture cellulaire en présence ou non de CCL19 (500 ng / ml; Peprotech, London, UK) dans la chambre inférieure. Les chambres supérieures ont été remplies de 100 µl de milieu de culture cellulaire contenant des DC immatures ou traitées au LPS ($1{,}5.10^6$ cellules / ml) à différents [Na^+]. Le nombre de DC ayant migré dans le compartiment inférieur a été déterminé par cytométrie en flux après une incubation de 4 heures à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO2.

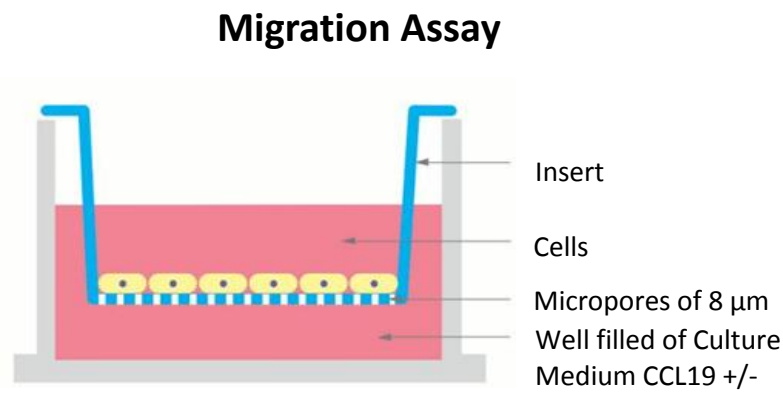


Figure 12 : schéma d'un transwell, test de migration cellulaire.

8 Analyse des surnageants de culture cellulaire par ELISA

Les surnageants des DC stimulées ont été collectés et stockés à -20 ° C jusqu'à ce qu'ils soient analysés pour la production de cytokines. Les sécrétions d'IL-12p70 (IL-12), IL-10, IL-6, IL-23 et TGF-ß des DC ont été mesurées par ELISA selon les instructions du fabricant (Thermofisher). Les densités optiques ont été mesurées dans un lecteur de plaques ELISA à une longueur d'onde de 450 nm.

9 Analyse de la production d'espèces réactives de l'oxygène

Le niveau total de ROS (Reactive Oxygen Species) dans les cellules vivantes non fixées a été mesuré par un kit ROS total selon les instructions du fabricant (Enzo Life Sciences). Les DC immatures ont été colorées avec le composant du kit de dosage ROS pendant 1 heure puis elles ont été non traitées, stimulées par du LPS avec ou sans ajout de Na^+ ou incubées avec 3% de peroxyde d'oxygène (témoin positif) dans des plaques 96 puits à la densité de 2.10^5 cellules / puits pendant une heure supplémentaire à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO2.Après diffusion dans la cellule, le réactif non fluorescent est oxydé par ROS et devient très fluorescent, ce qui peut être détecté par spectroscopie de fluorescence avec des spectres d'excitation et d'émission maximums de 495 nm et 529 nm, respectivement. Enfin, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS et analysées par cytométrie en flux et les intensités moyennes de fluorescence ont été utilisées pour comparer la production de ROS.

10 Réaction lymphocytaire mixte (MLR)

Les cellules T $CD4^+$ de donneurs de sang sains ont été isolées pour la première fois à partir d'une fraction de PBMC par une sélection positive en utilisant des billes magnétiques marquées anti-CD4 (Miltenyi Biotec, Paris, France). La pureté de la population $CD4^+$ a été évaluée à environ 95%, par cytomètre en flux (CD4-FITC, clone 13B8.2, IgG1, Beckman Coulter). Nous avons ensuite effectué une MLR de DC préalablement traitées au LPS avec des lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques à un rapport de 1 DC pour 3 LT dans du milieu complet. Au jour 6 de la culture, les surnageants ont été recueillis et stockés à -20°C jusqu'au test ELISA. L'expression du marqueur d'activation CD25 (clone HB15e; BD Biosciences) ainsi que la prolifération par coloration Ki67 (clone B56; BD Biosciences) ont été analysées dans les lymphocytes T $CD4^+$ co-cultivés avec les DC. La production des cytokines intracellulaires des cellules T (IFN-γ: clone B27 et IL-17A: clone N-49-653 de BD Biosciences) a été évaluée après 4 heures de stimulation avec 50 mg / ml de PMA (Phorbol Acétate Myristate; Sigma-Aldrich) et 750 ng/ml de Ionomycin (Sigma-Aldrich) en présence de Golgi Stop (BD Biosciences).

11 Test de suppression cellulaire

L'activité suppressive des LT $CD4^+$ co-cultivés avec des DC a été testée dans un test de suppression de la prolifération de LT $CD4^+$ autologues préalablement marqués au CFSE (Life technologies). Ainsi, à la fin de la première co-culture de 6 jours, les LT $CD4^+$ activés sont remis en présence de LT CD4 autologues marqués au CFSE pendant 6 jours. La prolifération des cellules répondeuses a été analysée par le marquage CFSE et CD25-APC (clone M-1251, IgG1, BD Pharmingen) par cytométrie en flux.

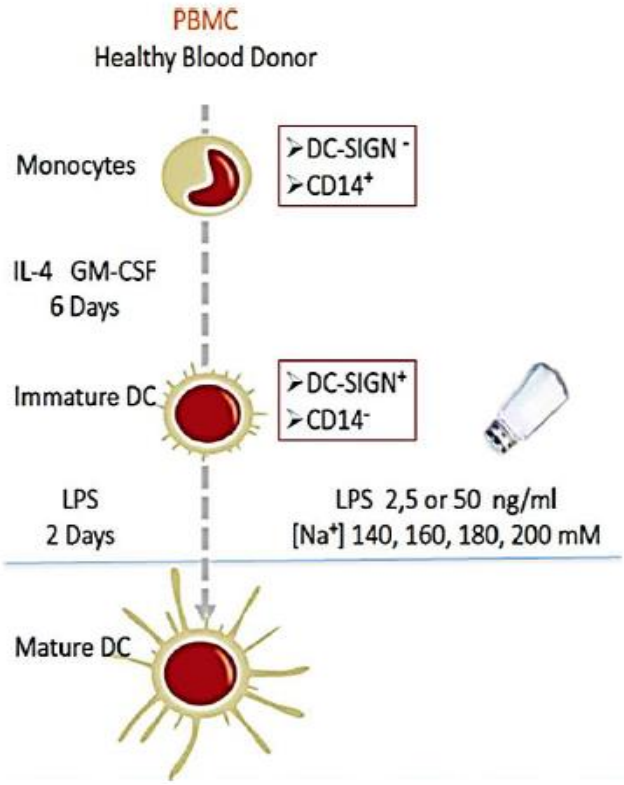
12 Western Blot

1.10^6 iDC/mL sont stimulées pendant 15 minutes ou une heure avec du LPS en présence ou non de concentrations croissantes de NaCl, lavées dans du PBS froid, puis lysées à 4°C pendant une nuit avec un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM [pH 7,4], 150 mM NaCl, MgCl2 1 mM, CaCl2 1 mM, SDS 0,1%, désoxycholate de sodium 0,5%, Triton X-100 1%) contenant des inhibiteurs de protéase (Sigma-Aldrich).

Les lysats protéiques sont ensuite récupérés après une centrifugation de 11 000 g pendant 10 minutes à 4°C. La concentration protéique des lysats clarifiés est déterminée par dosage BCA (Thermofisher Scientific). Du tampon de charge de Laemmli a été ajouté au lysat de protéines (4% de SDS, 40% de glycerol, 10% de ß-mercaptoéthanol, 125 mM de Tris-Cl, pH 6,8) et incubé pendant 5 minutes à 95 ° C.Les échantillons sont chargés (60 µg de protéines), séparés par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide à 10-12%, puis transférés sur membranes de nitrocellulose et saturés avec 5% de BSA dans du TBS 0,1% Tween 20 (TBS-T) à température ambiante pendant 1 heure.Les voies de signalisation des MAP Kinases ont été étudiées à l'aide des anticorps primaires humains suivants: p38, phospho-p38 (Thr180/Tyr182), Erk1/2, phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) et SGK1, phospho-SGK1 (1: 1000, cell signaling). Les membranes sont incubées avec les anticorps pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après 3 lavages en TBS-T, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à l'HRP (1:5000, Bio-Rad) pendant une heure à température ambiante sous agitation. La protéine HSC-70 a été utilisée comme protéine de référence. Elle a été immunodétectée en utilisant des anticorps anti-HSC-70 de souris (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) et des anticorps secondaires anti-IgG de souris conjugués à l'HRP (1:5000, Bio-Rad). Tous les anticorps ont été dilués dans du TBS-T avec 5% de BSA. La révélation des protéines a été effectuée en utilisant le kit ECL Plus (substrat de transfert Western Pierce ECL, ThermoFisher). L'intensité des bandes a été quantifiée en utilisant le logiciel ImageJ.

12 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Prism (GraphPad Software). La comparaison des paramètres quantitatifs a été analysée avec les tests de Wilcoxon (données appariées) et de Mann-Whitney (données non appariées), non paramétriques. La viabilité a été évaluée en utilisant le test Friedman ANOVA.



DC Viability Annexin V / PI	DC Morphology by electron & confocal microscopy
DC endocytosis by FITC-DE staining	
DC Phenotyping by flow cytometry - **Maturation markers** CD25,CD83 - **Costimulatory molecules** CD80, CD86 - **Chemokine Receptors** CCR7, CCR5	
Migration test CCL19 Transwell Assay	
Cytokines Secretion by **ELISA** IL-12, IL-10, IL-6, TGF-β, IL-23	
DC ROS production flow cytometry	
Protein production Western Blot p38 P-p38 ERK1/2 & P-ERK1/2; SGK1 & P-SGK1	

Figure 13 : Schéma récapitulatif des matériels et méthodes utilisés pour l'étude des effets des concentrations élevées du sel sur les cellules dendritiques humaines dérivées des monocytes.

Résultats

Partie -1-

Caractérisation phénotypique des DC traitées par le NaCl

Résultats 1-1 Une forte concentration en sodium (200 mM) n’altère pas la viabilité des DC

Nous avons d'abord mesuré l'impact des concentrations de sodium sur la viabilité des DC. Les DC immatures dérivées de monocytes ont été incubées avec du LPS (2,5 ng / ml) à des concentrations de [Na^+] allant de 140, à 160, 180 et 200 mM pendant 48 heures. La viabilité des DC a été évaluée par double marquage cellulaire à l'annexine V et à l'iodure de propidium. Comme le montre la **figure 14**, la concentration élevée de [Na^+] jusqu'à 200 mM n'a pas eu d'effet significatif sur la viabilité des DC. Il convient de noter qu'à 240 mM, la viabilité DC a fortement diminué pour atteindre 5%, ceci est éventuellement dû à la forte osmolarité du milieu. Par conséquent, dans toutes nos expériences et analyses ultérieures, nous nous sommes contenté de 200 mM de Na^+ comme la plus forte concentration de sel (HS) par rapport à 140 mM de Na^+, qui était considéré comme condition normal de sel (NS).

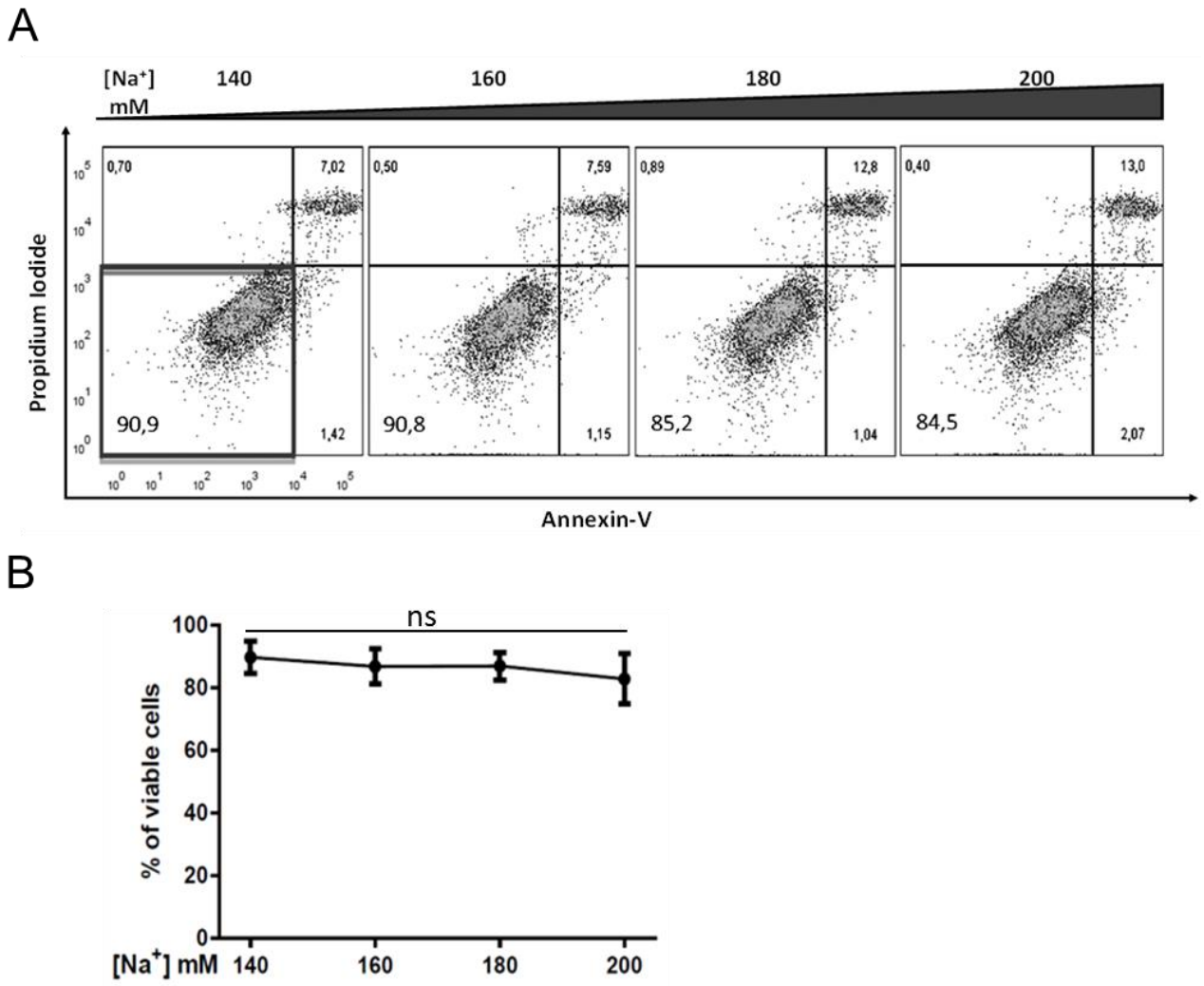


Figure 14: Le taux élevé de [Na^+] n'a pas modifié de manière significative la viabilité du courant continu jusqu'à 200 mM. Des DC immatures dérivées de monocytes ont été incubées avec du LPS (2,5 ng/ml) à des concentrations croissantes de Na^+ comme indiqué (140, 160, 180 et 200 mM) pendant 48 heures. Les colorations à l'Annexine V et à l'Iodure de Propidium ont ensuite été analysées par cytométrie en flux. A- Résultats d'une expérience représentative (les valeurs dans les quadrants inférieurs indiquent les pourcentages de cellules viables). B- Résultats pour 5 donneurs sains, indépendants. Les points noirs représentent la moyenne et barrent les écarts types. L'analyse statistique par test de Mann-Withney n'a pas montré de différence significative.

Résultats 1-2 Une forte concentration en sodium (200 mM) induit une modification du cytosquelette des DC traitées par le LPS

Les concentrations élevées de sel modifie le paramètre FSC de taille des DC mises en culture aux concentrations de 140, 160, 180, 200 mM de [Na^+], la taille des cellules analysées par cytométrie en flux augmente (**Figure 15**).

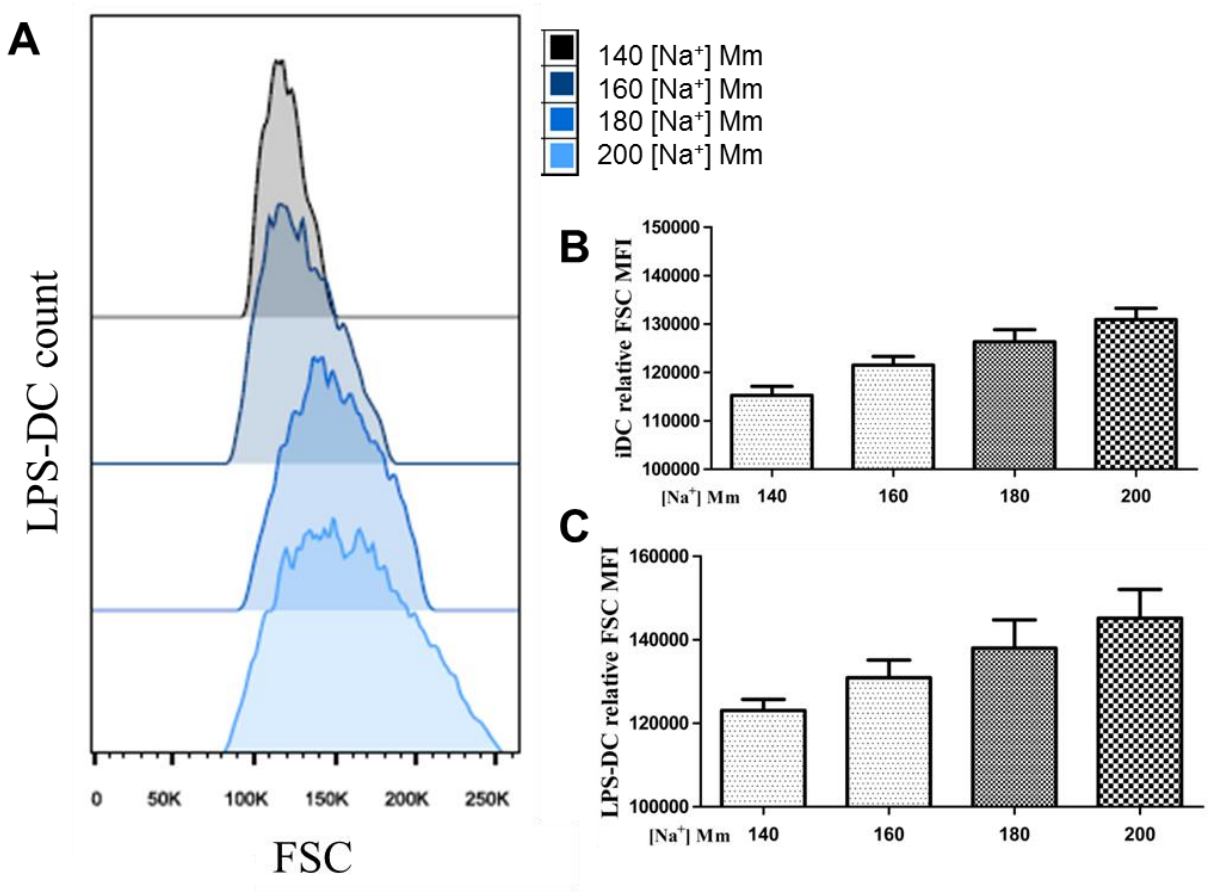


Figure 15 : Augmentation de la taille des DC induite par des concentrations élevées de sel. Les DC immatures dérivées de monocytes ont été cultivées pendant 48 heures avec ou sans LPS (2,5 ng/ml) à des concentrations croissantes de [NaCl] entre 140 et 200 mmol/l puis analysées en cytométrie en flux pour les paramètres FSC. A- Histogramme représantant la variation du paramètre FSC des LPS-DC d'une expérience. Les variations de la MFI du FSC relative aux iDC (B) et (LPS-DC) traitées à des concentrations croissantes de [NaCl] sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type pour 3 donneurs indépendants.

Ces résultats nous ont conduits à étudier leur morphologie en microcopie électronique à balayage et microscopie confocale.

Nous avons utilisé à la fois la microscopie électronique confocale à balayage et l'immunofluorescence afin de visualiser l'aspect morphologique de la DC traitée avec des concentrations croissantes de sodium. L'analyse ME des DC traitées au LPS à 140 mM [Na^+] (Fig 16 B et C) montre un aspect conventionnel des cellules dendritiques avec de grandes extensions du cytosol et des dendrites, alors que les dendrites des DC immatures sont très courtes (Fig 16 A).

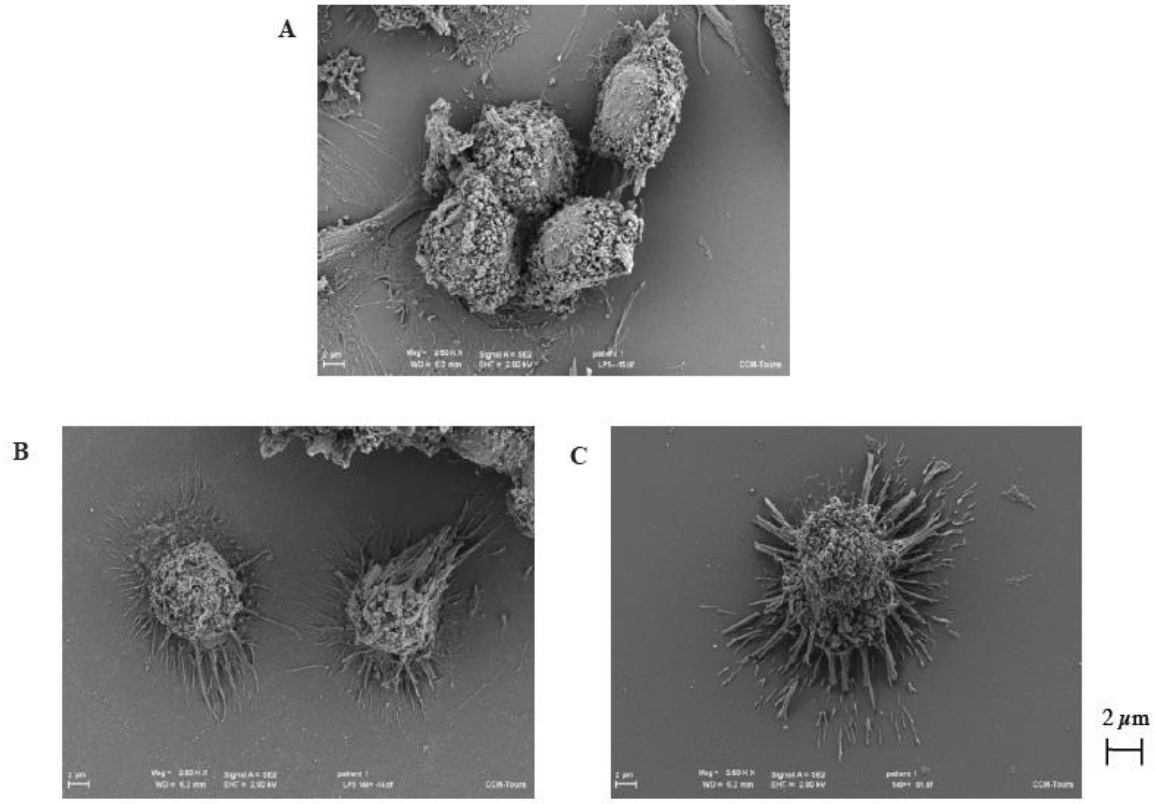
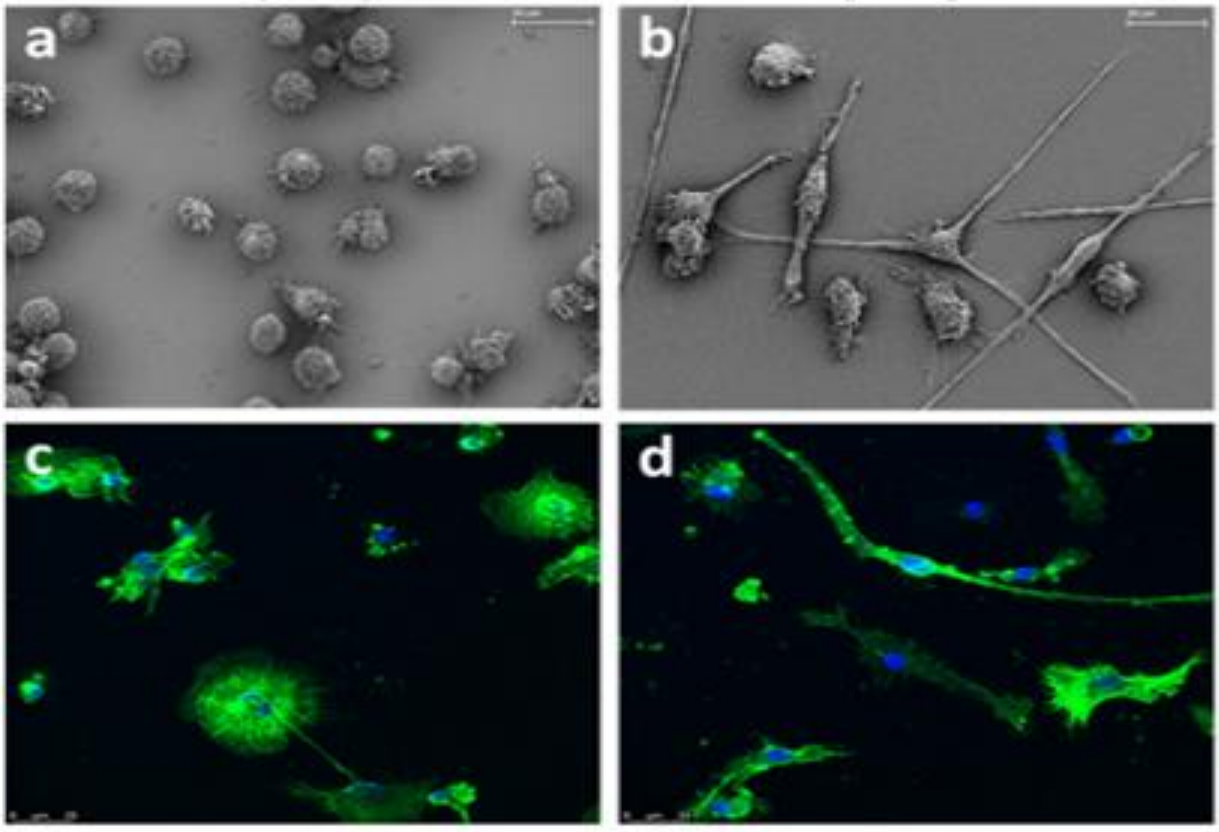


Figure 16 : Le LPS induit la formation de dendrites sur les DC. DC immatures (A), DC traitées par LPS 2,5 ng/ml (B) et 50 ng/ml (C) ont été analysées en microscopie électronique à balayage après 48h de culture sur lamelle de polylysine (présentation d'une expérience représentative de 4 donneurs différents).

De manière intéressante, à la concentration en HS (200 mM), les DC ont développé un cytosquelette beaucoup plus allongé (**Fig 17 A, b et d**). Ce résultat a été analysé en mesurant les longueurs de toutes les dendrites pour 34 DC, traitées par le LPS, sur des images de microscopie électronique à [Na^+] 140 et 200 mM (**Fig 17 B**). Les longueurs des dendrites étaient respectivement de 22,6 ± 11 µm et de 41,9 ± 20 µm à 140 et 200 mM [Na^+] ($p < 0,0001$). L'analyse de la coloration à l'actine par microscopie confocale a confirmé ce résultat (**Fig 17 A, c et d**). Ces changements de morphologie sont observés aussi bien après culture sur polylysine que sur lame de verre et sont donc indépendants de la surface de culture utilisée pour la fixation des DC (**Figure 18**).

A


140 [Na+] mM
200 [Na+] mM
a
b
c
d

B

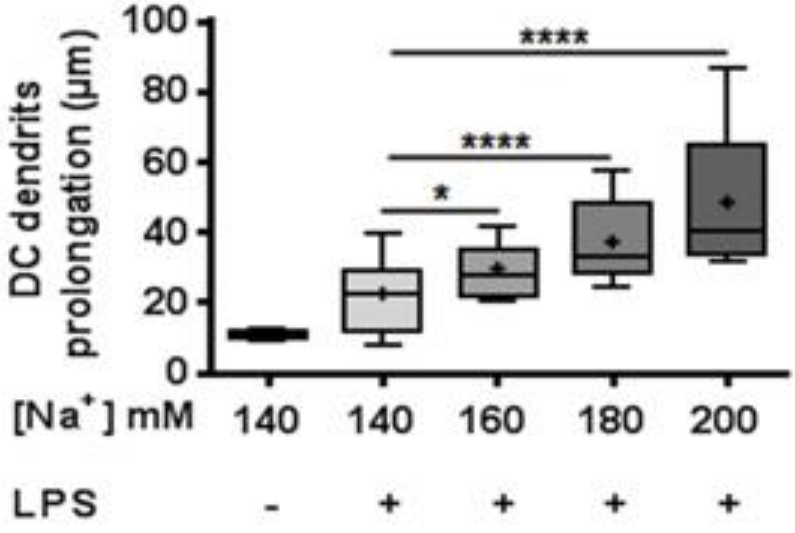

DC dendrits prolongation (µm)
100
80
60
40
20
0
****
****
*
[Na+] mM
140
140
160
180
200
LPS
-
+
+
+
+

Figure 17: Des concentrations élevées de NaCl étendent le cytosquelette de DC. (A) Des DC dérivées de monocytes ont été cultivées avec du LPS (2,5 ng/ml) pendant 48 h à 140 mM (a, c) ou 200 mM [Na^+] (b, d). La morphologie DC a été analysée par microscopie électronique (a, b) et par microscopie à immunofluorescence confocale à des grossissements x 20 (c, d). Les noyaux ont été colorés par Dapi (bleu) et par actine (en vert). Une expérience représentative est présentée. (B) Les longueurs de toutes les dendrites cellulaires ont été mesurées sur des images de microscopie électronique à 30 DC avec le logiciel inclus dans le microscope Zeiss ULTRA Plus pour 140 à 200 mM [Na^+] (comme indiqué) et représenté graphiquement en boîte à moustaches. La médiane (la bande à l'intérieur de la boîte), la moyenne (symbolisée par + dans des cases) et la valeur de S.D (lignes s'étendant verticalement à partir des cases) sont présentées (* p <0,01 **** p <0,00001).

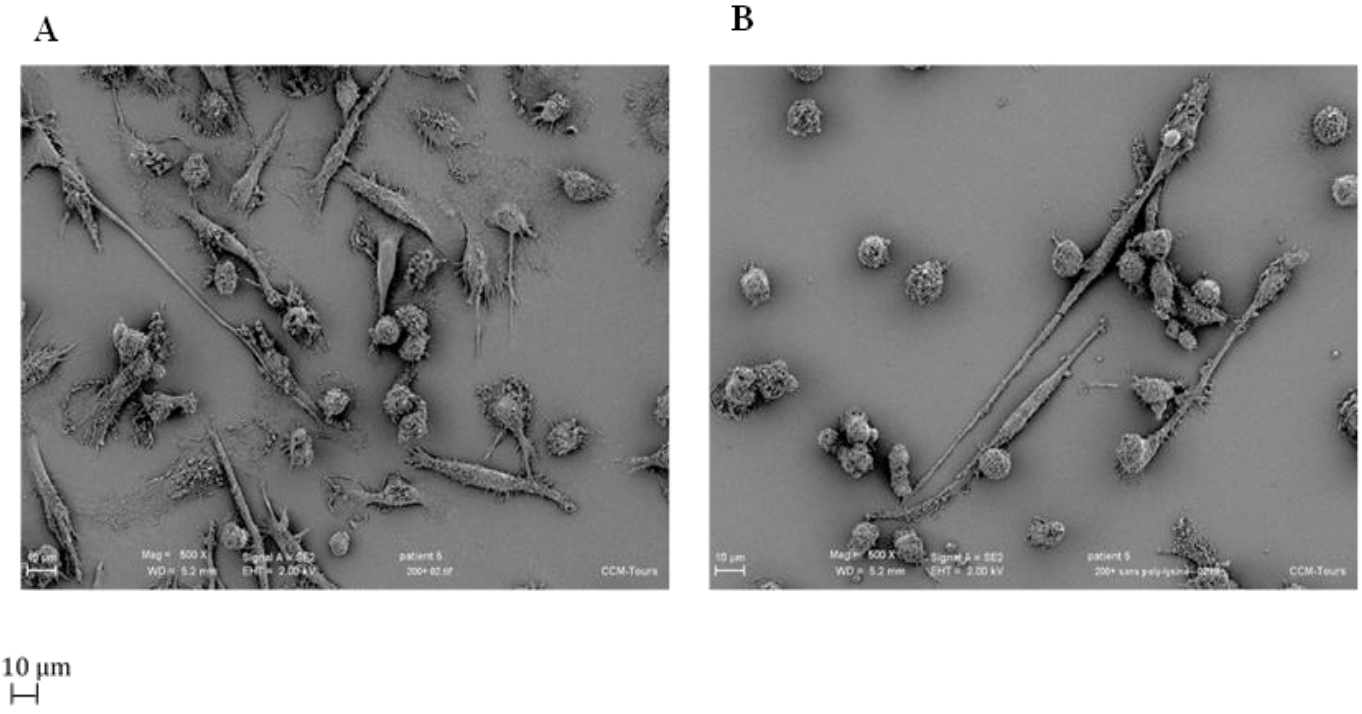


Figure 18 : Absence de modification de morphologie à 200 mM de [NaCl] lié au support de fixation des DC. Les DC ont été cultivées avec 2,5 ng/ml de LPS et 200 mM de [NaCl] pendant 48h sur une lamelle de polylysine (A) ou de verre (B) pour un donneur.

Résultats 1-3 Les DC traitées par le LPS avec de forte concentration de sodium maintiennent l'expression des marqueurs de DC et n'acquièrent pas de marqueurs de macrophages

Les monocytes circulants ont le potentiel de se transformer en divers autres types de cellules tels que les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Kupffer du foie ou même la microglie dans le système nerveux central. Nous explorons la possibilité que les conditions de HS puissent reprogrammer la différenciation des monocytes en d'autres types de cellules tels que les macrophages au lieu des cellules dendritiques comme suggéré par les modifications de la forme cellulaire. Nous avons analysé IBA-1 (un marqueur spécifique des macrophages), CD163, CD209 et CD14.

Nous avons trouvé que sous une forte concentration de [Na^+] les DC activé par LPS expriment CD209 mais pas les marqueurs de macrophages IBA1, CD14 et CD163 (**Fig 19**). Cela indique que les DC cultivées en concentrations HS conservent les caractéristiques des DC et ne transdifférencient pas en macrophages. L'expression du marqueur DC SIGN a diminué après 48 heures de maturation par le LPS 50 ng/ml (**Figure 20 A**). Cependant, des doses croissantes de [NaCl] ne modifiaient pas l'expression de DC SIGN sur les DC après une maturation suboptimale (**Figure 20 B**).

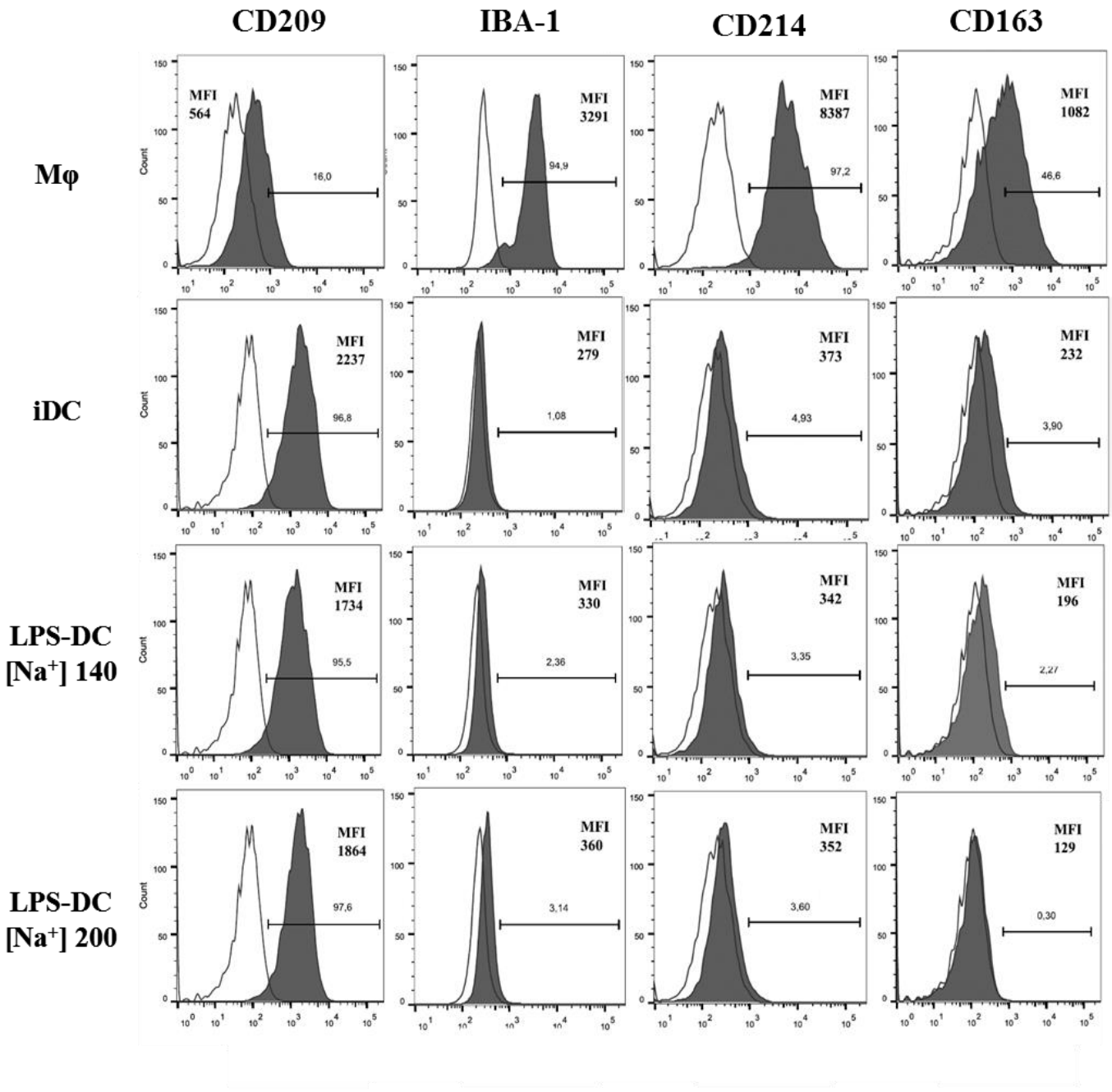


Figure 19: les DC immatures incubées avec du LPS à une concentration élevée en Na^+ maintiennent l'expression des marqueurs DC et n'acquièrent pas de marqueurs macrophages. (A) des monocytes ont été isolés par des billes magnétiques et différenciés en iDC pendant 6 jours puis traités pendant 2 jours avec LPS 2,5 ng/ml à 140 mM ou NaCl 200 mM. L'expression des signes DC a été évaluée par cytométrie pour les monocytes fraîchement isolés, iDC, LPS-DC à 140 mM de Na^+ et LPS-DC à 200 mM de Na^+ (comme indiqué). Les résultats pour un donneur en bonne santé sont présentés. (B) expression du signe DC par DC traitée avec LPS (2,5 ng/ml) et concentrations

croissantes de NaCl, comme indiqué (résultats pour 5 donneurs sains indépendants). (C) Le marqueur IBA-1 a été évalué par FAC sur des monocytes différenciés en présence de GM-CSF seul (a) ou de GM-CSF + IL4 (b) ou de DC traitée au LPS à 140 ou 200 mM NaCl (respectivement c et d).

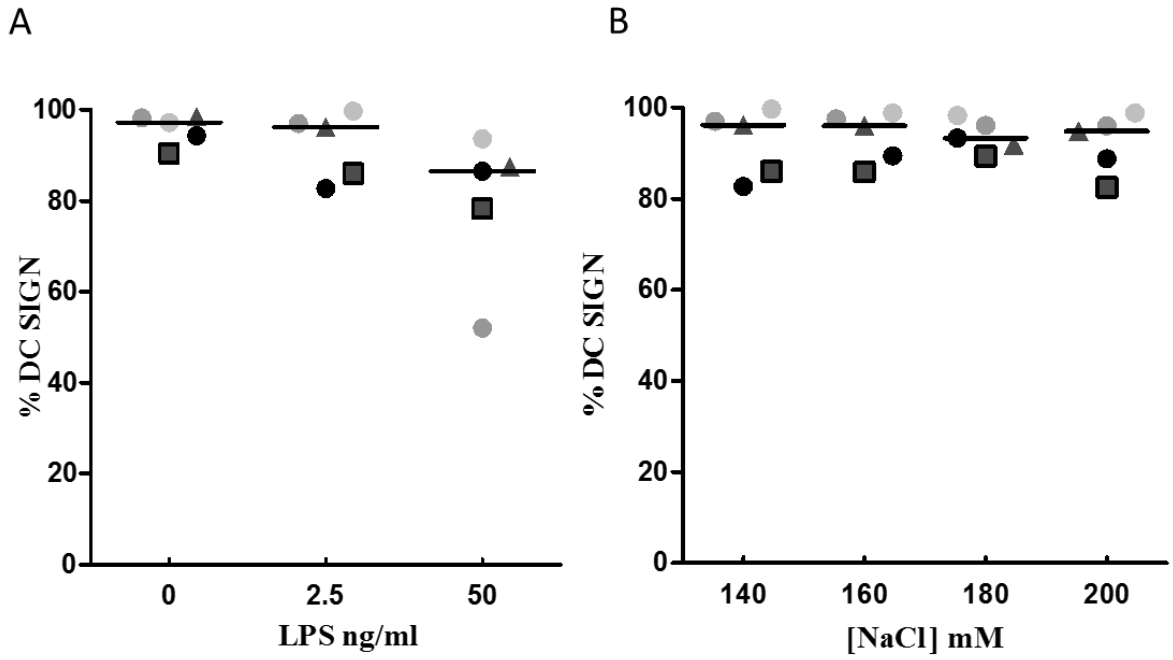


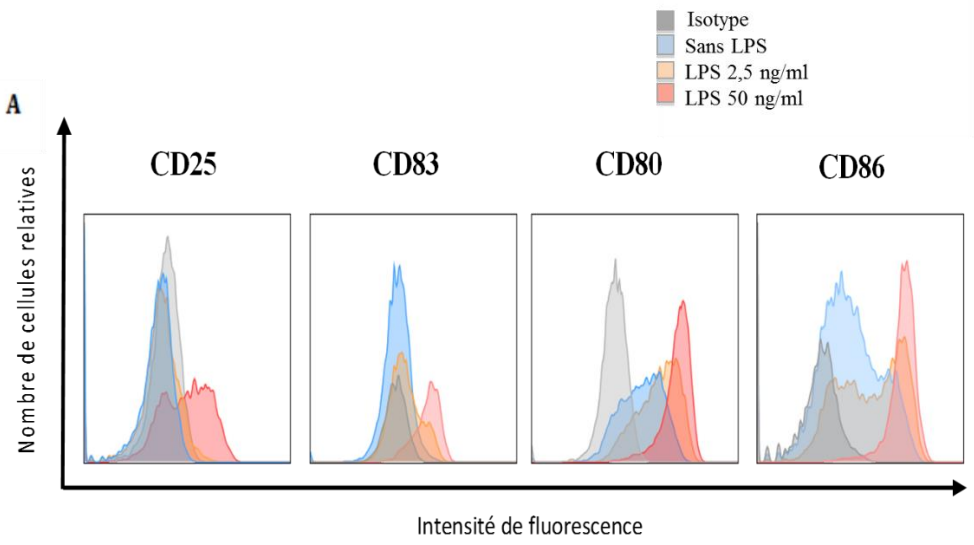
Figure 20 : Des doses croissantes de [NaCl] ne modifiaient pas l'expression de DC SIGN.

L'expression de DC SIGN a été étudiée en CMF sur des DC traitées par LPS 0 ; 2,5 et 50 ng/ml (A) et sur des DC traitées par LPS 2,5 ng/ml à des doses croissantes de sel indiquées en abscisse (B). Chaque symbole représente un donneur et les barres sont les médianes pour 5 donneurs.

Résultats 1-4 Une stimulation par le LPS à dose élevée et suboptimale induit l'expression des marqueurs de maturation des DC

Afin de tester soit une potentialisation soit une inhibition de la maturation, nous avons analysé l'effet de concentrations élevées de [NaCl] sur des DC en présence de LPS 2,5 ng/ml qui entraine une maturation suboptimale ou à 50 ng/ml qui entraine une maturation opimale. Nous avons réalisé des doubles marquages CD25, CD80 et CD83, CD86 après 48 heures de culture sans ou avec LPS 2,5 ou 50 ng/ml.

La réponse était constante et très forte pour l'activation par la concentration de LPS à 50 ng/ml (**Figure 21**). Cette réponse atteignait souvent les 100% de cellules positives pour plusieurs marqueurs. Nous avons confirmé que le LPS à 2,5 ng/ml induisait une expression intermédiaire pour la majorité des marqueurs CD25, CD83, CD86 et CD80 (Figure 21). Nous avons noté une forte variabilité interindividuelle de l'intensité de la réponse à cette concentration de LPS.



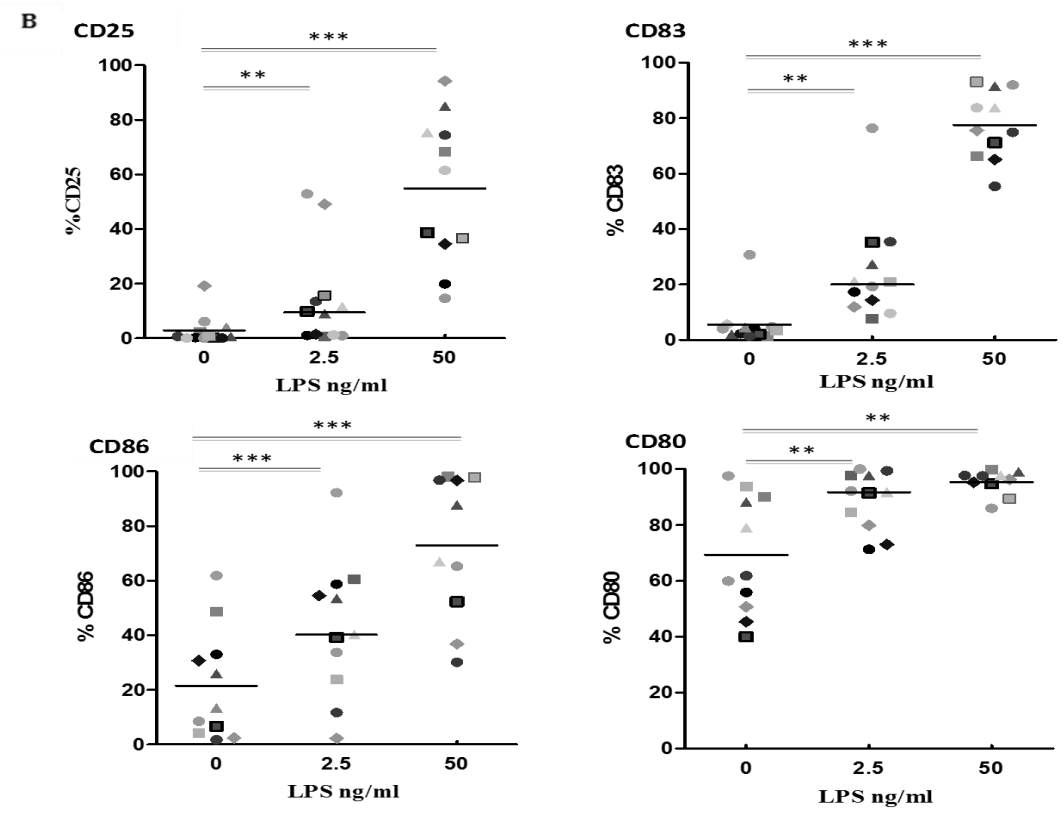


Figure 21 : induction des marqueurs de maturation par différentes concentrations de LPS. Les DC ont été stimulées pendant 48 h par du LPS 2,5 ou 50 ng/ml puis les marqueurs de maturation CD25, CD83, CD86 et CD80 ont été analysés en CMF. Le panel A montre une expérience représentative. Le panel B présente les résultats pour l'ensemble des donneurs (n=11 dernière ligne ou n=12 première ligne), Chaque symbole indique un même donneur et la barre la médiane les données ont été analysées par un test de Wilcoxon.

Résultats 1-5 Une forte concentration en sodium n'induit pas la maturation des DC immatures

Dans un premier temps, nous avons analysé les effets de concentrations élevées de sel sur des DC immatures en l'absence de LPS. Les DC immatures dérivées de monocytes ont été cultivées pendant 48 heures à des concentrations de [NaCl] de 140, 160, 180, et 200 mM. La **figure 22** montre plutôt une absence d'effet significatif du [NaCl] sur l'expression des marqueurs de maturation. Cependant 2 donneurs ont vu l'expression de CD83 augmenter très légèrement en présence de concentrations élevées de sel alors que le CD25 est resté négatif chez ces donneurs.

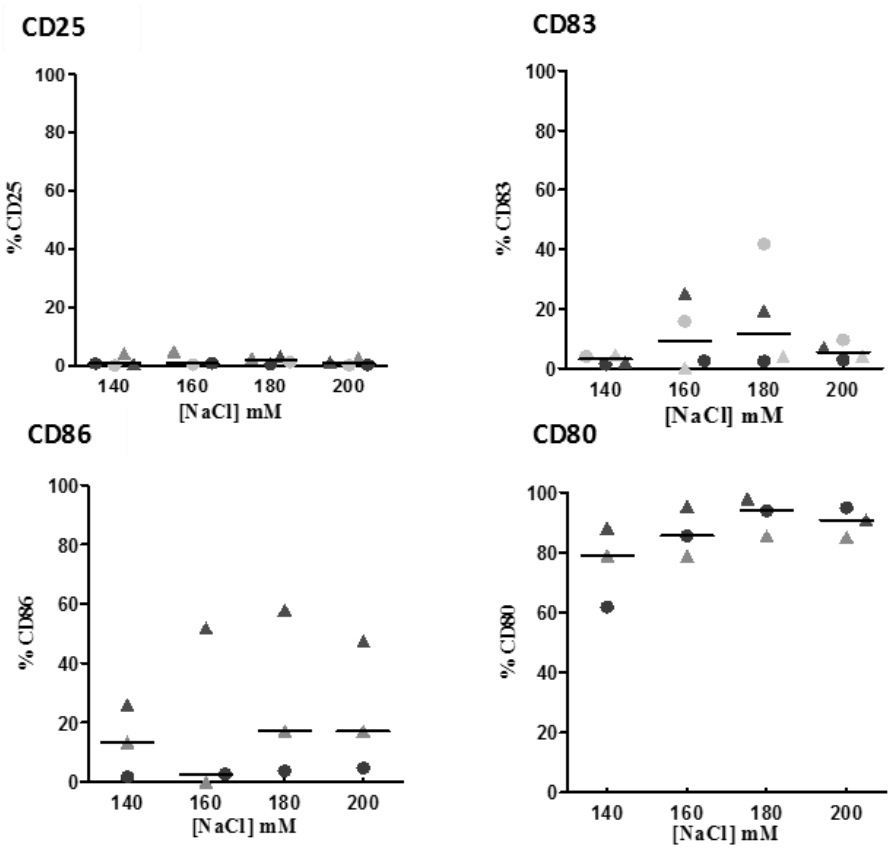


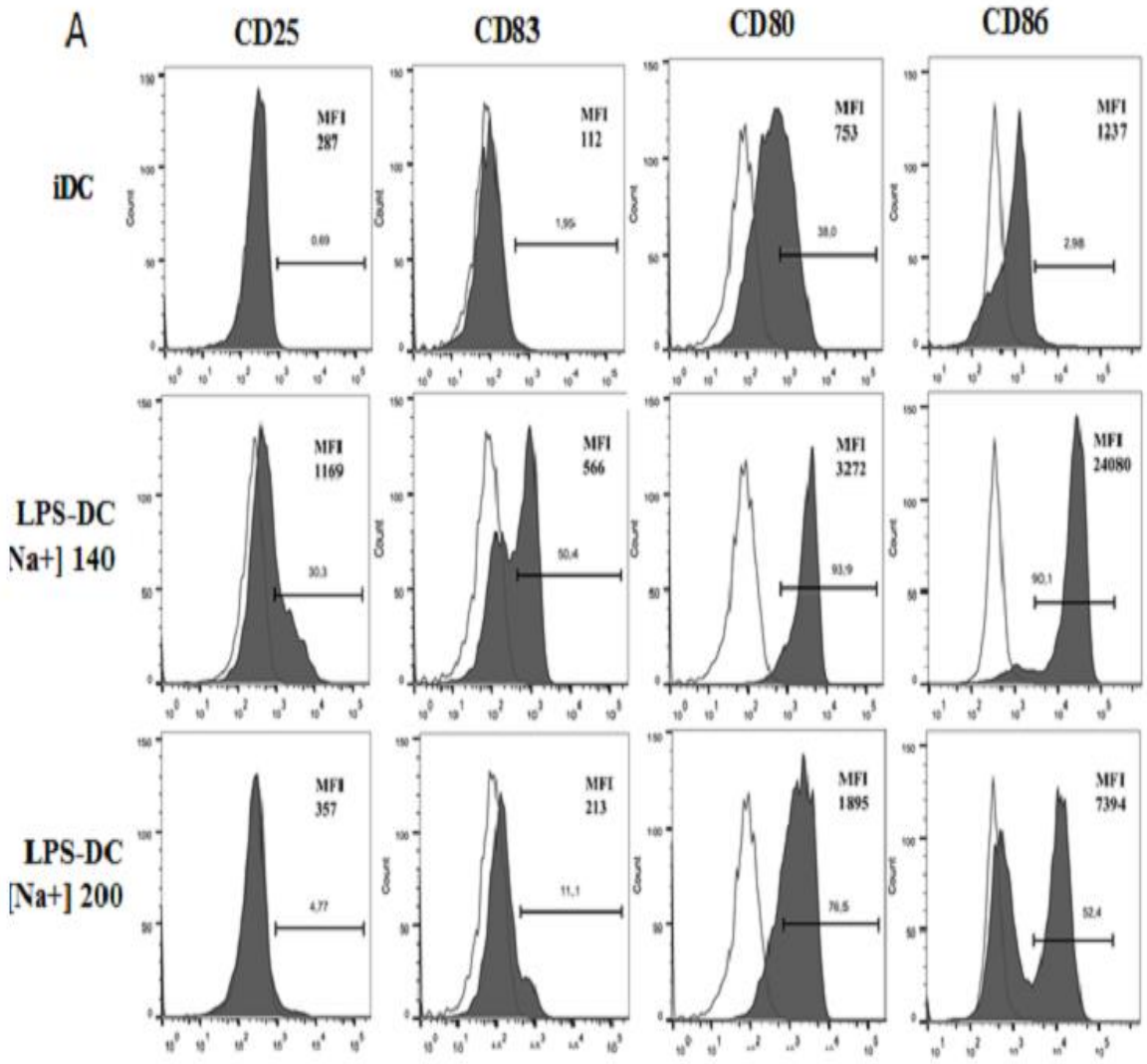
Figure 22 : Des concentrations élevées de sel n'induisaient pas ou très peu l'expression des marqueurs de maturation sur des DC immatures. Les DC immatures ont été cultivées en présence de concentrations croissantes de sel comme indiquée en abscisse et les pourcentages de cellules

positives pour le marqueur indiqué a été analysé en CMF (les barres indiquent la médiane de n=4 ou 3 donneurs).

Résultats 1-6 Une forte concentration en sodium inhibe la maturation des DC traitées par le LPS

Dans les tissus périphériques, les DC sont principalement immatures, caractérisées par une faible expression des molécules co-stimulatrices telles que CD80 CD86 et l'absence de CD25 et CD83 à la surface cellulaire. Après stimulation par LPS, les iDC augmentent l'expression tous ces marqueurs **FIG 23**. Nous avons étudié l'effet de [Na^+] élevé sur l'expression de ces marqueurs, l'augmentation de la concentration en Na^+ n'a pas modifiée l'expression de ces marqueurs à la surface des DC immatures. Alors qu'une stimulation des DC avec des doses sub-optimales de LPS (2,5 ng/ml) pendant 48h à 140 mM de [Na^+] a fortement induit l'expression des marqueurs de maturation CD83, CD25, CD80 et CD86 (**Figure 23 A**).

Comme le montre la **figure 23 B**, une concentration élevée de Na^+ a entraîné une diminution dose-dépendante de l'expression de ces 4 marqueurs. En effet, à 200 mM les MFI (moyenne de fluorescence acquis par cytométrie en flux) de CD25, CD83, CD80, les CD86 étaient significativement diminuées d'environ 55 ± 21,3%, 66 ± 13,7, 63 ± 30 et 60 ± 25% respectivement par rapport au DC traité au LPS à 140 mM [Na^+] ($p < 0,0001$). Ces données ont montré qu'une forte [Na^+] inhibe la maturation induite par le LPS de la DC. En effet, les DC traitées à des concentrations élevées de sel présentent un phénotype intermédiaire entre les cellules dendritiques complètement matures et les cellules dendritiques immatures.


A
CD25
CD83
CD80
CD86
iDC
LPS-DC
Na+] 140
LPS-DC
[Na+] 200
MFI
287
0.69
MFI
112
1,95
MFI
753
38,0
MFI
1237
2,98
MFI
1169
30,3
MFI
566
50,4
MFI
3272
93,9
MFI
24080
90,1
MFI
357
4,77
MFI
213
11,1
MFI
1895
76,5
MFI
7394
52,4
Count

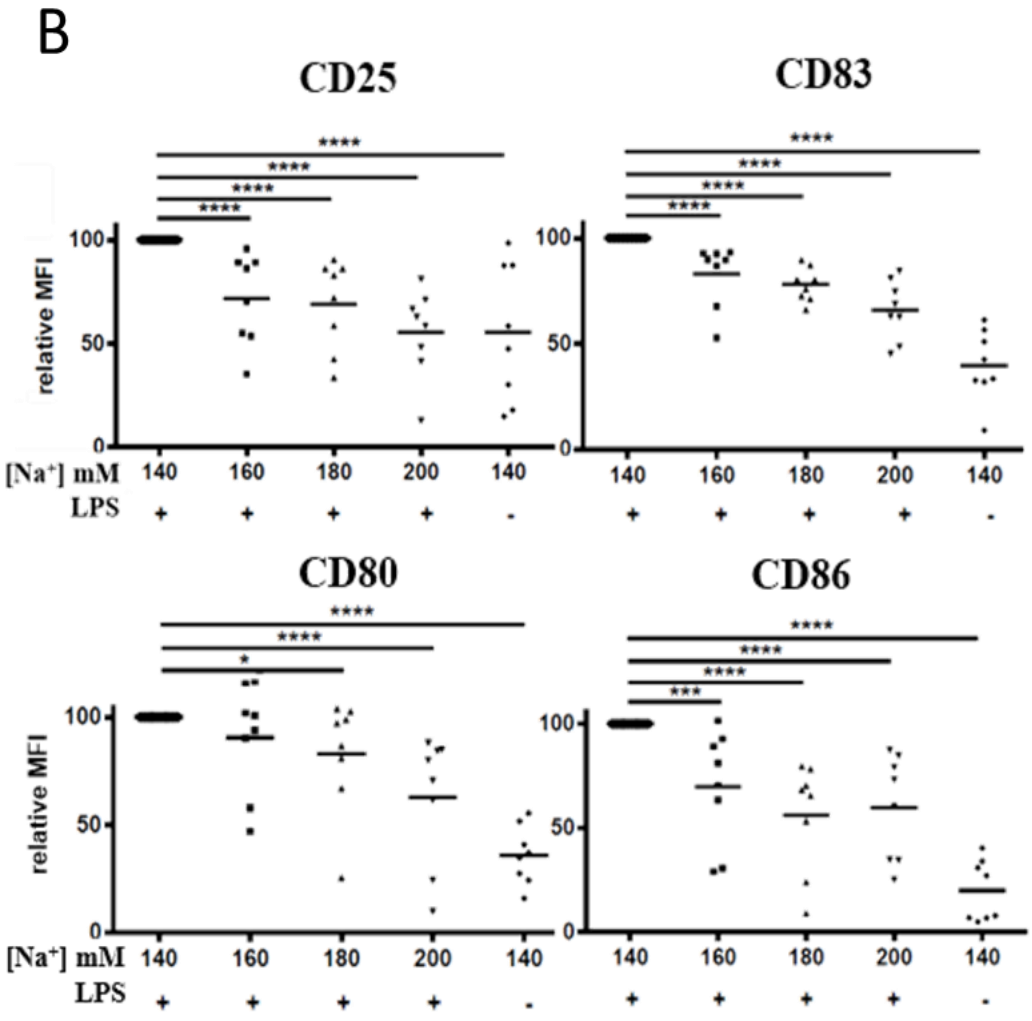


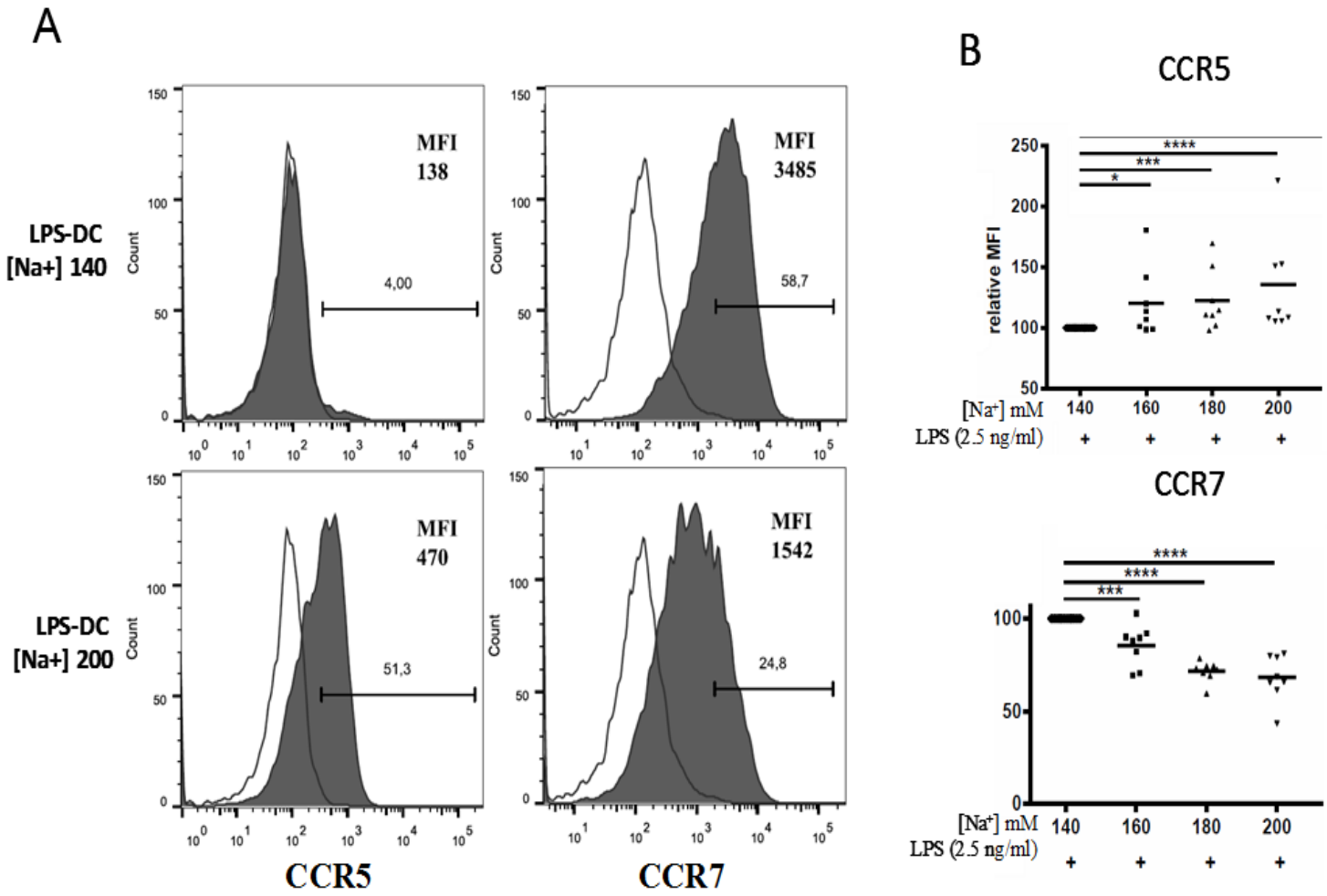
Figure 23: Un taux élevé de [Na^+] inhibe la maturation des DC induite par le LPS. (A) Des DC ou DC immatures traités pendant 48 h avec LPS (2,5 ng/ml) à 140 mM (LPS-DC [Na^+] 140) ou 200 mM Na^+ (LPS-DC [Na^+] 200) ont été colorés pour CD25, CD83, CD80 et CD86, comme indiqué et analysé par cytométrie en flux (les anticorps de contrôle d'isotype sont présentés dans des histogrammes vides et une coloration d'anticorps spécifique dans les histogrammes remplis). (B) Résultats de 8 donneurs indépendants exprimés en MFI pour chaque marqueur par rapport au MFI de LPS-DC à [Na^+] 140 mM.

Partie -2-

Caractérisation fonctionnelle des DC traitées par le NaCl

Résultats 2-1 Une forte concentration en sodium réduit la capacité de migration des DC dépendante de CCL19 et inhibe l'expression de CCR7

La régulation positive du CCR7 par le LPS confère aux DC la possibilité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires grâce aux interactions avec leur ligand CCL19. Pour déterminer si une forte [Na^+] pouvait affecter la capacité de migration des cellules dendritiques, les iDC humains ont été stimulés pendant 48 heures avec LPS 2,5 ng/ml à des concentrations croissantes en Na^+, Nous avons observé à forte [Na^+] une inhibition dose-dépendante de l'expression de CCR7 avec l'augmentation d'expression de CCR5 (**figure 24 A, B**). De plus, nous avons montré, par un test de migration transwell, une inhibition significative de la migration dépendante de CCL19, des DC stimulées par le LPS à 200 mM de [Na^+], (**Figure 24 C**). Ces données suggèrent que le taux élevé de [Na^+] inhibe la migration des DC stimulées par le LPS vers les ganglions lymphatiques.


A
LPS-DC
[Na+] 140
LPS-DC
[Na+] 200
MFI
138
4,00
MFI
3485
58,7
MFI
470
51,3
MFI
1542
24,8
Count
CCR5
CCR7
B
CCR5
relative MFI
[Na+] mM 140 160 180 200
LPS (2.5 ng/ml) + + + +
CCR7
[Na+] mM 140 160 180 200
LPS (2.5 ng/ml) + + + +

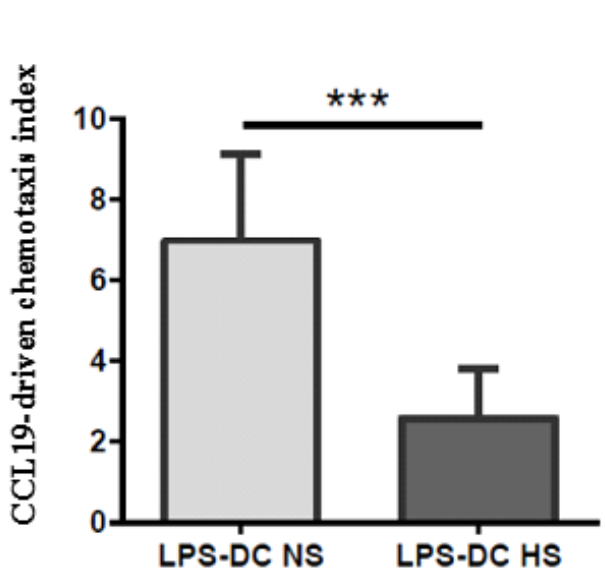

C
CCL19-driven chemotaxis index
***
LPS-DC NS
LPS-DC HS

Figure 24 : Une forte concentration de Na^+ augmente l'expression de CCR5 par les DC traitées au LPS et inhibe la migration de DC induite par CCL19 ainsi que l'expression de CCR7. Les DC immatures ont été traitées avec du LPS pendant 48 h à une augmentation de [Na^+] de 140 mM à 200 mM (comme indiqué) et colorées pour CCR5 et CCR7 (comme indiqué) pour analyse par cytométrie en flux (A). Les DC à 140 mM (LPS-DC [Na^+] 140) ou 200 mM Na^+ (LPS-DC [Na^+] 200) sont présentées. (B) Intensité de fluorescence moyenne (MFI) de CCR5 et CCR7 sur les DC traitées au LPS à [Na^+] (comme indiqué) pour huit donneurs indépendants par rapport aux DC traitées au LPS à 140 mM [Na^+]. (C) La migration de DC entraînée par CCL19 a été mesurée par un kit de test de migration avec des transwells d'inserts de micropores de 8 um. L'indice de chimiotaxie piloté par le CCL19 DC a été calculé selon cette formule: (% de migration induite par le CCL19) / (% de la migration spontanée). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type pour 8 donneurs indépendants (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$). (D) L'intensité de fluorescence moyenne (MFI) des marqueurs indiqués sur les DC traitées au LPS à des concentrations croissantes de Na^+ (comme indiqué) pour huit donneurs indépendants par rapport aux DC traitées au LPS à 140 mM [Na^+] a été analysée par cytométrie en flux. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

Résultats 2-2 Une forte concentration en sodium augmente la capacité d'endocytose des DC traitées par le LPS

Nous avons ensuite analysé l'impact des concentrations de HS sur la capacité endocytaire. Cette capacité est essentielle pour l'absorption d'antigène avant le traitement et constitue donc une propriété fondamentale des DC immatures. Ensuite, lors de la stimulation par LPS, les DC sont connues pour réduire leur capacité endocytaire26. Nous avons étudié les effets de la concentration élevée de Na^+ sur la capacité endocytaire de la DC stimulée par le LPS. Nous avons estimé l'endocytose, en utilisant la quantification de l'absorption de FITC-Dextran dans des cellules individuelles par cytométrie en flux.

Comme prévu, la stimulation de l'iDC par le LPS (50 ng / ml) à des concentrations de sel normales (140 mM [Na^+]) entraînait une diminution de l'absorption de FITC-Dextran de 316 ± 169% par rapport à l'iDC. (Figure 5 D). Alors que nous avons observé une augmentation dose-dépendante de la capacité d'absorption de FITC-Dextran avec une augmentation de [Na^+] (figure 5 D). À noter que les DC stimulées par le LPS cultivées dans 200 mM [Na^+] ont une capacité d'endocytose encore plus élevée que celle du DCI. Ces résultats ont indiqué que le taux élevé de [Na^+] inhibait la régulation à la baisse induite par le LPS de la capacité d'endocytose de la DC.

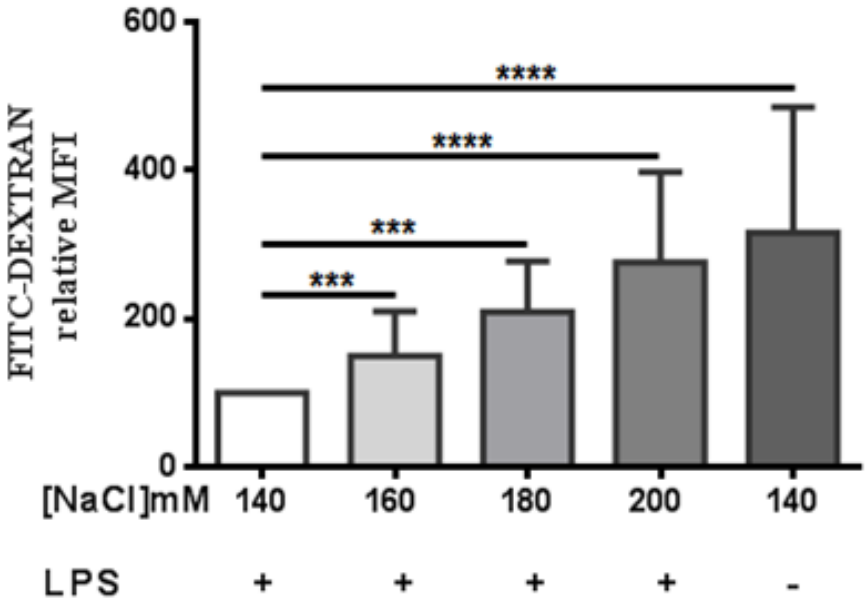


Figure 25 : Une forte concentration en sodium augmente la capacité d'endocytose de FITC-DEXTRAN par les DC traitées par le LPS. Les cellules dendritiques ont été stimulées avec du LPS (50 ng/ml) pendant 48 h à des concentrations croissantes de Na^+ (comme indiqué), puis incubées pendant 1 heure avec du FITC-Dextran et analysées par cytométrie de flux pour mesurer l'absorption de Dextran. MFI de cellules marquées FITC-Dextran sont présentés pour 8 donneurs sains indépendants par rapport à iDC à qui on a donné la valeur 100 pour chaque donneur (les valeurs p ont été calculées par test de Wilcoxon * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

Résultats 2-3 Une forte concentration en sodium diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et augmente la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires par les DC traitées par le LPS

Le type de cytokines produites par les DC est un facteur déterminant de la polarisation de la réponse immunitaire. Les DC stimulées avec LPS (50 ng/ml) à [Na^+] et surnageants en augmentation ont été recueillies après 48 h. Les productions de trois cytokines pro-inflammatoires (IL-12p70, IL-6, IL-23) et deux anti-inflammatoires (IL-10, TGFβ) ont été évaluées par ELISA (Figure 26).

Les concentrations de cytokines étaient très variables entre les individus, par exemple à 140 mM [Na^+], les concentrations d'IL10 se situaient entre 13 et 280 pg/ml et des intervalles similaires ont été observés pour toutes les autres cytokines. Par conséquent, afin de mieux évaluer les effets de l'augmentation de [Na^+] pour chaque donneur, nous avons normalisé les concentrations par rapport à celle de sa valeur à 140 mM [Na^+].

Comme prévu, la stimulation du LPS à 140 mM [Na^+] induit fortement la production d'IL-12 et d'IL-23 et, dans une moindre mesure, celle d'IL-10 par rapport au DC immature (figure 26). À des concentrations de Na^+ supérieures, les sécrétions d'IL-12 et d'IL-23 étaient significativement diminuées à 180 mM et 200 mM de Na^+ alors que celles d'IL-10 et de TGF-β étaient fortement augmentées. À 200 mM [Na^+], les diminutions moyennes de la
sécrétion d'IL12 et d'IL23 étaient respectivement de 40% et 60% alors que les augmentations moyennes d'IL10 et de TGFβ étaient respectivement de 700% et 220% ($p < 0,001$).

Fait intéressant, il y avait une augmentation dose-dépendante du rapport IL10 / IL12 avec une augmentation de [Na^+] chez les 6 donneurs testés figure 26. Ces résultats suggèrent que le taux élevé de [Na^+] fait pencher la balance vers la production d'un environnement anti-inflammatoire autour du DC.

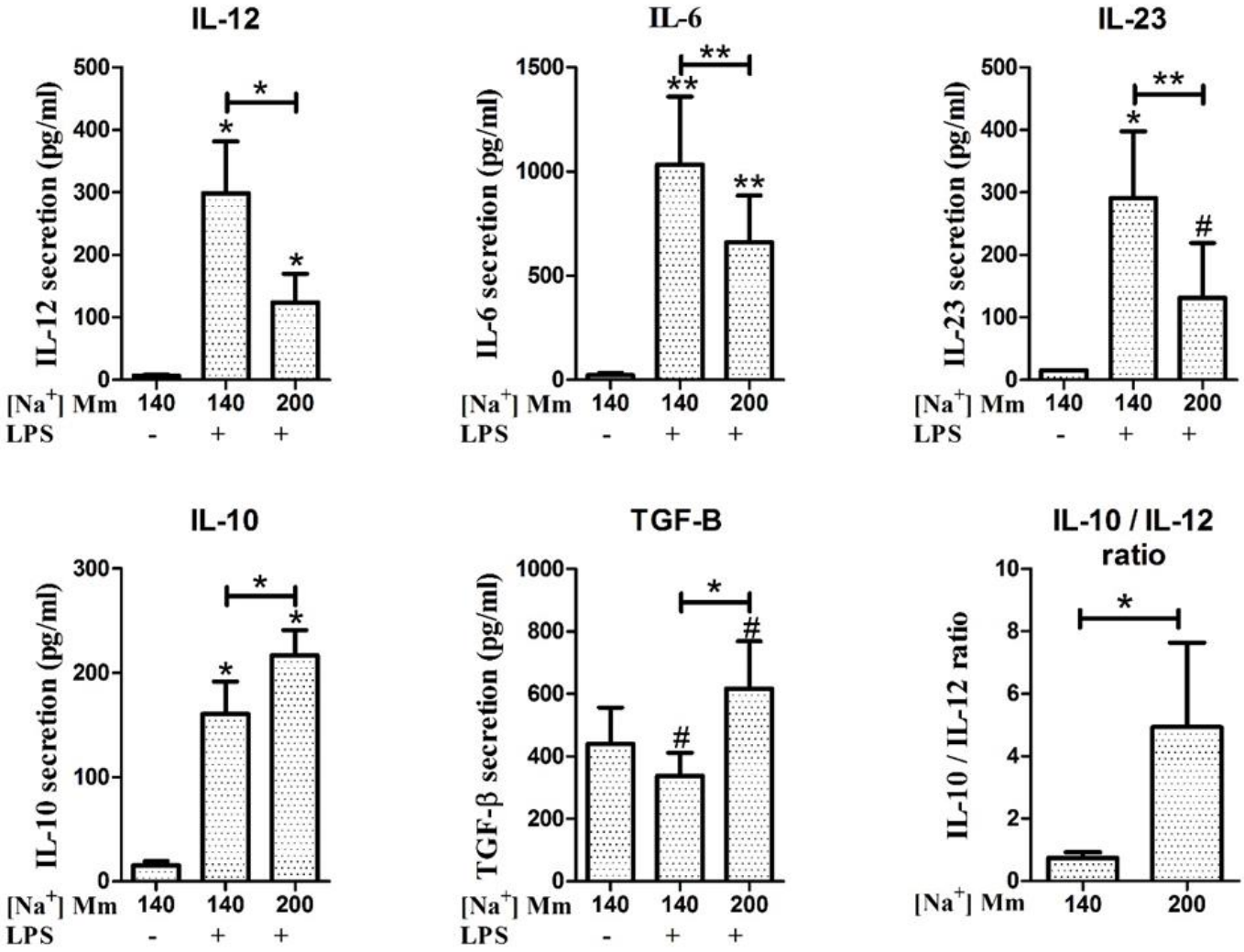


Figure 26: Une forte concentration en sodium diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-12, IL-6, IL-23 et augmente la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF-β par les DC traitées par le LPS. La sécrétion dans les cellules dendritiques induite par le LPS 50 ng/ml sous différentes [Na+], pendant 48 h, d'IL-12 (p70), IL-6, IL-23 de TGFβ, et IL-10 ont été analysés par ELISA. Les concentrations de chaque cytokine ont été exprimées en pg/ml ainsi qu'on a rapporté le ration d'IL-10/IL-12. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type obtenues auprès de 8 donneurs indépendants. Les résultats ont été analysés en utilisant des tests de wilcoxon (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Résultats 2-4 Une forte concentration en sodium inhibe la production de ROS dans les DC traitées par le LPS

Étant donné les mécanismes bien connus reliant la production accrue de ROS à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, nous avons fait l'hypothèse que le milieu surchargé en sodium pouvait moduler la production de ROS dans les DC.

Comme prévu, la stimulation du LPS à 140 mM [Na^+] a déclenché une production significative de ROS par rapport au iDC, mais à 200 mM [Na^+], la production de ROS par les DC traitées au LPS a diminué de manière significative = 0,001, **figure 27**). Cela indiquait qu'un traitement [Na^+] élevé entraînait une forte inhibition de la production de ROS déclenchée par les LPS dans les DC.

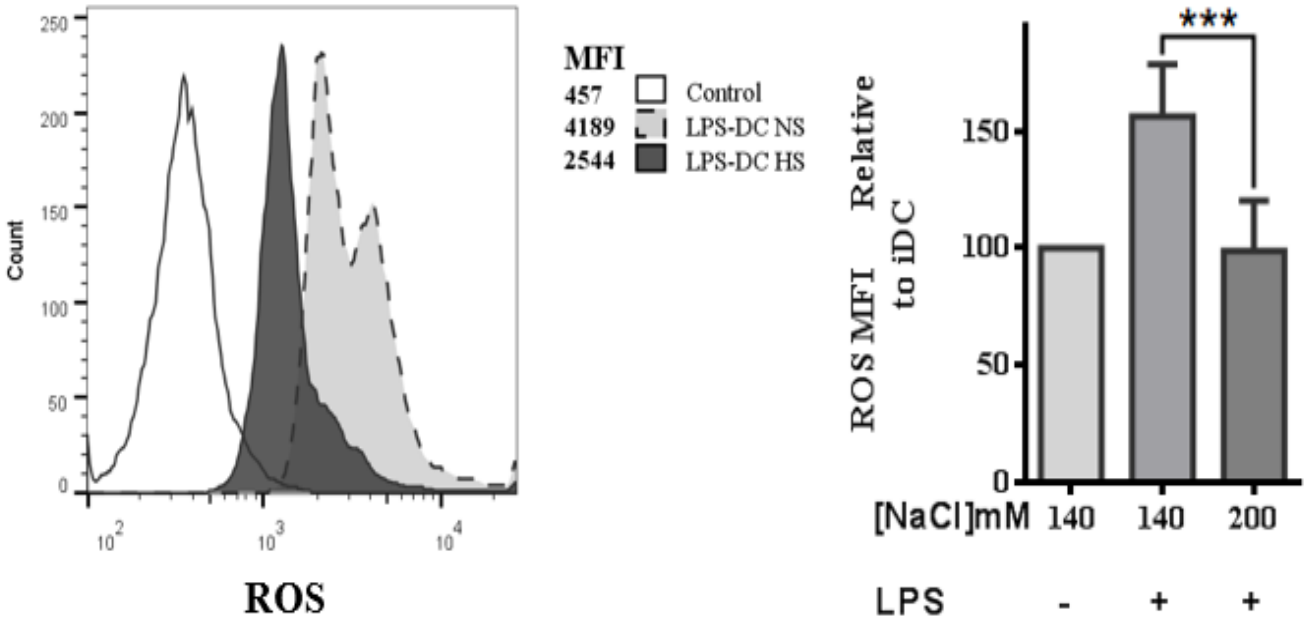


Figure 27: Inhibition de la production de ROS par les DC traitées au LPS à forte de [Na^+]. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été mesurée par cytométrie en flux dans les DC immatures non stimulées et les DC traitées aux LPS à 140 mM ou 200 mM [Na^+]. (gauche) Résultat de 1 expérience représentative montrant la production de ROS dans LPS-DC à 140 ou 200 mM [Na^+]. (droite) Les intensités moyennes de fluorescence ont été enregistrées et les rapports ont été calculés par rapport au DC immature non traité. Les résultats de 8 donneurs indépendants sont présentés sous la forme Means ± S.D.Wilcoxon (*** p <0,0005).

Partie -3-

Polarisation lymphocytaire induite par des DC traitées le NaCl

Résultats 3-1 Une forte concentration en sodium inhibe la capacité allostimulatrice des DC et augmente la production d'IL-10 dans les MLR allogéniques

Compte tenu des résultats précédents indiquant que le [Na^+] inhibait l'activation de la DC induite par le LPS, nous avons cherché à analyser la capacité allostimulatrice des DC traitées par le LPS à forte [Na^+]. Les DC immatures ont été pré-activées avec du LPS (50 ng/ml) à 140 mM ou 200 mM [Na^+] pendant 48 h, puis lavées et incubées avec des lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques purifiés pendant 6 jours dans un milieu complet à 140 mM [Na^+].

Les cellules T CD4 ont ensuite été marquées pour analyser leur expression de CD25 (en tant que marqueur d'activation), Ki67 (en tant que marqueur de prolifération) ainsi que leur production d'IFN-γ par cytométrie en flux. L'IL-10 a été mesurée par ELISA dans les surnageants de MLR à la fin des cultures de 6 jours.

Comme le montre la **figure 28**, les DC pré-activées avec LPS à 200 mM [Na^+] comparées à celles pré-activées à 140 mM [Na^+] ont déclenché une activation significative des lymphocytes T $CD4^+$ évaluée par l'expression de CD25 (inhibition de 66 ± 20,4%). p = 0,001; figure 28 A) et Ki67 (inhibition de 50 ± 14,6% p = 0,001; figure 28 B) ainsi qu'une production significative d'IFN-γ et d'IL-17 plus faible par les cellules T $CD4^+$ (figure 28 C) et une sécrétion IL10 dans les surnageants de MLR (figure 28 D).

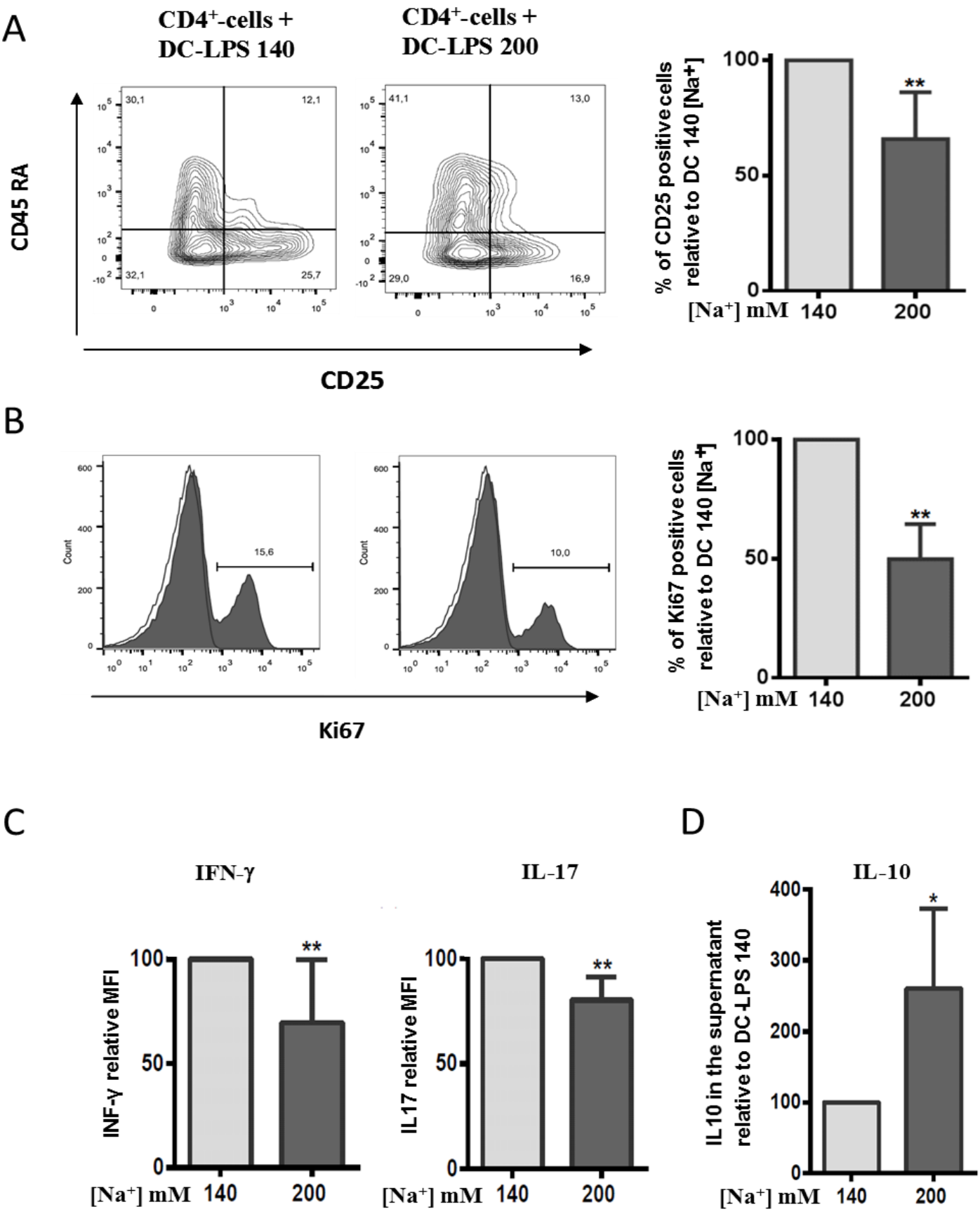

A
CD4+-cells + DC-LPS 140
CD4+-cells + DC-LPS 200
CD45 RA
CD25
30,1
12,1
32,1
25,7
41,1
13,0
29,0
16,9
% of CD25 positive cells relative to DC 140 [Na+]
[Na+] mM 140 200
B
Ki67
15,6
10,0
Count
% of Ki67 positive cells relative to DC 140 [Na+]
C
IFN-γ
IL-17
INF-γ relative MFI
IL17 relative MFI
D
IL-10
IL10 in the supernatant relative to DC-LPS 140

Figure 28: Une forte concentration en sodium inhibe la capacité allostimulatrice des DC et augmente la production d'IL-10 dans les MLR allogéniques. Les iDC ont été pré-activés avec du LPS (50 ng/ml) à 140 mM ou 200 mM [Na^+] pendant 48 h et lavés puis incubés avec des lymphocytes T $CD4^+$ allogéniques purifiés pendant 6 jours dans un milieu à 140 mM [Na^+]. Les cellules T CD4 ont ensuite été déclenchées par cytométrie. Expression de CD25 (A) et Ki67 (B) par les cellules T $CD4^+$. Le pourcentage de cellules positives pour CD25 et Ki67 a été exprimé par rapport à DC 140 [Na^+] (résultats de 6 donneurs indépendants ** p = 0,001). (C) Production d'IFN-by par les lymphocytes T $CD4^+$, telle qu'évaluée par les mesures MFI après coloration intracellulaire et exprimée par rapport au DC 140 [Na^+] (résultats de 6 donneurs indépendants ** p = 0,001). (D) L'IL-10 a été mesurée par ELISA dans les surnageants de MLR à la fin des cultures de 6 jours et exprimée par rapport au DC 140 [Na^+] (résultats de 5 donneurs indépendants ** p = 0,004).

Résultats 3-2 Étude de la capacité suppressive des LT $CD4^+$ issus de co-culture avec des DC traitées par de fortes concentration de sodium

Suite à l'observation de la production d'IL-10 dans les surnageants de co-culture, nous avons débuté une analyse des propriétés immunorégulatrices des LT $CD4^+$ pré-activés par des DC-Na200. Nous avons d'abord étudié la capacité à inhiber une prolifération polyclonale induite par des tétramères anti-CD3/CD28. Pour ce faire des LT $CD4^+$ pré-activés par des DC-Na200 ont été incubés avec des LT $CD4^+$ marqués par le CFSE avec un ratio 1:1 en présence de tétramères anti-CD3/CD28 pendant 6 jours puis l'expression du marqueur CD25 sur les cellules $CD4^+$ CFSE+ a été analysé pour évaluer l'activation des LT CD4 répondeurs.

Les cellules CD4 répondeuses marquées au CFSE et activées de façon polyclonale avec les tétramères anti-CD3/CD28 (graphe de gauche) servent de référence pour évaluer l'éventuelle inhibition de l'activation polyclonale. Nous n'avons eu le temps de réaliser qu'une seule expérience (figure 29). La figure 9 montre que les cellules $CD4^+$ CFSE+ expriment moins de CD25 en présence de LT $CD4^+$ qui ont été pré-activés par des DC-Na200 en comparaison avec l'activation polyclonale de référence (56% *vs* 70%, une expérience). Ce résultat suggère que les LT CD4 pré-activés par des DC-Na200 inhibent l'activation polyclonale de LT $CD4^+$ induite par anti-CD3/CD28.

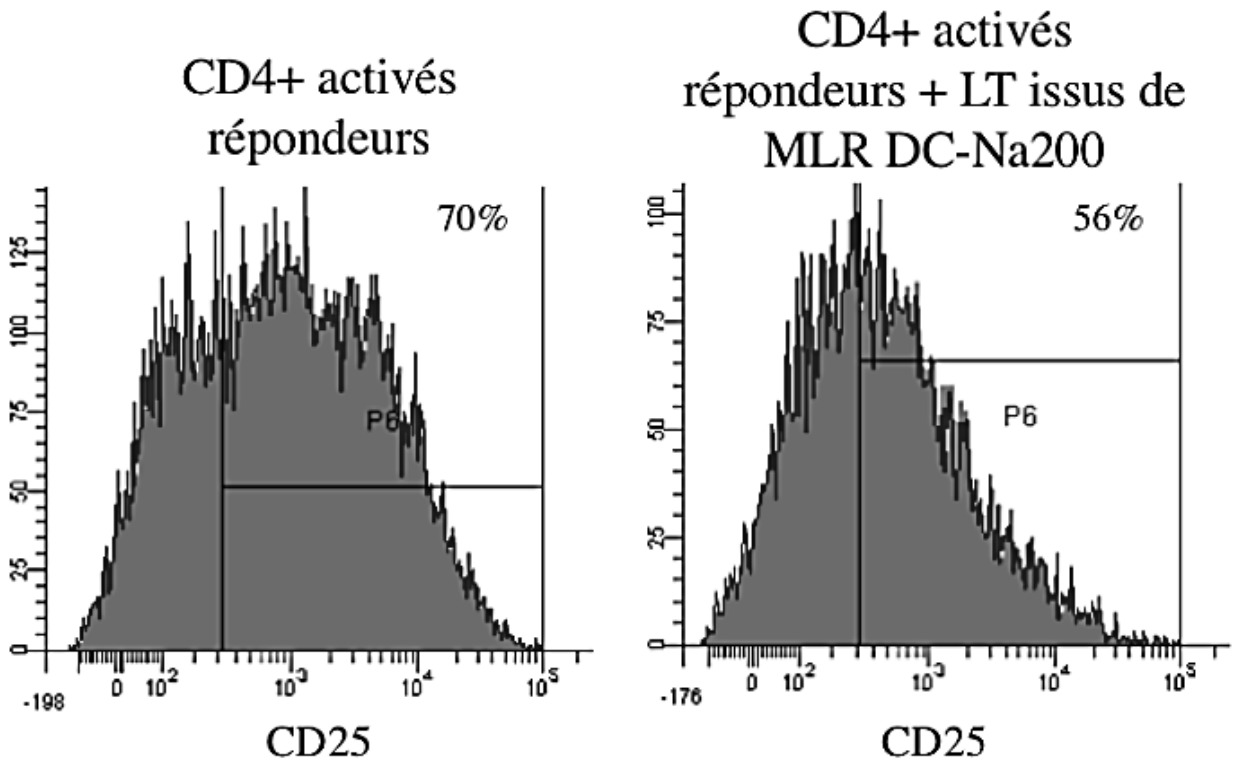


Figure 29 : Les LT CD4+ pré-activés par des DC-Na200 inhibent l'activation polyclonale de LT $CD4^+$ induite par anti -CD3/CD28. Des LT CD4+ pré-activés par des DC-Na200 ont été incubés en présence de LT $CD4^+$ marqués par le CFSE (ration 1:1) et avec des tétramères CD3/CD28 puis l'expression de CD25 sur les CD4 CFSE+ a été analysé (graphe de droite). Les cellules $CD4^+$ répondeuses marquées au CFSE et activées de façon polyclonale avec les tétramères anti-CD3/CD28 sont représentées sur le graphe de gauche.

Résultats 3-3 L'activation polyclonale CD3/CD28 des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs à forte concentration de sodium induit la polarisation vers des lymphocytes Th17 ($CCR4^+$ $CCR6^+$)

Les résultats présentés ci-dessus indiquaient que le NaCl induisait plutôt un profil « anti-inflammatoire » des DC en apparente contradiction avec certains résultats de la littérature rapportant que de fortes concentrations en sel polarisaient des LT $CD4^+$ isolés vers un profil Th17 en présence d'activateurs polyclonaux et un cocktail de cytokines polarisantes.

Notons de façon importante que ces résultats étaient obtenus en absence de cellules dendritiques dans le milieu. A la fin de notre étude, nous avons souhaité confirmer ce résultat de la littérature.

Ainsi nous avons mis en culture des LT $CD4^+$ purifiés pendant 6 jours avec des tétramères anti-CD3/CD28 et sans ajout de cytokines polarisantes. La polarisation vers les profils Th1, Th2 et Th17 a été évaluée avec un marquage des antigènes de surface, CXCR3, CCR4 et CCR6. Après 6 jours de culture en milieu riche en sel (200 mM), le pourcentage de Th17 passe de 22,7% sans ajout de sel à 39,8% à 200 mM NaCl (figure 30A, soit une augmentation de 75%). Les lymphocytes Th2 ont vu quant à eux leur population diminuer de 8% à 1.7% (soit une diminution de 89,67%, figure 30 B) et on a observé une légère diminution de la population TH1. Ce résultat semble confirmer que le NaCl favorise la polarisation vers d'une population LT CCR4+ CCR6+ (TH17) connue par capacité à produire l'IL-17.

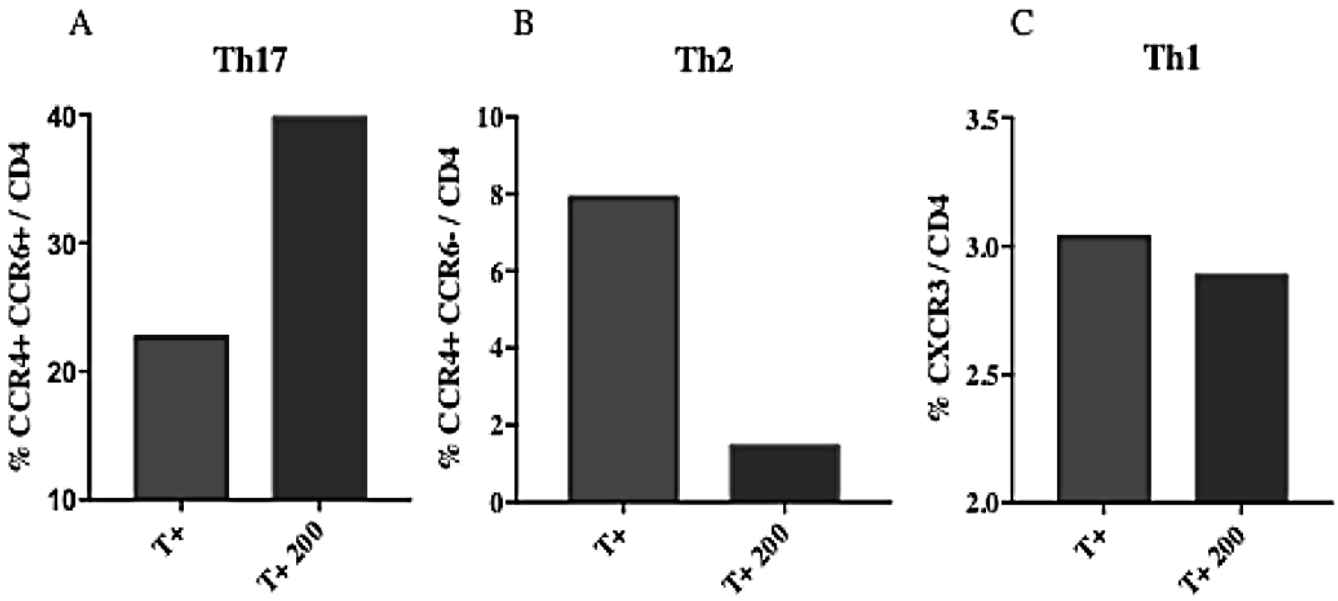


Figure 30 : Le sel favorise l'induction de cellules Th17. Les cellules CD4+ ont été incubées et activées de façon polyclonale grâce à des tétramères anti-CD3/CD28, en présence de fortes concentrations en NaCl (barre rouge T+ 200) ou non (barre bleu T+). A- L'analyse de l'expression des marqueurs CCR4+ et CCR6+ relate la présence de Th17. B- L'expression des marqueurs CCR4+ CCR6- est analysée pour l'orientation Th2. C- Le niveau d'expression du marqueur CXCR3 permet l'analyse de la population Th1. n=1.

Partie -4-

Etude des voies de signalisation induites par les DC traitées par le NaCl

Résultats 4 Une forte concentration en sodium augmente la phosphorylation de SGK1 et ERK1/2 et inhibe celle de la kinase p38 MAPK dans les DC traitées par le LPS

Pour mieux comprendre les voies de signalisations impliquées dans les effets du sel observés dans les résultats ci-dessus, nous avons analysé différentes voies de signalisation. Tout d'abord les voies MAPK, ERK 1/2 et p38. Il a été montré que la phosphorylation de p38 est centrale dans la maturation des DC alors que la phosphorylation d'ERK1/2 est connue pour réguler négativement la maturation des DC[272]. Dans un premier temps, une mise au point de la technique a été effectuée avec des cultures de LPS-DC à différents temps de culture et différentes concentrations de Na+. Plusieurs temps de stimulation ont été également testés 0, 15, 30min et 1h pour ces protéines avec 140 mM ou 200 mM de [Na+] et LPS 2,5 ou 50 ng/ml. Puis on a observé une phosphorylation des protéines p-38 après 15 minutes de culture des DC et à 1 heure pour ERK phosphorylée.

On a aussi étudier la phosphorylation de SGK1(Serum Glucocorticoid kinase1). La forme phosphorylée de SGK1 n'était pas exprimée après 15 min de culture mais à une heure de stimulation avec le LPS. L'effet du sel a été rapporté notamment dans les lymphocytes T entrainant une augmentation de la phosphorylation de SGK1, ainsi nous l'étudiant pour la première fois dans les DC.

Comme le montre la **figure 31**, la culture des DC à 200 mM [Na^+] a entraîné une diminution significative de la phosphorylation de p38 MAPK (- 55 ± 22,7% p = 0,0001) et est associée à une augmentation significative de la phosphorylation de SGK-1 et de ERK (+ 80 ± 39% et +104 ± 27%, p = 0,01 et p = 0,001 respectivement). Ce qui suggère que ces voies sont impliquées dans les effets du sel sur les fonctions immunitaires des DC observés dans les résultats ci-dessus.

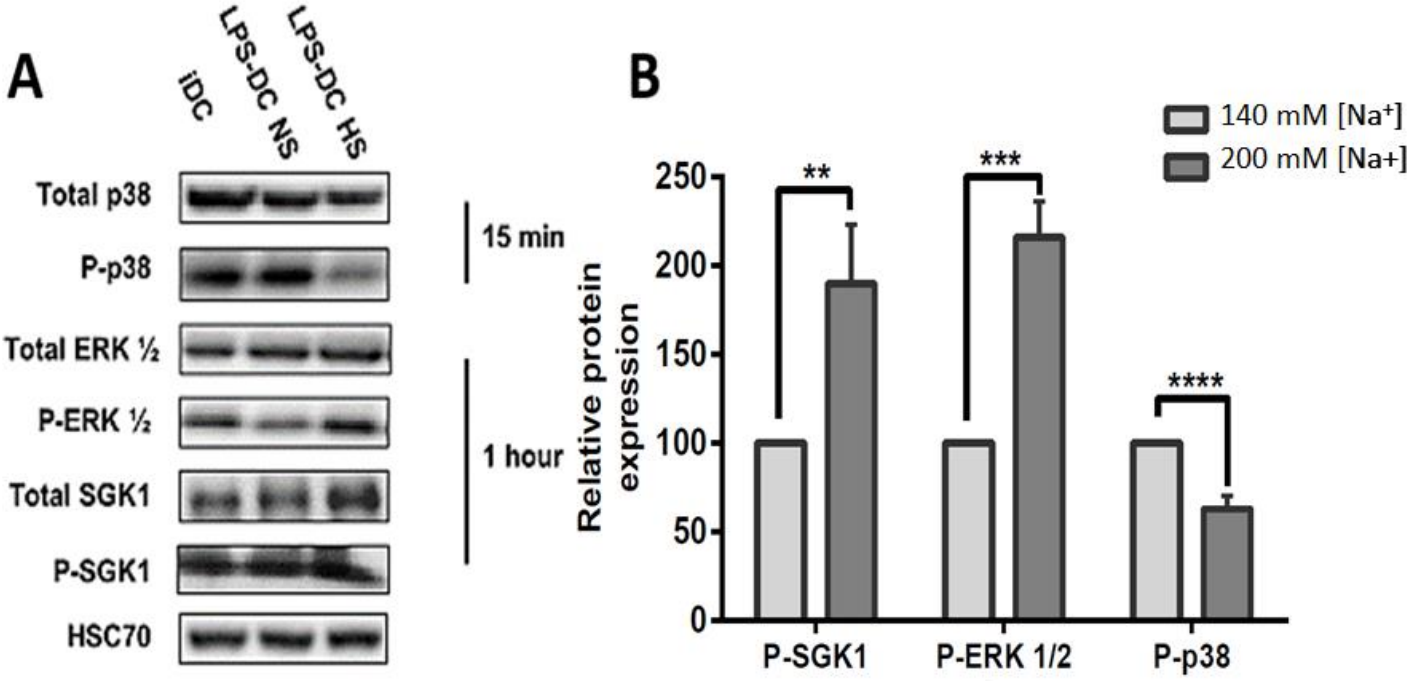


Figure 31: Une forte [Na^+] augmente la phosphorylation de SGK1 et ERK1 / 2 et inhibe celle de p38 MAPK dans les DC. Les DC ont été stimulées avec du LPS (2,5 ng/ml) à 140 mM (LPS-DC NS) ou 200 mM de Na^+ (LPS-DC HS) pendant 15 min et 60 min (comme indiqué) et analysées par une technique de transfert Western afin de étudier les taux de phosphorylation de p38, ERK1/2 et SGK1. La protéine HSC70 a été utilisée comme contrôle de la charge en protéines (A). Les résultats d'un représentant de 8 expériences indépendantes sont présentés. (B) Les taux de phosphorylation de p38, ERK1/2 et SGK1 lors d'une stimulation par LPS à 200 mM et 140 mM [Na^+] ont été quantifiés par rapport à HSC70 et représentés sous la forme d'un rapport de leur contrôle stimulé respectif à 140 mM [Na^+]. La densitométrie a été déterminée par analyse des membranes de transfert Western avec le logiciel Image J. Les résultats de 8 expériences indépendantes sont présentés. Les barres gris clair et gris foncé représentent respectivement le DC traité avec 140 mM [Na^+] ou 200 mM [Na^+] (** p <0,001, *** p <0,0001; **** p <0,00001).

Discussion

Discussion

Un milieu interstitiel hyperosmotique est rencontré dans des conditions physiologiques (médulla rénale) et parfois peut être associé à des pathologies. Depuis longtemps il est bien établi que l'osmolarité physiologique du sang (285–295 mOsm) est maintenue dans une gamme restreinte *via* des mécanismes régulateurs robustes. Cependant dans le rein, le compartiment médullaire est exposé physiologiquement à un gradient physiologique d'osmolarité atteignant des valeurs > 1000 mOsm (médulla interne). De même, l'osmolarité du disque intervertébral et du tissu cartilagineux des articulations varie entre 430 mOsm et 496 mOsm. Ces observations indiquent que les fonctions cellulaires physiologiques peuvent se dérouler dans un milieu hyperosmolaire.

Jusqu'à récemment, le dogme dominant dans la communauté scientifique était qu'une augmentation des apports alimentaires en Na^+ était rapidement excrétée par les reins pour rétablir l'homéostasie normale et maintenir une concentration physiologique à 140 mM en Na^+ dans les principaux milieux liquidiens extracellulaires de l'organisme. Plusieurs études ont remis en cause ce dogme en montrant de nombreux tissus corporels (peau, muscle squelettique, érythrocytes et autres tissus[8,2,6,1,68] peuvent retenir les ions Na^+ atteignant 200 mM de [Na^+] en réponse à des apports alimentaires élevés[14,67,255,256]. Des rapports comprenant une mesure directe de l'osmolarité tissulaire ont démontré une hyperosmolarité physiologique des compartiments tissulaires lymphoïdes, atteignant 330-340 mOsm.

Ces dernières années, des interactions entre l'apport en sodium et la réponse immunitaire ont été mises en évidence[257], et les cellules immunitaires sont récemment devenues des acteurs clés des modèles animaux d'hypertension[258]. Ainsi, à côté de son rôle classique dans l'hypertension et la surcharge volumique, un apport élevé en sel est considéré comme un facteur environnemental clé pouvant affecter le système immunitaire et par conséquent, la sensibilité aux infections et aux maladies inflammatoires ou auto-immunitaires. Plusieurs études ont pointé vers un rôle proinflammatoire[94,91] alors que d'autres sont plutôt en faveur d'effets anti-inflammatoires[202,5]. Ainsi les effets du sel sur

l'immunité font l'objet de débats et sont encore mal compris notamment pour son effet sur les cellules dendritiques humaines.

Dans la présente étude, nous avons analysé *in vitro* les effets de concentrations élevées de Na^+ sur des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains activées par du LPS. Nous avons d'abord montré que des concentrations élevées de sodium (HS) n'affectaient pas significativement la survie des cellules dendritiques jusqu'à 200 mM et que les DC traitées au LPS en présence de fortes concentrations en sel (Na^+ 200 mM) développaient des dendrites très allongées comparées aux conditions à teneur normale (Na^+ 140 mM). Il s'agit d'un trait distinctif ne correspondant pas à la morphologie habituelle des DC déjà décrites[259]. Jusqu'à présent, les modifications morphologiques de la DC humaine induites par le sel n'ont jamais été rapportées.

Ces changements auraient pu suggérer une dédifférenciation des DC vers un phénotype de type « macrophage like » ressemblant les microglies. Notons que Chessa et al.[260] ont rapporté que les DC dérivées de la moelle de souris (BMDC) avaient acquis le marqueur F4.80 lorsqu'elles étaient cultivées dans un milieu enrichi en chlorure de sodium, suggérant un phénotype macrophagique.

Contrairement à Chessa et al., nous avons constaté que les DC en présence de LPS et de fortes concentrations en Na+ conservent leur marqueur CD209 (DC SIGN), et n'acquièrent aucun marqueur classique de macrophage humain tel que IBA-1[261], CD14 ou CD163. Ainsi ces résultats montrent que les DC humaines cultivées dans des conditions de sodium élevées (HS) restent bien des DC, mais leurs changements morphologiques suggéraient qu'elles pourraient avoir développé des propriétés spécifiques liées à des voies de signalisation qui pourraient être mobilisées lors du réarrangement du cytosquelette.

En effet les voies Rho & Rock sont connues pour être très importantes dans la structuration du cytosquelette[262], il a été montré que l'activation de ces voies entrainait la phosphorylation de Erk1/2[263] connu pour jouer un rôle crucial dans la modulation de la réponse immunitaire des DC[264].

Ensuite, nous avons observé, à l'instar de Popovic et al[5], que les DC traitées au LPS dans des conditions HS maintiennent une capacité élevée d'endocytose de l'antigène, caractéristique des DC

immatures. De plus, nous avons montré qu'une forte concentration de Na^+ inhibait la capacité de migration et la chimiotaxie des DC induite par le CCL19.

Ces résultats suggèrent que des concentrations sodiques élevées dans les tissus périphériques pourraient inhiber la capacité de la DC à migrer vers les ganglions lymphatiques et maintenir certaines caractéristiques des DC immatures même en présence de stimulus inflammatoire.

En cohérence avec ces résultats, nous avons constaté que le milieu enrichi en chlorure de sodium inhibait à la fois l'expression des molécules co-stimulatrices sur les DC (comme CD80/86) et leur capacité à activer les cellules T allogéniques. L'analyse de la production de cytokines a indiqué que les DC en condition HS sécrètent de grandes quantités d'IL-10 et de TGFβ et de faibles taux d'IL-12, d'IL-6 et d'IL-23 lors de la stimulation par LPS. Ces résultats sont conformes à certaines études publiées précédemment[260,93] qui ont montré qu'une concentration élevée de Na^+ induisait l'acquisition d'un phénotype macrophagique de type 2 par des DC murines , caractérisées par la production d'un taux élevé d'IL-10 et d'un taux faible d'IL-12[93].

Le faible rapport IL-12/IL-10, le faible niveau d'expression des molécules costimulatrices sont des caractéristiques de DC parfois appelées semi-mature comme on l'observe après des traitements par des agents tels que les glucocorticostéroïdes, vitamine D3, MPA, rapamycine et IL-10[265,266,267,268] . Notons que ces cellules sont aussi parfois douées de capacité à induire des Treg. Des résultats préliminaires de nos travaux semblent indiquer que les cellules dendritiques stimulées dans un milieu enrichi en chlorure de sodium ont acquis une capacité à induire des lymphocytes T aux propriétés régulatrices mais ceci nécessite des travaux complémentaires valider le concept de DC reg induites par des fortes concentrations en Na+.

En concordance avec les résultats ci-dessus, nous avons constaté qu'un milieu riche en sel diminuait la production de ROS dans les MoDC en réponse au LPS[269,270]. Ceci est en contraste avec les résultats de Barbaro et al. qui ont rapporté que le milieu à forte teneur en sel augmentait la production de ROS dans les DC spléniques de souris[203]. Plusieurs différences pourraient expliquer ce contraste: l'espèce, la source des DC et les protocoles expérimentaux étaient différents puisque ces auteurs utilisaient des DC dérivées de rates de souris qu'ils cultivaient directement dans le milieu HS sans activation du TLR4. Il convient de noter que lorsque nous avons cultivé des DC dérivées de monocytes

humains directement dans un milieu enrichi en chlorure de sodium sans activation par le LPS, nous n'avons observé aucun effet promaturant ou proinflammatoire.

De plus, nous avons trouvé que le milieu enrichi en chlorure de sodium inhibe la production d'IL-23 par les DC activés par le LPS. Cela peut sembler paradoxal avec d'autres études montrant qu'un milieu enrichi en Na^+ *in vitro* favorisait les réponses immunitaires pro-inflammatoires Th17 dont la polarisation dépend de la présence d'IL-23[95]. Deux autres études ont montré qu'un milieu enrichi en sel induisait une surpexpression de SGK1 directement dans les LT activés avec des anti CD3 et CD28 et avec des cytokines polarisantes, augmentait l'expression de l'IL23R par les cellules T $CD4^+$ et favorisait la polarisation des cellules Th17 chez la souris[208] et chez l'homme[94].

Comment nos données peuvent-elles être conciliées avec ces études?

La plupart de ces études rapportant des effets pro-inflammatoires du NaCl ont été réalisées chez la souris et parmi celles réalisées chez l'homme, aucune étude n'a analysé les effets de fortes concentrations en Na+ *in vitro* directement sur des DC. L'effet du sel montré *in vitro* augmentant la polarisation vers TH17 était obtenu dans des conditions de cultures en présence de cytokines polarisantes dont l'IL-23 et en absence de DC. Chez l'homme, l'IL-23 est nécessaire au développement du TH17[94] et est principalement produite par les DC elles-mêmes en réponse à l'activation du TLR. Par conséquent, en ajoutant de l'IL-23 exogène, normalement synthétisée par les DC, ces auteurs ne pouvaient pas exclure que le sel puisse inhiber la production d'IL23 par les DC.

De façon intéressante, nous avons montré que des concentrations élevées en sel activent SGK-1 dans les cellules dendritiques humaines, à l'instar de ce qui a été rapporté pour les lymphocytes T $CD4^+$[212]. Cependant, nous avons constaté que cette activation de SGK-1 était associée à un profil plutôt anti-inflammatoire des DC. Nos résultats sont en accord avec plusieurs autres études sur les cellules dendritiques murines qui ont indiqué que l'activation de SGK-1 régulait négativement la maturation des DC en inhibant la voie NFκB[207] et une autre étude a identifié l'effet régulateur négatif de SGK1 sur les cytokines inflammatoires médiées par TLR[216]. Par conséquent, nos résultats, ainsi mettent en évidence une association entre l'activation de SGK1 et le profil anti-inflammatoire des DC humaines.

Enfin il convient de noter que les quelques études *in vivo* rapportant les effets exacerbants du sel sur l'auto-immunité n'impliquaient que des modèles murins d'EAE[91,96,208]. Cependant, ces études peuvent être reconsidérées à la lumière des résultats de Krementsov indiquant qu'un régime riche en sodium exacerbait la pathologie cérébrale mais par une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique sans augmenter les réponses des LTh[271]. Les effets du sel sur les pathologies inflammatoires cérébrales pourraient donc être indépendants d'un effet direct du sel sur les cellules T.

Ainsi, nos résultats suggèrent la possibilité que lors d'une réponse immunitaire *in vivo*, les effets du chlorure de sodium sur les cellules T pourraient être atténués par sa capacité à réguler négativement l'activation des DC. Par conséquent, notre étude combinée avec d'autres indique que les effets du régime alimentaire riche en sel sur la réponse immunitaire sont d'une grande complexité et restent à clarifier, en particulier chez l'homme.

Conclusion & perspectives

Conclusion & perspectives

Ce travail a montrer qu'une forte concentration en sodium inhibe la maturation des DC traitées par le LPS (diminution d'expression de marqueurs de maturation CD80 CD86 CD25 CD83), réduit la capacité de migration des DC dépendante de CCL19 et leur expression de CCR7 tout en augmentant leur capacité d'endocytose. Ces effets sont associés à une diminution de production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS en faveur d'une synthèse accrue de cytokines anti-inflammatoires. De plus, des fortes concentrations de sel inhibent la capacité allostimulatrice des DC traitées par le LPS. Nous avons montré que des fortes concentrations en sel augmentent la phosphorylation de SGK1 et de ERK1 / 2 et inhibent la phosphorylation de p38MAP kinase. Ainsi, nos résultats suggèrent un rôle régulateur du sel sur les DC.

Cet effet régulateur du sel ouvre la perspective pour mener d'autres études, notamment l'implication des DCs traitées par LPS/Sel dans différentes pathologies telle le rejet aigue (transplantation) et l'échappement cellulaire lors du cancer.

Annexes

Annexe 1 : Manuscrit principal issu des travaux de thèse soumis en premier auteur

High sodium concentration modulates human dendritic cell immune functions.

Sally AL-HAJJ*[(1)], Roxane LEMOINE[(1)], Stéphanie CHADET[(1)], Annabelle GOUMARD[(1.2)], Laura LEGAY[(1)], Ellena ROXBURGH[(1)], Audrey HERAUD[(1)], Bertrand CALIPPE[(3)], Nora DELUCE[(1)], Lucille LAMENDOUR[(1)], Yann GALLAIS[(1)], Julien BURLAUD-GAILLARD[(4.5)], Sonia GEORGEAULT[(5)], Damien MINOIS[(1)], Philippe GATAULT[(1.2)], Mathias BÜCHLER[(1.2)], Jean-Michel HALIMI*[(1.2)], Christophe BARON*[(1.2)].

(1) EA4245 Transplantation, Immunology & Inflammation, Tours University, Tours, France.

(2) Nephrology, clinical immunology department, University Hospital Center, Tours, France.

(3) UMR 7292 GICC Groupe Innovation et Ciblage Cellulaire, University of Tours, France.

(4) U1259 Morphogenesis and antigenicity of HIV and hepatitis virus, Tours University, France.

(5) Platform IBISA of electronic microscopy, University Hospital Center, Tours, France.

Corresponding author is Sally Al-Hajj*, Tours University, EA 4245 "Transplantation, Immunology & Inflammation", 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France. Sally.alhajj@gmail.com
Christophe BARON* and Jean-Michel HALIMI* have equally participated to the work.
The authors declare no competing financial interests.
All heathy patient's blood samples used in this study are provided by the French blood Establishment (EFS, Etablissement Français du Sang) under a signed convention N°CA-PLER-2016-004, no ethics approval is required.

ABSTRACT

Recent evidence showed that in response to elevated sodium dietary intakes, many body tissues retain Na^+ ions for long periods to reach concentrations up to 200 mM. Recent studies suggested that the immune system might be the bridge linking high sodium intake to several cardiovascular diseases and cancer progression as well. However, the studies about the effects of sodium on immunity brought about contrasted results. So far the effects of sodium on human dendritic cells (DCs) remain unknown. Considering their central role in the immune response, we tested how sodium chloride-enriched medium influences the immune properties of human DCs. DCs were derived from $CD14^+$ monocytes from healthy donors and then stimulated by LPS, in sodium-enriched medium (from 140 up to 200 mM) and finally analyzed. We found that DCs cultivated in high Na^+ concentrations remain viable and maintain the expression of DC markers up to 200 mM. In response to LPS, their maturation, their chemotaxis toward CCL19, their production of pro-inflammatory cytokines and ROS were inhibited by high [Na^+]. In line with these results, we report that the T-cell allostimulatory capacity of DCs was also inhibited. Finally our data indicate that these effects were mediated through the phosphorylation of SGK1 (serum and glucocorticoid induced kinase-1) and ERK1/2 kinases. Our results raised the possibility that the effects of sodium on T-cells might be counterbalanced by its ability to downregulate DC activation. Therefore the effects of high sodium diet on the immune response might be more complex than previously thought.

Keywords: High sodium concentrations, dendritic cells, immune functions, stimulation, endocytosis, maturation.

ABBREVIATIONS:

Mo-DCs Monocytes-derived Dendritic Cells

DCs Dendritic Cells

EAE Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

HS High Sodium condition

NS Normal Sodium condition

LPS Lipopolysaccharide

ROS Reactive Oxygen Species

ERK1/2 Extracellular Signal-Regulated Kinases

p38 MAPK p38 Mitogen-Activated Protein Kinases

SGK1 Serum and Glucocorticoid induced Kinase-1

MLR Mixed Lymphocytes Reaction

TGF-β Tumor Growth Factor-β

Introduction

Recent evidence suggests that high sodium diet can alter the immune system[1]. Therefore the influence of high sodium concentration on immune cells is under intense investigation. Until recently the prevailing dogma in the scientific community was that increased dietary Na^+ intakes were rapidly excreted by the kidney to restore the normal sodium homeostasis. Several studies have challenged this dogma by showing that indeed many body tissues, (skin, skeletal muscle, erythrocytes and other tissues[2-6]) may retain Na^+ ions to reach concentrations up to 200 mM in response to elevated dietary intakes[7-10]. These last years the interplay between sodium intake and the immune response has been highlighted[11], and recently immune cells have emerged as key players in animal models of hypertension[12]. So the effects of high sodium intake on immunity might be a bridge that links together immunity, hypertension and several cardiovascular diseases. In addition sodium intake has also been reported to play a role in cancer progression by acting not only on tumor cells but also on tumor-infiltrating immune cells[13]. Consequently, a better understanding of how sodium concentrations affect immunity might have consequences in cardiology and oncology. However several studies brought about contrasted results[14]. Some of them found that sodium drives Th17-mediated inflammation[15] while other reported rather anti-inflammatory effects[16]. Of note, the direct effects of sodium on immunity were mostly studied in rodents. The few studies carried out in human concerned either T cells or macrophages[1] but none of them has specifically analyzed dendritic cells (DCs). DCs are powerful antigen-presenting cells divided in two main subtypes, conventional DCs of myeloid origin and plasmacytoid DCs[17]. In response to pathogen-derived or inflammatory signals tissue-resident DCs undergo a process of maturation characterized by a loss of endocytic activity, upregulation of antigen-presenting and costimulatory molecules, production of polarizing cytokines, and capacity to migrate towards

draining lymph nodes to trigger efficient naïve T cell activation [18,19]. The contact between T cells and DCs in lymph nodes, determines the polarization of the immune response towards tolerance or immune activation[20]. Considering this central role of DC in the immune response[21], we tested whether sodium chloride-enriched medium, influences the immune properties of human monocyte-derived DC (Mo-DC).

Materials and Methods

Generation and stimulation of Mo-DC

PBMC were prepared from healthy donor blood samples obtained from Etablissement Français du Sang according to institutional guidelines. Briefly, magnetic bead-sorted $CD14^+$ monocytes were cultured for 6 days in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin (Life Technologies, France), 25 ng/ml human IL-4, 100 ng/ml GM-CSF (Miltenyi Biotec, France) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; GIBCO) as previously described[22]. On day 6, immature DCs were washed and re-suspended in medium with IL-4 and GM-CSF and LPS (Sigma-Aldrich) for 2 days, in sodium chloride-enriched medium (from 140 mM [Na^+] up to 200 Mm [Na^+]) and finally used for subsequent experiments.

Determination of Cell viability and surface staining of DCs

Cell viability was assessed using the AnnexinV/propidium iodide kit (BD Biosciences) according to manufacturer's instructions and analyzed by flow cytometry (FACSCanto II, BD Biosciences, Germany) with the DIVA (Becton Dickinson) or FlowJo softwares (Tree Star). DC surface staining was analyzed by flow cytometry using the following fluorophore-conjugated monoclonal antibodies: CD83-FITC (clone HB15e), CD25-APC (clone M-A251), CD80-PE (clone B7), CD86-

PE-Cy5 (clone 2331), CCR7-PE (clone 150503), CD163-PE (clone GHI/61) from BD Biosciences, CD14-PE (clone RMO52), CD209-PE (clone AZND1) from Beckman Coulter**,** IBA-1 further conjugated to Alexa Fluor 488 (Wako chemicals USA) and their respective isotypes controls.

Scanning electron microscopy (SEM)

DCs were placed in a 24-well plate (Corning) bottomed with glass slides coated with poly-l-lysine (Sigma-Aldrich). Then DCs were fixed with 1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer; pH 7.4, for 2h at room temperature (RT). DCs were then post-fixed with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences, USA) at RT for 1h, dehydrated in graded ethanol, dried using HMDS (hexamethyldisilazane) and coated by gold-palladium sputtering. The samples were finally photographed and the spreading cell area was calculated by Zeiss Ultra Plus electron microscope at 2 kV (Carl Zeiss, Germany).

Confocal microscopy

DCs were seeded for 48h in 8-well LabTek II CC2 chamber slide (Thermofisher) at 37°C in an atmosphere of 5% CO2. and then fixed in 4% PFA for 15 minutes, permeabilized with 0.1% Triton×100 for 10 min. Nonspecific binding was blocked by 10% FCS for 20 min followed by staining for F-actin (Alexa Fluor 555-conjugated phalloidin) combined with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear counterstaining. Confocal images were generated using an inverted Leica confocal laser scanning microscope TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Germany).

FITC-DEXTRAN uptake

Stimulated DC were incubated with FITC-Dextran (0.1 mg/ ml) from Sigma-Aldrich either at 4°C (internalization control) or at 37°C for 1 hour. Then, DC were washed twice with a cold buffer containing 5% FCS in PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco) and analyzed with a FACS Canto^{TM} flow cytometer.

In vitro Migration Assay

For the migration assays, transwell inserts (Corning) with pores of 8 µm diameter were placed in a 24-well cell culture plate containing cell culture medium with or without CCL19 (500 ng/ml; Peprotech, UK) in the lower chamber. The upper chambers were filled with medium containing immature or LPS-treated DCs ($1.5x10^6$ cells/ml) at different [Na+]. The number of migrated DCs in the lower compartment were counted by flow cytometry after incubation for 4 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO2.

Cytokine release measurements

DCs were stimulated with LPS (50 ng/ml) at increasing [Na^+] and supernatants were collected after 48 h and stored at -20°C until analyzed for cytokines production. Secretions of IL-12p70, IL-10, IL-23 and TGF-β (Thermofisher) of cultured DC were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions.

Reactive Oxygen Species Production

Total ROS (Reactive Oxygen Species) level in live, unfixed cells were measured by a total ROS kit recording to the manufacturer's instructions (Thermofisher) and analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensities were used to compare the production of ROS.

Western Blotting

iDCs were stimulated during 15 min or 1 h at a density of 1.10^6 Cells/ml, then they were washed in cold PBS, lysed at 4°C overnight with a lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 1 mM CaCl2, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate, 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich). Cleared lysates were subjected to western blot analysis for the

following protein HSC-70, p38 MAP Kinase, Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), p44/42 MAPK (Erk1/2) and Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), according to the manufacturer's instructions (Cell Signaling).

Mixed Lymphocyte Reaction

$CD4^+$ T cells of healthy blood donors were first isolated from PBMC fraction by a positive selection using anti-CD4-labeled magnetic beads, (Miltenyi Biotec, France). The purity of CD4 isolated population was evaluated around >95%, by flow cytometer (CD4-FITC, clone 13B8.2, Beckman Coulter). We then carried out MLR of previously treated DC with allogenic $CD4^+$ T lymphocytes at a ratio of 1:3 in complete medium. At day 6 of culture, supernatants were collected and stored at -20°C until ELISA tests. Expression of CD25 activation marker (clone HB15e) as well as proliferation by Ki67 staining (clone B56) from BD Biosciences were analyzed on T cells cocultured with DC by flow cytometry. Intracellular cytokine's staining of T cells (IFN-γ : clone B27 and IL-17A : clone N-49-653) from BD Biosciences, were assessed after 4 hours stimulation with 50ng/ml Phorbol-Myristate-Acetate (PMA; Sigma-Aldrich) and 750ng/ml Ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of Golgi Stop (BD Biosciences).

Statistical analysis

Analyses were performed with Prism software (GraphPad Software, La Jolla, Calif). Comparison of quantitative parameters were analyzed with Wilcoxon and Mann-Whitney U tests, qualitative parameters by Chi^2 or Fisher test as appropriate. Viability was assessed using Friedman ANOVA test.

Results

High Na^+ concentrations do not significantly alter DC viability up to 200 mM

Immature Mo-DCs were incubated with LPS (2.5 ng/ml) at 140, 160, 180 and 200 mM [Na^+] for 48 hours. Cell viability, as assessed by staining with annexin-V/propidium iodide was not significantly affected by increasing Na^+ concentrations up to 200 mM (**Fig. 1**). Of note at 240 mM DC viability sharply decreased to attain 5% (data not shown). Therefore, in all subsequent studies, we used 200 mM Na^+ for the highest sodium (HS) concentration in comparison to 140 mM Na^+ that was considered as normal sodium (NS) condition.

Increasing Na^+ concentrations stretch the cytoskeleton of LPS-treated DC

We used both scanning electron and immunofluorescence confocal microscopy in order to visualize the morphologic aspect of LPS-treated DCs treated with increasing [Na^+]. The EM analysis of LPS-treated DCs at 140 mM [Na^+] (**Fig. 2A a**) showed a conventional aspect of mature dendritic cells with large cytosol and dendrite extensions whereas iDCs had short extensions similar to that previously published[22]. Interestingly at HS concentration (200mM) DCs developed a much more elongated cytoskeleton (**Fig. 2A b**). The mean lengths of 30 cells dendrites were 22.6±11 µm versus 41.9±20 µm at 140 versus 200 mM [Na^+] respectively ($p<0.0001$). Analysis of Actin staining by confocal microscopy confirmed this result (**Fig. 2A c,d**).

iDCs incubated with LPS in High Na^+ concentrations maintain the expression of DC markers and do not acquire macrophage markers.

Circulating monocytes have the potential to transform into various other cell types such as macrophages, dendritic cells, liver Kupffer cells or even microglia in the central nervous system[23]. We explored the possibility that HS conditions may reprogram the differentiation of monocytes into macrophages instead of dendritic cells as suggested by the modifications of the cellular shape We found that under high [Na^+] iDC activated with LPS expressed CD209 but neither IBA-1[24] nor CD14 nor CD163 (specific markers of macrophages). This indicated that at HS concentrations DCs characteristics were maintained and were not transdifferentiated into macrophages (**Fig. 3**).

High [Na^+] inhibits the LPS-induced maturation of DC

In peripheral tissues DC are mainly immature, characterized by low expression of co-stimulatory molecules such as CD80 CD86 and absence of CD25 and CD83 at the cell surface. After LPS stimulation, iDCs upregulate all of these markers. We studied the effect of high [Na^+] on the expression of these DC maturation markers. iDC cultivated at 140 mM [Na^+] strongly upregulated CD83, CD25, CD80 and CD86 upon stimulation with 2.5 ng/ml of LPS (**Fig. 4A**). As shown in the **Fig. 4B**, increasing the concentrations of Na^+ resulted in a dose-dependent decrease in the expression of these four markers. Finally, at 200 mM MFI of CD25, CD83, CD80, CD86 were significantly decreased by -55±21.3%, -66±13.7%, -63±30% and -60±25% respectively as compared to 140mM [Na^+] ($p<0.0001$). These data together indicated that increasing [Na^+] inhibited LPS-induced maturation of DC. Indeed, HS LPS-treated DC had an intermediate phenotype between fully mature DC and immature DC.

High [Na^+] reduces DC chemotaxis toward CCL19 and inhibits the LPS-induced loss of endocytosis ability of DC.

Upregulation of CCR7 by LPS endows the DCs with the ability to migrate toward secondary lymphoid organs through CCL19 interactions[25]. To determine whether increasing [Na^+] might affect dendritic cell migration capacity, human iDC were stimulated for 48 hours with LPS 2,5 ng/ml at increasing Na^+ concentrations, then CCR5 and CCR7 expression was analyzed as well as CCL19-driven chemotaxis. We observed a dose dependent inhibition of CCR7 expression with increasing [Na^+] (**Fig. 5A,B**). Furthermore, 200 mM [Na^+] inhibited CCL19-driven migration of LPS-stimulated DCs as assessed by transwell migration assay (**Fig. 5C**). These data suggested that high [Na^+] inhibited LPS-stimulated DC migration toward lymph nodes.

In addition, upon LPS-stimulation, DCs are known to reduce their endocytic ability[26]. Thus, we estimated the effects of high [Na^+] on endocytic capacity of LPS-stimulated DC, using FITC-Dextran uptake quantification in single cells by flow cytometry. As expected, LPS stimulation of DC resulted in a 3-fold downregulation of FITC-Dextran MFI as compared to iDC (**Fig. 5D**). Whereas, we observed a dose-dependent increase in the dextran-FITC uptake capacity with increasing [Na+] (**Fig. 5D**). These results indicated that high [Na^+] inhibited the LPS-induced downregulation of endocytosis by DCs.

High [Na^+] promotes an anti-inflammatory cytokine profile.

The cytokines produced by DCs are a key determinant of immune response polarization. As expected, LPS stimulation at 140mM [Na^+] induced a high production of IL-12, IL-6 and IL-23 and to a lower extent of IL-10 as compared to iDC (**Fig. 6A**). At 200mM as compared to 140 mM [Na^+], the secretion of IL-12, IL-6 and IL-23 significantly diminished (298.4±82 vs 124±45,

1032±327 vs 660±222 and 290±107 vs 131±87, pg/ml respectively) whereas that of IL-10 and TGF-β strongly increased (160.7±30.8 vs 217±24 and 339±73 vs 617±150, pg/ml respectively). Interestingly, there was a dose-dependent increase in the IL-10/IL-12 ratio with increased [Na^+]. These findings suggested that high [Na^+] tipped the balance toward the production of an anti-inflammatory environment around the DC.

High [Na^+] inhibits LPS-induced ROS production in DCs.

Given the well-known mechanisms linking increased ROS production to pro-inflammatory cytokine synthesis[27], we hypothesized that sodium overloaded medium may modulate ROS production within DC. As expected LPS stimulation at 140 mM [Na^+] resulted in a significant ROS production as compared to iDC : at 200 mM [Na^+] the production of ROS by LPS-treated DC significantly decreased down to the baseline level of iDC ($p=0.001$, **Fig. 6B**). This indicated that high [Na^+] treatment resulted in a strong inhibition of LPS-triggered ROS production in DC.

High [Na^+] increases the phosphorylation of SGK1 and ERK1/2 and inhibits that of p38MAP kinase within LPS-stimulated DCs.

It has been shown that ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases) phosphorylation negatively regulates whereas that of p38 MAPK (p38 Mitogen-Activated Protein Kinases) positively regulates the phenotypic and functional maturation of Mo-DC[28]. To gain a deeper insight into the mechanisms involved in the effects of HS concentrations, DCs were stimulated with LPS (2.5 ng/ml) at 140 mM or 200 mM [Na^+] for 15 min and 60 min (**Fig. 7**) and cell lysates were analyzed by western blot for p38MAPK, ERK1/2 and SGK-1 and for their respective phosphorylated forms. The phosphorylation rates of p38, ERK1/2 and SGK1 upon LPS stimulation at 140 mM and 200 mM [Na^+] were quantified relative to HSC70 and represented as a ratio of their

respective stimulated control at 140 mM [Na^+]. As shown in **Fig. 7**, cultivating DC at 200mM [Na^+] resulted in a strong phosphorylation increase of both SGK-1 and ERK (+80±39% and +111±27%, p=0.01 and p=0.001, respectively) and a significant phosphorylation decrease of P38MAPK (-45±12.7%, p=0.0001).

High [Na^+] inhibits T-cells allostimulatory capacity of DC and increases IL-10 production in allogeneic MLR.

Given the previous results, we sought to analyze the T-cell allostimulatory capacity of DC according to [Na^+]. iDC were pre-activated with LPS (50ng/ml) at either 140 mM or 200 mM [Na^+] for 48 h and then washed and incubated with purified allogeneic $CD4^+$ T-cells for 6 days in complete medium at 140 mM [Na^+]. $CD4^+$ T-cells were then gated by cytometry to analyze CD25 (activation marker), CD45RA (naive T-cell marker), Ki67 (proliferation marker) expressions and IFN-γ and IL-17 productions. IL-10 was measured by ELISA in MLR supernatants at the end of the 6-day cultures. As a result, HS-LPS pre-activated DCs compared to NS-LPS pre-activated DCs triggered a significant lower $CD4^+$ T-cell activation since the inhibition of CD25 (-66±20.4 % p=0.001; **Fig. 8A**) and Ki6 (-50±14.6 % p=0.001; **Fig. 8B**) expression, as well as a significant lower IFN-γ and IL-17 productions by $CD4^+$ T-cells (**Fig. 8C**) and a significant higher secretion of IL-10 within MLR supernatants (**Fig. 8D**). Thus, these results suggest that sodium-enriched medium reprogram DCs toward a rather anti- inflammatory profile.

Discussion

In the current study we analyzed the effects of high Na^+ concentrations on LPS-activated human monocyte-derived DCs. We first showed that HS concentrations did not affect DC survival up to 200mM. We showed that LPS-treated DCs at 200mM Na^+ developed elongated dendrites as compared to LPS-DC in 140mM Na^+. This is a distinctive feature corresponding neither to mature nor immature DC nor semi mature DCs[22]. To our knowledge, human DC morphological changes induced by salt have never been reported before. These morphological changes may suggest a switch towards a macrophage-like phenotype as reported by Chessa *et al.*[16] for mouse bone marrow-derived DC. In contrast we found that HS LPS-treated DCs kept the DC marker CD209 and did not acquire any classical human macrophage markers such as IBA-1[24], CD14 or CD163. Our results suggested that human DC cultivated in HS conditions remained bona fide DC but their distinctive morphological changes may indicate specific properties. Next, we showed that LPS-treated DC in HS conditions kept a high antigen uptake capacity as previously reported by Popovic et al[29]. In line with this result we showed that high Na^+ inhibited the CCL19-driven chemotaxis ability of DC. Our findings may suggest that HS concentrations in peripheral tissues may inhibit the ability of DC to migrate towards lymph nodes. Furthermore, we found that HS medium inhibited the expression of costimulatory molecules and the ability to activate allogeneic T cells. All of these results are consistent and suggest that HS diet may reduce the ability to mount an efficient antigen-specific immune response. In line with this we found that HS-treated DC secreted high amounts of IL-10 and TGF-β and low levels of IL-12 and IL-23 upon LPS stimulation. These results are in accordance with previous published studies[1613] showing that high Na^+ induced a shift of DC toward an M2 like phenotype[30]. The shift of the IL-12/IL-10 balance toward IL-10, the low level of expression of costimulatory molecules are characteristics of regulatory DCs [31-34].

ROS production is a hallmark of inflammatory DC and is highly induced by LPS[35,36]. Consistently with our results, we found that HS medium decreased the ROS production in monocyte-derived DC in response to LPS. This is in contrast with the results of Barbaro *et al.*[37] who reported that HS medium increased the production of ROS in mouse splenic DCs. Several differences might explain this contrast: the specie, the source of DCs and experimental protocols were different since these authors used mouse splenic-derived DC that they directly cultivated in HS medium without activation of TLR. Of note when we cultivated human monocyte-derived DC directly in HS medium without LPS activation, we did not observe any effect (data not shown). Next we found that HS medium inhibited the production of IL-23 by LPS-activated DCs. This is in sharp contrast to other studies showing that HS diet favors proinflammatory Th17 immune responses[15,38]. How our data can be reconciled with these studies? Most of these studies reporting proinflammatory effects of NaCl were carried out in mice. Among those conducted in human none reported proinflammatory effects directly on DCs. A study by Wu *et al.* in mice showed that HS induced upregulation of SGK1, increased IL-23R expression $CD4^+$ T-cells and enhance pathogenic Th17 cell differentiation[39]. In line with this study, Kleinewietfeld *et al.* reported that HS human polarized $CD4^+$T-cells toward inflammatory TH17 through SGK1 activation within $CD4^+$T-Cells[38]. At a first glance our results may appear in sharp contrast with these 2 studies since we report that HS concentrations increased the production of IL10, decreased that of IL23 by DC and reduced both their T-cell allostimulatory capacity and TH17-polarizing ability. Several points must be stressed: firstly, none of them used DCs as APCs, and more importantly they directly prepolarized T helper cells by adding a cocktail of TH17 polarizing cytokines including IL-23 to culture medium. In human, IL-23 is required for the development of TH17 [40] and is primarily produced by DCs themselves in response to TLR activation. Therefore by adding exogenous IL-23, normally synthesized by the DCs, these authors refrain from seeing the potential regulatory effects of NaCl

on these cells. Importantly, we found that HS concentrations activated SGK-1 within human dendritic cells as well, in line with what has been reported by others for $CD4^{+}$T-cells[38,39]. However, we found that this activation of SGK-1 was associated with a rather anti-inflammatory profile in DC. Our results are in accordance with several other studies which reported that SGK-1 activation negatively regulated DC maturation and NFκB activation in mouse DCs[41] and identified the negative regulatory effect of SGK1 on TLR-mediated inflammatory cytokine productions in human monocytes[42]. Therefore, our findings along with others support an anti-inflammatory function of SGK1 in human DC. Of note most of the *in vivo* studies reporting the exacerbating effects of high sodium on autoimmunity came from mouse models of EAE[38,43]. However these studies must be analyzed in the light of the Krementsov's results reporting that HS diet did not augment Th17 or Th1 responses, but did exacerbate brain pathology through an increase in blood-brain barrier permeability[44]. Our results raised the possibility that during an *in vivo* immune response, the effects of NaCl on T cells might be blunted by its ability to downregulate DC activation. Consequently, our study together with other reports indicate that the effects of HS diet on the immune response is more complex than previously thought and remain to be clarified in human.

Bibliography

1. Müller, S. *et al.* Salt-Dependent Chemotaxis of Macrophages. *PLoS One* **8,** 2–10 (2013).
2. Resnick, L. M. *et al.* Intracellular ionic consequences of dietary salt loading in essential hypertension. Relation to blood pressure and effects of calcium channel blockade. *J. Clin. Invest.* **94,** 1269–76 (1994).
3. Kopp, C. *et al.* 23Na magnetic resonance imaging of tissue sodium. *Hypertension* **59,** 167–172 (2012).
4. Machnik, A. *et al.* Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat. Med.* **15,** 545–552 (2009).
5. Wiig, H. *et al.* Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. **123,** (2013).
6. Jantsch, J. & Titze, J. Cutaneous Na+ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab.* **42,** 407–420 (2016).
7. Heer, M. *et al.* Increasing sodium intake from a previous low or high intake affects water, electrolyte and acid-base balance differently. *Br. J. Nutr.* **101,** 1286–1294 (2009).
8. Titze, J. *et al.* Balancing wobbles in the body sodium. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31,** 1078–1081 (2016).
9. Suckling, R. J., He, F. J., Markandu, N. D. & MacGregor, G. A. Dietary salt influences postprandial plasma sodium concentration and systolic blood pressure. *Kidney Int.* **81,** 407–411 (2012).
10. He, F. J., Markandu, N. D., Sagnella, G. A., De Wardener, H. E. & MacGregor, G. A. Plasma

sodium: Ignored and underestimated. *Hypertension* **45,** 98–102 (2005).

11. Yi, B. *et al.* Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects : a longitudinal study. 103–110 (2015).
12. McMaster, W. G., Kirabo, A., Madhur, M. S. & Harrison, D. G. Inflammation, Immunity, and Hypertensive End-Organ Damage. *Circ. Res.* **116,** 1022–1033 (2015).
13. Amara, S. & Tiriveedhi, V. Inflammatory role of high salt level in tumor microenvironment (Review). *Int. J. Oncol.* **50,** 1477–1481 (2017).
14. Chiu, Y. L., Chiang, W. C. & Chen, Y. M. Too much salt inflames our body: Fact or artifact? *J. Formos. Med. Assoc.* **113,** 671–672 (2014).
15. Jörg, S. *et al.* High salt drives Th17 responses in experimental autoimmune encephalomyelitis without impacting myeloid dendritic cells. *Exp. Neurol.* **279,** 212–222 (2016).
16. Chessa, F. *et al.* The renal microenvironment modifies dendritic cell phenotype. *Nat. Publ. Gr.* 1–13 (2015).
17. Plos, L. L., Segura, E. & Soumelis, V. Of Human DC Migrants and Residents. *Immunity* **46,** 342–344 (2017).
18. Liu, Z. & Roche, P. A. Macropinocytosis in phagocytes : regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. **6,** 1–6 (2015).
19. Ohl, L. *et al.* CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions Max-Delbruck-Center for Molecular Medicine. **21,** 279–288 (2004).
20. Gaurav, R. & Agrawal, D. K. Clinical view on the importance of dendritic cells in asthma. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **9,** 899–919 (2013).
21. Said, A. & Weindl, G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. *J. Immunol. Res.* **2015,** (2015).
22. Velge-roussel, F., Lagaraine, C., Hoarau, C. & Lebranchu, Y. Mycophenolic acid-treated

human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses *via* direct and indirect pathways. **17,** 351–363 (2005).

23. Safi, W., Kuehnl, A., Nüssler, A., Eckstein, H. H. & Pelisek, J. Differentiation of human CD14+ monocytes: an experimental investigation of the optimal culture medium and evidence of a lack of differentiation along the endothelial line. *Exp. Mol. Med.* **48,** e227 (2016).
24. Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S. & Imai, Y. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286,** 292–297 (2001).
25. Hansson, M., Lundgren, A., Elgbratt, K. & Quiding-ja, M. Dendritic cells express CCR7 and migrate in response to CCL19 (MIP-3 b) after exposure to Helicobacter pylori. **8,** 841–850 (2006).
26. Autenrieth, S. E. Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. 523–529
27. Dixon, K. B., Davies, S. S., Kirabo, A. & Kirabo, A. Dendritic Cells and Isolevuglandins in Immunity , Inflammation and Hypertension. (2016).
28. Puig-Kroger, A. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* **98,** 2175–2182 (2001).
29. Popovic, Z. V *et al.* Hyperosmolarity impedes the cross-priming competence of dendritic cells in a TRIF-dependent manner. 1–14 (2017).
30. Amara, S., Whalen, M. & Tiriveedhi, V. High salt induces anti-inflammatory MΦ2-like phenotype in peripheral macrophages. *Biochem. Biophys. Reports* **7,** 1–9 (2016).
31. Stasiolek, M. *et al.* Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. 1293–1305 (2006).
32. Bscheider, M. & Butcher, E. C. Vitamin D immunoregulation through dendritic cells.

Immunology **148,** 227–236 (2016).

33. Lagaraine, C. *et al.* Induction of human CD4 ♀ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells Abstract : Depending on their degree of matura- tion , costimulatory molecule expression , and cyto- model of mixed culture by allogeneic MPA-DC dis- tivated by matur. **84,** 1057–1064 (2008).
34. Wang, G. Y. *et al.* Rapamycin-treated mature dendritic cells have a unique cytokine secretion profile and impaired allostimulatory capacity. *Transpl. Int.* **22,** 1005–1016 (2009).
35. Yamada, H. *et al.* LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Life Sci.* **78,** 926–933 (2006).
36. Matsue, H. *et al.* Generation and Function of Reactive Oxygen Species in Dendritic Cells During Antigen Presentation. *J. Immunol.* **171,** 3010–3018 (2003).
37. Barbaro, N. R. *et al.* Dendritic Cell Amiloride-Sensitive Channels Mediate Sodium- Induced Inflammation and Hypertension. **21,** 1009–1020 (2017).
38. Kleinewietfeld, M. *et al.* Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* **496,** 518–22 (2013).
39. Wu, C. *et al.* Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* **496,** 513–7 (2013).
40. Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A. & Chiocchia, G. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* **38,** 336–348 (2008).
41. Schmid, E. *et al.* Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 sensitive NF-KB signaling in dendritic cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **34,** 943–954 (2014).
42. Zhou, H. *et al.* Inhibition of serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances TLR-mediated inflammation and promotes endotoxin-driven organ failure. *FASEB J.* **29,** 3737–3749

(2015).

43. Hucke, S. *et al.* Sodium chloride promotes pro-in fl ammatory macrophage polarization thereby aggravating CNS autoimmunity. *J. Autoimmun.* 1–12 (2015).

44. Krementsov, D. N., Case, L. K., Hickey, W. F. & Teuscher, C. Exacerbation of autoimmune neuroin fl ammation by dietary sodium is genetically controlled and sex

Legend of the figures

Figure 1: High [Na^+] does not significantly alter DC viability up to 200 mM. Immature monocyte-derived DC were incubated with LPS (2.5 ng/ml) at increasing concentrations of Na^+ as indicated (140, 160, 180 and 200 mM) for 48 hours. Stainings with Annexin V and Propidium Iodide were then analyzed by flow cytometry. A- Results of one representative experiment (values in the lower quadrants indicate the percentages of viable cells). B- Results for 5 independent healthy donors. Black dots represent the mean and bars the standard deviations. Statistical analysis by ANOVA test did not show any significant difference.

Figure 2: High Na^+ concentrations stretches the cytosqueletton of DC. (A) Monocyte-derived DC were cultured with LPS (2.5 ng/ml) for 48 h at 140 mM (a,c) or 200 mM [Na^+] (b,d). DC morphology was analyzed by electron microscopy (a, b) and by confocal immunofluorescence microscopy at 1024 X 768 pixels image resolution (c, d). *Nuclei* were stained by Dapi (in blue) and cytoskeleton by actin (in green). One representative experiment is shown. (B) The lengths of all cell dendrites were measured on electronic microscopy images for 30 DC by *Zeiss ULTRA Plus microscope* for 140 up to 200 mM [Na^+] (as indicated) and graphically depicted in box-and-whisker plots. Median (the band inside the box), mean (symbolized by + in boxes) and S.D values (lines extending vertically from the boxes) are presented (* $p<0.01$**** $p<0.00001$).

Figure 3: Immature DCs incubated with LPS in High Na^+ concentration maintain the expression of DC markers and do not acquire macrophage markers. Monocytes were isolated by magnetic beads and differentiated into macrophages in the presence of GM-CSF alone for 6 days (first line) or into iDC with GM-CSF + IL4 for 6 days (second line). Immature DC were treated with LPS (2.5 ng/ml) for 2 days at either 140mM (third line) or 200 mM [Na^+] (fourth line). DC-sign (CD209), IBA-1, CD214 and CD163 expressions were assessed by cytometry as indicated (result for one healthy donor is presented).

Figure 4: High [Na^+] inhibits LPS-induced DC maturation. (**A**) Immature DC or DC treated for 48 h with LPS (2.5 ng/ml) at either 140mM (LPS-DC [Na^+] 140) or 200mM Na^+ (LPS-DC [Na^+] 200) were stained for CD25, CD83, CD80, and CD86, as indicated and analyzed by flow cytometry (isotype control antibodies are presented in empty histograms and specific antibody staining in filled histograms). MFI are indicated in the upper left corner and % of positive cells above the barriers in each graph. (**B**) Results of 8 independent donors expressed as MFI for each marker relative to the MFI of LPS-DC at [Na^+] 140 mM.

Figure 5: High [Na^+] increases CCR5 expression on LPS-treated DC and inhibits CCL19-driven DC migration. Immature DC were treated with LPS for 48 h at increasing [Na^+] from 140 mM up to 200mM (as indicated) and stained for CCR5 and CCR7 (as indicated) for analysis by flow cytometry (**A**) results of one representative experiment of LPS treated DC at either 140mM (LPS-DC [Na^+] 140) or 200mM Na^+ (LPS-DC [Na^+] 200) are shown. (**B**) Mean fluorescence intensity (MFI) of CCR5 and CCR7 on LPS-treated DC at increasing [Na^+] (as indicated) relative to LPS-treated DC at 140 mM [Na^+]. (**C**) DC CCL19-driven chemotaxis index was calculated according to this formula: (% of CCL19-driven migration)/(% of spontaneous migration). (**D**) Dendritic cells were stimulated with LPS (50 ng/ml) for 48 h at increasing Na^+ concentrations (as indicated), then incubated for 1 h with FITC-Dextran and analyzed by flow cytometry to measure Dextran uptake. MFI of Dextran-FITC labelled cells are presented relative to iDC that was given the value 100 for each donor. Results are presented as mean ± SD for 8 independent healthy donors. (*p* values were calculated by Wilcoxon test * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ **** $p<0.0001$).

Figure 6: High [Na^+] inhibits LPS-induced production of IL-12(p70), Il-6, IL-23, ROS and increases that of IL-10 and TGF-β in dendritic cells. (Panel A) IL-12, IL-6, IL-23, IL-10 and TGF-β were analyzed by ELISA in supernatants collected from monocytes-derived DC stimulated

for 48h with LPS at 50 ng/ml with increasing concentrations of Na^+ as indicated. We also represented the ratio of IL-10/IL-12 with increasing [Na+]. Concentrations of each cytokine were expressed by pg/ml. Data are presented as mean ± EM obtained from 8 independent donors. Results were analyzed using Wilcoxon tests (*p<0.05, **p<0.01). (Panel B) Reactive Oxygen Species **(**ROS) production was measured by flow cytometry for unstimulated immature DC and for LPS-treated DC at either 140 mM or 200 mM [Na^+]. (Left column) Result of 1 representative experiment showing the ROS production in LPS-DC at either 140 or 200 mM [Na^+]. (Right column) Mean fluorescence intensities were recorded and ratios were calculated relative to the untreated immature DC. The results of 8 independent donors are presented as Means ± S.D. (***$p < 0.0005$).

Figure 7: high [Na^+] increases SGK1 and ERK1/2 phosphorylation and inhibits that of p38 MAPK phosphorylation in DC. DC were stimulated with LPS (2.5 ng/ml) at 140 mM (LPS-DC NS) or 200 mM of Na^+ (LPS-DC HS) for 15 min and 60 min (as indicated) and analyzed by western blot technique in order to study the phosphorylation rates of p38, ERK1/2 and SGK1. The protein HSC70 was used as a control for protein load (A) Results from one representative of 8 independent experiments are shown. (B) The phosphorylation rates of p38, ERK1/2 and SGK1 upon LPS stimulation at 200 mM and 140 mM [Na^+] were quantified relative to HSC70 and represented as a ratio of their respective stimulated control at 140 mM [Na^+]. Densitometry was determined by analysis of western blot membranes with Image J software. The results of 8 independent experiments are presented. Light grey and dark grey bars represent DC treated with 140 mM [Na^+] or 200 mM [Na^+], respectively (**p<0.001, ***p<0.0001; **** p<0.00001).

Figure 8: **High [Na^+] inhibits the T-cell allostimulatory capacity of DC and increases IL-10 production in allogeneic MLR.** iDC were pre-activated with LPS (50ng/ml) at either 140 mM or 200mM [Na^+] for 48 h and washed and then incubated with purified allogeneic $CD4^+$ T-cells for 6

days in medium at 140mM [Na^+]. $CD4^+$T-cells were then gated by cytometry. Expression of CD25 (A) and Ki67 (B) by $CD4^+$T-cells. Percentage of CD25 and Ki67 positive cells were expressed relative to DC 140 [Na^+] (results of 6 independent donors **p=0.001). (C) IFN-γ production by $CD4^+$T-cells as assessed by MFI measurements after intracellular staining and expressed relative to DC 140 [Na^+] (results of 6 independent donors **p=0.001). (D) IL-10 was measured by ELISA in MLR supernatants at the end of the 6-day cultures and expressed relative to DC 140 [Na^+] (results of 5 independent donors **p=0.004).

Figure

1

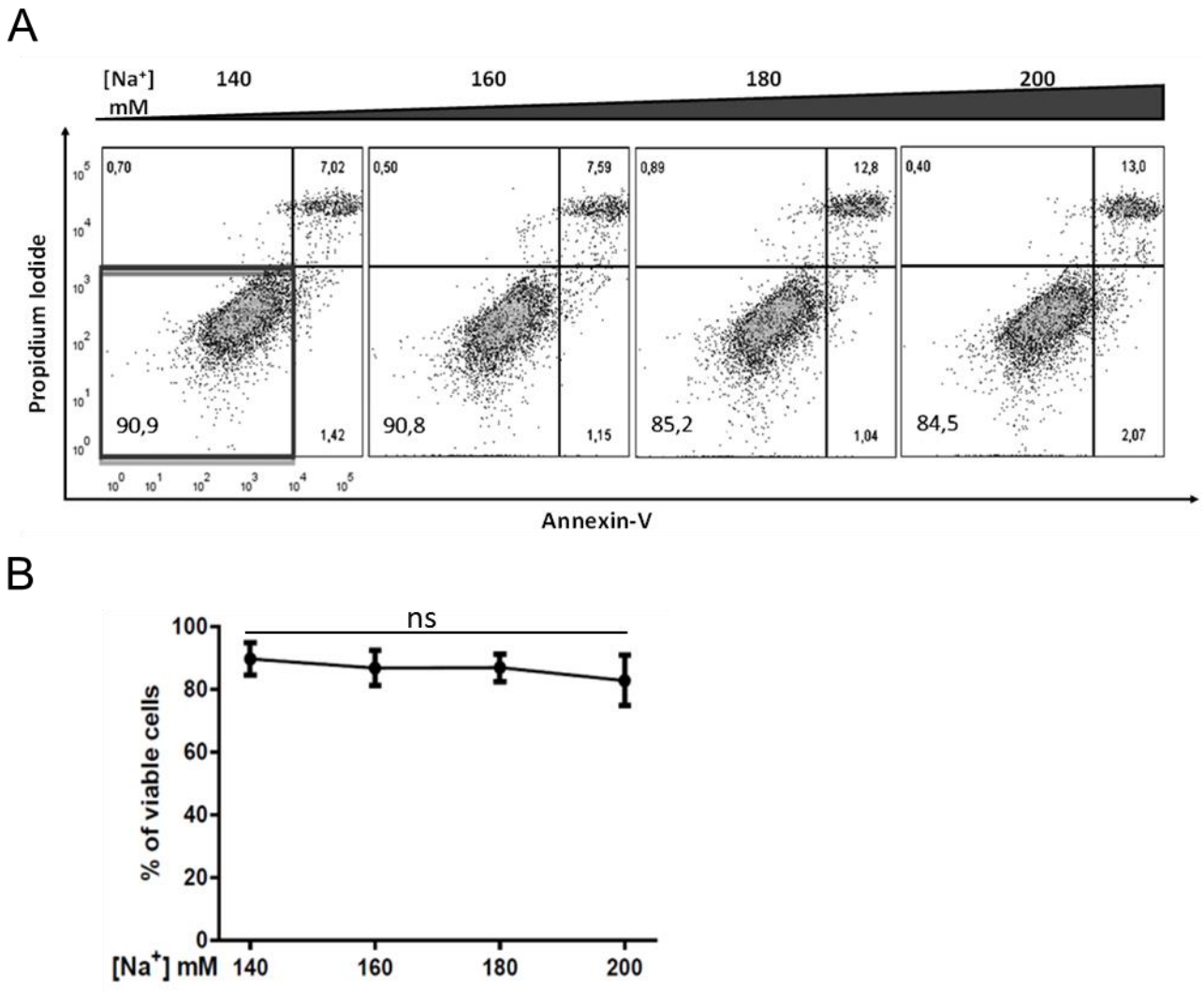

A
[Na+] mM
140
160
180
200
Propidium Iodide
Annexin-V
0,70
7,02
90,9
1,42
0,50
7,59
90,8
1,15
0,89
12,8
85,2
1,04
0,40
13,0
84,5
2,07
B
ns
% of viable cells
[Na+] mM 140 160 180 200

Figure 2

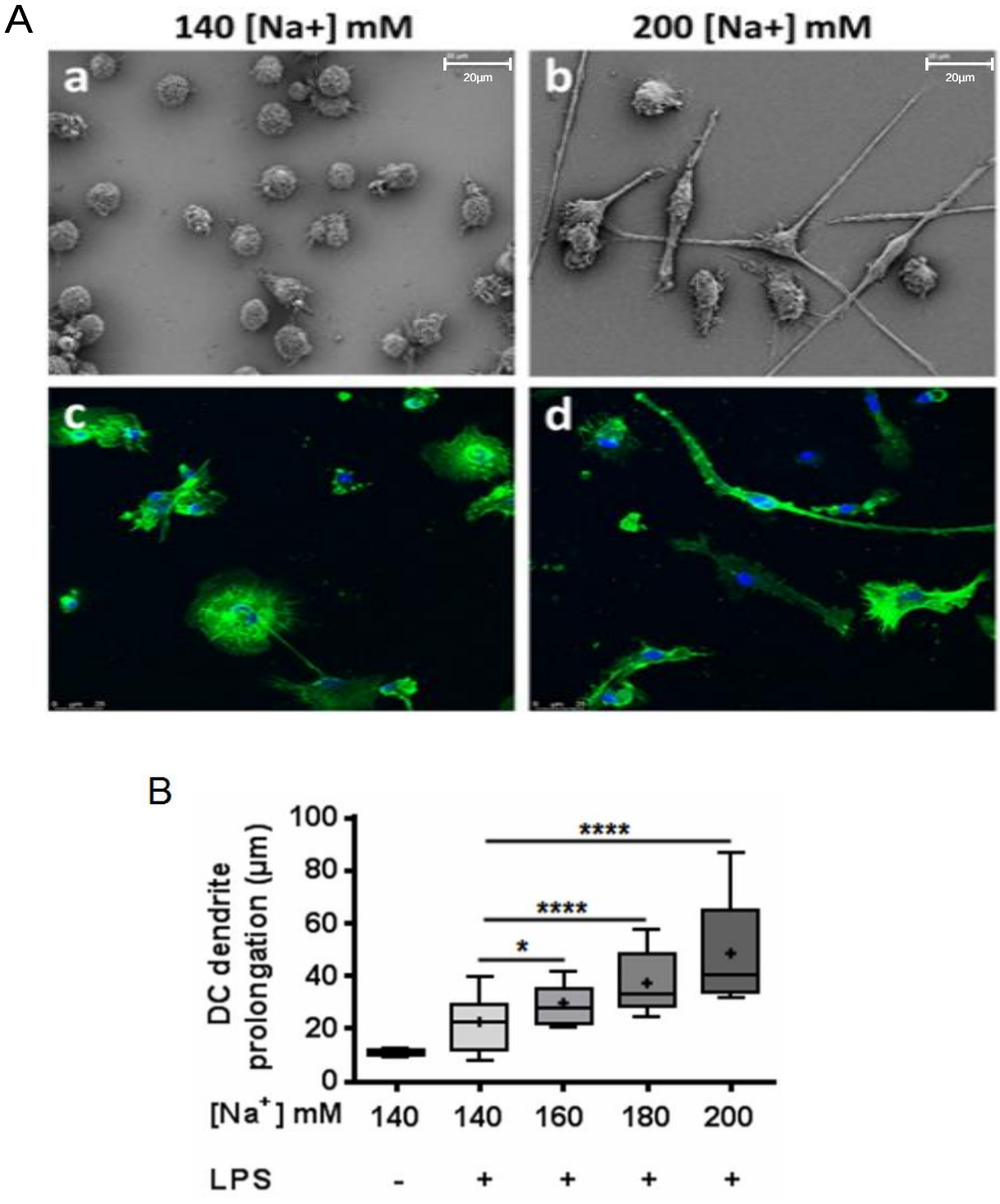

A
140 [Na+] mM
200 [Na+] mM
a
b
c
d
20µm
20µm
B
DC dendrite prolongation (µm)
100
80
60
40
20
0
****
****
*
[Na+] mM
140
140
160
180
200
LPS
-
+
+
+
+

Figure 3

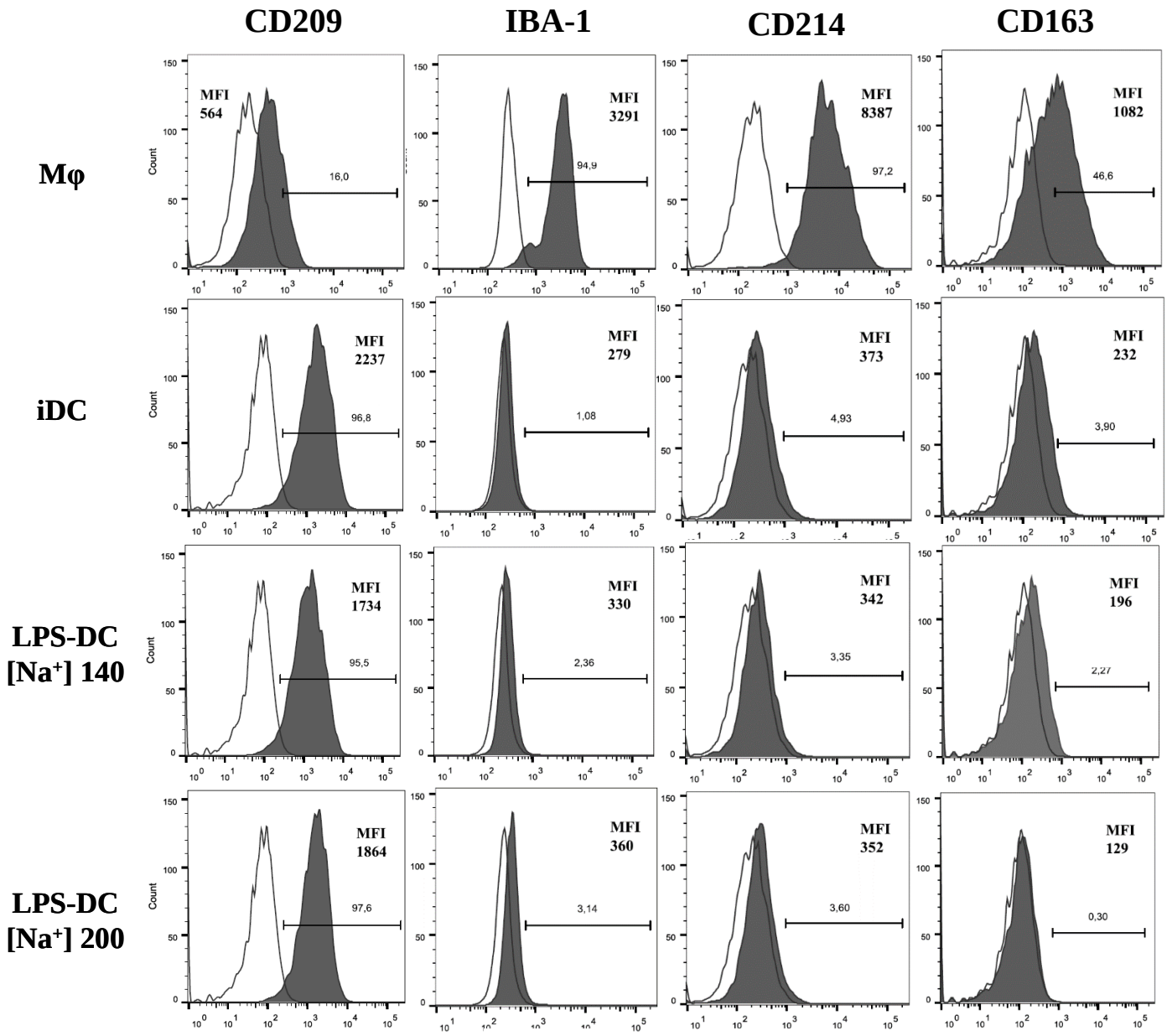

CD209
IBA-1
CD214
CD163
Mφ
iDC
LPS-DC [Na+] 140
LPS-DC [Na+] 200
MFI 564
16,0
MFI 3291
94,9
MFI 8387
97,2
MFI 1082
46,6
MFI 2237
96,8
MFI 279
1,08
MFI 373
4,93
MFI 232
3,90
MFI 1734
95,5
MFI 330
2,36
MFI 342
3,35
MFI 196
2,27
MFI 1864
97,6
MFI 360
3,14
MFI 352
3,60
MFI 129
0,30
Count

Figure 4

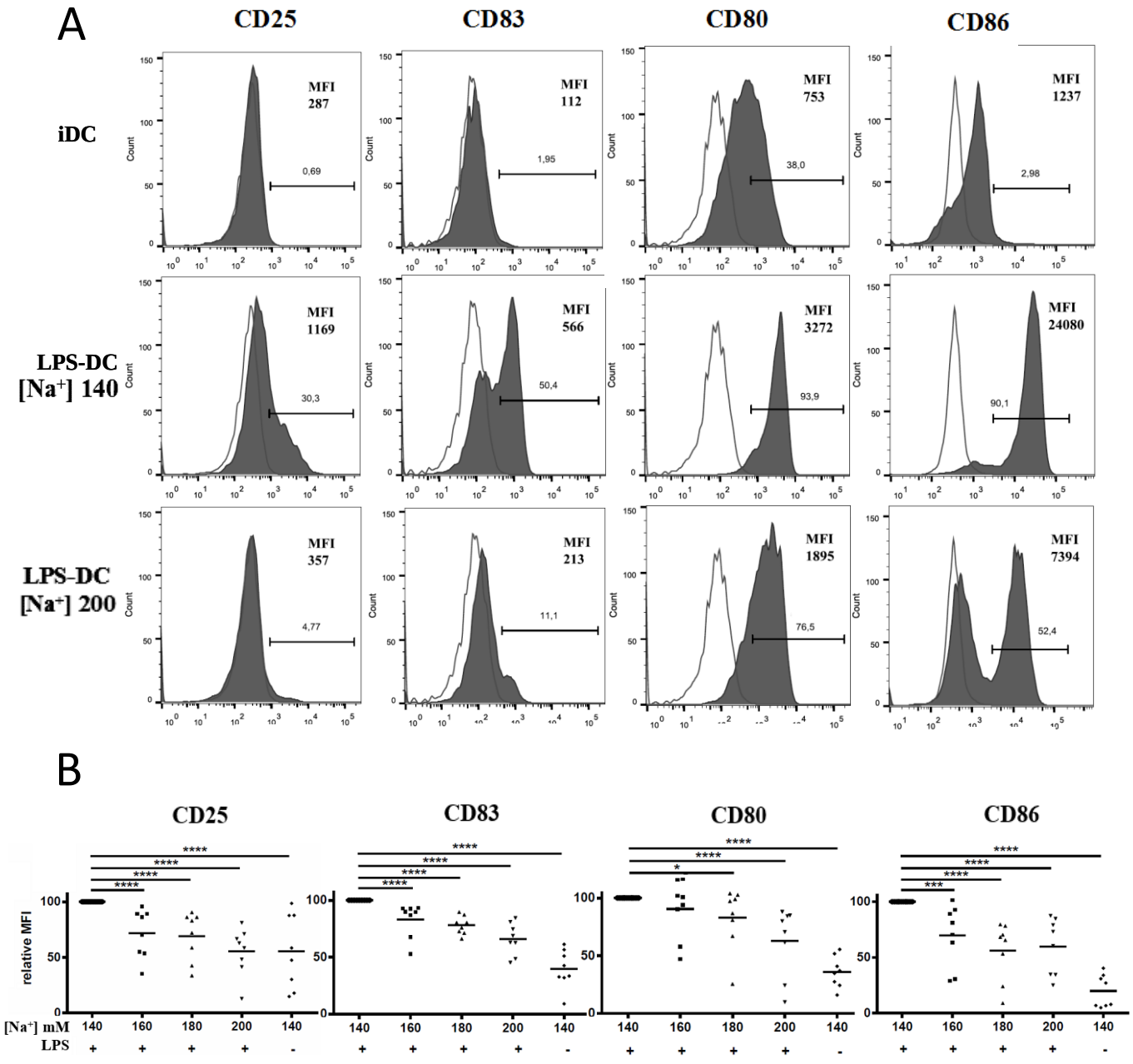

A
CD25
CD83
CD80
CD86
iDC
LPS-DC [Na+] 140
LPS-DC [Na+] 200
MFI 287
0,69
MFI 112
1,95
MFI 753
38,0
MFI 1237
2,98
MFI 1169
30,3
MFI 566
50,4
MFI 3272
93,9
MFI 24080
90,1
MFI 357
4,77
MFI 213
11,1
MFI 1895
76,5
MFI 7394
52,4
Count
B
CD25
CD83
CD80
CD86
relative MFI
[Na+] mM
LPS
140
160
180
200
140
+
-

Figure 5

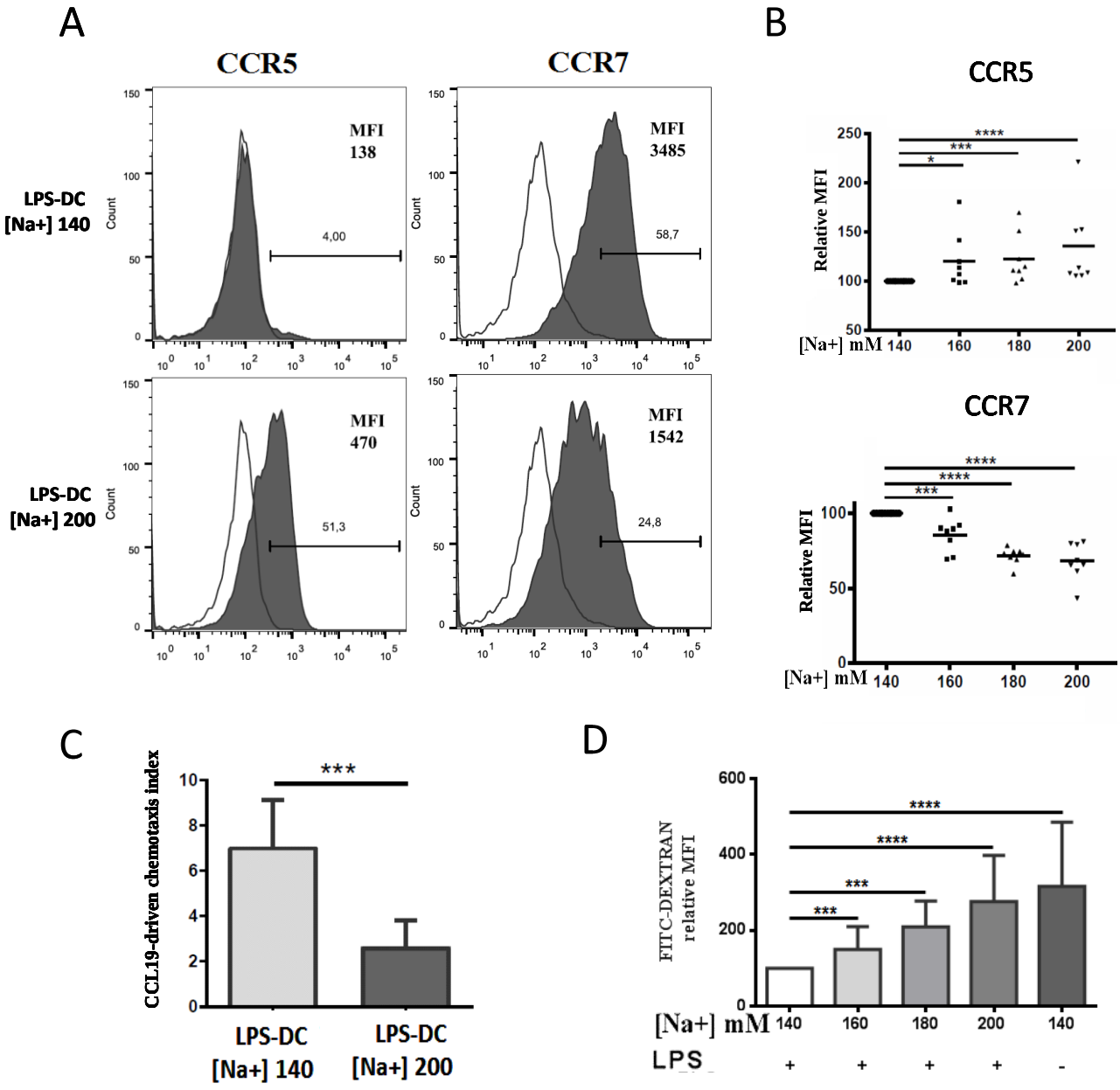
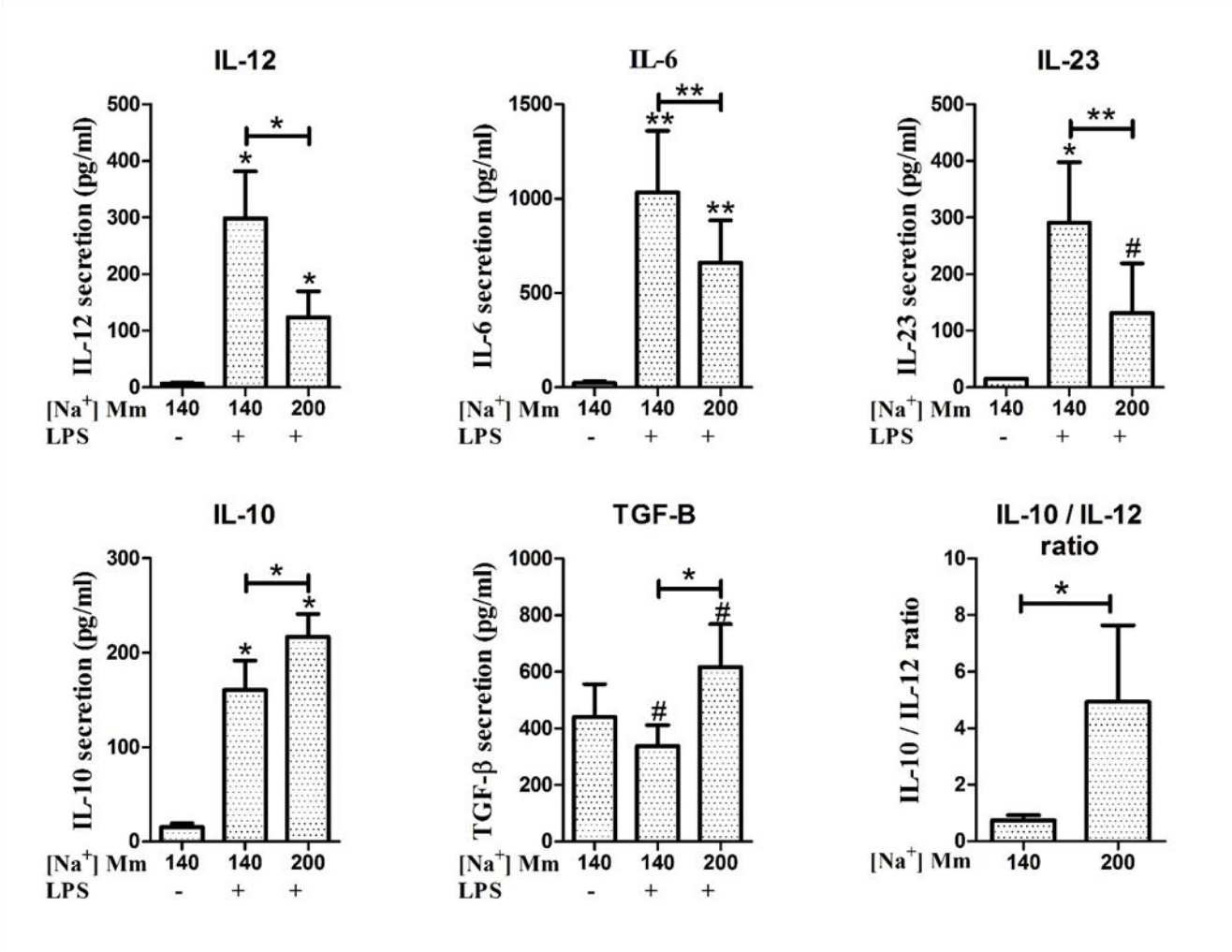

A
CCR5
CCR7
LPS-DC
[Na+] 140
LPS-DC
[Na+] 200
MFI
138
4,00
MFI
3485
58,7
MFI
470
51,3
MFI
1542
24,8
Count
B
CCR5
Relative MFI
[Na+] mM 140 160 180 200
CCR7
Relative MFI
[Na+] mM 140 160 180 200
C
CCL19-driven chemotaxis index
LPS-DC
[Na+] 140
LPS-DC
[Na+] 200
D
FITC-DEXTRAN
relative MFI
[Na+] mM 140 160 180 200 140
LPS + + + + -

Figure 6

A


IL-12
IL-12 secretion (pg/ml)
IL-6
IL-6 secretion (pg/ml)
IL-23
IL-23 secretion (pg/ml)
IL-10
IL-10 secretion (pg/ml)
TGF-B
TGF-β secretion (pg/ml)
IL-10 / IL-12 ratio
IL-10 / IL-12 ratio
[Na+] Mm 140 140 200
LPS - + +

B

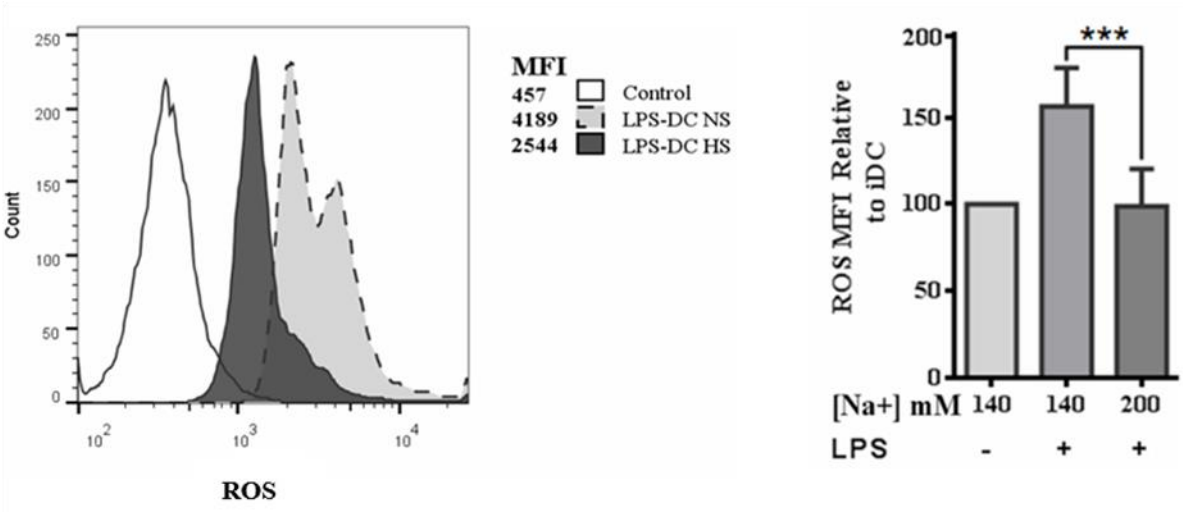

Count
ROS
MFI
457 Control
4189 LPS-DC NS
2544 LPS-DC HS
ROS MFI Relative to iDC
[Na+] mM 140 140 200
LPS - + +

Figure 7

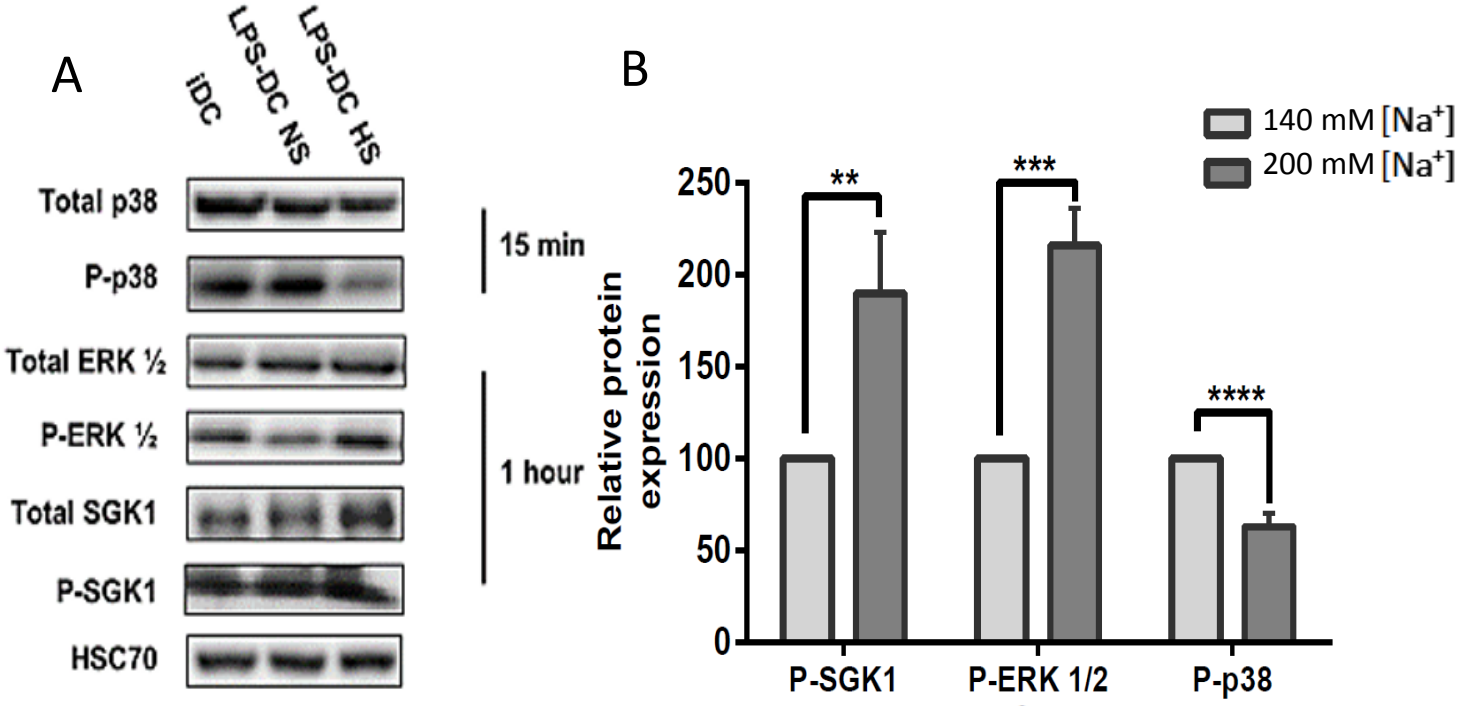
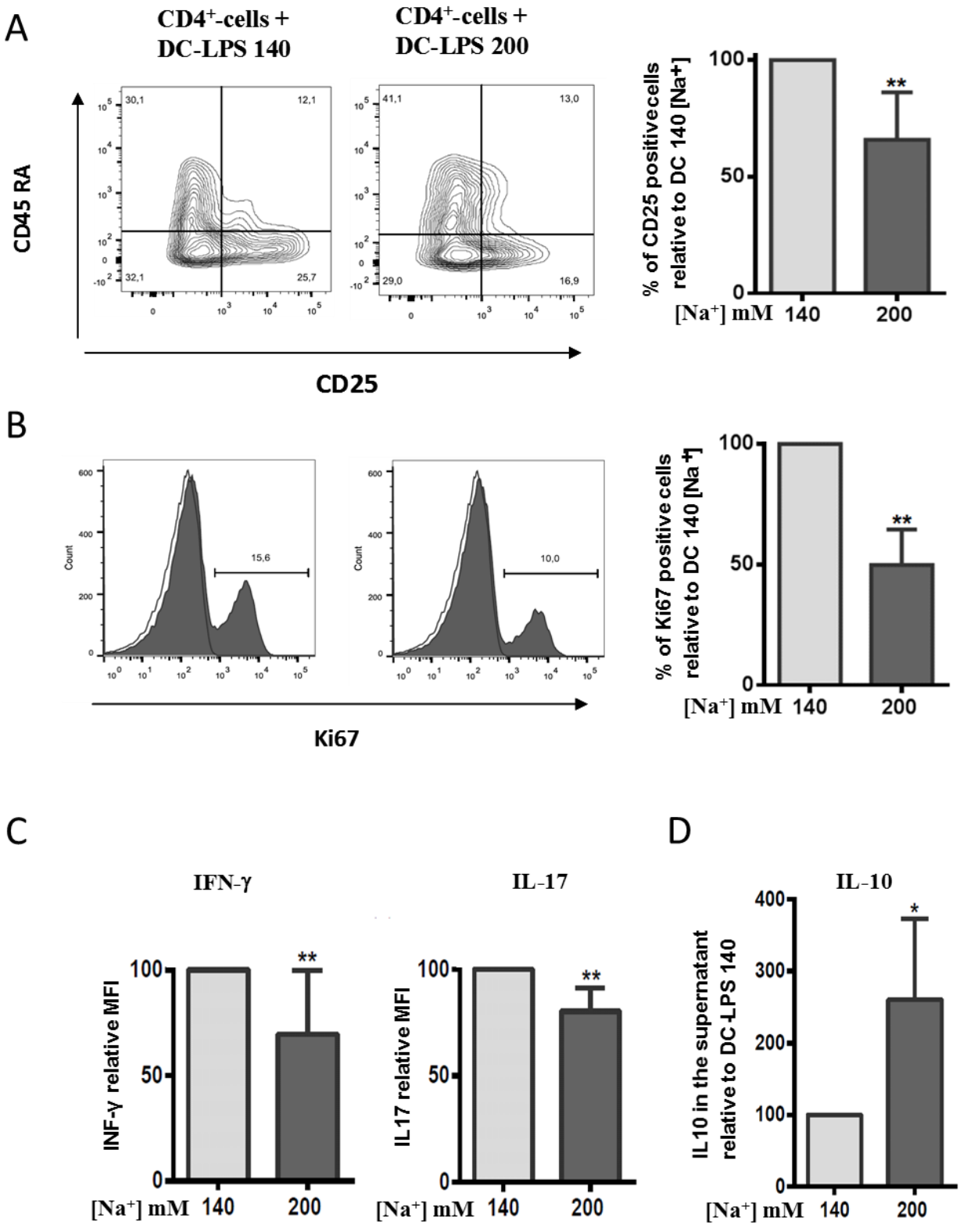

A
iDC
LPS-DC NS
LPS-DC HS
Total p38
P-p38
Total ERK ½
P-ERK ½
Total SGK1
P-SGK1
HSC70
15 min
1 hour
B
140 mM [Na+]
200 mM [Na+]
Relative protein expression
250
200
150
100
50
0
**
***
****
P-SGK1
P-ERK 1/2
P-p38

Figure 8


A
CD4+-cells + DC-LPS 140
CD4+-cells + DC-LPS 200
CD45 RA
CD25
30,1
12,1
32,1
25,7
41,1
13,0
29,0
16,9
% of CD25 positive cells relative to DC 140 [Na+]
[Na+] mM 140 200
B
Ki67
15,6
10,0
Count
% of Ki67 positive cells relative to DC 140 [Na+]
C
IFN-γ
INF-γ relative MFI
IL-17
IL17 relative MFI
D
IL-10
IL10 in the supernatant relative to DC-LPS 140

Annexe 2 : Manuscrit d'article soumis en co-premier auteur (travaux collaboratifs)

Durant mon séjour dans l'EA 4245 et en continuité avec mes travaux de thèse j'ai participé à divers études sur les DC. J'ai notamment réalisé les dernières expériences nécessaires à la finalisation d'un travail portant sur le rôle de l'IL-10 dans la différenciation des DC-10.

CD4$^+$ T-cells preactivated with allogeneic dendritic cells derived from IL10-treated monocytes are devoid of regulatory properties.

Authors : **Ihab Kazma[1], Sally AL-Hajj[1], Wafa Benakouche[1], Roseline Guibon[1], Mathias Büchler[1,2], Jean-Michel Halimi[1,2], Philippe Gatault[1,2], Roxane Lemoine[1,3], Christophe Baron[1,2].**

[1] UPRES EA 4245 T2i «Transplantation, Immunology and Inflammation », UFR de Médecine, University of Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France.

[2] Service de Néphrologie – Transplantation Rénale, CHRU of Tours 37000 Tours, France.

[3] Plateforme B Cell Ressources, University of Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France

Keywords : dendritic cells, IL-10, T-cell alloimmune response.

Address correspondence to : Roxane Lemoine and Christophe Baron, EA4245 T2i, 10 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France. Phone: 33.2.47.36.63.76 ; E-mail: roxane.lemoine@univ-tours;fr and christophe.baron@univ-tours.fr

Authorship note: Ihab Kazma and Sally AL Hajj contributed equally to this work.

Roxane Lemoine and Christophe Baron contributed equally to this work.

ABSTRACT

*Interleukin-10 (*IL-10) is generally considered as an anti-inflammatory cytokine inhibiting T-cell immune responses. However, some pro-inflammatory effects have been reported *in vivo* and effects of IL-10 on monocyte-derived Dendritic Cells (DC) have led to controversial results. In this study, we compared the properties of $CD4^+$ T cells activated either with allogeneic DC-10 (T-10) or allogeneic LPS-activated DC (T-LPS). Firstly, we showed that DC-10 expressed membrane markers different from those of conventional monocyte-derived DC and have a lower allostimulatory capacity as compared to DC-LPS. In addition, T-10, unlike T-LPS cells are anergic after restimulation with allogeneic mature DC. Surprisingly, T-10 had no regulatory capacity, but rather potentiated the allogeneic responsiveness of naive $CD4^+$ T cells cultured with allogeneic mature DC. These data suggest that the use of IL-10-differentiated DC might not be an efficient strategy to downregulate the $CD4^+$ T-cell alloimmune response.

INTRODUCTION

Dendritic cells (DC) play crucial role in activation or regulation of the T-cell immune response. Human monocyte-derived DC treated with several pharmacologic or physiologic agents may induce the differentiation of regulatory T cells with different characteristics. We have previously reported that human dendritic cells (DC) treated by mycophenolic acid (MPA-DC) induced antigen-specific foxp3-expressing $CD4^+$ iTreg that suppress both naive $CD4^+$ T cell allogeneic response [1] and cytotoxic $CD8^+$ T cell alloreactivity [2]. Whereas, IL-10 pretreated DC induced differentiation of type 1 Treg (Tr1) that do not express foxp3 but produced high level of IL-10 [3]. Regulatory T cells (Treg) are critical players in the control of immune response. Treg cells play an important role in prevention of allograft rejections [4] and of autoimmune diseases [5]. Therefore the ways to generate Treg with modified DC is a field of intensive research in order to reprogram the immune system toward tolerance [1, 3, 6].

*Interleukin-10 (*IL-10) is generally considered predominantly as an inhibitor of pro-inflammatory reactions. In T cells, IL-10 down-regulates T-cell immune responses [7], favors T-cell anergy and induces the differentiation of type 1 regulatory T (Tr1) cells in humans [8] and mice [9]. On immature DC, ligation of IL-10 receptor (IL-10R) induces the transcription of SOCS3 and phosphorylation of STAT3 which suppresses the transcription of pro-inflammatory genes [10-12]. IL-10 decreased the expression of MHC II and costimulatory molecules on DC [13] leading to an antigen-specific anergy in T cells [3,14]. Finally, mice injected with IL-10-pretreated DC and Methacholine, exhibited a drop in Th2 response, IgE and IgG1 concentrations specific for this allergen [15]. IL-10-pretreated DC were also able to reverse the phenotype of asthmatic mice sensitized by OVA [16]. Together, these data indicate that IL-10 maintains the DC in a tolerogenic state.

However, some pro-inflammatory and rather paradoxical effects of IL-10 have been reported *in vivo*. In healthy human subjects, IL-10 treatment enhanced LPS-induced IFN-γ release, as well as the release of the IFN-γ-inducible protein-10 [17]. In addition, treatment of Crohn's disease with human IL-10 also resulted in the induction of the pro-inflammatory cytokine IFN-γ [18]. Injection of IL-10 in mice results in accelerated GVHD and graft rejection in bone marrow allo-transplantation [19] and exacerbates xenogeneic GVHD by inducing massive human T cell expansion in mice [20]. However, the effects of IL-10 on monocyte differentiation are complex. IL-10 enhances various cell functions such as induction of FcγRI and FcγRIII [21,22] and facilitates macrophage accumulation and differentiation from monocytes in inflamed tissues that present autoreactive antibodies [23]. Other data suggested that IL-10 has a dual function on monocytes, to inhibit pro-inflammatory cytokine production and to suppress monocyte spontaneous apoptosis [24]. While in contrast, other suggested that IL-10 inhibited GM-CSF-dependent monocyte survival [25]. Finally, Gregori *et al*. reported that antigen presenting cells derived from monocytes treated with a mixture of IL-10, GM-CSF and IL-4 preferentially activated allogeneic type 1 regulatory T cells (Tr1) cells by a mechanism dependent on autocrine IL-10, under the effect of the interaction of ILT4 expressed by DC with its ligand HLA-G [26]. These cells had several characteristics in common with DC and were referred to as DC-10 by these authors. These cells expressed CD14, CD16, CD11c, and CD11b but neither CD1a nor CD1c and secrete small amounts of IL-12 [26]. Importantly these authors pointed to the fact that these cells had an *in vivo* counterpart in human blood.

In the present study, we generated monocyte-derived DC-10 in a way similar to that used by Gregori *et al*. [26]. We used either DC-10 or standard monocyte-derived LPS-activated DC (LPS-DC) as control to activate allogeneic $CD4^+$ T cells and then compared the properties of

these two types of $CD4^+$ T cells. Our study demonstrated that DC-10 express membrane markers that differentiate them from conventional monocyte-derived dendritic cells and that they have low allostimulatory capacity. T-10 cells, unlike T-LPS cells, are anergic after restimulation with mature DC and induce a weak expression of maturation markers on iDC. Surprisingly, T-10 had no regulatory capacity, but rather potentiated the responsiveness of allogeneic $CD4^+$ T cells in culture with allogeneic mature DC. In contrast, T-LPS inhibited the allogeneic responsiveness of naive $CD4^+$ T cells.

RESULTS

DC-10 express membrane markers that differentiate them from conventional monocyte-derived dendritic cells.

Three different types of monocyte-derived dendritic cells were generated. Monocytes were cultured in presence of IL-4, GM-CSF and IL-10 for 7 days to generate DC-10, or with IL-4 and GM-CSF for 5 days and then LPS for the last 2 days to generate LPS-DC, or finally with IL-4 and GM-CSF for 7 days to obtain immature DC (iDC). We first confirmed that the three cell types highly expressed (more than 90% of cells) the C-lectin protein (DC-SIGN) (data not shown). Furthermore, DC-10, contrary to LPS-DC and iDC, strongly expressed CD14 and CD16 markers. Conversely, CD1a marker was highly expressed on LPS-DC and iDC but absent on DC-10 (Figure 1A).

We then compared the expression of maturation markers and co-stimulatory molecules by each of these three cell types. As expected, LPS induced high level of expression of maturation markers such as CD25, CD83 and CD80 co-stimulatory molecule. On the contrary, DC-10 expressed low levels of these markers as immature DC (Figure 1A). Collectively, these data indicated that DC-10 do not express the common phenotype of conventional myeloid DC

derived from monocytes. These differences in expression of membrane markers were associated with a different morphology as evidenced by electron scanning microscopy (Figure 1B). Immature DC and LPS-DC emit short and long membrane extensions respectively, while DC-10 have an heterogeneous cell surface and exhibited small extension, forming pedicles with rounded ends (Figure 1B).

DC-10 have a low allostimulatory capacity and induce the synthesis of IL-10 and IL-6.

Naive $CD4^+$T cells labeled with CFSE were cultured with LPS-DC, iDC or allogeneic DC-10 during five days. As shown in Figure 2A, 28%, 49.6% and 12.6% of allogeneic $CD4^+$ T cells proliferated in response to DC-10, LPS-DC and iDC respectively. Thus, DC-10 have a lower allostimulatory capacity than LPS-DC, but higher than that of iDC. We also showed that DC-10 co-cultured with $CD4^+$ T cells induced high production of IL-10 but small amount of IL-12 similarly to iDC. Interestingly, DC-10 induced large amount of IL-6, which was even higher than that of LPS-DC (Figure 2B).

DC-10, unlike LPS-DC, induced of $CD4^+$T cell anergy.

Allogeneic $CD4^+$T cells were cultured during 14 days with either DC-10 or LPS-DC, and the expressions of CD25, Foxp3, and CTLA-4 markers were analyzed in these 2 types of $CD4^+$T cells (further referred to as T-10 and T-LPS respectively). As shown on Figure 3A, T-10 and T-LPS equally expressed CD25 while T-10 expressed slightly higher level of intracellular CTLA-4 than T-LPS and T-LPS expressed Foxp3 at a significantly higher level than that of T-10 (Figure 3A).

The capacity of T-10 and T-LPS to respond to a secondary stimulation was then assessed. On day 14, after PKH26 labelling, T-10 and T-LPS were restimulated with allogeneic LPS-DC.

Five days later, the T cell proliferation was analyzed in each condition by flow cytometry. The results showed that T-10 were poorly reactive to restimulation with LPS-DC (less than 10% of mean proliferation), while T-LPS were extremely reactive (mean proliferation greater than 60%) (Figure 3B). This suggested that T-10 were relatively anergic to a strong stimulus such as LPS-DC.

T-10 induced a weak expression of maturation markers and strong IL-6 production by iDC whereas T-LPS induced strong maturation, IL-12 and IFN-γ secretions.

We then analyzed the effects of T-10 and T-LPS on the maturation of allogeneic DC. T-10 or T-LPS were cocultured for 48h with allogeneic immature DC or LPS-DC (from the donor used in the first phase of prestimulation of T-10 or T-LPS). Expression of CD80, CD25 and CD83 markers was then analyzed on DC. Our results showed that T-LPS, compared to T-10, strongly induced expression of CD83 and CD25 on iDC (66% *vs* 37% for CD83 and 38.3 % *vs* 19.7% for CD25). CD80 was slightly more upregulated by T-LPS as compared to T-10 (Figure 4A). Our results also showed that expression of these three markers on LPS-DC were affected neither by T-10 nor by T-LPS (Figure 4B).

We then assessed the effects of T-10 and T-LPS on the production of cytokines after a two-day coculture with iDC or LPS-DC. In culture supernatants of iDC, we obtained a 3.5 fold increase of IL-10 and 1.7 fold increase of IL-6 after incubation with T-10, compared to incubation with T-LPS (Figure 4C). On the other hand, the concentration of IL-12 in the presence of T-LPS was 1.5 greater than that observed with T-10 (Figure 4C). The co-culture of T-LPS with iDC was also associated with a very high production of IFN-γ (7 fold increase compared to co-culture with T-10 ; Figure 4C). Similar results were obtained for cocultures between LPS-DC and T-10 or T-LPS (Figure 4D). To better characterize the origin of cytokine productions, we analyzed the intracellular expression of IL-6, IL-10 and IFN-γ in DC. Both T-

10 and T-LPS induced the expression of IFN-γ in iDC and LPS-DC although T-LPS were more efficient (data not shown). In contrast the percentage of IL-10-positive iDC or LPS-DC was affected neither by T-10 nor T-LPS, suggesting that the difference in concentration of IL-10, previously noted in supernatants, mainly reflected a differential production by lymphocytes (data not shown). Interestingly, only T-10 could drive the production of IL-6 by DC (Figure 4C and D).

T-10, unlike T-LPS, potentiated the $CD4^+$T-cell alloproliferative response.

We then tested the capacity of the two subpopulations of pre-activated $CD4^+$T cells to modulate the alloreactive response of naive $CD4^+$ T cells. At the end of the prestimulation cycle of 14 days, T-10 and T-LPS were labeled with PKH26, and then mixed with autologous CFSE-labeled $CD4^+$ T cells and allogeneic LPS-DC (Figure 5A). Analysis of PKH26 in T-10 indicated that T-10 unresponsiveness was abrogated when cocultured with naive $CD4^+$ T cells and LPS-DC (Figure 5B, left graph). In contrast, T-LPS proliferation was not affected by the presence of naive $CD4^+$ T cells and LPS-DC (Figure 5B, medium graph). Analysis of CFSE in naive responder $CD4^+$ T-cells (Figure 5B, right graph) indicated that T-10 had no regulatory capacity but surprisingly significantly potentiated the allogeneic responsiveness of naive $CD4^+$ T cells in 5-day culture with LPS-DC. In contrast, T-LPS inhibited significantly the allogeneic responsiveness of naive $CD4^+$ T cells cultured with LPS-DC (Figure 5B, right graph).

DISCUSSION

Gregori *et al*., described a subset of IL-10–producing human dendritic cells, termed DC-10, which could be either isolated from the blood or induced *in vitro* by differentiation of human monocytes in the presence of IL-10 [26]. These authors reported that these DC-10 cells induced the expansion of human Tr1 regulatory T cells. In the present study, we further explored the bidirectional interactions between DC-10 and T cells. The signals of DC directed toward T cells have been largely studied. In contrast, the reverse effects of T cells on DC have been much less studied and mainly with natural Treg or naive T cells. In fact, the effects of pre-activated T cells (by DC-10) on the properties of human DC have not been studied yet.

In our work, we compared alloreactive T cells preactivated with monocyte-derived DC either under inflammatory conditions (with LPS) or differentiated in the presence of IL-10. We firstly characterized the population of DC differentiated from monocytes in the presence of IL-10 (DC-10) using a procedure similar to that described by Gregori *et al*., [26]. We first confirmed that DC-10 express membrane markers that differentiate them from conventional monocyte-derived myeloid dendritic cells. If DC-10 are DC-SIGN^{+}, like iDC and LPS-DC, they do not acquire the expression of CD1a marker but express on their surface CD14 and CD16 markers, unlike conventional monocyte-derived myeloid DC. These results are broadly consistent with those of Gregori *et al*. [26]. The effects of IL-10 on monocyte-derived DCs have led to controversial results [27]–[29]. Allavena *et al*., reported that IL-10 prevented the differentiation to DC and fostered a phenotype "macrophage-like" [27], while other studies indicate that IL-10-treated monocytes expressed markers associated with DC [29]. Anyway, many of the commonly receptors associated with DC or macrophages were subsequently shown to be either non-discriminative like CD11c, CD14, CD16, DC-SIGN or CD1a [30],[31].

Surface markers expressed by DC-10 reported in our work and by Gregori *et al*., suggested that these cells are not bona fide DC. Next, we confirmed that DC-10 have a low allostimulatory capacity on $CD4^+$ T cells. However, contrary to Gregori *et al*., we found that DC-10 had a higher allostimulatory capacity than immature DC but significantly lower than that of LPS-DC. Furthermore, besides the high production of IL-10 as reported by Gregori, we observed a strong synthesis of IL-6 in 5-day mixed cultures in the presence of DC-10. In contrast, there was low IL-6 production in the presence of immature DC. This high production of IL-6 was also observed by Gregori *et al*., [26]. IL-6 is known for its pro-inflammatory effects and its ability to prevent differentiation of Treg and biased the immune response towards Th17 pathway [32]. This production of IL-6 might participate to the allostimulatory capacity of DC-10. Then, we analyzed the characteristics of $CD4^+$ T cells stimulated during 14 days with either allogeneic DC-10 or LPS-DC. Coculture of $CD25^+$-depleted $CD4^+$ T cells with DC-10 or LPS-DC for 14 days generated two distinct cell populations, T-10 and T-LPS respectively which have marked different abilities to proliferate in response to allogeneic mature DC. T-10 had a much lower proliferative capacity as compared to T-LPS, indicating a relative anergy of T-10, similarly to results reported by Gregori *et al*., [26]. Then, we analyzed the interactions between T-10 or T-LPS with DC. We found that T-LPS induced strong maturation of immature DC, whereas the effect of T-10 on this aspect was much less marked. We might envision that T-LPS as compared to T-10 express higher levels of activation markers crucial for DC maturation such as CD40L [33] and thus be the source of a stronger signal of maturation on DC. In addition, T-10 and T-LPS in their interaction with DC induce very different cytokine profiles**.** T-10 are associated with a high production of IL-6 and IL-10 and low IL-12 production, unlike T-LPS that induce a strong synthesis of IL-12 and IFN-γ indicating a Th1

orientation. These results suggested that the type of pre-activation of T cells could in turn modify the polarization of the DC.

Then we asked whether T-10 were endowed with regulatory capacities. We analyzed the effect of T-10 and T-LPS on the proliferation of naive $CD4^+$ T cells stimulated by allogeneic LPS-DC. The results appeared quite surprising. Although T-10 were relatively anergic to allogeneic restimulation, they did not suppress the proliferation of naive $CD4^+$ T cells, but on the contrary, led to a significant increase of their proliferation in the presence of mature DC. This result was in sharp contrast with that reported by Gregori *et al*., who in similar experimental model found an inhibition of about 70% [26] by analyzing ^{3}H-thymidine incorporation. However, in another more recent study these authors reported a lower inhibitory capacity of only 20% [34] by CFSE analysis. However, our results are consistent with the cytokine profile that resulted from the interaction of T-10 with DC. Indeed the high synthesis of IL-6 in the absence of TGF-β (which was analyzed in four independent experiments, data not shown) may inhibit Foxp3 gene transcription [35] and antagonize the differentiation of Tregs.

More surprisingly, T-10 as compared with T-LPS were not only non-regulatory cells but had also the ability to potentiate the proliferation of naive $CD4^+$ cells. Interestingly, mixing naive $CD4^+$ T cells with mature allogeneic DC and T-10 abolished anergy of these latter. This result suggested that responder $CD4^+$ T cells in the presence of mature DC produced cytokines such as IL-2 that reversed the anergy of T-10. In turn, these activated T-10 could produce cytokines to further activate naive $CD4^+$T cells. These results are in striking contrast with those of Gregori et al. [26]. It should be noted that the monocyte-derived DC-10 used by Gregori et al. were obtained by adherence to plastic, unlike those of our work which were derived from positive selection of $CD14^+$ cells by magnetic beads. It has been shown that the

selection method of monocytes influenced cytokine synthesis DC [36] which could have an effect on the functionality of T-10 and T-LPS.

Interestingly, and contrary to T-10, we observed that T-LPS strongly suppress the proliferation of autologous responding $CD4^+$ T cells. We may discuss the various phenomena responsible for this observation. Firstly, we may envision an artifact rather than immune regulation. Indeed, a depletion of nutrients in the culture medium by pre-sensitized T-LPS, which may have a proliferative advantage over naive $CD4^+$ and consume the elements of the medium necessary for proliferation of naive T cells. To exclude this hypothesis we added (Phytohaemagglutinin) PHA to a coculture of T-LPS with naive $CD4^+$ T cells and allogeneic DC. Under these conditions we noted that adding PHA in the medium induced a strong proliferation of both $CD4^+$ naive T cells and T-LPS. This result makes it unlikely the hypothesis of depletion of environmental resources. Of note, we showed that T-LPS strongly expressed both Foxp3 and CD25 at a high level after reactivation by mature DC. These data are consistent with several other studies which showed an expression of Foxp3 after activation of conventional human T cells [37]. Although, Foxp3 and CD25 are not absolutely specific of Treg in human, the presence of these two markers could call to mind a transient regulatory action of T-LPS. However, the strong proliferation T-LPS *in vitro* is an argument against their nature of Treg which are known to be poorly responsive to specific antigens.

Material and methods

Reagents

Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 50 IU/ml penicillin, 50 IU/ml streptomycin, 2mM L-Glutamine and 10% heat-inactivated FCS (Gibco). Recombinant human IL-4 and GM-CSF were supplied by Miltenyi Biotec (Paris,

France), IL-10 was obtained from R&D systems (Abingdon, United Kingdom) and lipopolysaccharide (LPS) from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

Generation of dendritic cells

The blood of healthy volunteers was obtained by cytapheresis after signed informed consent. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Lymphoprep, Oslo, Norway). Monocytes were purified from PBMC by positive selection using anti-CD14-conjugated magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Germany). Immature DC were generated by culturing monocytes for 5 days in complete medium supplemented with IL-4 (25ng/ml) and GM-CSF (100ng/ml) at 37°C in a humidified 5% CO2 atmosphere in the presence (DC-10) or not (iDC) of IL-10 (30ng/ml). Day 5-iDC were stimulated for additional 2 days with LPS (50 ng/ml) in order to obtain mature DC (LPS-DC). On day 7, DC were washed extensively with RPMI /10% FCS before further experiments. DC-10 were kept in the same culture medium from day 5 to day 7.

Isolation of T lymphocyte subpopulations

$CD4^+$ T cells were isolated from PBMC using anti-CD4-coated Dynabeads®, followed by Detachabeads® (Dynal, Compiegne, France) according to the manufacturer's instructions. The purity of $CD4^+$ T populations was >95%. Purified $CD4^+$ T cells were incubated with mouse anti-human CD25 antibody, (BD Biosciences) followed by a negative selection with anti-mouse IgG antibody-coupled magnetic beads (Dynal) in order to deplete $CD4^+CD25^+$ T cells to finally obtain purified naive $CD4^+CD25^-$ T cells.

Generation of T-10 and T-LPS

$CD4^+CD25^-$T cells were co-cultured for 14 days, at a ratio DC:T of 1:3 with either allogeneic DC-10 or LPS-DC to generate T-10 or T-LPS respectively. On day 7, 20 IU/ml of IL-2 were added to the co-culture. On D14, T-10 and T-LPS were selected using magnetic beads

coupled to anti-CD4 antibody (Dynal) and expressions of CD25, intranuclear Foxp3 and intracellular CTLA-4 molecules were analyzed by flow cytometry.

Co-cultures of T-10 or T-LPS with allogeneic DC

T-10 or T-LPS were cultured for 48h with iDC or LPS-DC issued from the donor used in the first phase of T cell prestimulation at a ratio DC:T of 1:3. Supernatants of the co-cultures were collected for measuring the synthesis of IL-10, IL-12, IL-6 and IFN-γ cytokines by ELISA. Analysis of the expression of maturation markers CD83 and CD25 among DC-SIGN positive cells was carried out by flow cytometry.

Antibodies and flow cytometry

A total of 10^5 cells were incubated with fluorescence-labeled conjugated mouse anti-human antibodies (mAbs) for 20 min at 4°C. The following mAbs were used for cytometric analysis: CD1a-APC (clone HI149, IgG1), CD16-FITC (clone 3G8, IgG1), CD25-APC (clone M-A251, IgG1), CD83-FITC (clone HB15e, IgG1), FoxP3-PE (clone PCH101, IgG2a) were purchased from BD Biosciences, CD80-PE (clone MAB104, IgG1), DC-SIGN-PE (clone AZND1, IgG1), CD14-PE (clone RMO52, IgG2a) and CD4-FITC (clone 13B8.2, IgG1) were purchased from BD. Data were analyzed for geometric mean fluorescence intensity (MFI) and for the percentage of marker-positive cells. For intracellular staining of Foxp3, T cells were fixed and permeabilized with a kit purchased from eBiosciences and subsequently stained for Foxp3 according to the manufacturer's protocols.

Measurement of $CD4^+$ T-cell proliferation

$CD4^+$ T cells were labeled with either carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) at a final concentration of 5 μM (Sigma-Aldrich) for 10 min at 37°C in 1 ml of PBS or with PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma-Aldrich) for 5 min at RT according to the manufacturer's protocol as mentioned. Co-cultures of DC with allogeneic CFSE-labeled $CD4^+$ cells were

performed at a ratio DC:T of 1:3 and the proliferation was analyzed at day 4, 5, 6 by FACS. To assess T cell regulatory functions, T-10 or T-LPS were stained with PKH26 then co-cultured in the presence or not of autologous CFSE-labeled $CD4^+$T cells and allogeneic LPS-DC issued from the donor used in the first phase of T cell prestimulation.

ELISA analysis of cytokine production

Determination of cytokine concentrations in culture supernatants was performed by ELISA according to the manufacturer's instructions. Reagents for IL-10, IL-12, IL-6 and IFN-γ measurements were obtained from eBiosciences (Montrouge, France). Samples were assayed in duplicate.

Statistical analysis

Data for each experiment were expressed as mean values ± SD and the results were analyzed for statistical significance using the non-parametric Mann-Whitney test. The level of significance was set at $p<0.05$.

REFRERENCES

1. **Lagaraine C**, **Lemoine R**, **Baron C**, **Nivet H**, **Velge-Roussel F**, **Lebranchu Y**. Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2008; **84**:1057–1064.DOI: 10.1189/jlb.1007716.

2. **Kazma I, Lemoine R, Herr F, Chadet S, Meley D, Velge-Roussel F, Lebranchu Y, *et al.*** Mycophenolic acid-treated dendritic cells generate regulatory CD4+ T cells that suppress CD8+ T cells' allocytotoxicity. *Int. Immunol.* 2014; **26**:173–181.DOI: 10.1093/intimm/dxt054.

3. **Roncarolo MG**, **Gregori S**, **Battaglia M**, **Bacchetta R**, **Fleischhauer K**, **Levings MK**. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 2006; **212**:28–50.DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x.

4. **van Maurik A van**, **Herber M**, **Wood KJ**, **Jones ND**. Cutting edge: CD4+CD25+ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8+ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2002; **169**:5401–5404.

5. **Piccirillo CA**, **Shevach EM**. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2001; **167**:1137–1140.

6. **Farias AS, Spagnol GS, Bordeaux-Rego P, Oliveira COF, Fontana AGM, de Paula RFO, Santos MPA, *et al.*** Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. *CNS Neurosci. Ther.* 2013; **19**:269–277.DOI: 10.1111/cns.12071.

7. **Mosser DM**, **Zhang X**. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol. Rev.* 2008; **226**:205–218.DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x.

8. **Groux H**, **Bigler M**, **de Vries JE**, **Roncarolo MG**. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 1996; **184**:19–29.

9. **Groux H**, **O'Garra A**, **Bigler M**, **Rouleau M**, **Antonenko S**, **de Vries JE**, **Roncarolo MG**. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997; **389**:737–742.DOI: 10.1038/39614.

10. **Akdis CA**, **Blaser K**. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology*. 2001; **103**:131–136.

11. **Maldonado RA**, **von Andrian UH**. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.* 2010; **108**:111–165.DOI: 10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5.

12. **Murray PJ**. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; **6**:379–386.DOI: 10.1016/j.coph.2006.01.010.

13. **Steinbrink K**, **Wölfl M**, **Jonuleit H**, **Knop J**, **Enk AH**. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 1997; **159**:4772–4780.

14. **Levings MK**, **Gregori S**, **Tresoldi E**, **Cazzaniga S**, **Bonini C**, **Roncarolo MG**. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood*. 2005; **105**:1162–1169.DOI: 10.1182/blood-2004-03-1211.

15. **Lu M**, **Dawicki W**, **Zhang X**, **Huang H**, **Nayyar A**, **Gordon JR**. Therapeutic induction of tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells in a mouse model of house dust mite-asthma. *Allergy*. 2011; **66**:612–620.DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02526.x.

16. **Henry E, Desmet CJ, Garzé V, Fiévez L, Bedoret D, Heirman C, Faisca P, *et al.*** Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2008; **181**:7230–7242.

17. **Lauw FN**, **Pajkrt D**, **Hack CE**, **Kurimoto M**, **van Deventer SJ**, **van der Poll T**. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2000; **165**:2783–2789.

18. **Tilg H, van Montfrans C, van den Ende A, Kaser A, van Deventer SJH, Schreiber S, Gregor M, *et al.*** Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut*. 2002; **50**:191–195.

19. **Blazar BR**, **Taylor PA**, **Smith S**, **Vallera DA**. Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow grafts. *Blood*. 1995; **85**. Available at: http://experts.umn.edu/en/publications/interleukin10-administration-decreases-survival-in-murine-recipients-of-major-histocompatibility-complex-disparate-donor-bone-marrow-grafts(55d81178-accc-4709-b78c-0359f9050195).html [Accessed January 1, 2016].

20. **Abraham S**, **Choi J**, **Ye C**, **Manjunath N**, **Shankar P**. IL-10 exacerbates xenogeneic GVHD by inducing massive human T cell expansion. *Clin. Immunol.* 2015; **156**:58–64.DOI: 10.1016/j.clim.2014.11.004.

21. **Calzada-Wack JC**, **Frankenberger M**, **Ziegler-Heitbrock HW**. Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages. *J. Inflamm.* 1996; **46**:78–85.

22. **te Velde AA**, **de Waal Malefijt R**, **Huijbens RJ**, **de Vries JE**, **Figdor CG**. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 1992; **149**:4048–4052.

23. **Wang ZQ**, **Bapat AS**, **Rayanade RJ**, **Dagtas AS**, **Hoffmann MK**. Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcgammaRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. *Immunology*. 2001; **102**:331–337.

24. **Eslick J**, **Scatizzi JC**, **Albee L**, **Bickel E**, **Bradley K**, **Perlman H**. IL-4 and IL-10 inhibition of spontaneous monocyte apoptosis is associated with Flip upregulation. *Inflammation*. 2004; **28**:139–145.

25. **Hashimoto SI**, **Komuro I**, **Yamada M**, **Akagawa KS**. IL-10 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2001; **167**:3619–3625.

26. **Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, Hauben E, *et al.*** Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. 2010; **116**:935–944.DOI: 10.1182/blood-2009-07-234872.

27. **Allavena P**, **Piemonti L**, **Longoni D**, **Bernasconi S**, **Stoppacciaro A**, **Ruco L**, **Mantovani A**. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.* 1998; **28**:359–369.DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<359::AID-IMMU359>3.0.CO;2-4.

28. **Ancuta P**, **Weiss L**, **Haeffner-Cavaillon N**. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur. J. Immunol.* 2000; **30**:1872–1883.DOI: 10.1002/1521-4141(200007)30:7<1872::AID-IMMU1872>3.0.CO;2-2.

29. **Velten FW**, **Duperrier K**, **Bohlender J**, **Metharom P**, **Goerdt S**. A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity in vitro. *Eur. J. Immunol.* 2004; **34**:2800–2811.DOI: 10.1002/eji.200324732.

30. **Becker L, Liu N-C, Averill MM, Yuan W, Pamir N, Peng Y, Irwin AD, *et al.*** Unique proteomic signatures distinguish macrophages and dendritic cells. *PloS One*. 2012; **7**:e33297.DOI: 10.1371/journal.pone.0033297.

31. **Gogolak P**, **Rethi B**, **Szatmari I**, **Lanyi A**, **Dezso B**, **Nagy L**, **Rajnavolgyi E**. Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARgamma. *Blood*. 2007; **109**:643–652.DOI: 10.1182/blood-2006-04-016840.

32. **Kimura A**, **Kishimoto T**. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 2010; **40**:1830–1835.DOI: 10.1002/eji.201040391.

33. **Würtzen PA**, **Nissen MH**, **Claesson MH**. Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. *Scand. J. Immunol.* 2001; **53**:579–587.

34. **Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, Guo B, *et al.*** Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* 2013; **19**:739–746.DOI: 10.1038/nm.3179.

35. **Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, Awasthi A, Dardalhon VA, Galileos G, Vollmar P, *et al.*** IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; **105**:18460–18465.DOI: 10.1073/pnas.0809850105.

36. **Elkord E**, **Williams PE**, **Kynaston H**, **Rowbottom AW**. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*. 2005; **114**:204–212.DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.02076.x.

37. **Morgan ME, van Bilsen JHM, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, *et al.*** Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.* 2005; **66**:13–20.DOI: 10.1016/j.humimm.2004.05.016.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: DC-10 had distinct morphologic characteristics and expressed membrane markers that distinguished them from both mature and immature conventional monocyte-derived dendritic cells. Dendritic cells were differentiated from monocytes with IL-4 and GM-CSF for 7 days in the presence (DC-10) or not (iDC) of IL-10. LPS was added for the last 2 days to obtain mature DC (LPS-DC). **A)** Expressions of CD16, CD14, CD1a, CD80, CD83 and CD25 markers were analyzed by flow cytometry. Data represent mean ± SD from ten donors for CD80, CD25, CD83 and five donors for CD16, CD14 and CD1a. NS (not significant), ** P <0.005, *** P <0.001 according to the statistical Mann-Whitney test. **B)** Analysis by electronic microscopy of DC-10, LPS-DC and iDC morphology (Zeiss ULTRA Plus).

Figure 2: IL-10 decreased allostimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells but induced production of IL-10. Naive $CD4^+$ CFSE-labeled T cells were cultured with allogeneic DC-10, LPS-DC or iDC (DC were from the same donor) at a ratio DC:T of 1:3. **A)** Proliferation of CD4+ T cells (CFSE dilution) was analyzed by flow cytometry. Representative results from one out of 3 independent donors. The percentages of proliferating cells in each condition are indicated. Cell types are mentioned above each graph. **B)** Levels of IL-10, IL-12p70 and IL-6 were measured by ELISA in culture supernatants at day-5. Each symbol represents a donor and the red bar represents the mean for 4 donors. NS (not significant), * P <0.05 according to the statistical test of Mann-Whitney.

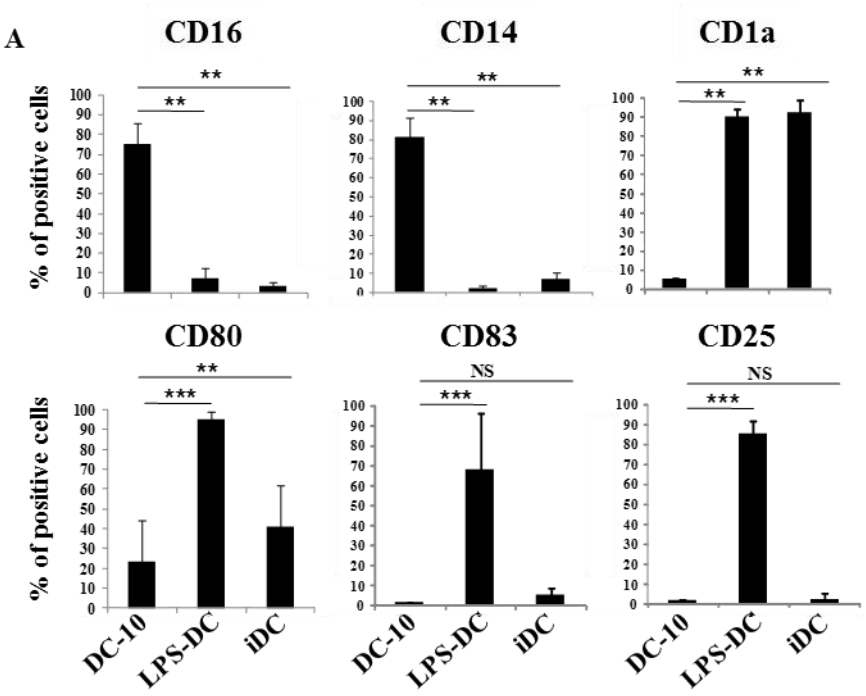
Figure 3: T cells preactivated with allogeneic DC-10 during 14 days did not respond to a secondary stimulation with LPS-DC contrary to T-cells preactivated with LPS-DC. CD4+ naive T cells were first stimulated with either allogeneic DC-10 (designated as T-10) or LPS-DC (T-LPS,) for 14 days. Both types of DC were from the same donor. **A)** Flow cytometry analysis of the expression of CD25 (left column), Foxp3 (middle column), and cytoplasmic CTLA-4 (right column) by the T-10 (first line) or T-LPS (second line). The corresponding isotype controls are shown by empty histograms. Result of 1 representative out of 3 experiments. **B)** T-10 or T-LPS were labeled with PKH26 and restimulated with allogeneic LPS-DC from the donor used for prior stimulation of naive CD4+ T cells at a ratio DC:T of 1:3. At day 5, T cell proliferation was analyzed by flow

cytometry in each condition. Histograms represented mean ± SD of PKH26^{low} positive cells in three independent experiments. *P <0.05 (Mann-Whitney test).

Figure 4: T-10 induced a weak expression of maturation markers and strong IL-6 production by iDC whereas T-LPS induced IL-12 and IFN-γ productions. T-10 or T-LPS were cocultured with allogeneic iDC or LPS-DC from the donor used in the first phase of prestimulation of T-10 or T-LPS at a ratio DC:T of 1:3. **A) and B)** After 2 days, cells were harvested and the expression of maturation markers (CD83, CD25 and CD80) (full histograms) was analyzed by flow cytometry. Empty histograms represented isotype controls and percentage of positive cells for each marker is indicated on the graph. One out of 4 representative experiments is presented. **C) and D)** After 2 days, supernatants were harvested for assaying IL-10, IL-12, IL-6 and IFN-γ cytokines by ELISA. Each symbol represents a donor and the bars represent the mean ± SD (n = 4). *p<0.05 by Mann-Whitney test. NS: Not Significant.

Figure 5: T-10 had no regulatory capacity but rather potentiated allo-proliferation of naive CD4$^+$ T-cells. Naive CD4$^+$ T cells were prestimulated with allogeneic DC-10 (T-10) or LPS-DC (T-LPS) for 14 days as previously described. T-10 and T-LPS were then labeled with PKH26 and mixed with naive autologous CFSE-labeled CD4$^+$ T cells and allogeneic LPS-DC (from the donor used in the first phase of prestimulation). Ratios T:T and DC:T were 1:1 and 1:3 respectively. Five days later, cells were harvested and analyzed by flow cytometry. A) Representation of CFSE/PKH26 labeling for one donor out of 3 tested with percentages of cells in each quadrant indicated. **B)** Fraction of proliferating cells for each subpopulation was calculated using formula indicated in materials and methods. Each symbol represents an independent donor and bars represent the mean ± SD of percentages of proliferating cells in each specified condition. NS (not significant), *p<0.05 (by Mann-Whitney test).

Figure 1


A
CD16
CD14
CD1a
CD80
CD83
CD25
% of positive cells
**
***
NS
DC-10
LPS-DC
iDC

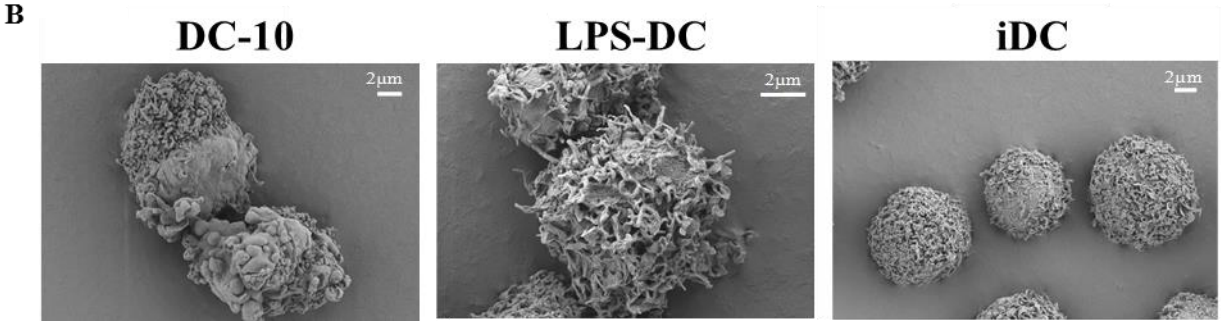

B
DC-10
LPS-DC
iDC
2μm

Figure 2

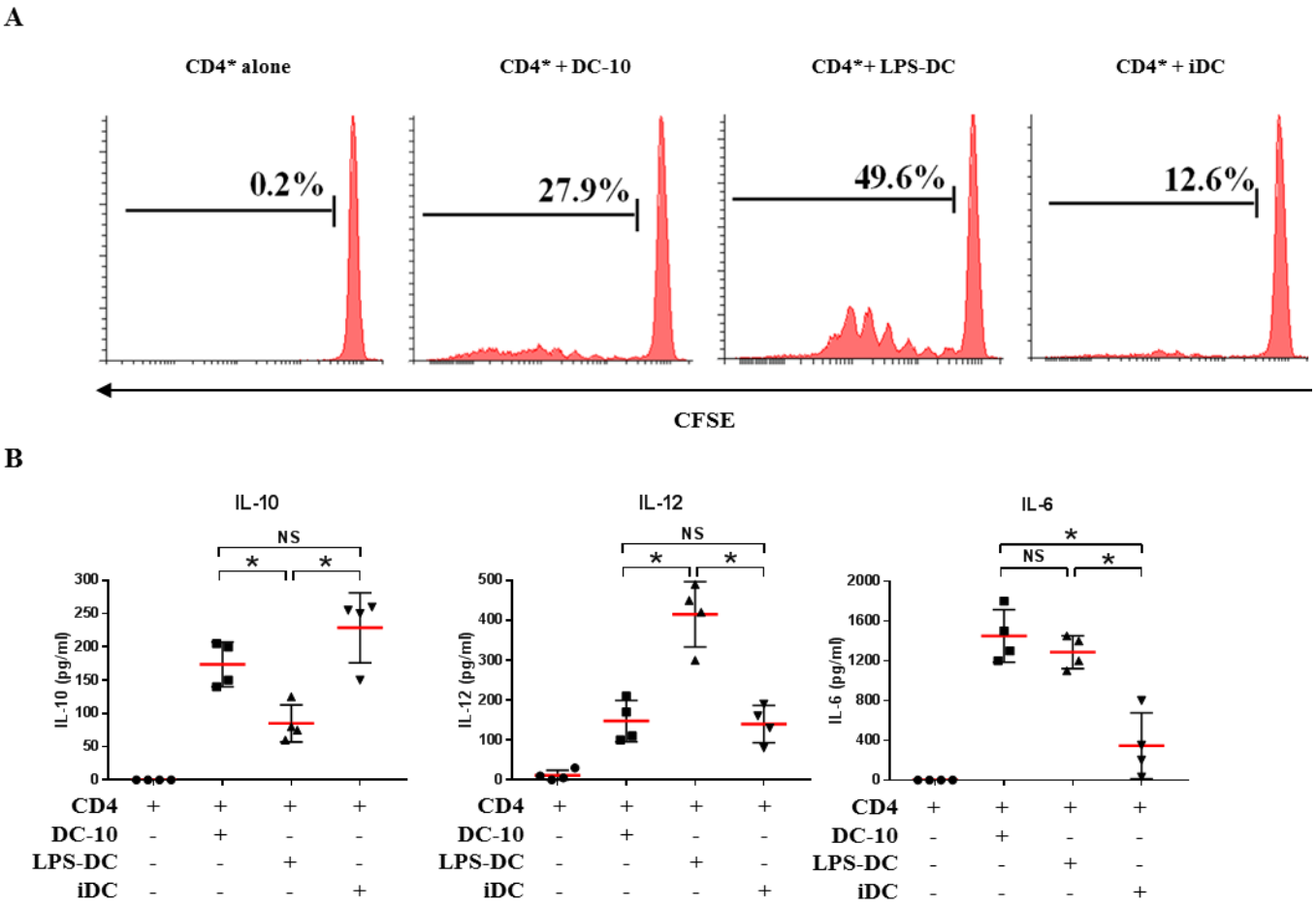
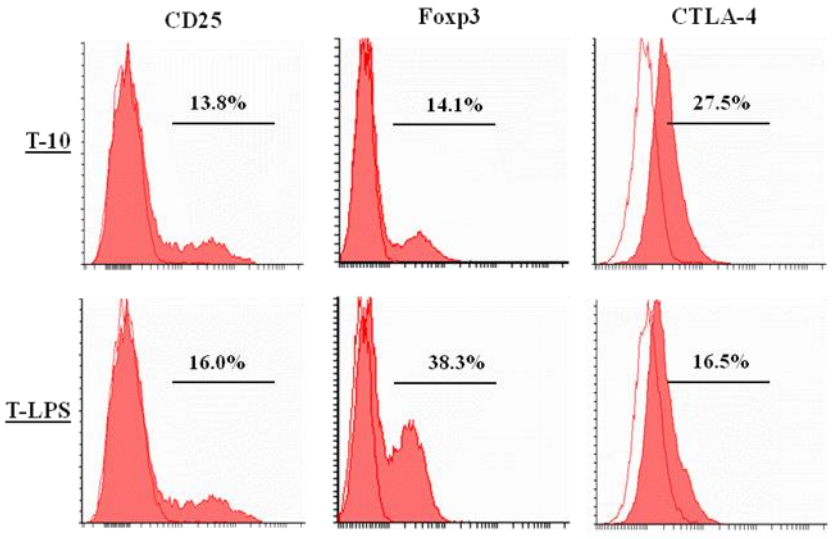

A
CD4* alone
CD4* + DC-10
CD4*+ LPS-DC
CD4* + iDC
0.2%
27.9%
49.6%
12.6%
CFSE
B
IL-10
IL-12
IL-6
IL-10 (pg/ml)
IL-12 (pg/ml)
IL-6 (pg/ml)
NS
*
CD4
DC-10
LPS-DC
iDC

Figure 3

A


CD25
Foxp3
CTLA-4
T-10
13.8%
14.1%
27.5%
T-LPS
16.0%
38.3%
16.5%

B

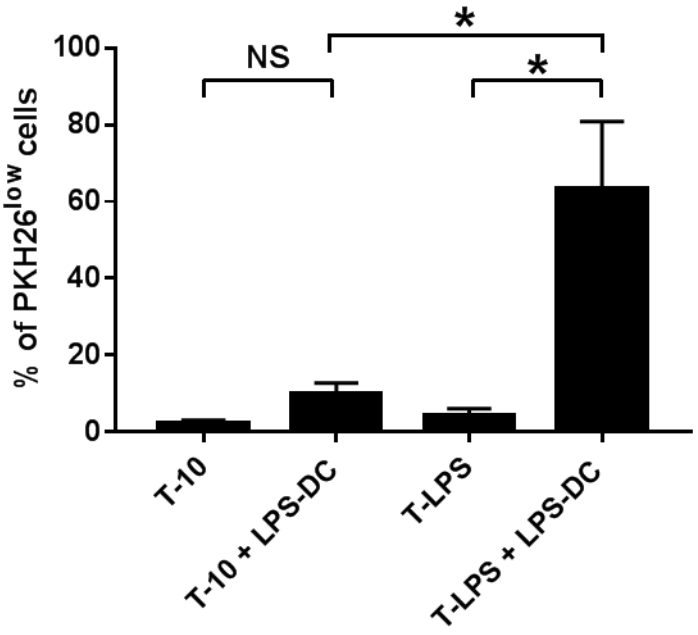

% of PKH26low cells
100
80
60
40
20
0
NS
*
*
T-10
T-10 + LPS-DC
T-LPS
T-LPS + LPS-DC

Figure 4

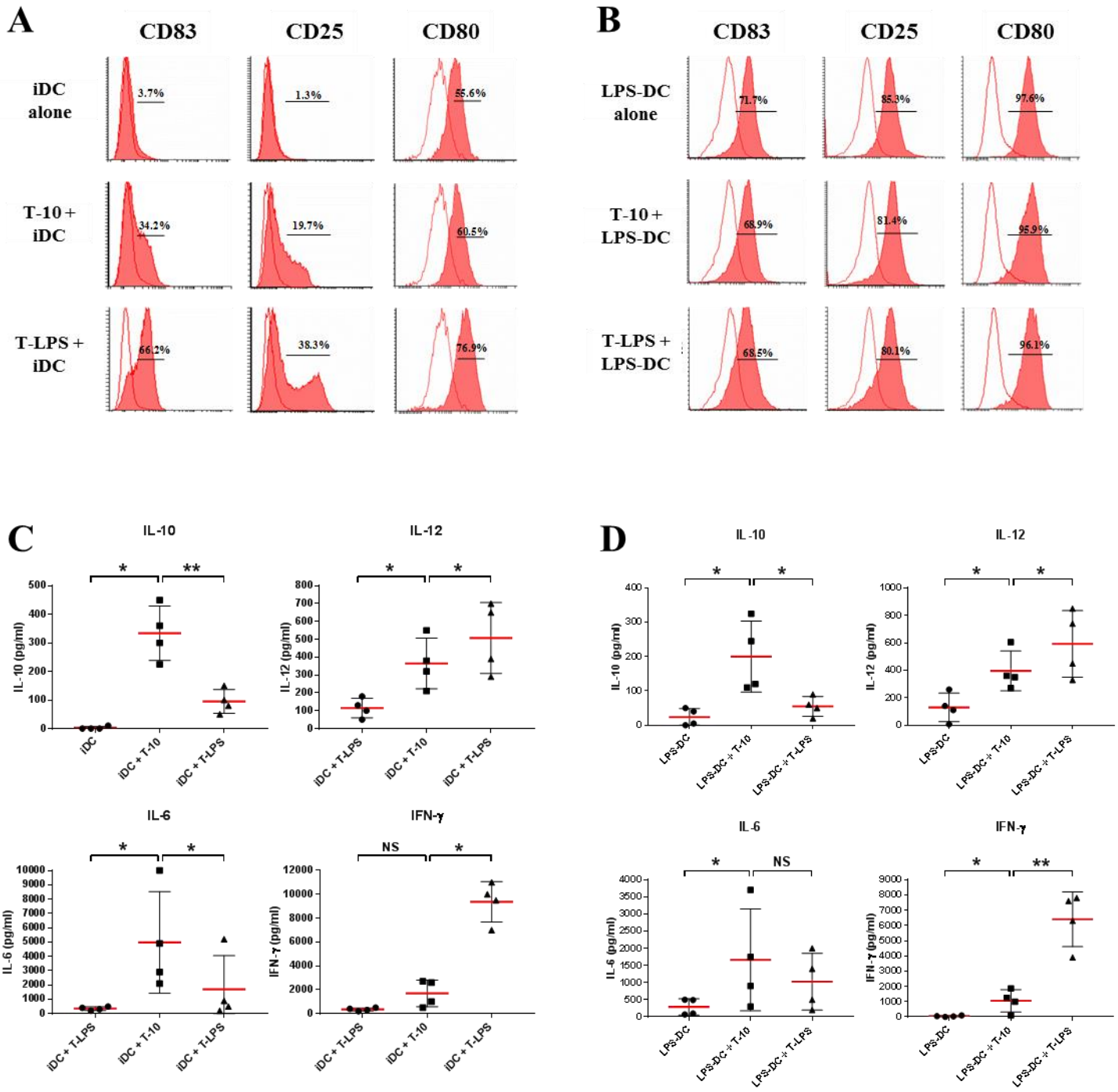
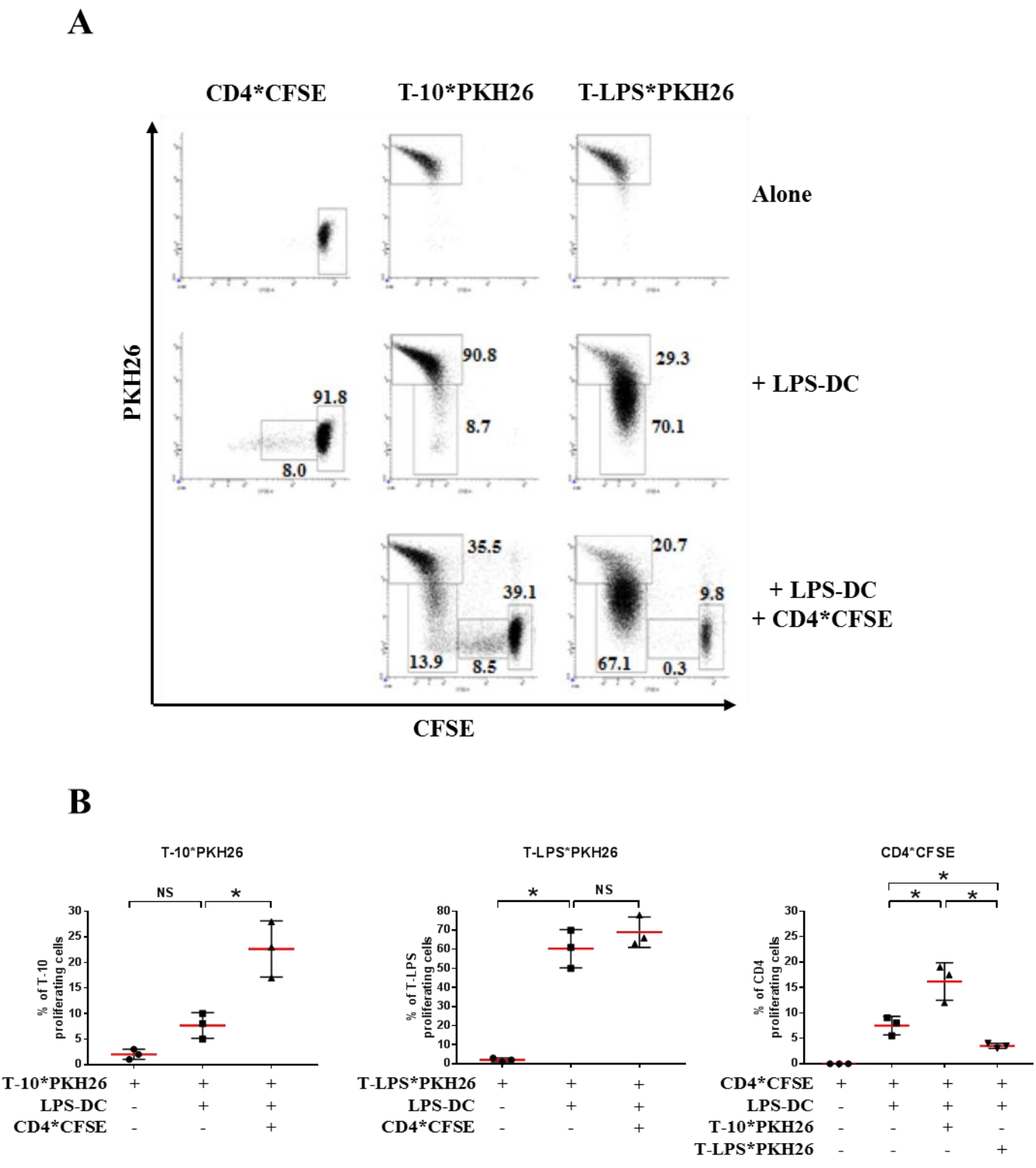

A
CD83
CD25
CD80
iDC alone
3.7%
1.3%
55.6%
T-10 + iDC
34.2%
19.7%
60.5%
T-LPS + iDC
66.2%
38.3%
76.9%
B
CD83
CD25
CD80
LPS-DC alone
71.7%
85.3%
97.6%
T-10 + LPS-DC
68.9%
81.4%
95.9%
T-LPS + LPS-DC
68.5%
80.1%
96.1%
C
IL-10
IL-10 (pg/ml)
iDC
iDC + T-10
iDC + T-LPS
IL-12
IL-12 (pg/ml)
iDC + T-LPS
iDC + T-10
iDC + T-LPS
IL-6
IL-6 (pg/ml)
iDC + T-LPS
iDC + T-10
iDC + T-LPS
IFN-γ
IFN-γ (pg/ml)
NS
iDC + T-LPS
iDC + T-10
iDC + T-LPS
D
IL-10
IL-10 (pg/ml)
LPS-DC
LPS-DC + T-10
LPS-DC + T-LPS
IL-12
IL-12 (pg/ml)
LPS-DC
LPS-DC + T-10
LPS-DC + T-LPS
IL-6
IL-6 (pg/ml)
NS
LPS-DC
LPS-DC + T-10
LPS-DC + T-LPS
IFN-γ
IFN-γ (pg/ml)
LPS-DC
LPS-DC + T-10
LPS-DC + T-LPS

Figure 5


A
CD4*CFSE
T-10*PKH26
T-LPS*PKH26
Alone
+ LPS-DC
+ LPS-DC
+ CD4*CFSE
PKH26
CFSE
91.8
8.0
90.8
8.7
29.3
70.1
35.5
39.1
13.9
8.5
20.7
9.8
67.1
0.3
B
T-10*PKH26
T-LPS*PKH26
CD4*CFSE
% of T-10 proliferating cells
% of T-LPS proliferating cells
% of CD4 proliferating cells
NS
*
T-10*PKH26 + + +
LPS-DC - + +
CD4*CFSE - - +
T-LPS*PKH26 + + +
LPS-DC - + +
CD4*CFSE - - +
CD4*CFSE + + + +
LPS-DC - + + +
T-10*PKH26 - - + -
T-LPS*PKH26 - - - +

Annexe 3 : Manuscrit d'article publié en deuxième auteur (travaux collaboratifs)

CMV--infected kidney grafts drive the expansion of blood-- borne CMV--specific T cells restricted by shared class I HLA molecules *via* presentation on donor cells

Philippe Gatault[1,2] | Sally Al-Hajj[1] | Johan Noble[1,2] | Eloi Chevallier[1,2] | Marie Piollet[1] | Catherine Forconi[1] | Catherine Gaudy-Graffin[3] | Gilles Thibault[4] | Elodie Miquelestorena-Standley[1,5] | Jean-Michel Halimi[1,2] | Matthias Büchler[1,2] | Roxane Lemoine[1] | Christophe Baron[1,2]

Am J Transplant. 2018;18:1904–1913

Received: 9 September 2017 | Revised: 16 January 2018 | Accepted: 18 January 2018

DOI: 10.1111/ajt.14672

ORIGINAL ARTICLE

CMV--infected kidney grafts drive the expansion of blood-- borne CMV--specific T cells restricted by shared class I HLA molecules *via* presentation on donor cells

Philippe Gatault[1,2] | Sally Al-Hajj[1] | Johan Noble[1,2] | Eloi Chevallier[1,2] | Marie Piollet[1] | Catherine Forconi[1] | Catherine Gaudy-Graffin[3] | Gilles Thibault[4] | Elodie Miquelestorena-Standley[1,5] | Jean-Michel Halimi[1,2] | Matthias Büchler[1,2] | Roxane Lemoine[1] | Christophe Baron[1,2]

[1]EA4245 T2I Transplantation Immunologie Inflammation, University of Tours, Tours, France

[2]Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU de Tours, Tours, France

[3]Laboratory of Bacteriology and Virology Tours, CHRU de Tours, Tours, France

[4]Laboratory of Immunology Tours, CHRU de Tours, Tours, France

[5]Department of Pathology, CHRU de Tours, Tours, France

Correspondence
Philippe Gatault
Email: philippe.gatault@univ-tours.fr

We aimed to determine the role of cytomegalovirus (CMV)--infected donor cells in the development of a CMV--specific immune response in kidney transplant recipients. We assessed the CMV pp65--specific immune response by using interferon--ɣ ELISPOT and dextramers in peripheral blood mononuclear cells from 115 recipients (D+R− 31, D+R + 44, D−R + 40) late after transplantation (mean 59 ± 42 months). Receiving a kidney from a D+ donor resulted in a higher number of IFN--ɣ--producing anti--CMV T cells (P = .004). This effect disappeared with the absence of shared HLA class I specificities between donors and recipients (P = .430). To confirm the role of donor cells in stimulating the expansion of newly developed CMV--specific $CD8^+$ T cells after transplantation, we compared the number of HLA--A2–restricted CMV--specific $CD8^+$ T cells in primo--infected recipients who received an HLA--A2 or non–HLA--A2 graft. The median of anti--CMV pp65 T cells restricted by HLA--A2 was very low for patients who received a non–HLA--A2 graft vs an HLA--A2 graft (300 [0--14638] vs. 17972 [222--85594] anti--CMV pp65 $CD8^+$ T cells/million $CD8^+$ T cells, P = .001). This adds new evidence that CMV--infected kidney donor cells present CMV peptides and drive an inflation of memory CMV--specific $CD8^+$ T cells, likely because of frequent CMV replications within the graft.

KEYWORDS

antigen presentation/recognition, basic (laboratory) research/science, complication: infectious, infection and infectious agents – viral: Cytomegalovirus (CMV), infectious disease, kidney transplantation/nephrology, translational research/science

Abbreviations: APC, antigen-presenting cell; CMV, cytomegalovirus; D−/R+CMV, seronegative donor/seropositive recipient; D+/R+CMV, seropositive donor/seropositive recipient; D+/R−CMV, seropositive donor/seronegative recipient; Grz-B, granzyme B; HLA-I, class I human leukocyte antigen; IFN-ɣ, interferon-gamma; KTR, kidney transplant recipient; MCMV, mouse

cytomegalovirus; SLO, secondary lymphoid organ; T_{CM}, central memory T cell; T_{EFF}, effector T cell; T_{EM}, effector memory T cell; T_{EMRA}, terminally differentiated effector memory T cell; TNF-α, tumor necrosis Factor-alpha; T_{RM}, resident memory T cell.

1 | INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (CMV) is a ubiquitous herpes virus that infects 50--90% of people in the United States and Europe, usually during childhood.[1,2] Following primary infection, a large and powerful anti--CMV immune response, involving both innate and adaptive components, leads to resolution of the acute primary infection and confines it to a restricted number of cells in a latent state.[3] Thus, CMV is not eliminated and persists life--long in its host, with a dynamic subtle equilibrium established between the virus, which needs to multiply to be shed in secretions and to disseminate to a new host, and the anti--CMV immune response.

CMV--specific human leukocyte antigen I (HLA--I)--restricted $CD8^+$ T cells are an important component of the anti--CMV response after organ transplantation.[4] Most blood--borne CMV--specific $CD8^+$ T cells consist of terminally differentiated effector T cells, also called memory inflation T cells (T_{EFF}, T_{EMRA}), and a minority of central memory T cells (T_{CM}) and effector memory T cells (T_{EM}). T_{EFF} cells are endowed with immediate effector function but have a short life span.[4] They are continuously replenished by human CMV--specific T_{CM} or T_{EM} subsets, which divide and differentiate after occasional antigen stimulation by non--haematopoietic cells.[4] These cells, along with resident memory T cells (T_{RM}), participate in the immune surveillance in latently infected organs.[4,5]

In transplant patients, the use of immunosuppressive drugs and highly frequent events promoting the exit of latency, such as ischemia--reperfusion, sepsis, and alloreactivity, deeply affect the course of CMV infection. In addition, different situations can be encountered depending on the donor and recipient CMV status. First, latent recipient CMV can be reactivated in the R+ recipient regardless of the donor CMV status. Second, donor CMV reactivation can lead to a reinfection in the D+R+ recipient because CMV is able to establish a secondary persistent infection despite the previous CMV infection and memory CMV--specific immune response,[6,7] or primary infection in the D+R− recipient. We previously re-ported donor CMV positivity as a risk factor of graft loss, espe-cially in CMV--infected recipients (D+R+).[8] Also, CMV is commonly detected in transplanted kidneys from CMV--positive donors[9,10] and replication of CMV within kidney grafts is associated with a poor clinical outcome.[9,11] In addition, we showed that the delete-rious effect of donor CMV positivity on kidney graft outcome was mainly observed in kidney transplant recipients with full HLA--I mis-match with their donors or with a strong post--transplant reduction in $CD8^+$ T cell number.[8] More recently, we reported that a poly-morphism in programmed cell death--1 (*PDCD-1*) gene affected the specific CMV immune response and the survival of CMV--infected grafts.[12] Altogether, these data suggest that anti--CMV CD8 T cells have an important role in controlling CMV replication within the kidney graft and preventing chronic damage.

The effect of donor CMV infection on the CMV--specific T cell response is not yet well known. In addition, the role of CMV--infected donor cells in the development of the CMV immune response remains poorly understood. In this retrospective cross--sectional study of kidney

transplant patients, we report that donor CMV infection deeply affects the CMV--specific immune response. This effect requires HLA--I matching between the donor and recipient. Finally, we provide some evidence that donor--shared HLA--I is crucial for the development of CMV--specific $CD8^+$ T cells.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

In this study, we enrolled 115 kidney transplant adult recipients exposed to CMV (D+ and/or R+) who were followed up at Tours University Hospital. Samples were obtained when CMV disease was not suspected, at least one year after transplantation.

Initial immunosuppression involved methylprednisolone, polyclonal antilymphocyte globulins (Thymoglobuline) or basiliximab. The maintenance immunosuppressive regimen was mycophenolate mofetil or enteric--coated mycophenolate sodium, cyclosporine, tacrolimus, mammalian target of rapamycin inhibitors (sirolimus or everolimus) and prednisone as previously described.[13]

Recipients with the highest risk of CMV disease (D+R−) received prophylaxis with aciclovir or valaciclovir (1995--2003) or valganciclovir (2004--2015) for three to six months in the ab-sence of contraindications and severe adverse events. Recipients with low risk of CMV disease (R+) received preemptive ther-apy until 2008. After 2009, all CMV--positive recipients received prophylaxis with valganciclovir for three months, except D−R+ recipients receiving basiliximab. From 1995 to 2012, the di-agnosis of systemic CMV infection relied on CMV pp65 an-tigenemia and thereafter was based on PCR of whole blood (Abbott RealTime), with results calibrated according to WHO standards and expressed in log international units per millilitre -(IU/mL) whole blood. The threshold of detection of the assay was 1.79 log IU/mL Antiviral drugs were used for asymptomatic patients with CMV pp65 antigenemia >50 stained neutrophils per milliliter or CMV load >4 log IU/mL and when CMV viremia was associated with attributable symptoms (CMV syndrome or tissue--invasive disease) according to the American Society of Transplantation,[14] regardless of level of CMV viremia.

2.2 | Cell preparation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained after informed signed consent. Cells were isolated from whole blood by Ficoll hypaque density--gradient (Lymphoprep; AbCys). After two washes in RPMI--1640 medium, PBMCs were suspended and incubated for functional assays.

2.3 | Measurement of cytokine production after CMV pp65 stimulation (ELISPOT)

Plates were coated with interferon--ɣ (IFN--ɣ; Mabtech 3420--2APW--Human--IFN--ɣ ELISpot PRO kit), tumor necrosis

factor--α (TNF--α; Mabtech 3510--2AW--Plus--Human--TNF--α ELISpot PRO kit) or both IFN--ɣ and granzyme B (Grz--B; Mabtech 3485--2AW--Plus--Human--Grz--B ELISpot Plus kit) for detecting anti-- CMV plurifunctional T cells, to test each response in duplicate. After one wash with phosphate buffered saline (PBS; ref. 20452335), fresh or freeze--thawed isolated PBMCs were incubated for 24 hour at 37°C with human CMV pp65 peptide mix (15 μmol/L, Peptivator CMV--pp65 130--093--438; Miltenyi Biotech) in 96--well plates (1.10^5 PBMCs per well). Anti--CD3 antibody and medium alone were positive and negative controls, respectively. Plates were then washed twice with PBS and twice with PBS--0.05% Tween. Then, 80 μL biotinylated anti--IFN--ɣ, anti--TNF--α, or anti--Grz--B was added at 1:500, 1:250, and 1:1000 dilution, respectively, for 30--minute incubation at room temperature. Then plates were washed three times with PBS-- 0.05% Tween before incubation with streptavidine--FITC solution at 1:1000 dilution for 30 minutes at room temperature. Finally, plates were washed twice with PBS--0.05% and twice with distilled water after the last incubation with adequate substrate solutions (15 min-ute for Grz--B and TNF--α and 5 minute for IFN--ɣ). Analysis involved use of ImmunoSpot Counter (CTL--ImmunoSpot S6 FluoroSpot line, Cleveland, OH, USA). The number of spots was expressed per mil-lion PBMCs or per million lymphocytes. Data for the negative control wells were subtracted from that for wells containing the stimulated responder cells.

2.4 | Measurement of anti--CMV pp65 $CD8^+$ T cells

The number of CMV--specific $CD8^+$ T cells was determined in HLA--A2 kidney transplant recipients by using PE--labelled dextramers (Immudex, Denmark) loaded with HLA--A*0201 immunogenic CMV pp65--derived peptide (amino acids 465--503, NLVPMVATV). A total of 1.10^6 PBMCs in 50 μL PBS was incubated with 10 μL dextram-ers for 10 minutes at room temperature in 96--well plates as per the manufacturer's instructions. A dextramer loaded with an irrelevant peptide was a negative control. A minimum of 1.10^5 cells was acquired with use of a FACSCanto cytometer (BD Biosciences) and the proportion of positive cells was determined with use of Diva soft-ware (BD Biosciences). The number of cells stained with a dextramer loaded with an irrelevant peptide was subtracted from the number of positive cells.

2.5 | Statistical analysis

Data are expressed as number (%) or mean ± SD for normally distributed variables and median (range [5th--95th centiles]) for non--normally distributed variables. Qualitative data were com-pared by chi--square test and quantitative data by Mann–Whitney test. For correlation analysis, we calculated the IFN--ɣ spot-- forming $CD8^+$ T cell slopes in D+R−, D+R+, and D−R+ cases by linear regression analysis. Statistical analyses involved use of XLSTAT 2016.4 (Addinsoft). $P < .05$ was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Patients' characteristics

The characteristics of donors and recipients at the time of transplantation and at three--month follow--up are in Table 1 for all recipients (n = 115) and for D+R− (n = 31), D+R+ (n = 44), and D−R+ recipients (n = 40). Otherwise, prophylaxis was more often given to D+R+ than D−R+ recipients (57% vs. 33%, $P = .025$). No other significant differ-ence was observed (Table 1). The frequency of CMV viremia (n = 55) and CMV disease (n = 10) was greater for D+R− than other recipi-ents but similar for D+R+ and D−R+ recipients. CMV prophylaxis was based on valganciclovir for all patients except 3 D+R− patients who received valaciclovir.

3.2 | Donor CMV infection drives the expansion of CMV pp65--responsive blood--borne T cells

We analyzed the T cell response to CMV pp65 stimulation accord-ing to donor CMV serology in CMV--positive recipients (44 D+R+ and 40 D−R+) and 17 D+R− patients. The median [range] number of IFN--ɣ--producing cells was higher for D+R+ than D−R+ recipi-ents whether expressed per million T cells (3234 [850--9311] vs. 1983 [101--8585] spots/10^6 $CD3^+$ T cells, $P = .004$) or per blood volume unit (4508 [726--12718] vs. 2069 [75--12782] spots/mL blood, $P = .003$) (Figure 1). Only two CMV diseases were observed in R+ patients, both D+R+. The CMV diseases occurred 2.5 and 6.9 years before the time of sampling, and the number of spots at the time of sampling was 1184 and 2188 spots/ml blood. Finally, the CMV--specific immune response in D+R+ recipients reached the level observed in D+R− recipients (4508 [726--12718] vs. 6343 [805--14900] spots/ml blood, $P = .550$). The number of IFN--ɣ-- producing cells was not affected by a history of viremia in differ-ent groups (data not shown).

In a subgroup of 35 CMV--positive recipients (20 D+R+ and 15 D−R+), we could assess the number of cells producing TNF--α, IFN--ɣ, Grz--B or both IFN--ɣ and GzB (the later considered polyfunctional T cells). Results were similar to those described above, with a higher median number of cells producing IFN--ɣ for CMV--positive than CMV--negative donors (4508 [726--12718] vs. 1025 [0--6019] spots/mL blood, $P = .011$). The median number of cells producing TNF--α, GzB or both IFN--ɣ and GzB was higher for D+R+ than D−R+ recipients, although not statistically significant (5334 [0--15429] vs. 2896 [0--9737] spots/mL blood, $P = .069$ for TNF--α; 1376 [0--5191] vs. 579 [0--6585] spots/mL blood, $P = .067$ for Grz--B; 705 [0--2573] vs. 101 [0--4251] spots/mL blood, $P = .069$ for polyfunctional T cells). Results were similar if expressed per mil-lion T lymphocytes (data not shown).

These results indicate that transplanting kidneys from CMV--infected donors resulted in an expansion of CMV pp65--responsive blood--borne memory T cells in CMV--seropositive recipients. Knowing that most of the responding T cells in CMV--pp65 ELISPOT

TA B LE 1 Baseline characteristics

	All (n = 115)	D+R− (n = 31)	D+R+ (n = 44)	D−R+ (n = 40)	D+R− vs. D+R+	D+R+ vs. D−R−	D+R− vs. D−R+
Donor characteristics							
Age (y)	57.3= 15.7	54.2 = 17.3	59.6 = 15.3	57.1= 14.7	0.218	0.262	0.536
Male sex (%)	57.5	54.8	51.1	60.0	0.749	0.411	0.909
Living (%)	95.8	0	6.7	5.0	0.266	1.000	0.501
Recipient characteristics							
Age (y)	53.9 = 14.7	50.4 = 15.6	55.8 = 13.9	54.4= 14.4	0.140	0.333	0.311
Male sex (%)	59.2	67.7	62.2	52.5	0.621	0.365	0.195
Sensitized (%)	31.7	35.4	26.7	40.0	0.411	0.556	0.792
Graft characteristics at the time of transplantation							
First graft (%)	81.7	83.9	88.9	80.0	0.525	0.256	0.676
Preemptive transplantation (%)	13.3	9.7	11.1	20.0	1.000	0.256	0.327
HLA class AB mismatch	2.5± 1.1	2.4 ± 1.2	2.7± 0.1	2.4± 1.0	0.305	0.035	0.346
HLA class DR mismatch	1.0± 0.7	1.0 ± 0.8	1.0± 0.7	1.0± 0.6	0.674	0.380	0.870
DGF (%)	8.3	6.4	4.4	12.5	1	0.246	0.457
Cold ischemia (h)	16.9 ± 6.7	19.9 ± 6.6	16.1± 7.3	17.1 ± 6.1	0.44	0.794	0.813
Initial immunosuppressive regimen							
Antithymocyte globulins (%)	45	35.5	54.5	37.5	0.103	0.118	0.861
Interleukin 2 receptor antagonists (%)	51.7	54.8	48.9	57.5	0.610	0.427	0.823
Cyclosporin (%)	22.5	25.8	28.9	15.0	0.768	0.125	0.256
Tacrolimus (%)	74.2	74.2	64.4	82.5	0.639	0.061	0.291
MMF or EC--MPS (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	1.000	1.000	0.395
mTOR inhibitors (%)	5.0	3.2	8.9	2.5	0.643	0.364	1.000
Clinical and biochemical variables at 3 months							
Systolic arterial pressure (mmHg)	140 ±14	137 ± 13	141 ± 13	140 ±15	0.232	0.329	0.595
Diastolic arterial pressure (mmHg)	78 ± 10	81 ± 9	79 ± 9	76 ± 11	0.291	0.315	0.111
Serum creatinine level (μmol/L)	139 ±44	131 ± 47	146 ± 46	139 ±38	0.112	0.282	0.187
Proteinuria (g/d)	0.4± 0.5	0.3 ± 0.3	0.4± 0.4	0.4± 0.8	0.17	0.229	0.679
BPAR (%)	24.2	19.4	28.9	22.5	1.000	0.502	0.747
CMV--related data							
CMV prophylaxis	60	100	56.8	32.5	**0.0001**	**0.025**	**<0.0001**
CMV viremia (%)	47.8	58.1	45.5	42.5	0.282	0.785	0.193
Interval transplantation--first viremia (mo)	5.6± 4.9	7.1 ± 3.3	5.7± 6.1	4.0± 4.0	0.093	0.692	**0.009**

(Continues)

TA B LE 1 (Continued)

	All (n = 115)	D+R− (n = 31)	D+R+ (n = 44)	D−R+ (n = 40)	D+R− vs. D+R+	D+R+ vs. D−R−	D+R− vs. D−R+
First viremia occurring during the first posttransplant year (%)	88.2	94.4	90.0	88.2	1.000	1.000	0.603
CMV disease (%)	8.7	25.9	4.5	0.0	**0.013**	0.495	**0.001**
Interval transplantation--blood sampling (mo)	59 ± 42	70 ± 53	57 ± 36	50 ± 32	0.329	0.199	0.282

Bold indicates $P < .05$.

D+, CMV--positive donor; D−, CMV--negative donor; R+, CMV--positive recipient; R−, CMV--negative recipient; HLA, human leukocyte antigen; DGF, delayed graft function; MMF, mycophenolate mofetil; BPAR, Biopsy-proven acute rejection; CMV, cytomegalovirus; EC--MPS, enteric--coated mycophenolate sodium; mTOR, mammalian target of rapamycin.

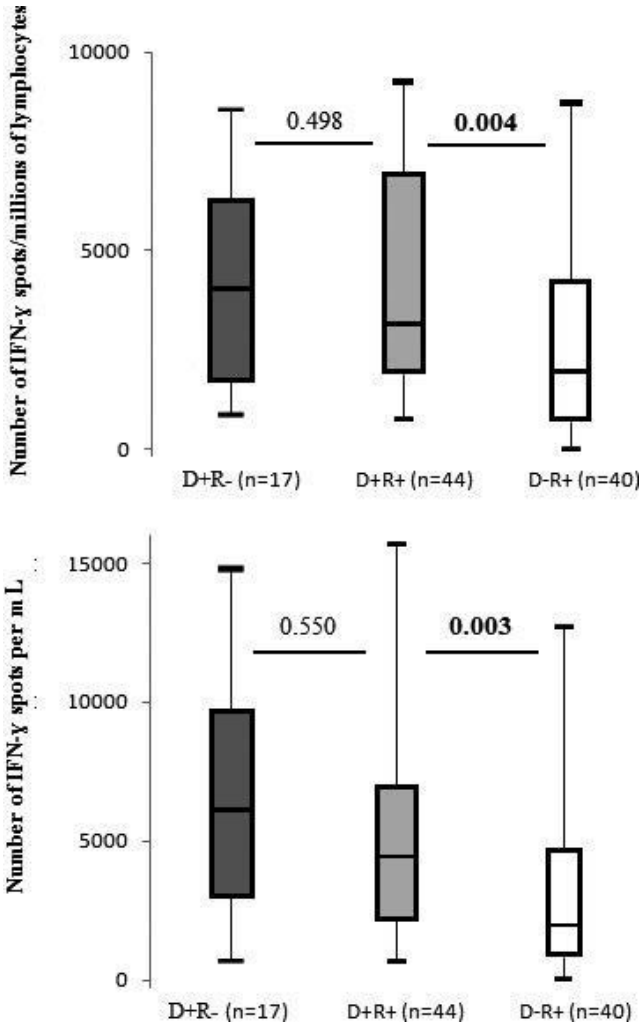
assays are $CD8^+$ memory T cells, as reported by Calarota et al.[15] and personal results (data not shown), we strongly suggest that the ex-pansion of CMV--specific $CD8^+$ memory T cells was driven by a CMV-- infected kidney.

3.3 | Expansion of CMV--specific T cells in D+R+ requires HLA class I matching

Our finding that receiving kidney from a D+ donor increased the number of CMV--responsive T cells in R+ recipients raises the issue of how viral peptides originating from CMV--infected transplants are presented to $CD8^+$ T cells and leads to questioning the role of the kidney in the development of the CMV immune response. So far, the extent to which donor cells directly present CMV antigens to recipi-ent $CD8^+$ T cells is poorly understood. Indeed, viral peptides from a CMV--infected graft can be taken up by recipients' antigen--presenting cells (APCs), then carried to secondary lymphoid organs (SLOs) to ac-tivate T cells or, alternatively, can be directly presented by the donor HLA--I within the kidney to activate $CD8^+$ T cells. With this latter hy-pothesis, donor CMV infection should not increase the number of CMV--specific $CD8^+$ T cells in full HLA--I--mismatched patients.

To this end, we assessed the number of CMV--responsive T cells in D−R+ and D+R+ recipients according to HLA--I matching between a donor and recipient (Figure 2), namely, recipients shar-ing at least one HLA class I (A or B) identity with donors (referred to as "no full HLA--I--mismatched recipients") and in full HLA--I-- mismatched recipients. Donor CMV seropositivity did not affect the number of IFN--ɣ--producing cells in full HLA--I--mismatched R+ recipients (2505 [1055--6818] vs. 3651 [143--5961] spots/10^6 $CD3^+$ cells, P = .430). In contrast, the anti--CMV response was stron-ger in HLA--I (partial) matched D+R+ than D−R+ recipients (3245 [824--12999] vs. 1791 [111--8614] spots/10^6 CD3 + cells, P = .003) (Figure 2). Analysis ofthe absolute number of CMV--responsive T cells per milliliter whole blood led to similar results (4090 [962-- 12581] vs. 3468 [495--10621] spots/mL, P = .465 with full HLA--I mismatch; 4939 [710--12998] vs. 1987 [165--13550] spots/mL, P = .002 with HLA--I partial match).

FI G U R E 1 Donor cytomegalovirus (CMV) positivity is associated with stronger anti--CMV response. Interferon ɣ (IFN--ɣ) production in response to CMV pp65 stimulation in 17 D+R−, 44 D+R+, and 40 D+R− recipients. Data are expressed as number of spots per million $CD3^+$ cells and per milliliter whole blood. Horizontal bars represent the median, the rectangular box connects the upper and lower quartiles, and whiskers connect the 5th and 95th percentiles. The P value is indicated on each histogram



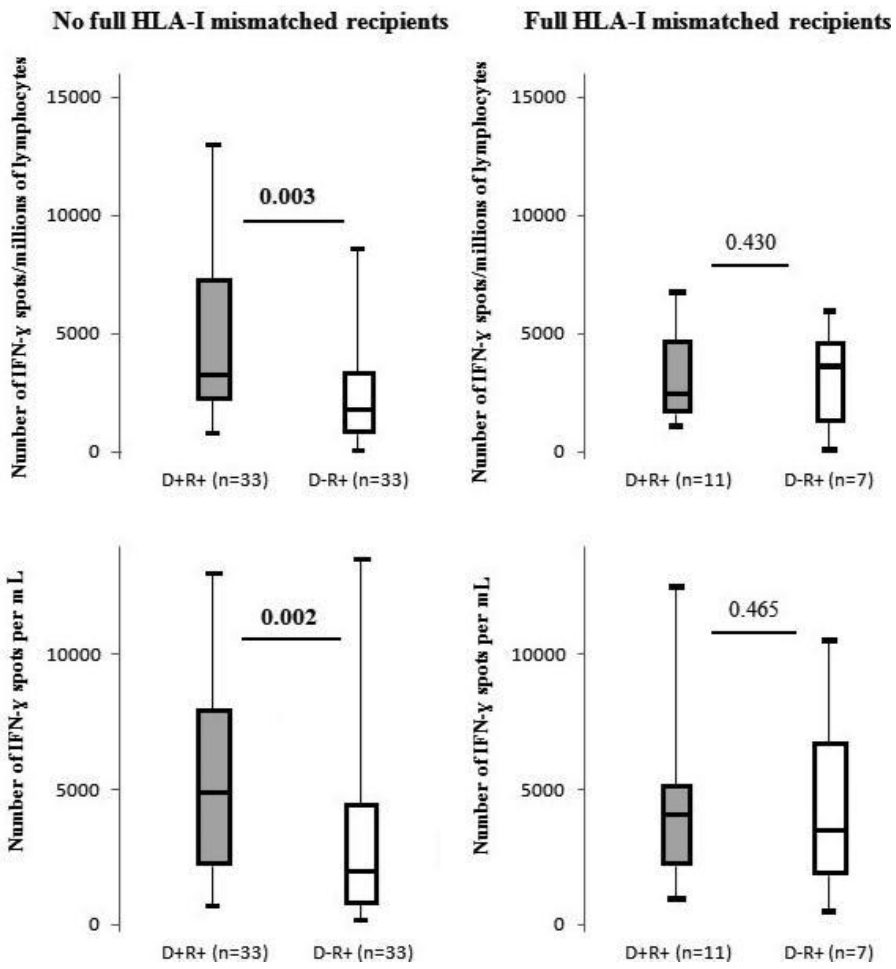


FIGURE 2 The effect of donor CMV infection on anti-CMV response required that donor and recipient share at least one human leukocyte antigen (HLA)-I identity. Data for 66 recipients sharing at least one HLA--A or HLA--B identity with donors ("no full HLA--I--mismatched recipients") and 18 recipients with full HLA--I mismatch with their donors. Data are expressed as number of spots per million $CD3^+$ cells and per milliliter whole blood. Horizontal bars represent the median, the rectangular box connects the upper and lower quartiles and whiskers connect the 5th and 95th percentiles. The *P* value is indicated on each histogram. **P* < .05 by Mann–Whitney test. CMV, cytomegalovirus; HLA, human leukocyte antigen

To confirm that HLA matching truly contributed to CMV--specific T cells responses, we thoroughly studied immunosuppression and antiviral strategies in four groups depicted in Figure 2. Only fre-quency of anti--thymocyte globulins use was slightly increased (but not significantly) in the group with the highest anti--CMV response (Figure S1). Furthermore, the number of IFN--γ--producing cells was not correlated with tacrolimus levels (R = .063, P = .702) and did not differ by dose of mycophenolate mofetil (data not shown). According to our clinical practice, valganciclovir was used more often in D+R+ than D−R+ recipients, regardless of HLA--I matching. This difference in CMV prophylaxis between D+R+ and D−R+ recipients does not likely account for the difference in the CMV immune response ob-served solely in "no full HLA--I--mismatched recipients." Furthermore, the number of IFN--ɣ--producing cells was not associated with the valganciclovir prophylaxis in "no full HLA--I--mismatched" recipients, whether D+R+ (P = .509) or D−R+ (P = .985), and remained higher in D+R+ than D−R+ recipients when the recipient and donor shared at least one HLA--I identity, regardless of antiviral strategy (prophylaxis: P = .050, no prophylaxis P = .008).

Altogether, these results argue for a pivotal role of the presentation of CMV peptides by donor cells to stimulate the expansion of CMV pp65--specific memory $CD8^+$ T cells.

3.4 | Donor--type HLA shaped CMV--specific immune response in CMV--naïve recipients

To ensure that the CMV--specific T cells we analyzed had developed after transplantation, we studied recipients who were primary--infected via the transplant (D+R−). Then we counted CMV pp65--specific $CD8^+$ T cells (thereafter CMV T cells) restricted to HLA--A2 in recipients expressing HLA--A2 in their SLOs but not in their graft epithelial cells (non--HLA--A2--expressing donors). In these patients, HLA--A2--restricted $CD8^+$ T cell generation relied on only presentation on self--APCs and not donor cells. We then compared to recipients expressing HLA--A2 in both their SLOs and graft epithelial cells (HLA--A2--expressing donors).

Thus, we compared the frequency of HLA--A2--restricted anti--CMV pp65 $CD8^+$ T cells depending on whether the donor expressed HLA--A2 or not (Figure 2A). We analyzed data for 31 HLA--A2 D+R− recipients; for 11, the donor did not express HLA--A2. The number of anti--CMV T cells restricted by HLA--A2 was lower for recipients who received non--HLA--A2--expressing than HLA--A2--expressing kidneys (P = .002; Table 2). Therefore, the presentation of CMV peptides to $CD8^+$ T cells by HLA--A2--expressing recipient APCs did not take place or was not efficient to drive the development

of CMV--specific memory CD8$^+$ T cells if the donor kidney did not express HLA--A2 itself.

We next assessed the impact of donor HLA on the development of anti--CMV T cells according to history of CMV viremia (Figure 3B). Indeed, we hypothesized that CMV antigens may have disseminated and gained access to recipient APCs within SLOs during a viremia episode, and we wondered whether recipients with a history of viremia may be more likely to develop any clones restricted by recipient--type HLA--I. Otherwise, CMV antigens may stay localized within the kidney in nonviremic patients and thus the CMV response would become highly dependent on the presentation by donor--type HLA. First, we observed that the effect of donor HLA--I on the development of CMV--specific CD8$^+$ T cells remained strong in recipients with a CMV viremia history (P = .013; Table 2). Importantly, CMV

TABLE 2 Number of CMV pp65--specific CD8+ T cells in D+R− recipients

	HLA-A2 donor		Non–HLA--A2 donor		
	Median	**Range**	**Median**	**Range**	***P*-value**
All D+R− recipients					
Anti--pp65CMV CD8 T cells/million CD8 + T cells	17972	222--85594	300	0--14638	.001
Anti--pp65CMV CD8 T cells/mL blood	7694	84--47879	213	0--10688	.002
D+R− recipients with at least one pp65CMV viremia episode					
Anti--pp65CMV CD8 T cells/million CD8 + T cells	18785	1019--59224	742	1--16237	.017
Anti--pp65CMV CD8 T cells/mL blood	12680	599--50728	539	1--12013	.013
D+R− recipients without any viremia episode					
Anti--pp65CMV CD8 T cells/million CD8 + T cells	13000	213--83653	30	0--1369	.025
Anti--pp65CMV CD8 T cells/mL blood	6405	54--23336	8	213--1186	.025

CMV, cytomegalovirus; HLA, human leukocyte antigen.

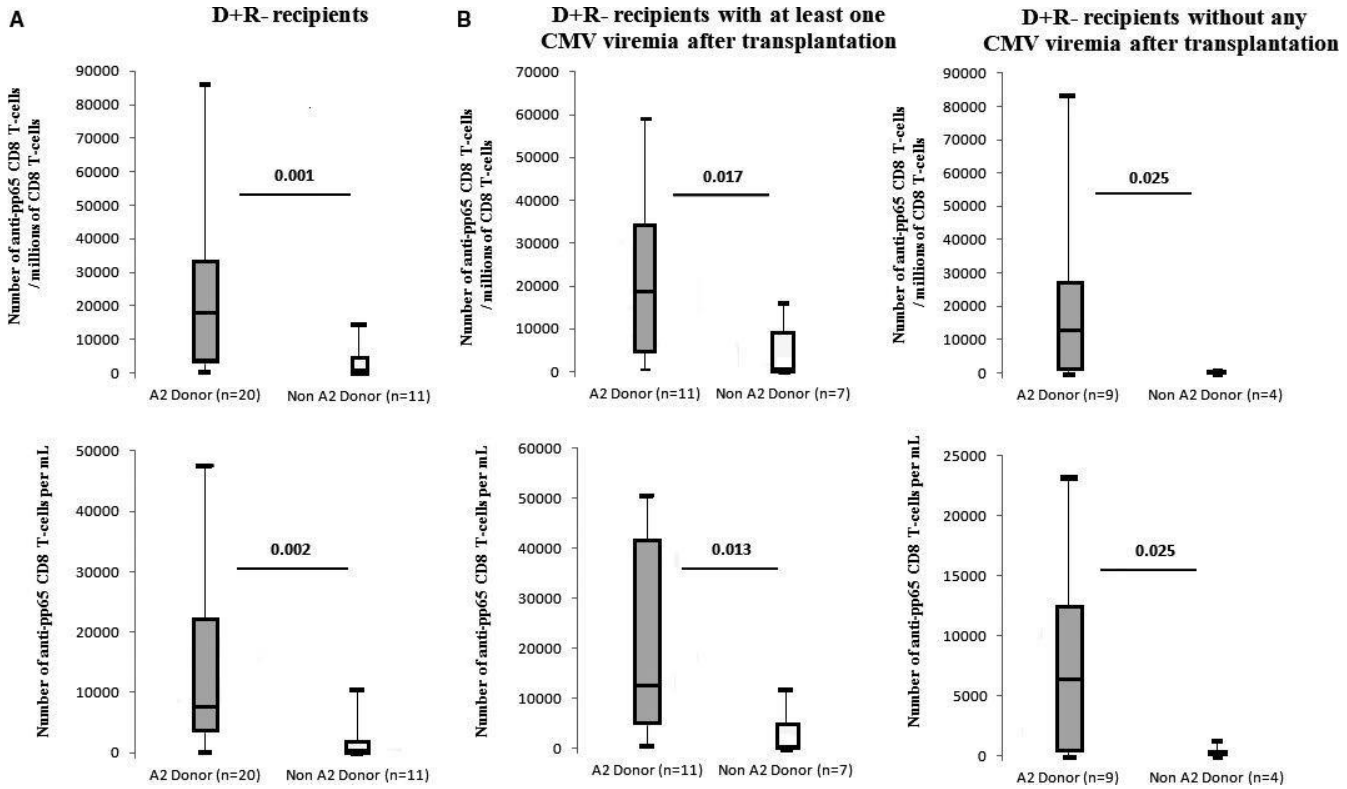


FIGURE 3 Donor HLA--I within the graft plays an important role in shaping the CMV--specific immune response. (A) Number of anti--CMV pp65 CD8 T cells restricted to HLA--A2 in 31 D+R− recipients according to HLA--A2 expression in donor. (B) Results according occurrence of CMV viremia during the first year post--transplantation. Data are expressed as number of anti--CMV pp65 CD8 T cells restricted to HLA--A2 per million CD8 T cells and per milliliter whole blood. Horizontal bars represent the median, the rectangular box connects the upper and lower quartiles and whiskers connect the 5th and 95th percentiles. The P value is indicated on each histogram of the figure. *P < .05 by Mann–Whitney test. CMV, cytomegalovirus; HLA, human leukocyte antigen

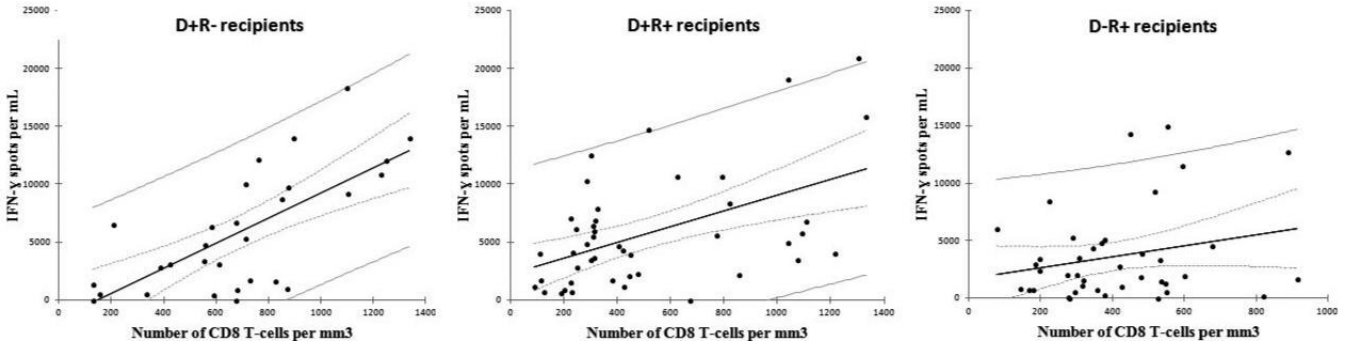


FIGURE 4 CMV drives the size of the CD8$^+$ circulating T cells in D+ but not D− recipients. Correlation between number of CD8$^+$ T cells and number of cells producing IFN--ɣ in response to CMV pp65 stimulation in 29 D+R− recipients (left), 44 D+R+ recipients (middle) and 40 D−R+ recipients (right). We observed a positive correlation in D+R− recipients (R = .697, P < .0001) and D+R+ recipients (R = .502, P = .001) but not D−R+ recipients (R = .237, P = .141). CMV, cytomegalovirus; IFN--ɣ, interferon ɣ

viremia was resolved at the time of sampling in 16 of 18 patients with a history of viremia, with the median interval between the end of the CMV viremia and the time of sampling (25 [2--74] months) similar in both groups (P = .354). Second, the effect of donor HLA--I status remained true for D+R− recipients without a viremia history (Table 2, P = .025). This finding suggests that CMV--peptide presentation on donor cells was crucial to generate an anti--CMV CD8$^+$ T cell response in both viremic and nonviremic patients.

3.5 | Close correlation between CMV--specific immune response and size of blood--borne CD8$^+$ T cell- pool in recipients of CMV--infected grafts

Because a large proportion of the CD8$^+$ T cell- repertoire is devoted to fight CMV,[16,17] we assessed whether CMV--infected grafts could expand the size of the blood--borne CD8$^+$ T cell- compartment. For this purpose, we simultaneously measured the number of circulat-ing CD8$^+$ T cells and the level of CMV pp65--specific immune re-sponse (by ELISPOT) and assessed their relationship in D+ vs D−R+ recipients. We observed a positive correlation in 29 D+R− recipients (R = .697, P < .0001) and 44 D+R+ recipients (R = .502, P = .001), with no significant correlation in 40 D−R+ recipients (R = .237, R = .141) (Figure 4). Thus, the CMV response was a major determinant of the size of the blood--borne CD8$^+$ T cell compartment in D+ but not D− recipients, which suggests that CMV--infected grafts govern the size of the circulating CD8$^+$ T cell- pool as a whole.

4 | DISCUSSION

The impact of donor CMV infection on the post--transplantation specific immune response to CMV, especially anti--CMV CD8$^+$ T cells, and even the involvement of CMV replication, has rarely been studied. Experimental models have suggested that a large proportion of mouse CMV (MCMV) viremia in D+R+ recipients originated from the recipient.[18,19] However, later, a dominant MCMV resistance trait expressed by C57BL/6 mice used as recipients in these studies was suggested, which therefore limited the scope of these results.[20] In contrast, among human kidney transplant recipients, seropositive recipients could be reinfected by a new CMV strain from the donor after transplantation.[21] Our results indicate that donor CMV infec-tion drives a specific CMV immune response and suggest that the donor CMV reactivates after transplantation and then stimulates anti--CMV lymphocytes in the recipient. Moreover, because the am-plitude of the T cell response is correlated with the size of the viral inoculum, the effect of donor CMV infection on the CMV--specific response indicates that CMV reactivation in donor cells is frequent and significant.[22]

The relative weight of the donor and recipient CMV presentation on amplification of the CMV immune response after transplantation is unknown. The CMV--specific CD8$^+$ T cell response is greater than the CD4$^+$ T cell response.[15] Shabir et al reported that specific donor HLA--I had no role in generating CMV--specific CD8$^+$ T cells after kidney transplantation.[10] Indeed, only CMV CD8$^+$ T cells restricted to the recipient HLA--I were identified and no recipients showed responses to CMV peptides presented by donor--specific HLA. This result could underline the importance of the recipient's APCs to generate anti--CMV$^+$ CD8 T cells. However, the role of HLA--I identities shared between the donor and recipient was not assessed in that study and therefore we cannot exclude that presentation of CMV peptides by donor cells activated specific CD8$^+$ T cells. Measuring the involvement of shared HLA--I is difficult. Here we report that expansion of blood--borne cytokines producing CMV pp65--specific T cells after transplantation with a kidney from a CMV--infected donor required the presence of shared HLA--I between donor and recipient. However, shared HLA--I is expressed in both recipient SLOs and organ donor cells. Our results show a greater number of anti--CMV CD8$^+$ T cells- in HLA--A2--expressing D+R− recipients for whom the graft (donor) also expressed HLA--A2. For the first time, we show that shared HLA--I on donor cells is the main contributor of the CMV-- specific CD8$^+$ T cell- response and that the kidney graft should be considered a "CMV--presenting organ."

More accurate analysis of the kinds of donor cells activate circulating CMV--specific CD8$^+$ T cells would be of interest. Indeed,

donor--presenting cells could be kidney cells, such as endothelial cells, fibroblasts and tubular cells, or donor passenger leucocytes.

As detailed in a recent extensive review, non--haematopoietic cells are considered to support memory $CD8^+$ T cell inflation, dependent on HLA--I.[4] This assumption relies on experimental data collected in mice infected by MCMV, which induced a large and sustained expansion of virus--specific $CD8^+$ T cells in the blood. Indeed, infected non--haematopoietic cells in lymph nodes restimulate the central memory $CD8^+$ T cells, which supply the blood--borne effector--memory $CD8^+$ T cell pool.[23] Unlike the presence of life--long donor non--haematopoietic cells in SLOs, we can hypothesize that donor non--professional APCs promoting $CD8^+$ T cell inflation in kidney transplant recipients are present in the kidney. In mice, infected endothelial cells could also participate in inflation of the MCMV--specific memory CD8 T cell pool because this latter inflation was not fully prevented after inhibition of T cell egress from SLOs.[24] Memory effector and resident memory $CD8^+$ T cells are not thought to be a source of inflated CD8 T cell population, so the infected graft vasculature expressing shared HLA--I may directly stimulate effector memory T cells.

How the blood--borne CMV--specific $CD8^+$ T cells participate to control the CMV replication inside the graft remains disputed. This is an important point because we and others have reported that donor CMV infection has been associated with a poor graft outcome,[8,25,26] and a few studies have shown that CMV replication within the kidney graft promotes chronic allograft dysfunction.[9,11] Lin et al recently classified organs according to their accessibility to $CD8^+$ T cells.[5] The authors considered the kidney as a permis-sive organ, meaning that it can recruit $CD8^+$ T cells even in the absence of inflammatory conditions in order to quickly and effi-ciently control CMV reactivation along tissue--resident memory T cells. We reported a higher number of IFN--ɣ--producing CMV-- specific T cells and better kidney graft survival in kidney trans-plant recipients carrying a genetic variant in *PDCD1* than wild--type homozygous patients.[12] This report, replicated in lung transplant recipients, might indirectly suggest that the CMV--specific T -cell response reflects the ability to control graft damage associated with donor CMV infection.

In conclusion, we give for the first time valuable evidence that CMV--infected donor cells directly drive inflation of memory CMV--specific $CD8^+$ T cells in kidney transplant recipients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Laura Smales for copyediting.

DISCLOSURE

The authors have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

ORCID

Johan Noble http://orcid.org/0000-0002-2329-0392

REFERENCES

1. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988--1994. *Clin Infect Dis*. 2006;43:1143-1151.
2. Lopo S, Vinagre E, Palminha P, Paixao MT, Nogueira P, Freitas MG. Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002--2003. *Euro Surveill Bull*. 2011;16:pii:19896
3. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:76-98.
4. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:367-377.
5. Shin H, Iwasaki A. Tissue--resident memory T cells. *Immunol Rev*. 2013;255:165-181.
6. Hansen SG, Powers CJ, Richards R, et al. Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science*. 2010;328:102-126.
7. Meyer-König U, Ebert K, Schrage B, Pollak S, Hufert FT. Simultaneous infection of healthy people with multiple human cytomegalovirus strains. *The Lancet*. 1998;352:1280-12811.
8. Gatault P, Halimi J-M, Forconi C, et al. CMV infection in the donor and increased kidney graft loss: impact of full HLA--I mismatch and posttransplantation CD8(+) cell reduction. *Am J Transplant*. 2013;13:2119-2129.
9. Helanterä I, Koskinen P, Finne P, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. *Transpl Int*. 2006;19:893-900.
10. Shabir S, Kaul B, Pachnio A, et al. Impaired direct priming of CD8 T cells by donor--derived cytomegalovirus following kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:1698-1708.
11. Dzabic M, Rahbar A, Yaiw K-C, et al. Intragraft cytomegalovirus protein expression is associated with reduced renal allograft survival. *Clin Infect Dis*. 2011;53:969-976.
12. Forconi C, Gatault P, Miquelestorena-Standley E, et al. Polymorphism in programmed cell death 1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV--positive donors. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:315-324.
13. Roland M, Gatault P, Al-Najjar A, et al. Early pulse pressure and low--grade proteinuria as independent long--term risk factors for new--onset diabetes mellitus after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8:1719-1728.
14. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid--organ transplantation. *Transplant J*. 2013;96:333-360.
15. Calarota SA, Chiesa A, Scaramuzzi L, et al. Normalizing ELISPOT responses to T cell counts: a novel approach for quantification of HCMV--specific CD4+ and CD8+ T cell responses in kidney transplant recipients. *J Clin Virol*. 2014;61:65-73.
16. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, et al. Herpesvirus--specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol*. 2004;173:7481-7489.
17. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus--specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med*. 2005;202:673-685.
18. Klotman ME, Starnes D, Hamilton JD. The source of murine cytomegalovirus in mice receiving kidney allografts. *J Infect Dis*. 1985;152:1192-1196.
19. Klotman ME, Henry SC, Hamilton JD. Determinants of the source of cytomegalovirus in murine renal allograft recipients. *Transplantation*. 1987;44:636-639.
20. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A, La Vista AB, Shellam GR. Cmv--1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med*. 1990;171:1469-1483.

21. Chou S. Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal-- transplant recipients. *N Engl J Med*. 1986;314:1418-1423.
22. Redeker A, Welten SPM, Arens R. Viral inoculum dose impacts memory T cell inflation: cellular immune response. *Eur J Immunol*. 2014;44:1046-1057.
23. Torti N, Walton SM, Brocker T, Rülicke T, Oxenius A. Non-- hematopoietic cells in lymph nodes drive memory CD8 T cell in-flation during murine cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002313.
24. Smith CJ, Turula H, Snyder CM. Systemic hematogenous main-tenance of memory inflation by MCMV infection. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004233.
25. Schnitzler MA, Lowell JA, Hardinger KL, Boxerman SB, Bailey TC, Brennan DC. The association of cytomegalovirus sero--pairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir CMV prophylaxis. *Am J Transplant*. 2003;3:445-451.
26. van Ree RM, de Vries APJ, Zelle DM, et al. Latent cytomegalovirus infection is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. *Med Sci Monit*. 2011;17:609-617.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the -supporting information tab for this article.

How to cite this article: Gatault P, Al-Hajj S, Noble J, et al. CMV--infected kidney grafts drive the expansion of blood-- borne CMV--specific T cells restricted by shared class I HLA molecules via presentation on donor cells. *Am J Transplant*. 2018;18:1904–1913. https://doi.org/10.1111/ajt.14672

Annexe 4 : Manuscrit d’article publié en cinquième auteur (travaux collaboratifs)

Author's Accepted Manuscript



Polymorphism in programmed cell death-1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors

Catherine Forconi, Philippe Gatault, Elodie Miquelestorena-Standley, Johan Noble, Sally Alhajj, Romain Guillemain, Marc Stern, Thomas Hoffmann, Louis Prat, Caroline Suberbielle, Emeline Masson, Anne Cesbron-Gautier, Catherine Gaudy-Graffin, Alain Goudeau, Gilles Thibault, Fabrice Ivanes, Roseline Guibon, Ihab Kazma, Yvon Lebranchu, Matthias Büchler, Antoine Magnan, Jean-Michel Halimi, Christophe Baron

PII: S1053-2498(16)30295-9
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2016.08.014
Reference: HEALUN6348

To appear in: *Journal of Heart and Lung Transplantation*

Received date: 10 March 2016
Revised date: 15 July 2016
Accepted date: 17 August 2016

Cite this article as: Catherine Forconi, Philippe Gatault, Elodie Miquelestorena-Standley, Johan Noble, Sally Alhajj, Romain Guillemain, Marc Stern, Thomas Hoffmann, Louis Prat, Caroline Suberbielle, Emeline Masson, Anne Cesbron-Gautier, Catherine Gaudy-Graffin, Alain Goudeau, Gilles Thibault, Fabrice Ivanes, Roseline Guibon, Ihab Kazma, Yvon Lebranchu, Matthias Büchler, Antoine Magnan, Jean-Michel Halimi and Christophe Baron, Polymorphism in programmed cell death-1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors, *Journal of Heart and Lung Transplantation*, http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2016.08.014

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting galley proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Polymorphism in Programmed Cell Death-1 gene is strongly associated with lung and kidney allograft survival in recipients from CMV-positive donors.

Authors:

*Catherine Forconi [1](PhD), *Philippe Gatault [1,2,3](MD), Elodie Miquelestorena-Standley, , Johan Noble [1,2](MD), Sally Alhajj ,[1]Romain Guillemain ([4]MD, PhD), Marc Stern ([5]MD, PhD), Thomas Hoffmann [1](PhD), Louis Prat [1,2](MD), Caroline Suberbielle ([6]MD, PhD), Emeline Masson ([6]MD, PhD), Anne Cesbron-Gautier [7](MD, PhD), Catherine Gaudy-Graffin [8,9](MD, PhD), Alain Goudeau [8,9](MD, PhD), Gilles Thibault [3,10](MD, PhD), Fabrice Ivanes ([4]MD, PhD), Roseline Guibon[1], Ihab Kazma ([1]PhD), Yvon Lebranchu [1,2](MD, PhD), Matthias Büchler [1,2](MD, PhD), Antoine Magnan [11](MD, PhD), Jean-Michel Halimi [1,2](MD, PhD), Christophe Baron [1,2](MD, PhD).

[1] : EA4245 Cellules dendritiques, Immunomodulation et Greffes, Université François-Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours France. [2] Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHRU Tours, 2 Boulevard Tonnellé, 37044 cedex 9 Tours France. [3] Laboratory of Immunology, CHRU Tours, 2 Boulevard Tonnelle, 37044 cedex 9, France. [4]Department of Thoracic Surgery and Lung Transplant, HEGP hospital, 20 rue Leblanc 75908 Paris, France. [5]Pneumology and Lung Transplant Unit, FOCH hospital, 40 rue Worth 92151 Suresnes, France. [6]Laboratory of Immunology and Histocompatibility, Saint-Louis hospital, APHP, 1 avenue Claude Vellefaux 75010 Paris, France. [7]: Laboratory of Histocompatibility, National Blood Bank, 34 Boulevard Jean Monnet 44000 Nantes, France. [8]: Laboratory of Bacteriology and Virology, CHRU de Tours, 2 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France. [9]: INSERM U966, Tours University, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours France. [10]: CNRS UMR 7292; Genetics; Immunotherapy;

Chemistry and Cancer; Tours University, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours France.

[11]INSERM UMR 915, Institut du Thorax, IRT-UN, Boulevard Jacques Monod 44093 Nantes, France.

7KH DIILOLDWLRQV RI (ORGLH 0LTXHOHVWRUHQD 6WDQGOH\ DUH /DERUDWRLUH G DQDWRPLH SDWKRORJLTXH &+58

7RXUV)UDQFH ($ 8QLYHUVLW«)UDQ©RLV 5DEHODLV 7RXUV)UDQFH %HVW UHJDUGV 3KLOLSSH

*Catherine Forconi and Philippe Gatault contributed equally to this work

Corresponding author:

Dr Philippe Gatault, MD

EA-4245 Dendritic Cells, Immunomodulation and Grafts

10, Bd Tonnelle. 37032 Tours FRANCE

Phone: +33 (0) 2 47 36 61 22

Fax: +33 (0) 2 47 47 89 01

E-mail: philippe.gatault@univ-tours.fr

Abstract

Background. Cytomegalovirus (CMV) has a role in chronic rejection and graft loss in kidney (KTR) and lung (LTR) transplant patients. In addition, donor CMV seropositivity (D+) is an independent risk factor for renal graft loss. The anti-CMV response might modulate this risk. Expression of programmed-cell-death-1 (PD-1), a receptor involved in viral-specific T-cell exhaustion, is influenced by a single nucleotide polymorphism (SNP) called PD-1.3 (wild-type allele G, variant allele A). Methods. We performed a retrospective study to assess the impact of PD-1.3 on graft outcome in D+ and D- KTR and LTR. In addition, we performed a case-control study to evaluate the anti-CMVpp65 response according to genotype. Results. PD-1.3 was determined in 1119 KTR and 181 LTR. In 481 D+ KTR, A-carriers (24%) experienced significantly less kidney graft failure compared to GG patients (p=0.001). Multivariate analysis showed that this association was independent of donor and recipient age, acute rejection episodes and number of HLA mismatches (HR: 0.381 [0.209–0.696]; p=0.002). Analysis in 85 D+ LTR showed similar results: A-carriers had better survival (HR: 0.302 [0.128–0.716]; p=0.006) and greater forced 6-month expiratory volume (71±17% vs. 54%±16%, p=0.001). In D- recipients, PD-1.3 did not affect kidney or lung transplant outcome. Finally, AA recipients had a stronger anti-CMVpp65 T-cell response than matched GG patients (p=0.003). Conclusions. The A variant allele in PD-1.3 SNP improved graft survival in kidney and lung transplant recipients receiving grafts from CMV-positive donors.

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infects 50 to 90% of adults in the United states and Europe (1, 2). This herpes virus establishes life-long infection characterized by phases of latency punctuated by periodic reactivations (3, 4). In animal models, the alloimmune response triggers productive replication of the virus within transplanted organs which in turn induces local inflammation, prevents graft acceptance and eventually promotes chronic rejection (5–7). Moreover, several human studies have suggested that CMV infection may also prime the kidney and lung allograft for rejection (8–10) and favour development of chronic damage such as vascular lesions and interstitial fibrosis/tubular atrophy in kidney grafts (11–13).

The role of CMV in lung transplantation has recently been highlighted by several authors who reported that CMV viremia and CMV pneumonitis increased the risk of bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) (14–17). These long term effects of CMV are of concern since BOS is the leading cause of death after the first post-transplant year and the incidence has been stable in recent decades (18). In kidney transplantation, it is now well established that active CMV replication is frequently present in grafts (11,19) especially in kidneys from CMV-positive donors (D+) (20). While persistent active intra-graft CMV replication has been associated with decreased graft survival (21,22), we and others have reported that CMV seropositivity of the donor is an independent risk factor for kidney graft failure (23,24). Interestingly, we showed that the deleterious impact of D+ was strongest in the case of full HLA class-I mismatch (23), possibly because the donor's kidney epithelial cells were poorly accessible to the recipient's CMV-specific CD8 ₸ cells, as suggested by another group (20), emphasizing the role of the anti-CMV cytotoxic T cell response. Progressive dysfunction of the T cell response is known to be a key element in the course of chronic viral infections such as HIV and hepatitis C (25).

Similarly, the persistence of CMV increases the number of dysfunctional CMV-specific T cells over time (26–29) that are continuously driven to exhaustion (28,30), eventually causing their elimination by apoptosis (30). Programmed cell death 1 (PD-1) has been revealed to be a crucial player in the dysfunction of HIV-specific T cells (31–33) and possibly of human CMV-specific $CD8^+$ T cells (30). Moreover, PD-1 has been found to be involved in the clinical control of CMV infections after kidney and liver transplantation (34,35).

An intronic single nucleotide polymorphism termed "PD-1.3 SNP" (G to A substitution; rs1568821) in PDCD-1 (minor allele frequency in European populations, about 13% (36)) disrupts the binding of transcription factor Runx1 and is associated with reduced transcriptional activity of the gene as well as decreased inhibition of T cells (37–39). This SNP has been reported to be associated with several autoimmune diseases (38–41). We therefore investigated whether this SNP impacted on graft survival of kidney and lung transplants in recipients who had received organs from CMV-seropositive donors. In addition, we performed an in vitro pilot study to assess the effects of PD1.3 SNP on the anti-CMV T cell response.

Patients and Methods

Patients and study design.

The DNA samples from kidney and lung transplant patients were obtained after obtaining informed signed consent. Collection of DNA samples and the study received Ethics Committee approval by the Comité de Protection des Personnes Tours-Région Centre Ouest 1 (DC 2013-1780).

The study included patients who underwent kidney transplantation between 1985 and 2008 in Tours, France. The following variables were recorded for kidney transplant patients: type of

donor (living or deceased), CMV serology, age and gender of the recipient and donor, the cause of renal disease, graft rank, number of HLA class I (-A, -B) and class II (-DR) mismatches, immunosuppressive treatments, cold ischemia time, delayed graft function (dialysis during the first week post transplantation), CMV antigenemia and acute rejection.

Among the 1280 transplantations performed during the study period, there were 561 D+ and 719 D- recipients. DNA samples were available for 486 D+ patients (D+R+ n=253; D+R- n=233) and for 633 D- patients (D-R+ n=328, D-R- n=305). Data for patients at high risk of post-transplantation CMV (i.e. those who received a kidney from a CMV-infected donor [D+]) and those at low risk (i.e. recipients from a CMV-negative donor [D-]) were analyzed separately. All D+R- kidney transplant patients received prophylaxis in the form of a weekly infusion of immunoglobulin therapy for one month (from 1985 to 1994), and aciclovir or valaciclovir (1995 to 2003) or valganciclovir (2004 to 2008) for 3 months. Patients with a lower risk of CMV disease (pre-transplantation CMV-positive recipients [R+]) received pre-emptive therapy. Diagnosis of CMV infection was based on CMV culture from 1984 to 1994, and subsequently on antigenemia tests (number of stained polynuclear cells/2.10^5 leucocytes), as previously described (20). Weekly CMV-antigenemia tests were performed for six months following transplantation. It is of note that during the period 1996-1997, pp65 antigenemia was introduced, and mycophenolate mofetil and gancyclovir were introduced. We therefore analyzed data from 1985 to 1995 (n=116 D+, n=176 D-) and from 1996 to 2008 (n=370 D+, n=457 D-) separately. We then assessed the impact of PD1.3 SNP in lung transplant patients, in whom it is known that CMV has more significant impact on survival than in kidney transplant patients (17,42). Moreover, we expected a greater number of graft losses than in kidney transplant patients. Given the strength of the association found in D+ kidney recipients, and assuming a similar hazard

ratio, we calculated that we would achieve sufficient power with analysis of 90 lung transplantations from D+ recipients (power of 80%, type 1 error of 5%). We therefore established a multicenter study of 181 patients (n=85D+ and n=96D-) who underwent lung transplantation between 2000 and 2009 at three different centers in France (HEGP, Paris; FOCH Hospital, Suresnes; and Nantes Hospital). CMV prophylaxis strategies were less heterogeneous than in kidney transplant patients, and all patients with a risk of CMV infection (D+ and/or R+) therefore received intravenous ganciclovir within a few days after transplantation and switched to valgancyclovir adjusted to renal function as soon as oral medication was tolerated. The following variables were recorded for lung transplantation: CMV serology, age and gender of the recipient, graft rank, cause of the lung disease, types of organs transplanted, immunosuppressive treatments and forced expiratory volume (FEV).

PD-1.3 genotyping

Patients underwent genotyping for the PD-1.3 SNP (rs11568821) by oligonucleotide ligation assay (43) blind to clinical data. In summary, Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed with the subsequent specific primers : forward (5'CCAGGCAGCAACCTCAATC3'), and reverse (5'GTCCCCCTCTGAAATGTCC3'). The PCR product was then split into two ligation solutions containing a "trap probe" specific for the wild-type allele (5'CGGTCGACGAGCTGCCGCGCAAGATGCACCCCCGAGACC3') or the variant allele (5'CGGTCGACGAGCTGCC-GCGCAAGATGCACCCCCGAGACT3') and an FITC-labeled reporting probe (5'GCAGGTGGGCTG3'). The trap probe was captured on fluorescent beads for analysis by flow cytometry (FACScanto, BD).

Case–control study for in vitro analysis of CMV-specific immune response

We included only patients with homozygous alleles (AA or GG) with a functioning graft at the time of analysis who were infected with CMV before transplantation (R+ recipients). Each patient with the variant allele (AA, case group) was matched with two GG allele carriers (control group). The matching criteria were: serologic CMV status of donor, anti-globulin at time of transplantation, recipient age at transplantation (±8 years), year of transplantation (±5 years), treatment with calcineurin inhibitor at the time of blood sampling or not. Freshly isolated PBMC (10^5) from patients were incubated for 24h at 37°C with human-CMV peptides (Peptivator CMV-pp65 130-093-438; Miltenyi Biotech) in 96-well plates pre-coated with anti-interferon-ɣ antibody (Mabtech 3420-2APW-10 Human-IFNg ELISpot PRO kit). Analysis was by use of ImmunoSpot Counter (CTL-ImmunoSpot S6 FluoroSpot line, Cleveland, OH, USA). The numbers of spots (per million PBMC) were compared for patients with AA and GG genotypes.

Statistical analysis

Qualitative and quantitative data were compared using Chi-square or Mann-Whitney tests, respectively. In kidney transplant patients, the Kaplan-Meier method was used to estimate the uncensored graft survival (death or graft failure defined as end stage renal disease requiring dialysis or transplantation), patient survival (end-stage Renal Disease was censored) and death-censored graft survival. In lung transplant patients, we assessed uncensored graft survival and patient survival.

Log-rank tests were used to compare survival for carriers of GA or AA and GG alleles using univariate and multivariate Cox regressions. The results were expressed with hazard ratios (HR), 95% confidence intervals (95% CI) and p values. We used Mann-Whitney tests to compare the

number of interferon-ɣ -producing cells. Statistical analyses were performed using SAS v9.1 (SAS Inst., Cary, NC, USA), and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

PD-1.3 SNP was strongly associated with kidney graft survival in D+ recipients, especially in D+R+ patients.

The frequency of the A allele was 13.0% (with 847 GG patients, 252 heterozygotous GA patients and 20 AA patients). There was no evidence to support rejection of the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$). The demographic characteristics of patients with the A allele did not differ from those of wild-type homozygous patients (GG) whether in group D + (n=486) or D- (n=633) (Table 1).

End stage renal disease occurred in 107 and 112 D+ and D- recipients, respectively. Over the period, 103 patients died (38 D+ and 65 D-) (median follow-up= 5.8 [0.0-23.8] years; 8206 patient-years). The PD-1.3 SNP A allele (GA or AA) was significantly associated with better uncensored graft survival ($p=0.006$) in the D+ group as compared to the GG allele (Figure 1, panel A). PD-1.3 SNP was significantly associated with death-censored graft survival ($p=0.001$) but not with patient survival ($p=0.748$). After adjustment for donor and recipient age, acute rejection and HLA mismatch, multivariate analysis revealed that the A allele of the SNP remained a strong and independent protective factor for graft failure for D+ patients (HR: 0.381, 95% CI 0.209–0.696; $p=0.0017$). It is of note that the association was stronger in the D+R+ group than in the D+R- (Figure 1, panel B). In contrast, there was no significant association in

the D- recipient group as a whole (p=0.486, Figure 1, panel A) or in the D-R+ or D-R- subgroups (p=0.723, p=0.522, respectively, Figure 1, panel B).

From 1985 to 1995 (n=116 D+, n=176 D-) and from 1996 to 2008 (n=370 D+, n=457 D-), risk of death-censored graft survival remained better in A-carrier than in GG D+ recipients (p=0.014 and p=0.022, respectively, Figure 2). Multivariate analysis demonstrated that the PD-1.3 SNP remained an independent risk factor in both periods (HR: 0.336, 95% CI 0.132–0.851; p=0.021 and HR: 0.421, 95% CI 0.190–0.934, p=0.033 for 1985-1995 and 1996-2008 periods, respectively). In addition, the difference between death-censored graft survival observed in D+ A-carriers and GG patients during the first period (+4.8% at 5 years and +15.1% at 10 years) remained at least as great in the most recent transplantation period (+7.7% at 5 years and +18.2% at 10 years). The association was therefore strong and robust in D+ recipients regardless of the period of transplantation. It is of note that the incidence of CMV viremia after 1995 in D+ recipients did not differ in relation to the PD-1.3 SNP (GG vs A-carriers: 57.4% vs 55.3%, p=0738).

PD-1.3 SNP was strongly associated with lung recipient survival in D+ subjects

The frequency of the A allele was 13.7% and Hardy-Weinberg equilibrium was respected (p>0.05). The demographic characteristics of patients with the A allele did not differ from those of wild-type homozygous patients (GG) whether in the D + or D- group (Table 2).

Death and retransplantation occurred in 101 and 4 patients, respectively (median follow-up=1.9 [0.0-15.4] years; 514 patient-years). In 85 D+ patients, uncensored graft survival and patient survival were significantly better for A-carriers than GG patients (p=0.004 and p=0.006, respectively). In D- patients, survival did not differ according to genotype (Figure 3). After

adjustment for recipient age, multivariate analysis revealed that the A allele strongly protected against death in D+ patients (HR: 0.302, 95% CI 0.128–0.716; p=0.006). It is of note that occurrence of CMV viremia (data available for 58 D+ patients) was not associated with PD-1.3 SNP (GG vs A-carriers: 65% vs 73%, , p=0.6).

In order to assess more fully the effects of SNP on the function of the lung transplant itself, we also analyzed forced expiratory volume (FEV). Of the 61 D+ patients still alive at 6 months post-transplantation, FEV was available in 47 (12 A-carriers and 35 GG). Interestingly, A-carriers had a significantly greater FEV at 6 months (71±17% vs. 54%±16% p=0.001). In contrast, FEV in D-R- was not statistically different in A-carriers or GG (14 A-carriers: 67±26%, 46 GG: 63±19%, p=0.29).

AA homozygous patients had a greater number of CMV-responding T cells.

To improve understanding of the above mentioned clinical results, we assessed the CMV-specific immune response according to the PD-1.3 SNP assessing the number of IFN-ɣ –producing T cells responding to CMV-pp65 peptides in kidney transplant patients. We analyzed only homozygous patients, i.e. AA and GG. Since the duration of CMV infection might affect the accumulation of dysfunctional T cells, we expected that the strongest effect of the PD1 SNP (if any) would be observed in patients infected long before the time of analysis.We therefore analyzed the CMV immune response in patients infected prior to transplantation, i.e. long before the analysis took place. We performed individual matching on clinical variables likely to influence the anti-CMV immune response, as described in the Methods section. We therefore included all R+ patients who were AA-carriers and still being followed in our transplant center (n=7), then each AA patient was individually matched with two GG control patients. The clinical

characteristics of each group are presented in Table 3. As shown in figure 4, the number of IFN-ɣ producing cells responding to pp65 peptides expressed per 10^6 PBMC and per 10^6 lymphocytes was 2.6-fold (and 4.2-(fold higher for AA than matched GG carriers, respectively.

Discussion

We have recently reported that CMV infection in kidney graft donors was associated with reduced graft survival (23). However, the risk factors for graft loss in these patients are largely unknown. The present study reports a strong and robust association between a SNP in the programmed cell death-1 gene (involved in viral-induced T cell exhaustion) and graft survival in patients who had received either kidney or lung transplants from CMV-infected donors, whereas there was no association in D- patients. It is of note that the hazard ratios were very similar in both kidney and lung transplant recipients. Obtained in two different organ settings, these results not only strongly support this clinical association but also indicate a non-organ-specific mechanism. Interestingly, our case control study found a stronger T cell response to CMV in AA patients. These results were therefore compatible with lower PD-1 activity in CMV-specific $CD8^+$ T cells from A-carrier patients, in agreement with another study which reported defective PD-1–mediated inhibition of IFN-ɣ production in PBMC of AA patients (37). Although disruption of the binding site of runx1 transcription factor due to the PD1.3 SNP has been described (39), the exact mechanisms underlying the association of the SNP with CMV-specific T cell dysfunction remain uncertain. However, our results are in accordance with a more exhausted phenotype in blood CMV-specific T cells in GG patients. Interestingly, a study in mice demonstrated that tissue-resident viral-specific T cells were more prone to clonal exhaustion than circulating blood T cells (44). We may thus speculate that graft-resident CMV-specific T cells of

GG recipients may be more exhausted and therefore have a poorer ability to control CMV reactivation within transplanted organs.

Our findings should encourage the design of studies aiming to individually tailor CMV-prevention strategies in order to limit the indirect sequelae of CMV. It is of note that Opelz et al. recently reported that CMV prevention improved death-censored graft survival in both D+R+ and D+R- patients but not in D-R+ (45), In agreement with this study, Kliem et al. showed that 4-year graft survival was improved by ganciclovir prophylaxis only in D+R+ patients (46). Genotyping of PD-1.3 could identify patients who may most benefit from prolonged antiviral treatment in order to prevent graft failure.

Interestingly, the strong association between the PD1.3 SNP and FEV at 6 months observed exclusively in D+ patients might suggest a causal relationship between BOS, intragraft CMV reactivation and PD1.3 SNP. In addition, 59% of graft loss among D+ kidney recipients was reported to be a consequence of chronic allograft nephropathy in GG patients, in contrast to 25% in A-carriers (p=0.033). However, we could not analyze correlations between pathological graft lesions, local CMV replication and PD1 genotypes because serial biopsies are not performed in kidney transplantation. These results together support the role of a cellular immune response to modulate local CMV replication and subsequent chronic allograft damage. To date, no study has focused on the role of CMV-specific cellular immunity to predict long term indirect CMV effects. Indeed, most studies have focused on the early risk of post-transplant CMV viremia or disease (47,48). Our results raise the possibility that serial monitoring of the CMV response might be more appropriate to predict CMV-associated graft loss.

Our study has certain limitations. First, we could not reliably assess CMV disease in relation to kidney graft failure and the SNP allele because the incidence of CMV disease was fairly low

(5%). However, although it is known that CMV disease increases the risk of death, there is no evidence to indicate that CMV disease per se is associated with chronic kidney graft dysfunction. For lung transplant patients in whom CMV disease was a cause of death, information about CMV disease was often lacking and a prospective study should be performed to assess the link between PD-1.3 SNP and CMV disease. Secondly, the CMV-specific immune response was assessed in a small number of patients because only a few AA kidney transplant patients were available. Therefore, although matching with GG patients was based on very stringent matching criteria, a larger study might confirm these results. Thirdly, the study period was long, with several changes in methods used to assess viral replication and treatments, especially viral prophylaxis regimens. Nevertheless, the impact of PD-1.3 SNP remained in the more recent period for kidney transplant patients, and lung transplant patients were grafted after 2000. Our results could therefore be considered as relevant to the current field of organ transplantation.

In conclusion, the presence of variant A allele of the PD-1.3 SNP conferred protection against graft failure in recipients of D+ kidney and lung transplants.

Acknowledgments: We thank Doreen Raine for editing the manuscript.

Disclosure: No financial interest for any authors

Source of support: This study was supported by VLM (Vaincre-La-Mucoviscidose) and FEDER (Fonds-Européens-de-DEveloppement-Régional). The funders permitted the data collection but they had no role in the study design, data analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

References

1. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2006;43:1143–51.

2. Lopo S, Vinagre E, Palminha P, Paixao MT, Nogueira P, Freitas MG. Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2011;16.

3. Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, Sissons JGP, Sinclair JH. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:4140–5.

4. Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:297–313.

5. Hummel M, Zhang Z, Yan S, et al. Allogeneic Transplantation Induces Expression of Cytomegalovirus Immediate-Early Genes In Vivo: a Model for Reactivation from Latency. J Virol. 2001;75:4814–22.

6. Orloff SL, Hwee Y-K, Kreklywich C, et al. Cytomegalovirus Latency Promotes Cardiac Lymphoid Neogenesis and Accelerated Allograft Rejection in CMV Naïve Recipients: CMV Latency Promates Cardiac TLOs. Am J Transplant. 2011;11:45–55.

7. Cook CH, Bickerstaff AA, Wang J-J, et al. Disruption of Murine Cardiac Allograft Acceptance by Latent Cytomegalovirus: Disruption of Murine Cardiac Allograft. Am J Transplant. 2008;9:42–5

8. Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM, et al. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. N Engl J Med. 1999;340:1462–70.

9. Palmer SM, Limaye AP, Banks M, et al. Extended valganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus after lung transplantation: a randomized, controlled trial. Ann Intern Med. 2010;152:761–9.

10. Jaksch P, Zweytick B, Kerschner H, et al. Cytomegalovirus prevention in high-risk lung transplant recipients: comparison of 3- vs 12-month valganciclovir therapy. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. 2009;28:670–5.

11. Helantera I, Koskinen P, Tornroth T, Loginov R, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. The impact of cytomegalovirus infections and acute rejection episodes on the development of vascular changes in 6-month protocol biopsy specimens of cadaveric kidney allograft recipients1: Transplantation. 2003;75:1858–64.

12. Smith JM, Corey L, Bittner R, et al. Subclinical Viremia Increases Risk for Chronic Allograft Injury in Pediatric Renal Transplantation. J Am Soc Nephrol. 2010;21:1579–86.

13. Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Třeška V. Effect of Cytomegalovirus Viremia on Subclinical Rejection or Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in Protocol Biopsy at 3 Months in Renal Allograft Recipients Managed by Preemptive Therapy or Antiviral Prophylaxis: Transplantation. 2009;87:436–44.

14. Paraskeva M, Bailey M, Levvey BJ, et al. Cytomegalovirus Replication Within the Lung Allograft Is Associated With Bronchiolitis Obliterans Syndrome: CMV in the Allograft Is Associated With BOS. Am J Transplant. 2011;11:2190–6.

15. Weigt SS, Elashoff RM, Keane MP, et al. Altered levels of CC chemokines during pulmonary CMV predict BOS and mortality post-lung transplantation. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2008;8:1512–22.

16. Snyder LD, Finlen-Copeland CA, Turbyfill WJ, Howell D, Willner DA, Palmer SM. Cytomegalovirus Pneumonitis Is a Risk for Bronchiolitis Obliterans Syndrome in Lung Transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181:1391–6.

17. Johanssson I, Mårtensson G, Andersson R. Cytomegalovirus and long-term outcome after lung transplantation in Gothenburg, Sweden. Scand J Infect Dis. 2010;42:129–36.

18. Christie JD, Edwards LB, Aurora P, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-sixth Official Adult Lung and Heart-Lung Transplantation Report—2009. J Heart Lung Transplant. 2009;28:1031–49.

19. Markovic-Lipkovski J, Müller CA, Engler-Blum G, et al. Human cytomegalovirus in rejected kidney grafts; detection by polymerase chain reaction. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 1992;7:865–70.

20. Shabir S, Kaul B, Pachnio A, et al. Impaired Direct Priming of CD8 T Cells by Donor-Derived Cytomegalovirus Following Kidney Transplantation. J Am Soc Nephrol. 2013;24:1698–708.

21. Helanterä I, Koskinen P, Finne P, et al. Persistent cytomegalovirus infection in kidney allografts is associated with inferior graft function and survival. Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant. 2006;19:893–900.

22. Dzabic M, Rahbar A, Yaiw K-C, et al. Intragraft Cytomegalovirus Protein Expression Is Associated With Reduced Renal Allograft Survival. Clin Infect Dis. 2011;53:969–76.

23. Gatault P, Halimi J-M, Forconi C, et al. CMV infection in the donor and increased kidney graft loss: impact of full HLA-I mismatch and posttransplantation CD8(+) cell reduction. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2013;13:2119–29.

24. Van Ree RM, de Vries APJ, Zelle DM, et al. Latent cytomegalovirus infection is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res. 2011;17:CR609–617.

25. Wherry EJ. T cell exhaustion. Nat Immunol. 2011;131:492–9.

26. Antoine P, Olislagers V, Huygens A, et al. Functional Exhaustion of CD4+ T Lymphocytes during Primary Cytomegalovirus Infection. J Immunol. 2012;189:2665–72.

27. Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, et al. Functional Impairment of Cytomegalovirus Specific CD8 T Cells Predicts High-Level Replication After Renal Transplantation. Am J Transplant. 2008;8:990–9.

28. Fletcher JM, Vukmanovic-Stejic M, Dunne PJ, et al. Cytomegalovirus-Specific CD4+ T Cells in Healthy Carriers Are Continuously Driven to Replicative Exhaustion. J Immunol. 2005;175:8218–25.

29. Hadrup SR, Strindhall J, Kollgaard T, et al. Longitudinal Studies of Clonally Expanded CD8 T Cells Reveal a Repertoire Shrinkage Predicting Mortality and an Increased Number of Dysfunctional Cytomegalovirus-Specific T Cells in the Very Elderly. J Immunol. 2006;176:2645–53.

30. Zhang J-Y, Zhang Z, Jin B, et al. Cutting edge: programmed death-1 up-regulation is involved in the attrition of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells in acute self-limited hepatitis B virus infection. J Immunol Baltim Md 1950. 2008;181:3741–4.

31. Zhang J-Y, Zhang Z, Wang X, et al. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. Blood. 2007;109:4671–8.

32. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. Nat Med. 2010;16:1147–51.

33. Petrovas C, Chaon B, Ambrozak DR, et al. Differential Association of Programmed Death-1 and CD57 with Ex Vivo Survival of CD8+ T Cells in HIV Infection. J Immunol. 2009;183:1120–32.

34. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Köhler H, Sester M. PD-1 Expression and IL-2 Loss of Cytomegalovirus- Specific T Cells Correlates with Viremia and Reversible Functional Anergy: PD-1 Expression and IL-2 Loss in CMV Viremia. Am J Transplant. 2008;8:1486–97.

35. La Rosa C, Krishnan A, Longmate J, et al. Programmed death-1 expression in liver transplant recipients as a prognostic indicator of cytomegalovirus disease. J Infect Dis. 2008;197:25–33.

36. Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, et al. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. Genes Immun. 2007;8:138–46.

37. Bertsias GK, Nakou M, Choulaki C, et al. Genetic, immunologic, and immunohistochemical analysis of the programmed death 1/programmed death ligand 1 pathway in human systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2009;60:207–18.

38. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2005;58:50–7.

39. Prokunina L, Castillejo-López C, Öberg F, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. Nat Genet. 2002;32:666–9.

40. Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, et al. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. Arthritis Rheum. 2004;50:327–8.

41. Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, Lillevang ST. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. Tissue Antigens. 2003;62:492–7.

42. Ruttmann E, Geltner C, Bucher B, et al. Combined CMV Prophylaxis Improves Outcome and Reduces the Risk for Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS) after Lung Transplantation: Transplantation. 2006;81:1415–20.

43. Iannone MA, Taylor JD, Chen J, et al. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. Cytometry. 2000;39:131–40.

44. Blackburn SD, Crawford A, Shin H, Polley A, Freeman GJ, Wherry EJ. Tissue-Specific Differences in PD-1 and PD-L1 Expression during Chronic Viral Infection: Implications for CD8 T-Cell Exhaustion. J Virol. 2010;84:2078–89.

45. Opelz G, Döhler B. Reduced rate of cardiovascular death after cytomegalovirus prophylaxis in renal transplant recipients. Transplantation. 2015;99:1197–202.

46. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2008;8:975–83.

47. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. J Exp Med. 2005;201:1031–6.

48. Manuel O, Husain S, Kumar D, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2013;56:817–24.

Table 1: Demographic characteristics of patients from Tours, France, who underwent kidney transplantation between 1985 and 2008. D+, donor positive for cytomegalovirus (CMV) (n=486); D-, donor negative for CMV (n=633). Chi-square and Mann-Whitney tests were used to compare qualitative and quantitative data, respectively.

Table 2: Demographic characteristics of lung transplant patients from 3 hospitals from France. D+, CMV-positive donor (n=85); D-R-, donor and recipient were CMV negative (n=96). Chi-square and Mann-Whitney tests were used to compare qualitative and quantitative data, respectively.

Table 3: Demographic characteristics of case-control study population. The left column represents the wild-type homozygous GG patients and the right column the homozygous variant AA patients. MM, Mismatch; HLA, Human Leucocyte Antigen. [a]Data are shown as percentage or mean ± standard deviation (SD). [b]the Chi-square test was used for quantitative data and the Mann and Whitney test for numerical data.

Figure legends

Figure 1: Variant A allele of the PD-1.3 single nucleotide polymorphism (SNP) was strongly associated with graft survival in patients who received kidneys from CMV-infected donors. Panel A) Kaplan-Meier analyses of data for kidney transplant patients who received organs from CMV-positive donors (D+, n=486) and CMV-negative donors (D-, n=633). Uncensored graft survival, patient survival and death-censored graft survival are in the top, middle and lower graphs, respectively. Bold lines represent GG allele carriers and dashed lines A allele carriers (AA or GA). In D+ recipients, the presence of the A allele was associated with a better uncensored graft survival rate (upper left, p=0.006) and death-censored graft survival rate (lower left graph, p=0.001). In the D- group (right graphs), the SNP was not associated with uncensored graft survival, patient survival or death-censored graft survival. Panel B) Variant A allele of PD-1.3 SNP is highly associated with death-censored kidney graft survival in D+R+ patients. Graphs represent death-censored graft survival by Kaplan-Meier analysis for the group indicated: D-R+ (n=328; p=0.726), D-R- (n=305; p=0.723), D+R+ (n=253; p=0.001) and D+R- (n=233; p=0.145).

Figure 2: Variant A allele of PD-1.3 SNP was associated with kidney graft survival in D+ recipients regardless of period of transplantation. Upper graphs represent death-censored graft survival by Kaplan-Meier analysis for transplantations between 1985 and 1995 (panel A: n=116; panel B: n=176) and lower graphs from 1996 to 2008 (panel C: n=370; panel D: n=457). Bold lines represent GG-allele carriers and dashed lines A-allele carriers (AA and GA). The presence of the A allele was associated with better graft survival in D+ recipients for both periods

of transplantation (panels A and C: p=0.014 and p=0.022, respectively). In contrast, there was no association in D- recipients (panels B and D: p=0.696 and p=0.540, respectively).

Figure 3: PD-1.3 SNP was highly associated with survival of lung transplant patients receiving CMV-positive grafts (D+). Kaplan-Meier analyses of data for lung transplant patients who received organs from CMV-positive donors (D+, n=85) and CMV-negative donors (D-, n=96). Uncensored graft survival and patient survival are in the top and lower graphs, respectively. Bold lines represent GG allele carriers and dashed lines A allele carriers (AA or GA). In D+ recipients, the presence of the A allele was associated with better uncensored graft survival (p=0.004) and patient survival (p=0.006). In the D- group (right graphs), the SNP did not affect uncensored graft survival or patient survival.

Figure 4: ELISPOT assay in response to CMV-pp65 peptides in AA (light dashed histogram) and GG patients (intense dashed histogram). Panel A) number of IFN-ɣ –producing cells/10^6 PBMC expressed as means ±SD (AA: 3343±1556, GG: 1295±1192/million cells; **p=0.003). Panel B) IFN- ɣ –producing cells/10^6 lymphocytes expressed as means ±SD (AA: 4980±2104, GG: 1929±1995; **p=0.006).

TABLE 1

	D+ patients			D- patients		
	G/G N=371	A-carriers N=115	P	G/G N=476	A-carriers N=157	P
Demographic characteristics						
Mean Donor age ± SD (years)	46 ± 17	43 ± 18	0.16	42 ± 16	41 ± 16	0.67
Living donor (%)	5 (1)	1 (1)	0.87	8 (1)	3 (2)	0.87
Mean Recipient age ± SD (years)	47 ± 15	46 ± 15	0.42	45 ± 15	46 ±15	0.41
Recipient male (%)	225 (60)	65 (57)	0.49	302 (63)	100 (64)	0.95
Cause of renal disease						
Diabetes (%)	22 (6)	6 (5)	0.95	25 (5)	5 (3)	0.40
Glomerulonephrtis (%)	57 (15)	16 (14)	0.82	58 (11)	12 (8)	0.27
Polycystic kidney (%)	68 (18)	25 (22)	0.50	67 (14)	37 (23)	0.01
IgA nephropathy (%)	29 (8)	12 (10)	0.49	54 (12)	20 (13)	0.74
Other (%)	195 (53)	56 (49)	0.54	277 (58	83 (53)	0.35
Pre-transplantation CMV-serology of the recipient						
R- (%)	176 (47)	57 (50)	0.77	233 (49)	72 (46)	0.56
R+ (%)	195 (53)	58 (50)	0.77	243 (51)	85 (54)	0.56
CMV prophylaxis (%)	175 (48)	52 (47)	0.80	19 (4)	6 (4)	0.87
Unknown prophylaxis (%)	10 (3)	4 (3)	0.90	9 (2)	4 (2)	0.85
Graft characteristics						
Graft rank > 1 (%)	56 (15)	12 (10)	0.27	58 (12)	22 (14)	0.64
Mean cold ischemia time ± SD (hours)	21 ± 9	21 ± 8	0.99	20 ± 8	21 ± 8	0.25
Mean HLA mismatches AB ± SD	2.7 ± 1	2.7 ± 1	0.58	2.7 ± 1	2.8 ± 1	0.29
Mean HLA mismatches DR ± SD	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.6	0.93	1.2 ± 0.7	1.2 ± 0.6	0.51
Anti-HLA immunization (%)	80 (24)	19 (18)	0.25	91 (21)	31 (22)	0.85
Delayed graft function (%)	78 (21)	26 (23)	0.82	101 (21)	37 (23)	0.61
Acute rejection (%)	122 (33)	34 (29)	0.21	161 (34)	54 (34)	0.97
Treatments in the first 3 months						
Anti-thymocyte globulins (%)	247 (67)	67 (59)	0.19	300 (63)	116 (74)	0.02
Anti-IL2R (%)	110 (30)	35 (31)	0.92	143 (30)	35 (22)	0.07
Calcineurin inhibitors (%)	345 (93	107 (93)	0.85	457 (96)	147 (94)	0.31
Mycophenolate mofetil (%)	251 (68)	77 (67)	0.94	302 (63)	99 (63)	0.98
Azathioprine (%)	108 (29	35 (30)	0.88	160 (34)	57 (36)	0.60

TABLE 2

	D+ patients			D- patients		
	G/G N=64	A-carriers N=21	p	G/G N=75	A-carriers N=21	p
Demographic characteristics						
Mean Donor age ± SD (years)	45 ± 14	44 ± 16	0.95	37 ± 13	44 ± 15	0.09
Mean Recipient age ± SD (years)	36 ± 14	35 ± 13	0.75	36 ± 14	39 ± 15	0.75
Recipient male (%)	35 (54)	13 (59)	0.91	44 (58)	11 (52)	0.79
Graft rank > 1 (%)	3 (5)	0 (0)	0.57	0	1	0.22
Cause of lung disease						
Cystic Fibrosis (%)	33 (52)	10 (45.5)	0.95	44 (58)	10 (48)	0.51
Emphysema (%)	9 (14)	4 (18)	0.84	15 (20)	6 (29)	0.58
Pulmonary fibrosis (%)	6 (9)	1 (4.5)	0.83	5 (7)	3 (14)	0.50
Other (%)	16 (25)	7 (32)	0.73	11 (15)	2 (9)	0.77
Pre-transpantation CMV-serology of the recipient						
R- (%)	32 (50)	10 (45)	0.90	44 (59)	15 (71)	0.42
R+ (%)	30 (47)	12 (55)	0.71	28 (37)	6 (29)	0.63
Unknown (%)	2 (3)	0	0.98	3 (4)	0	0.82
Transplanted organ (%)						
Mono-pulmonary (%)	14 (22)	4 (18)	0.76	12 (16)	7 (33)	0.14
Bi-pulmonary (%)	40 (62)	15 (68)	0.19	52 (69)	12 (57)	0.43
Heart and lung (%)	1 (2)	1 (5)	0.98	4 (5.5)	1 (5)	0.65
Others (%)	9 (14)	2 (9)	0.82	7(9.5)	1 (5)	0.82

TABLE 3

	G/G N=14	A-carriers N=7	p
Recipient characteristics			
Age (years)	54±14	52±11	0.97
Cause of renal disease			
- Diabetes (%)	0	1 (14)	0.71
- Glomerulonephritis (%)	1 (7)	1 (14)	0.79
- Polycystic kdney|(%)	5 (36)	2 (28)	0.87
- Other (%)	8 (57)	3 (43)	0.88
Graft characteristics			
Immunosupressive treatments in the first 3 months			
- Antilymphocyte antibodies (%)	8 (57)	4 (57)	0.64
- IL-2 receptor antagonists (%)	30.1	3 (43)	0.64
- Calcineurine inhibitor (%)	14 (100)	5 (72)	0.19
- Azathioprine (%)	1 (7)	2 (29)	0.51
- Rapamycine (%)	0 (0)	1 (14)	0.72
- Mycophenolate mofetyl (%)	13 (93)	5 (72)	0.51
CMV serology before transplantation (%)			
- D+R+	2 (14)	1 (14)	0.51
- D-R+	12 (86)	6 (86)	0.51
Graft rank	3 (21)	0 (0)	0.51
Class I AB mismatch	3.0±1.0	3.2±0.8	0.57
Class II DR mismatch	1.5±0.7	1.1±0.9	0.38
Chararacteristics when the blood sample			
Age (years)	60±13	61±13	0.45
Immunosupressive treatments			
- Calcineurine inhibitor (%)	12 (85)	5 (72)	0.45
- Azathioprine (%)	1 (7)	0 (0)	0.72
- Rapamycine (%)	1 (7)	1 (14)	0.79
- Mycophenolate mofetyl (%)	12 (86)	6 (86)	0.51
Blood count			
- Full lymphocyte (per mm3)	1262±443	1481±766	0.47
- CD8+ subpopulation (per mm3)	429±436	510±289	0.57
- CD4+ subpopulation (per mm3)	541±287	707±451	0.41
Clinical events after transplantation			
- CMV disease (%)	0 (0)	0 (0)	.
- Acute rejection (%)	4 (28)	1 (14)	0.86

FIGURE 1

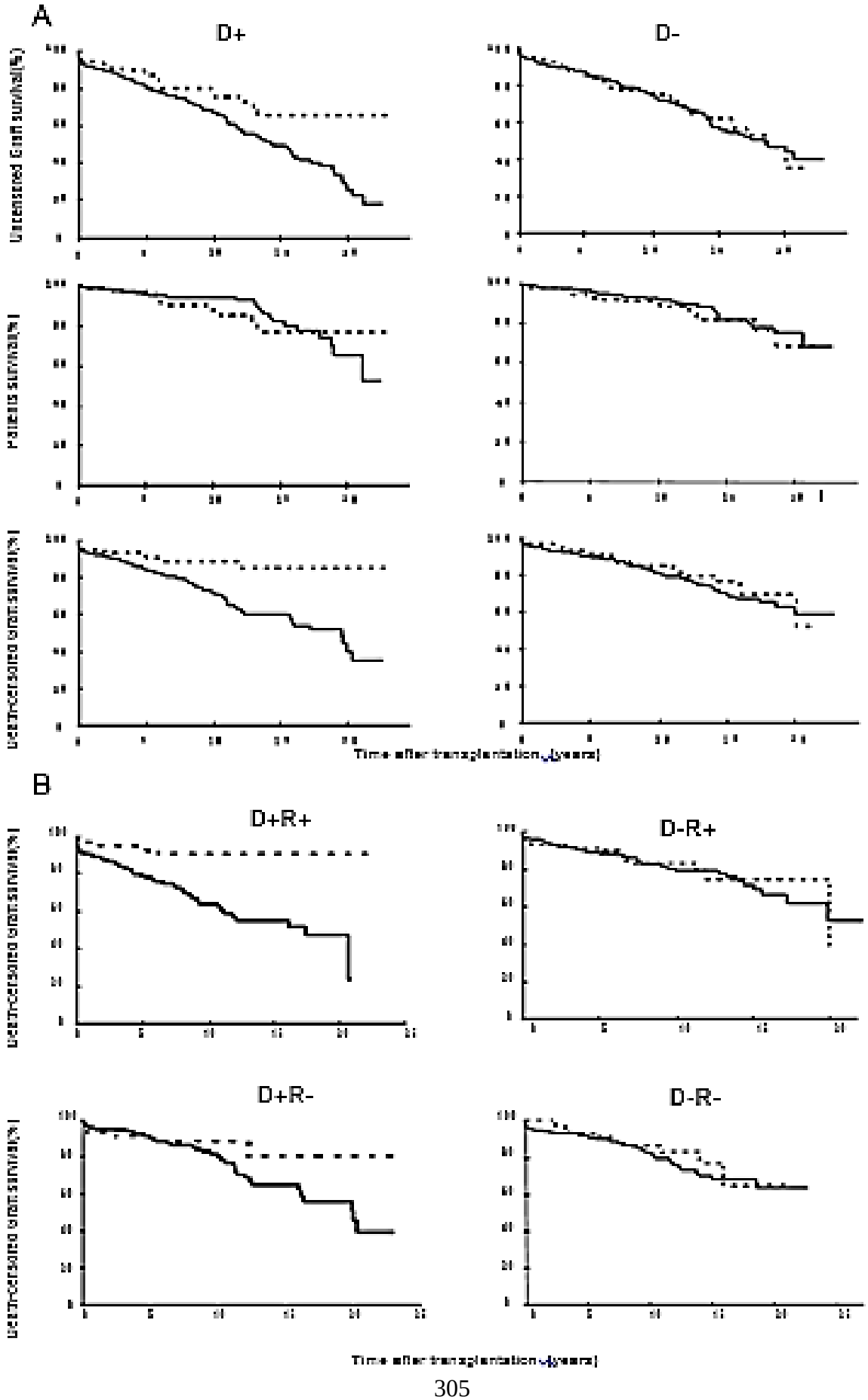


FIGURE 2

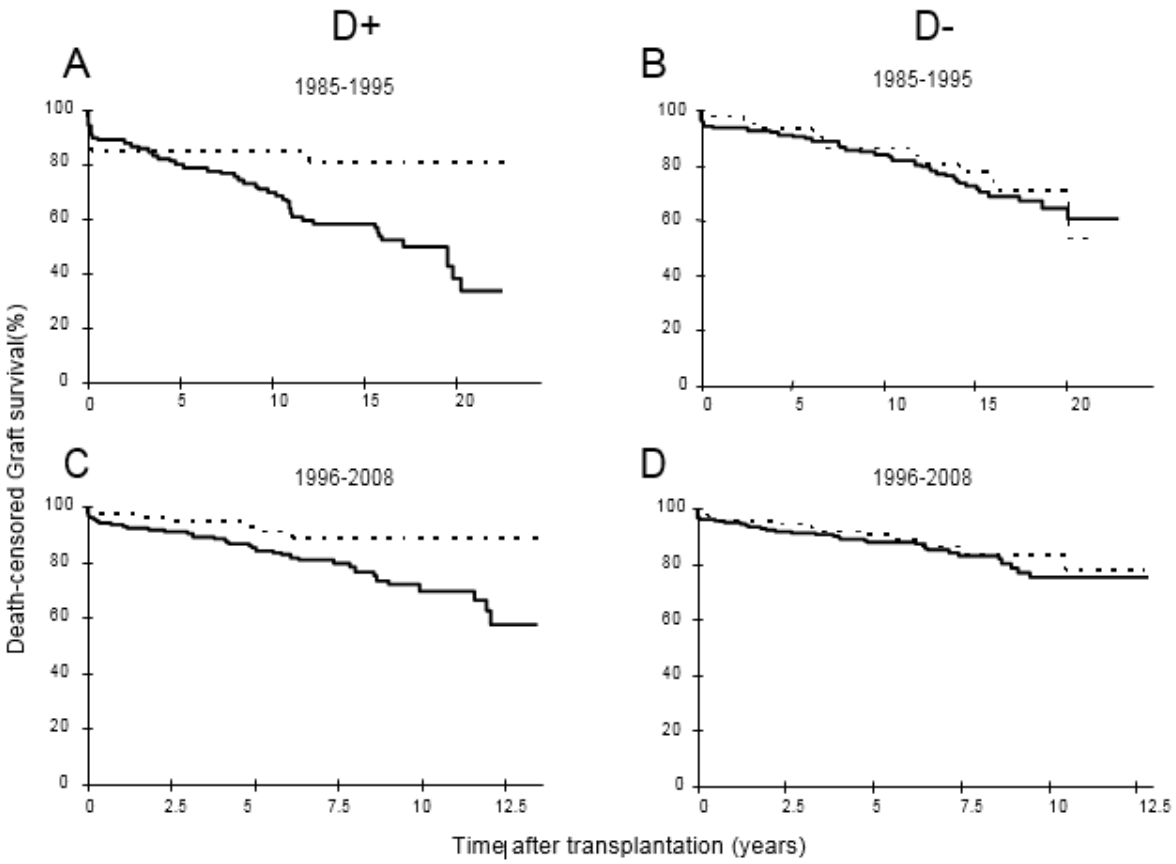

D+
D-
A
1985-1995
B
1985-1995
C
1996-2008
D
1996-2008
Death-censored Graft survival(%)
Time after transplantation (years)

FIGURE 3

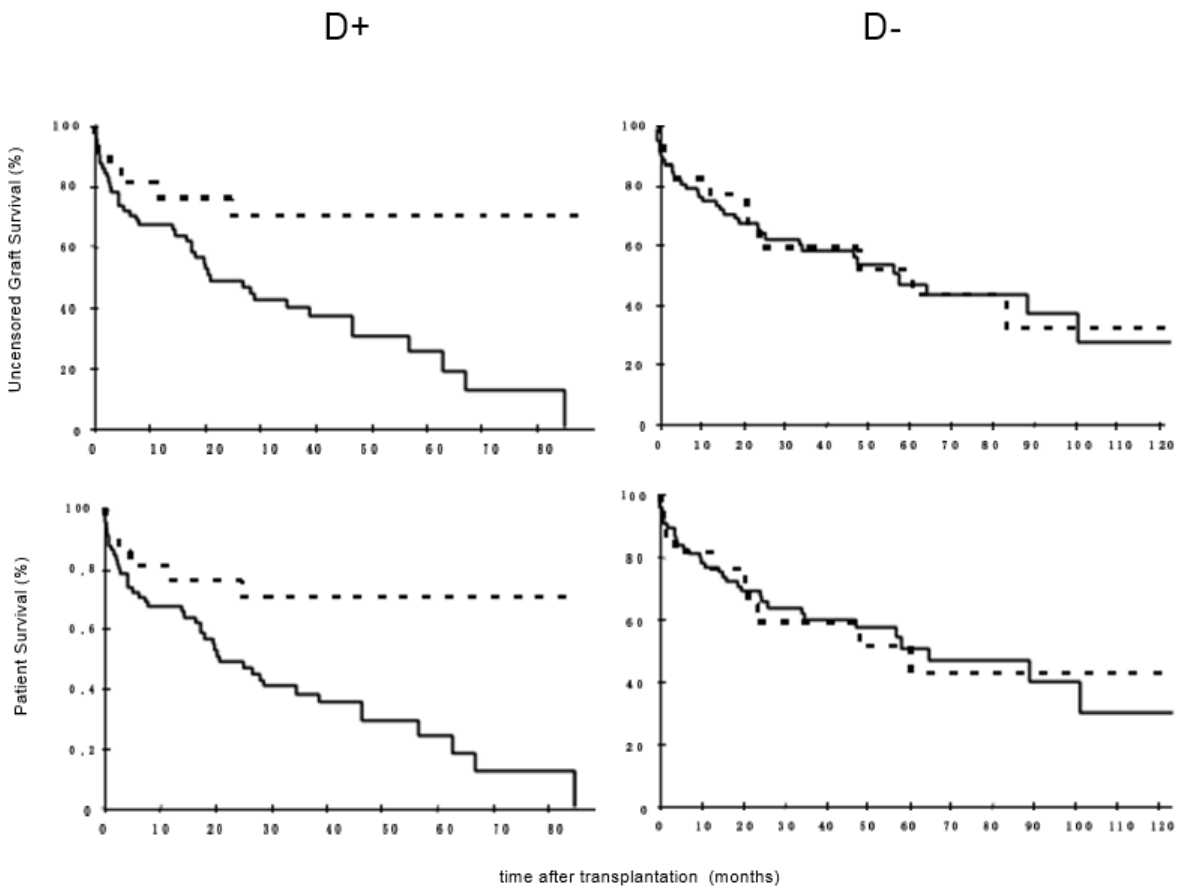
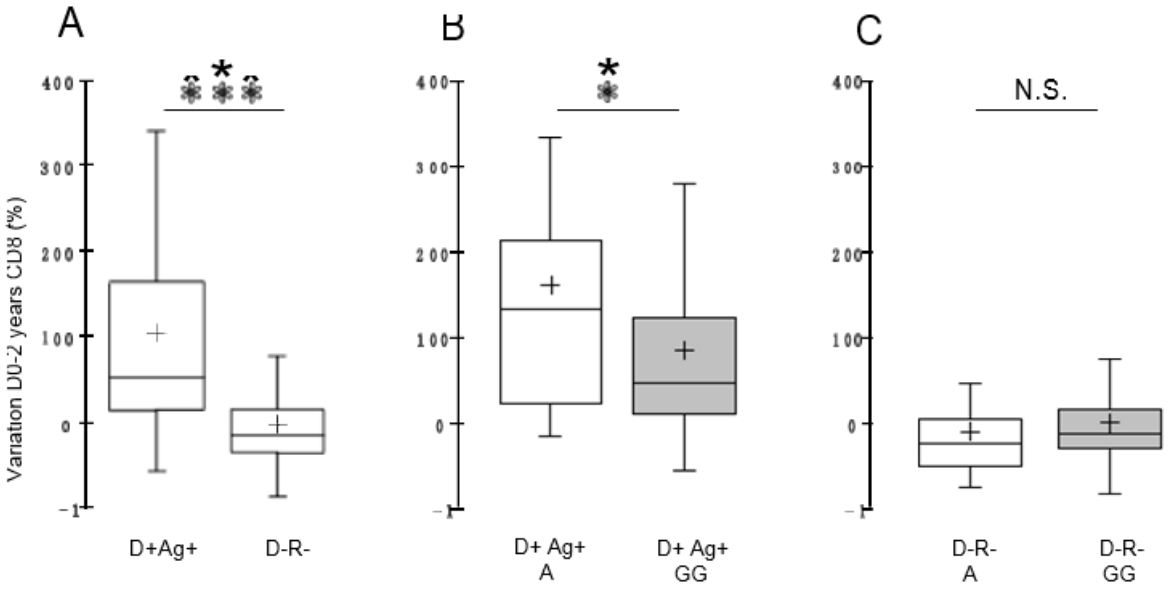

D+
D-
Uncensored Graft Survival (%)
Patient Survival (%)
time after transplantation (months)

FIGURE 4


A
B
C
*
*
N.S.
Variation D0-2 years CD8 (%)
400
300
200
100
0
-1
D+Ag+
D-R-
D+ Ag+ A
D+ Ag+ GG
D-R- A
D-R- GG

Bibliographie

Bibliographie

1. Wiig, H. *et al.* Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *The Journal of Clinical Investigation* **123,** (2013).
2. Kopp, C. *et al.* 23Na magnetic resonance imaging of tissue sodium. *Hypertension* **59,** 167–172 (2012).
3. Verbalis, J. G. Disorders of body water homeostasis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **17,** 471–503 (2003).
4. Go, W. Y., Liu, X., Roti, M. A., Liu, F. & Ho, S. N. NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 10673–8 (2004).
5. Popovic, Z. V *et al.* Hyperosmolarity impedes the cross-priming competence of dendritic cells in a TRIF-dependent manner. *Nat. Sci. reports* 1–14 (2017).
6. Machnik, A. *et al.* Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat. Med.* **15,** 545–552 (2009).
7. Cope, F. W. Spin-Echo Nuclear Magnetic Resonance Evidence for Complexing of Sodium Ions in Muscle, Brain, and Kidney. *Biophys. J.* **10,** 843–858 (1970).
8. Resnick, L. M. *et al.* Intracellular ionic consequences of dietary salt loading in essential hypertension. Relation to blood pressure and effects of calcium channel blockade. *J. Clin. Invest.* **94,** 1269–76 (1994).
9. Ructural, S. T., Lo, B. I. O. & Magleby, K. L. Ion-channel. doi:10.1038/nature21103
10. Torben, C. Quantification of Na+,K+ pumps and their transport rate in skeletal muscle: Functional significance. *J. Gen. Physiol.* **142,** 327–345 (2013).
11. Larsen, B. R., Stoica, A. & MacAulay, N. Managing Brain Extracellular K+ during Neuronal Activity: The Physiological Role of the Na+/K+-ATPase Subunit Isoforms. *Front. Physiol.* **7,** (2016).
12. Feehally, J., Floege, J., Tonelli, M. & Johnson, R. J. *Comprehensive clinical nephrology*. (2018).
13. Hoenig, M. P. & Zeidel, M. L. Homeostasis, the Milieu Intérieur, and the Wisdom of the Nephron. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9,** 1272–1281 (2014).
14. Heer, M. *et al.* Increasing sodium intake from a previous low or high intake affects water, electrolyte and acid-base balance differently. *Br. J. Nutr.* **101,** 1286–1294 (2009).
15. Damy, T., Guellich, A., Vermes, E., Deswarte, G. & Hittinger, L. Physiologie et physiopathologie du système rénine-angiotensine- aldostérone. *MT Cardio* **3,** 257–262 (2007).
16. Blaustein, M. P. & Hamlyn, J. M. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the Na+pump, the Na+/Ca2+exchanger and TRPC proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1802,** 1219–1229 (2010).
17. Rayner, B. & Ramesar, R. The importance of G protein-coupled receptor kinase 4 (GRK4) in pathogenesis of salt sensitivity, salt sensitive hypertension and response to antihypertensive treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **16,** 5741–5749 (2015).
18. Zanchetti, A. Salt, inflammation, pathophysiological mechanisms, and organ damage in hypertension. *J. Hypertens.* **32,** 205–206 (2014).
19. Fei, Y., Tsoi, M.-F. & Cheung, B. M. Y. Determining the Optimal Systolic Blood Pressure for Hypertensive Patients: A Network Meta-analysis. *Can. J. Cardiol.* (2018).
20. Ali, A. *et al.* American Heart Association High Blood Pressure Protocol 2017: A Literature Review. *Cureus* **10,** (2018).

21. Chrysant, G. S. High salt intake and cardiovascular disease: Is there a connection? *Nutrition* **16,** 662–664 (2000).
22. Intersalt Cooperative Research, G. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ* **297,** 319–328 (1988).
23. Elliott, P. *et al.* Intersalt revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within and across populations. *British Medical Journal* **312,** 1249–1253 (1996).
24. Luft, Friedrich & Weinberger, Myron. Heterogeneous the salt-sensitivity responses to changes in dietary salt intake : the salt-sensitivity paradigm. *American Journal of Clinical Nutrition* **65,** 612–617 (1997).
25. Schmidlin, O., Forman, A., Sebastian, A. & Morris Jr., R. C. What Initiates the Pressor Effect of Salt in Salt-Sensitive Humans? Observations in Normotensive African Americans. *Hypertension* **49,** 1032–1039 (2007).
26. He, F. J. & MacGregor, G. A. Reducing Population Salt Intake Worldwide: From Evidence to Implementation. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **52,** 363–382 (2010).
27. Barba, G. *et al.* Incidence of hypertension in individuals with different blood pressure salt-sensitivity: Results of a 15-year follow-up study. *J. Hypertens.* **25,** 1465–1471 (2007).
28. Mu, J., Zheng, S., Lian, Q., Liu, F. & Liu, Z. Evolution of blood pressure from adolescents to youth in salt sensitivies: A 18-year follow-up study in Hanzhong children cohort. *Nutr. J.* **11,** 1–5 (2012).
29. Franco, V. & Oparil, S. Salt Sensitivity, a Determinant of Blood Pressure, Cardiovascular Disease and Survival. *J. Am. Coll. Nutr.* **25,** 247S–255S (2006).
30. Graudal, N. & Jürgens, G. The blood pressure sensitivity to changes in sodium intake is similar in Asians, Blacks and Whites. An analysis of 92 randomized controlled trials. *Front. Physiol.* **6,** 4–11 (2015).
31. Armando, I., Villar, V. A. M. & Jose, P. A. Genomics and pharmacogenomics of salt-sensitive hypertension Minireview. *Curr. Hypertens. Rev.* **11,** 49–56 (2015).
32. Horne, J., O'Connor, C., Madill, J., Rinaldi, S. & Gilliland, J. Re: "Polymorphisms of three genes (ACE, AGT and CYP11B2) in the renin–angiotensin–aldosterone system are not associated with blood pressure salt sensitivity: a systematic meta-analysis". *Blood Press.* **26,** 255–256 (2017).
33. Greaney, J. L. *et al.* Dietary sodium loading impairs microvascular function independent of blood pressure in humans: Role of oxidative stress. *J. Physiol.* **590,** 5519–5528 (2012).
34. Matthews, E. L. *et al.* High dietary sodium reduces brachial artery flow-mediated dilation in humans with salt-sensitive and salt-resistant blood pressure. *J. Appl. Physiol.* **118,** 1510–1515 (2015).
35. Gijsbers, L. *et al.* Effects of sodium and potassium supplementation on endothelial function: A fully controlled dietary intervention study. *Br. J. Nutr.* **114,** 1419–1426 (2013).
36. Blanch, N., Clifton, P. M., Petersen, K. S. & Keogh, J. B. Effect of sodium and potassium supplementation on vascular and endothelial function: A randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **101,** 939–946 (2015).
37. Dickinson, K. M., Clifton, P. M. & Keogh, J. B. Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **93,** 500–505 (2011).
38. Dickinson, K. M., Clifton, P. M. & Keogh, J. B. A reduction of 3g/day from a usual 9g/day salt diet improves endothelial function and decreases endothelin-1 in a randomised cross_over study in normotensive overweight and obese subjects.

Atherosclerosis **233,** 32–38 (2014).
39. Jablonski, K. L. *et al.* Dietary sodium restriction reverses vascular endothelial dysfunction in middle-aged/older adults with moderately elevated systolic blood pressure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **61,** 335–343 (2013).
40. Strazzullo, P., D'Elia, L., Kandala, N.-B. & Cappuccio, F. P. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: Metaanalysis of prospective studies. *BMJ* **339,** (2009).
41. Aburto, N. J. *et al.* Effect of lower sodium intake on health: Systematic review and meta-analyses. *BMJ* **346,** 1–20 (2013).
42. Brodney, S. Reduced Dietary Salt for the Prevention of Cardiovascular Disease. *Cochrane Rev.* **12,** 148–149 (2016).
43. American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. *World Cancer Research Fund International*, *Washington, D.C* (2007).
44. Safar, M. E., Thuilliez, C., Richard, V. & Benetos, A. Pressure-independent contribution of sodium to large artery structure and function in hypertension. *Cardiovasc. Res.* **46,** 269–276 (2000).
45. DuPont, J. J. *et al.* High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt-resistant humans. *J. Hypertens.* **31,** 530–536 (2013).
46. Storm, B. *et al. Sodium Intake in Populations Assessment of Evidence*. *Institute of Medicine* (2013). doi:10.17226/18311
47. Whelton, P. K. *et al.* Sodium Reduction and Weight Loss in the Treatment of Hypertension in Older Persons. *Jama* **279,** (1998).
48. The Trials of Hypertension Prevention Collaborative Research, G. Effects of Weight Loss and Sodium Reduction Intervention on Blood Pressure and Hypertension Incidence in Overweight People With High-Normal Blood Pressure. *Arch Intern Med.* **157,** 657–667 (1997).
49. Sacks, F. M. *et al.* Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet. *N. Engl. J. Med.* **338,** 3–10 (2001).
50. Greenland, P. Beating High Blood Pressure With Low -Sodium Dash. *N. Engl. J. Med.* **344,** 53–55 (2001).
51. Graudal, N., Hubeck-Graudal, T., Jürgens, G. & McCarron, D. A. The Significance of Duration and Amount of Sodium Reduction Intervention in Normotensive and Hypertensive Individuals: A Meta-Analysis. *Adv. Nutr.* **6,** 169–177 (2015).
52. He, F. J., Li, J. & Macgregor, G. A. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ* **346,** 1–15 (2013).
53. Kidane, D. *et al.* Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49,** 116–139 (2014).
54. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420,** 860–867 (2002).
55. Hagerling, C., Casbon, A. J. & Werb, Z. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends Cell Biol.* **25,** 214–220 (2015).
56. Wang, K. & Karin, M. *Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer*. *Advances in cancer research* **128,** (Elsevier Inc., 2015).
57. Grivennikov, S. I. *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491,** 254–258 (2012).
58. Cone, C. D. Variation of the Transmembrane Potential level as a Basic Mechanism of Mitosis Control. *Oncology* **24,** 438–470 (1970).
59. Cone, C. D. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J. Theor. Biol.* **30,** 151–181 (1971).
60. Cone, C. D. & Tongier, M. Contact inhibition of division: Involvement of the electrical

transmembrane potential. *J. Cell. Physiol.* **82,** 373–386 (1973).
61. Cone, C. & Cone, C. Induction of mitosis in mature neurons in central nervous system by sustained depolarization. *Science (80-.).* **192,** 155–158 (1976).
62. Cone, C. D. Ionically mediated induction of mitogenesis in CNS neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **339,** 115–131 (1980).
63. BURG, M. B., FERRARIS, J. D. & DMITRIEVA, N. I. Cellular Response to Hyperosmotic Stresses. *Am. Physiol. Soc.* **87,** 1441–1474 (2007).
64. Dmitrieva, N. I., Cai, Q. & Burg, M. B. Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Cell Biol.* **101,** 2317–2322 (2004).
65. Kopp, C. *et al.* 23Na magnetic resonance imaging-determined tissue sodium in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension* **61,** 635–640 (2013).
66. Dahlmann, A. *et al.* Magnetic resonance-determined sodium removal from tissue stores in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **87,** 434–441 (2015).
67. Titze, J. *et al.* Balancing wobbles in the body sodium. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31,** 1078–1081 (2016).
68. Jantsch, J. & Titze, J. Cutaneous Na+ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab.* **42,** 407–420 (2016).
69. Fellner, R. C. *et al.* High-salt diet blunts renal autoregulation by a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Am J Physiol Ren. Physiol* **307,** F33-40 (2014).
70. Jin, K. & Vaziri, N. Salt-sensitive hypertension in mitochondrial superoxide dismutase deficiency is associated with intra-renal oxidative stress and inflammation. *Clin. Exp. Nephrol.* **18,** 1342–1751 (2014).
71. Coussens, L. M., Zitvogel, L. & Palucka, A. K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* **339,** 286–91 (2013).
72. Wu, P., Nielsen, T. E. & Clausen, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* **36,** 422–439 (2015).
73. H.M.W., V. Inhibition of angiogenesis in cancer patients. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **10,** 403–412 (2005).
74. Takahashi, S. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF Receptors and Their Inhibitors for Antiangiogenic Tumor Therapy. *Pharm. Soc. Japan* **34,** 1785–1788 (2011).
75. FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr. Rev.* **25,** 581–611 (2004).
76. Amara, S., Alotaibi, D. & Tiriveedhi, V. NFAT5/STAT3 interaction mediates synergism of high salt with IL-17 towards induction of VEGF-A expression in breast cancer cells. *Oncol. Lett.* **12,** 933–943 (2016).
77. Pidgeon, G. P., Barr, M. P., Harmey, J. H., Foley, D. A. & Bouchier-Hayes, D. J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br. J. Cancer* **85,** 273–278 (2001).
78. Gao, W. *et al.* Involvement of lymphatic system in salt sensitive hypertension in humans. *Int. J. Cardiol.* **152,** S100–S101 (2011).
79. Slagman, M. C. J. *et al.* Vascular endothelial growth factor C levels are modulated by dietary salt intake in proteinuric chronic kidney disease patients and in healthy subjects. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27,** 978–982 (2012).
80. Lankhorst, S. *et al.* Salt Sensitivity of Angiogenesis Inhibition-Induced Blood Pressure Rise: Role of Interstitial Sodium Accumulation? *Hypertension* **69,** 919–926 (2017).
81. Mizuno, R., Isshiki, M., Ono, N., Nishimoto, M. & Fujita, T. A High Salt Diet Alters

Pressure-Induced Mechanical Activity of the Rat Lymphatics with Enhancement of Myogenic Characteristics. *Lymphat. Res. Biol.* **13,** 2–9 (2015).
82. Remo, A. *et al.* Systems biology analysis reveals NFAT5 as a novel biomarker and master regulator of inflammatory breast cancer. *J. Transl. Med.* **13,** 1–13 (2015).
83. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* 519–530 (1926).
84. Li, C., Zhang, G., Zhao, L., Ma, Z. & Chen, H. Metabolic reprogramming in cancer cells: Glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J. Surg. Oncol.* **14,** 1–7 (2016).
85. Amara, S., Zheng, M. & Tiriveedhi, V. Oleanolic Acid Inhibits High Salt-Induced Exaggeration of Warburg-like Metabolism in Breast Cancer Cells. *Cell Biochem. Biophys.* **74,** 427–434 (2016).
86. He, F. J., Markandu, N. D., Coltart, R. & Graham, A. Effect of short-term supplementation of potassium chloride and potassium citrate on blood pressure in patients with untreated essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* **17,** 181–182 (2004).
87. Shalapour, S., Karin, M., Shalapour, S. & Karin, M. Immunity , inflammation , and cancer : an eternal fight between good and evil. *J. Clin. Invest.* **125,** 3347–3355 (2015).
88. Lopez Gelston, C. A. & Mitchell, B. M. Recent advances in immunity and hypertension. *Am. J. Hypertens.* **30,** 643–652 (2017).
89. Caillon, A. & Schiffrin, E. L. Role of Inflammation and Immunity in Hypertension: Recent Epidemiological, Laboratory, and Clinical Evidence. *Curr. Hypertens. Rep.* **18,** 21 (2016).
90. Yamashita, T., Sasaki, N., Kasahara, K. & Hirata, K. ichi. Anti-inflammatory and immune-modulatory therapies for preventing atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Cardiol.* **66,** 1–8 (2015).
91. Hucke, S. *et al.* Sodium chloride promotes pro-inflammatory macrophage polarization thereby aggravating CNS autoimmunity. *J. Autoimmun.* 1–12 (2015).
92. Müller, S. *et al.* Salt-Dependent Chemotaxis of Macrophages. *PLoS One* **8,** 2–10 (2013).
93. Amara, S., Whalen, M. & Tiriveedhi, V. High salt induces anti-inflammatory MΦ2-like phenotype in peripheral macrophages. *Biochem. Biophys. Reports* **7,** 1–9 (2016).
94. Kleinewietfeld, M. *et al.* Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* **496,** 518–22 (2013).
95. Jörg, S. *et al.* High salt drives Th17 responses in experimental autoimmune encephalomyelitis without impacting myeloid dendritic cells. *Exp. Neurol.* **279,** 212–222 (2016).
96. Hernandez, A. L. *et al.* Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3 + regulatory T cells. *The Journal of Clinical Investigation* **125,** (2015).
97. Daolin Tang1,*, Rui Kang1, Carolyn B. Coyne2, Herbert J. Zeh1, M. T. L. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* **249,** 158–175 (2012).
98. Spencer, L. A. & Weller, P. F. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol Cell Biol* **88,** 250–256 (2010).
99. Vivier, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (80-.).* **331,** 44–49 (2011).
100. Spits, H. *et al.* Innate lymphoid cells-a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* **13,** 145–149 (2013).
101. Karlmark, K., Tacke, F. & Dunay, I. Monocytes in health and disease — Minireview. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **2,** 97–102 (2012).
102. Murray, P. R. Monocyte recruitment during infection and inflammation Chao. *Nat Rev*

Immunol. **11,** 762–774 (2011).
103. Jakubzick, C. V., Randolph, G. J. & Henson, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Rev. Immunol.* **17,** 349–362 (2017).
104. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *F1000 Prime Reports* **13,** 1–13 (2014).
105. Tacke, F. *et al.* Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J. Exp. Med.* **203,** 583–597 (2006).
106. Acharya, M. *et al.* αv Integrin expression by DCs is required for Th17 cell differentiation and development of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J. Clin. Invest.* **120,** 4445–4452 (2010).
107. Melton, A. C. *et al.* Expression of αvβ8 integrin on dendritic cells regulates Th17 cell development and experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J. Clin. Invest.* **120,** 4436–4444 (2010).
108. Travis, M. A. *et al.* Loss of integrin αvβ8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* **449,** 361–365 (2007).
109. Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9,** 271–296 (1991).
110. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.* **137,** 1142–1162 (1973).
111. Burnet, F. M. Theories of Immunity. *Perspect. Biol. Med.* **3,** 447–458 (1960).
112. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392,** 245–252 (1998).
113. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* **5,** 1219–1226 (2004).
114. Romani, N. *et al.* Migration of dendritic cells into lymphatics - The Langerhans cell example: Routes, regulation, and relevance. *Int. Rev. Cytol.* **207,** 237–270 (2001).
115. Steinbach, F. & Hiepe, F. Development of accessory phenotype and function during the differentiation of monocyte-derived dendritic. *Res. Immunol.* 627–632 (1998).
116. Segura, E. & Amigorena, S. Identification of human inflammatory dendritic cells. *OncoImmunology* 1–2 (2013).
117. Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* **34,** 440–445 (2013).
118. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* **81,** 1–5 (2006).
119. Turvey, S. E. & Broide, D. H. Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125,** S24–S32 (2010).
120. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* **30,** 16–34 (2011).
121. Drummond, R. A. & Brown, G. D. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr. Opin. Microbiol.* **14,** 392–399 (2011).
122. Deretic, V., Saitoh, T. & Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13,** 722–737 (2013).
123. Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I. & Kagan, J. C. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **33,** 257–290 (2015).
124. Beutler, B. A. TLRs and innate immunity. *Blood* **113,** 1399–1407 (2008).
125. Kurt-jones, E. A. *et al.* Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* **1,** (2000).
126. Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudaravalli, R. & Ross, S. R. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci*

USA **99,** 2281–2286 (2002).
127. Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S. & Kolb, H. Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex. *J. Immunol.* **164,** 558–561 (2000).
128. Termeer, C. *et al.* Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med* **195,** 99–111 (2002).
129. Biragyn, A. Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by β -Defensin 2. *Science (80-.).* **298,** (2002).
130. Suzuki, N. *et al.* Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* **416,** 2–6 (2002).
131. Lomaga, M. A. *et al.* TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1 , CD40 , and LPS signaling. *GENES Dev.* **13,** 1015–1024 (1999).
132. Gohda, J., Matsumura, T., Inoue, J. & Alerts, E. Cutting Edge: TNFR-Associated Factor (TRAF) 6 Is Essential for MyD88-Dependent Pathway but Not Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β (TRIF)-Dependent Pathway in TLR Signaling. *J. Immunol.* **173,** 2913–2917 (2004).
133. Sato, S. *et al.* Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **6,** 1087–1095 (2005).
134. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H. & Hoshino, K. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-like Receptor Signaling Pathway Kiyoshi Takeda and Shizuo Akira Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : http://www.jstor.org/stable/3834886 JSTOR is a not-for-profi. *Science (80-.).* **301,** 640–643 (2003).
135. Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E. & Baltimore, D. Achieving Stability of Lipopolysaccharide-Induced NF- k B Activation. *Science (80-.).* **309,** (2005).
136. Tobias, P. S., Soldau, K. & Ulevitch, R. J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* **164,** 777–793 (1986).
137. Wright, B. Y. S. D. *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* **170,** 1236–1241 (1989).
138. Wright, S. D. *et al.* CD14 , a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. *Science (80-.).* **249,** 1431–1433 (2016).
139. Lu, Y., Yeh, W. & Ohashi, P. S. LPS / TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42,** 145–151 (2008).
140. Mogensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22,** 240–273 (2009).
141. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410,** 37–40 (2001).
142. Kawai, T. & Akira, S. Signaling to NF-κB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* **13,** 460–469 (2007).
143. Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-κB AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16,** 225–260 (1998).
144. Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I. & Matikainen, S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun.* **2,** 349–355 (2001).
145. Karin, M. Nuclear factor-κB in cancer development and progression. *Nature* **441,** 431–436 (2006).
146. Schroder, K. & Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell* **140,** 821–832 (2010).
147. Martinon, F. & Tschopp, J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **117,** 561–574 (2004).
148. Zewinger, S., Schumann, T., Fliser, D. & Speer, T. Innate immunity in CKD-associated

vascular diseases. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31,** 1813–1821 (2016).
149. The Plasticity of Dendritic Cell Responses to Pathogens and Their Components. *Huang, Qian* **294,** 870–875 (2001).
150. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5,** 987–995 (2004).
151. Laudanna, C., Kim, J. Y., Constantin, G. & Butcher, E. C. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev.* **186,** 37–46 (2002).
152. Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R. & Roitt, I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* **21,** 12–23 (2003).
153. Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Direct Action of Type I IFN on NK Cells Is Required for Their Activation in Response to Vaccinia Viral Infection In Vivo. *J. Immunol.* **180,** 1592–1597 (2008).
154. Salio, M. Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *PNAS* **104,** 20490–20495 (2007).
155. Matzinger, P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. **296,** 301–305 (2016).
156. Lebien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood* **112,** 1570–1580 (2008).
157. Martin, S. F. *T Lymphocytes as Tools in Diagnostics and Immunotoxicology*. *Springer Basel* **104,** (2014).
158. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N. & Forsthuber, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* **74,** 5–17 (2015).
159. Dai, H. *et al.* Blockade of CD27/CD70 pathway to reduce the generation of memory T cells and markedly prolong the survival of heart allografts in presensitized mice. *Transpl. Immunol.* **24,** 195–202 (2011).
160. Grant, E. P. *et al.* Fine Specificity of TCR Complementarity-Determining Region Residues and Lipid Antigen Hydrophilic Moieties in the Recognition of a CD1-Lipid Complex. *J. Immunol.* **168,** 3933–3940 (2002).
161. Chaplin, D. D. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol.* **125,** (2010).
162. Heath, W. R., Carbone, F. R., Walter, T., Hall, E. & Royal, P. O. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol.* **1,** 126–135 (2001).
163. Feau, S. *et al.* The CD4+ T-cell help signal is transmitted from APC to CD8 + T-cells via CD27-CD70 interactions. *Nat. Commun.* **3,** 948–949 (2012).
164. Denoeud, J. & Moser, M. Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *J. Leukoc. Biol.* **89,** 195–203 (2011).
165. Comi, M., Amodio, G. & Gregori, S. Interleukin-10-producing DC-10 is a unique tool to promote tolerance via antigen-specific T regulatory type 1 cells. *Front. Immunol.* **9,** 1–8 (2018).
166. Farias, A. S. *et al.* Vitamin D3induces IDO+tolerogenic DCs and enhances treg, reducing the severity of EAE. *CNS Neurosci. Ther.* **19,** 269–277 (2013).
167. O'Keeffe, M., Mok, W. H. & Radford, K. J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **72,** 4309–4325 (2015).
168. Said, A. & Weindl, G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. *J. Immunol. Res.* **2015,** (2015).
169. Xie, J. *et al.* Critical roles of Raf / MEK / ERK and PI3K / AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp. Hematol.* **33,** 564–572 (2005).
170. Fukao, T. *et al.* P13K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat. Immunol.* **3,** 875–881 (2002).

171. Zaru, R., Mollahan, P. & Watts, C. 3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 deficiency perturbs toll-like receptor signaling events and actin cytoskeleton dynamics in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **283,** 929–939 (2008).
172. Park, D., Lapteva, N., Seethammagari, M., Slawin, K. M. & Spencer, D. M. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat. Biotechnol.* **24,** 1581–1590 (2006).
173. Yang, W. *et al.* Akt2-and ETS1-dependent IP3 receptor 2 expression in dendritic cell migration. *Cell. Physiol. Biochem.* **33,** 222–236 (2014).
174. Zhao, H. *et al.* Angiotensin II induces TSLP via an AT1 receptor/NF-KappaB pathway, promoting Th17 differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* **30,** 1383–1397 (2012).
175. Guha, M. & Mackman, N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **277,** 32124–32132 (2002).
176. Martin, M. *et al.* Role of the Phosphatidylinositol 3 Kinase-Akt Pathway in the Regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **171,** 717–725 (2003).
177. Fang, H. *et al.* Kruppel-like factor 2 regulates dendritic cell activation in patients with acute coronary syndrome. *Cell. Physiol. Biochem.* **32,** 931–941 (2013).
178. Aksoy, E. *et al.* Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kB activation and IFN-B synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4. *Eur. J. Immunol.* **35,** 2200–2209 (2005).
179. De Jong, J. M. H. *et al.* Dendritic cells, but not macrophages or B cells, activate major histocompatibility complex class II-restricted CD4+T cells upon immune-complex uptake in vivo. *Immunology* **119,** 499–506 (2006).
180. Zhan, Y., Carrington, E. M., Zhang, Y., Heinzel, S. & Lew, A. M. Life and death of activated T cells: How are they different from naïve T Cells? *Front. Immunol.* **8,** 1–9 (2017).
181. Ley, K. The second touch hypothesis: T cell activation, homing and polarization. *F1000Research* 1–14 (2014).
182. Sun, B. *Th cell differentiation and their function*. (Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2014).
183. Totemeyer, S. *et al.* IFN- Enhances Production of Nitric Oxide from Macrophages via a Mechanism That Depends on Nucleotide Oligomerization Domain-2. *J. Immunol.* **176,** 4804–4810 (2006).
184. Ramirez-Alejo, N. & Santos-argumedo, L. Innate Defects of the IL-12 / IFN- g Axis in Susceptibility to Infections by Mycobacteria and Salmonella. *J. Interf. CYTOKINE Res.* **00,** (2013).
185. Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. & Casali, P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination : induction , targeting and beyond. *Nat. Publ. Gr.* **12,** 517–531 (2012).
186. Gordon, C. L. *et al.* Association between Severe Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus Infection and Immunoglobulin G 2 Subclass Deficiency. *Clin. Infect. Dis.* **50,** 672–678 (2010).
187. Van Der Werf, N. *et al.* Th2 Responses to Helminth Parasites Can Be Therapeutically Enhanced by, but Are Not D ependent upon, GITR − GITR Ligand Costimulation In Vivo. *J. Immunol.* **187,** 1411–1420 (2011).
188. Hegazy, A. N. *et al.* Article Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3 + T-bet + Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions. *Cell Press Immun.* **32,** 116–128 (2010).
189. Hofmann, A. & Burks, A. W. Pollen food syndrome: update on the allergens. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **8,** 413–417 (2008).

190. Munder, M., Eichmann, K. & Modolell, M. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Regulation by CD4 + T Cells Correlates with Synthase/Arginase Balance: Competitive of Th1/Th2 Phenotype. *J Immunol* **160,** 5347–5354 (1998).
191. Ghoreschi, K. *et al.* Generation of pathogenic TH 17 cells in the absence of TGF-β 2 signalling. *Nature* **467,** 967–971 (2010).
192. Segura, E. *et al.* Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* **38,** 336–348 (2013).
193. Iwakura, Y. & Ishigame, H. The IL-23 / IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* **116,** 1218–1222 (2006).
194. De Jong, E., Suddason, T. & Lord, G. M. Translational mini-review series on Th17 Cells: Development of mouse and human T helper 17 cells. *Clin. Exp. Immunol.* **159,** 148–158 (2010).
195. Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. Plasticity of CD4+T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30,** 646–655 (2009).
196. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* **30,** 531–564 (2012).
197. Paust, S., Lu, L., McCarty, N. & Cantor, H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101,** 10398–10403 (2004).
198. Ley, K. & Kansas, G. S. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **4,** 325–336 (2004).
199. Groom, J. R. *et al.* CXCR3 Chemokine Receptor-Ligand Interactions in the Lymph Node Optimize CD4+T Helper 1 Cell Differentiation. *Immunity* **37,** 1091–1103 (2012).
200. Oestreich, K. J. & Weinmann, A. S. Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* **24,** 191–195 (2012).
201. Jantsch, J., Binger, K. J., Müller, D. N. & Titze, J. Macrophages in homeostatic immune function. *Front. Physiol.* **5 MAY,** 1–7 (2014).
202. Chessa, F., Hielscher, T., Mathow, D., Gröne, H. J. & Popovic, Z. V. Transcriptional profiling of dendritic cells matured in different osmolarities. *Genomics Data* **7,** 64–66 (2016).
203. Barbaro, N. R. *et al.* Dendritic Cell Amiloride-Sensitive Channels Mediate Sodium-Induced Inflammation and Hypertension. *Cell Rep* **21,** 1009–1020 (2017).
204. Vinh, A. *et al.* Inhibition and genetic ablation of the B7/CD28 T-cell costimulation axis prevents experimental hypertension. *Circulation* **122,** 2529–2537 (2010).
205. Schatz, V. *et al.* Elementary immunology: Na+as a regulator of immunity. *Pediatr. Nephrol.* **32,** 201–210 (2017).
206. Wu, H. *et al.* High salt promotes autoimmunity by TET2-induced DNA demethylation and driving the differentiation of Tfh cells. *Sci. Rep.* **6,** 28065 (2016).
207. Schmid, E. *et al.* Serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 sensitive NF-KB signaling in dendritic cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **34,** 943–954 (2014).
208. Wu, C. *et al.* Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* **496,** 513–7 (2013).
209. Lang, F., Bo, C., Strutz-seebohm, N. & Vallon, V. (Patho) physiological Significance of the Serum- and. *Physiol. Rev* **86,** 1151–1178 (2006).
210. CHEN, S.-Y., Bhargava, A. & Mastroberardino, L. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 2514–2519 (1999).
211. Butterworth, M. B. Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1802,** 1166–1177 (2010).

212. Binger, K., Linker, R., Muller, D. & Kleinewietfeld, M. Sodium chloride, SGK1, and Th17 activation. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* (2015).
213. MURRAY, J. T. *et al.* Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem. J.* **384,** 477–488 (2004).
214. Hosoi, F. *et al.* N-myc downstream regulated gene 1/Cap43 suppresses tumor growth and angiogenesis of pancreatic cancer through attenuation of inhibitor of κB kinase β expression. *Cancer Res.* **69,** 4983–4991 (2009).
215. Murakami, Y. *et al.* Identification of sites subjected to serine/threonine phosphorylation by SGK1 affecting N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1)/Cap43-dependent suppression of angiogenic CXC chemokine expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396,** 376–381 (2010).
216. Zhou, H. *et al.* Inhibition of serum-and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances TLR-mediated inflammation and promotes endotoxin-driven organ failure. *FASEB J.* **29,** 3737–3749 (2015).
217. Sigaux, J., Semerano, L., Favre, G., Bessis, N. & Boissier, M.-C. Salt, inflammatory joint disease, and autoimmunity. *Jt. Bone Spine* **85,** 411–416 (2018).
218. Pons, H. *et al.* Immune reactivity to heat shock protein 70 expressed in the kidney is cause of salt-sensitive hypertension. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **304,** F289-99 (2013).
219. Parra, G. *et al.* Experimental induction of salt-sensitive hypertension is associated with lymphocyte proliferative response to HSP70. *Kidney Int.* **74,** (2008).
220. Bravo, J. *et al.* Vimentin and heat shock protein expression are induced in the kidney by angiotensin and by nitric oxide inhibition. *Kidney Int. Suppl.* **64,** S46–S51 (2003).
221. Hoch, N. E. *et al.* Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296,** R208–R216 (2008).
222. Amara, S. & Tiriveedhi, V. Inflammatory role of high salt level in tumor microenvironment (Review). *Int. J. Oncol.* **50,** 1477–1481 (2017).
223. Sigaux, J., Semerano, L., Favre, G., Bessis, N. & Boissier, M. C. Salt, inflammatory joint disease, and autoimmunity. *Jt. Bone Spine* **85,** 411–416 (2018).
224. Safa, K. *et al.* Salt Accelerates Allograft Rejection through Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase-1 – Dependent Inhibition of Regulatory T Cells. *JASN* 1–7 (2015).
225. Rodríguez-Iturbe, B., Quiroz, Y., Ferrebuz, A., Parra, G. & Vaziri, N. D. Evolution of renal interstitial inflammation and NF-κB activation in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Nephrol.* **24,** 587–594 (2004).
226. Rodriguez-Iturbe, B., Franco, M. & Johnson, R. J. Impaired pressure natriuresis is associated with interstitial inflammation in salt-sensitive hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **22,** 37–44 (2013).
227. Rodríguez-Iturbe, B. *et al.* Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282,** F191–F201 (2002).
228. Franco, M. *et al.* Impaired pressure natriuresis resulting in salt-sensitive hypertension is caused by tubulointerstitial immune cell infiltration in the kidney. *Am J Physiol Ren. Physiol 304* **2,** 982–991 (2013).
229. Machnik, A. *et al.* Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor c expression and induces salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension* **55,** 755–761 (2010).
230. De Miguel, C., Das, S., Lund, H. & Mattson, D. L. T lymphocytes mediate hypertension and kidney damage in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **298,** R1136–R1142 (2010).
231. Hughson, M. D. *et al.* Associations of Glomerular Number and Birth Weight With

Clinicopathological Features of African Americans and Whites. *Am. J. Kidney Dis.* **52,** 18–28 (2008).
232. VONEND, O. Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X7 receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int.* **66,** 157–166 (2004).
233. Ji, X. *et al.* P2X 7 receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens. Res.* **35,** 173–179 (2012).
234. Riteau, N. *et al.* ATP release and purinergic signaling: A common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis.* **3,** e403-10 (2012).
235. Schorn, C. *et al.* Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *J. Biol. Chem.* **286,** 35–41 (2011).
236. Mazzali, M. *et al.* Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* **38,** 1101–1106 (2001).
237. Zhou, X. *et al.* Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice. *Am. J. Physiol. Physiol.* **305,** F957–F967 (2013).
238. Vaziri, N. D. & Rodríguez-iturbe, B. Mechanisms of Disease : oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **2,** 582–593 (2006).
239. Rodriguez-iturbe, B. Renal infiltration of immunocompetent cells : cause and effect of sodium-sensitive hypertension. *Clinical and Experimental Nephrology* 105–111 (2010).
240. Kirabo, A. *et al.* DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. **124,** (2014).
241. MacHnik, A. *et al.* Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor c expression and induces salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension* **55,** 755–761 (2010).
242. Elmarakby, A. A., Quigley, J. E., Imig, J. D., Pollock, J. S. & Pollock, D. M. TNF-α inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **294,** R76–R83 (2008).
243. Ishibashi, M. *et al.* Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling. *Circ. Res.* **94,** 1203–1210 (2004).
244. Chan, C. T. *et al.* Reversal of vascular macrophage accumulation and hypertension by a CCR2 antagonist in deoxycorticosterone/salt-treated mice. *Hypertension* **60,** 1207–1212 (2012).
245. De Ciuceis, C. *et al.* Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: Evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25,** 2106–2113 (2005).
246. Ko, E. A. *et al.* Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **292,** H1789–H1795 (2006).
247. Binger, K. J. *et al.* High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages. *J. Clin. Invest.* **125,** 4223–4238 (2015).
248. Itani, H. A. *et al.* CD70 Exacerbates Blood Pressure Elevation and Renal Damage in Response to Repeated Hypertensive Stimuli. *Circ. Res.* **118,** 1233–1243 (2016).
249. Guzik, T. J. *et al.* Role of the T cell in the genesis of angiotensin II – induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* **204,** 2449–2460 (2007).
250. Mattson, D. L. *et al.* Genetic mutation of recombination activating gene 1 in Dahl salt-

sensitive rats attenuates hypertension and renal damage. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **304,** R407–R414 (2013).
251. Norlander, A. E. *et al.* Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension* **68,** 167–174 (2016).
252. Amador, C. A. *et al.* Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes. *Hypertension* **63,** 797–803 (2014).
253. Zhou, L. *et al.* TGF-b-induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing RORct function Liang. *Nature* **453,** 236–240 (2008).
254. Viel, Fe. C., Lemarié, C. A., Benkirane, K., Paradis, P. & Schiffrin, E. L. Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **298,** 938–944 (2010).
255. Suckling, R. J., He, F. J., Markandu, N. D. & MacGregor, G. A. Dietary salt influences postprandial plasma sodium concentration and systolic blood pressure. *Kidney Int.* **81,** 407–411 (2012).
256. He, F. J., Markandu, N. D., Sagnella, G. A., De Wardener, H. E. & MacGregor, G. A. Plasma sodium: Ignored and underestimated. *Hypertension* **45,** 98–102 (2005).
257. Yi, B. *et al.* Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects : a longitudinal study. *Transl. Res.* 103–110 (2015).
258. McMaster, W. G., Kirabo, A., Madhur, M. S. & Harrison, D. G. Inflammation, Immunity, and Hypertensive End-Organ Damage. *Circ. Res.* **116,** 1022–1033 (2015).
259. Velge-roussel, F., Lagaraine, C., Hoarau, C. & Lebranchu, Y. Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways. **17,** 351–363 (2005).
260. Chessa, F. *et al.* The renal microenvironment modifies dendritic cell phenotype. *Nat. Publ. Gr.* 1–13 (2015).
261. Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S. & Imai, Y. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286,** 292–297 (2001).
262. Zeidan, A., Javadov, S. & Karmazyn, M. Essential role of Rho / ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes. **72,** 101–111 (2006).
263. Chaturvedi, L. S., Marsh, H. M. & Basson, M. D. Role of RhoA and its effectors ROCK and mDia1 in the modulation of deformation-induced FAK , ERK , p38 , and MLC motogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol 301* 1224–1238 (2011). doi:10.1152/ajpcell.00518.2010.
264. Puig-Kroger, A. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* **98,** 2175–2182 (2001).
265. Stasiolek, M. *et al.* Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. 1293–1305 (2006). doi:10.1093/brain/awl043
266. Bscheider, M. & Butcher, E. C. Vitamin D immunoregulation through dendritic cells. *Immunology* **148,** 227–236 (2016).
267. Lagaraine, C. *et al.* Induction of human CD4+ regulatory T cells by mycophenolic acid-treated dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **84,** 1057–1064 (2008).
268. Wang, G. Y. *et al.* Rapamycin-treated mature dendritic cells have a unique cytokine secretion profile and impaired allostimulatory capacity. *Transpl. Int.* **22,** 1005–1016 (2009).

269. Yamada, H. *et al.* LPS-induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Life Sci.* **78,** 926–933 (2006).
270. Matsue, H. *et al.* Generation and Function of Reactive Oxygen Species in Dendritic Cells During Antigen Presentation. *J. Immunol.* **171,** 3010–3018 (2003).
271. Krementsov, D. N., Case, L. K., Hickey, W. F. & Teuscher, C. Exacerbation of autoimmune neuroinflammation by dietary sodium is genetically controlled and sex specific. *FASEB J.* **29,** 3446–3457 (2015).
272. Nakahara, T *et al.* Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *Journal of Dermatological Science* 42, 1-11 (2006).

Sally AL HAJJ

Effets des concentrations élevées en Chlorure de Sodium sur les fonctions immunitaires des Cellules Dendritiques

Résumé

En réponse à des apports alimentaires élevés en sodium, de nombreux tissus corporels retiennent les ions Na^+ pendant de longues périodes pour atteindre des concentrations allant jusqu'à 200 mM. Des études récentes suggèrent que le système immunitaire pourrait être un médiateur qui relie l'apport élevé en sodium avec le développement de plusieurs maladies cardiovasculaires ou la progression de certains cancers. Les effets de fortes concentrations de sodium sur les cellules du système immunitaire sont encore mal connus notamment sur les cellules dendritiques (DC) humaines. Nous avons testé l'effet d'un milieu enrichi en chlorure de sodium sur les propriétés immunitaires des DC humaines. Les DC ont été dérivés de monocytes $CD14^+$ provenant de donneurs sains, puis stimulées par le lipolpolysaccharide (LPS), dans un milieu enrichi ou non en sodium (de 140 à 200 mM) avant d'être analysées. Les DC cultivées à des concentrations élevées de Na^+ restent viables jusqu'à 200 mM. En réponse au LPS et en présence d'une forte concentration en [Na^+], la maturation, le chimiotactisme vis-à-vis du CCL19, la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS par les DC ont été inhibés. Conformément à ces résultats, nous rapportons que la capacité d'allostimulation des DC était également diminuée. Enfin, nos données indiquent que ces effets sont dépendants de la phosphorylation de SGK1 (Serum and Glucocorticoid induced Kinase-1) et des kinases ERK 1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases). Ces résultats indiquent que des concentrations élevées en sel inhibent les principales fonctions effectrices des DC humaines et suggèrent que les effets proinflammatoires rapportés antérieurement du sodium sur les cellules T pourraient être contrebalancés par la régulation négative des DC. Ainsi, les effets d'un régime riche en sodium sur la réponse immunitaire apparaissent plus complexes qu'on ne le pensait auparavant.

Mots clés: Concentrations élevées de sodium, cellules dendritiques, fonctions immunitaires, stimulation, maturation.

Abstract

Recent evidence showed that in response to elevated sodium dietary intakes, many body tissues retain Na^+ ions for long periods to reach concentrations up to 200 mM. Recent studies suggested that the immune system might be the bridge linking high sodium intake to several cardiovascular diseases and cancer progression as well. However, the studies about the effects of sodium on immunity brought about contrasted results. So far the effects of sodium on human dendritic cells (DCs) remain unknown. Considering their central role in the immune response, we tested how sodium chloride-enriched medium influences the immune properties of human DCs. DCs were derived from $CD14^+$ monocytes from healthy donors and then stimulated by LPS, in sodium-enriched medium (from 140 up to 200 mM) and finally analyzed. We found that DCs cultivated in high Na^+ concentrations remain viable and maintain the expression of DC markers up to 200 mM. In response to LPS, their maturation, their chemotaxis toward CCL19, their production of pro-inflammatory cytokines and ROS were inhibited by high [Na^+]. In line with these results, we report that the T-cell allostimulatory capacity of DCs was also inhibited. Finally our data indicate that these effects were mediated through the phosphorylation of SGK1 (serum and glucocorticoid induced kinase-1) and ERK 1/2 kinases. Our results raised the possibility that the effects of sodium on T-cells might be counterbalanced by its ability to downregulate DC activation. Therefore the effects of high sodium diet on the immune response might be more complex than previously thought.

Keywords: High sodium concentrations, dendritic cells, immune functions, stimulation, maturation.