



Université de Montréal

**Rôle du microenvironnement apoptotique tissulaire et du  
MFG-E8 dans la modulation de la réponse inflammatoire**

par

Marie-Joëlle Brissette

Programme de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Sciences Biomédicales  
(Immunologie)

Septembre 2015

© Marie-Joëlle Brissette, 2015

### **Comité de suivi Ph.D. :**

Jean-François Cailhier, M.D., Ph.D.

Marie-Josée Hébert, M.D.

François Rodier, Ph.D.

Jean-Sébastien Delisle, M.D., Ph.D.

### **Comité d'évaluation de la thèse :**

Jean-François Cailhier, M.D., Ph.D.

Michel Roger, M.D., Ph.D.

Natalie Patey, M.D., Ph.D.

Lakshman Gunaratnam, M.D., M.Sc.

Fred Saad, M.D.

## Résumé

L'inflammation fait partie des processus réactionnels de défense dont dispose l'organisme en réponse aux agressions, assurant l'intégrité de l'hôte. En réponse au dommage tissulaire, plusieurs médiateurs inflammatoires interviennent dans le processus de l'inflammation. Lors de ces dommages, des signaux de dangers provenant de cellules endommagées sont relâchés dans l'environnement tissulaire, pouvant causer des dommages cellulaires et tissulaires. Les macrophages, tout comme d'autres cellules, peuvent être activés par ces signaux de danger, menant à la sécrétion de molécules telles que des cytokines et des chimiokines pouvant modifier le microenvironnement tissulaire. Les insultes au tissu sain peuvent entraîner la mort cellulaire telle que l'apoptose. Les molécules pouvant être relâchées lors de celle-ci contribuent au microenvironnement, notamment de par l'influence de celles-ci sur le macrophage. Parmi ces médiateurs, nous avons identifié le *Milk Fat Globule-Epidermal growth factor 8* (MFG-E8), un acteur important dans la résolution de l'inflammation, comme étant relâché spécifiquement par les cellules apoptotiques. Nous avons émis l'hypothèse que le microenvironnement apoptotique tissulaire, via la relâche de MFG-E8, module le phénotype du macrophage, modifiant le microenvironnement, la réponse inflammatoire ainsi que le devenir de l'insulte tissulaire. Nos objectifs sont 1) de caractériser ce microenvironnement apoptotique tissulaire et la cinétique de relâche du MFG-E8 par les cellules apoptotiques, 2) d'en évaluer son rôle dans la modulation du phénotype du macrophage ainsi que 3) d'en étudier, *in vivo*, son influence sur l'environnement inflammatoire et le devenir tissulaire.

Dans le premier article présenté, nous avons démontré que les cellules endothéliales apoptotiques relâchent le MFG-E8 de façon Caspase-3 dépendante. La stimulation des macrophages par l'environnement conditionné par les cellules endothéliales apoptotiques mène à l'adoption d'un profil macrophagien davantage anti-inflammatoire et moins pro-inflammatoire. Ce phénotype est réduit par l'inhibition de la Caspase-3 et il dépend de la présence de MFG-E8. De plus, le potentiel du MFG-E8 à la reprogrammation du macrophage pro-inflammatoire a été démontré via un modèle expérimental de péritonite. Ce changement phénotypique médié par MFG-E8 implique une signalisation STAT3. Ayant démontré que les cellules épithéliales apoptotiques, à l'instar des cellules endothéliales apoptotiques, relâchent

elles aussi de façon apoptose-dépendante le MFG-E8, nous avons étudié plus exhaustivement un modèle *in vivo* riche en apoptose épithéliale, l'obstruction urétérale unilatérale. Dans ce deuxième article présenté, nous rapportons l'implication bénéfique de MFG-E8 dans ce modèle de pathologie rénale obstructive. Nous avons constaté que la présence ou l'administration de MFG-E8 réduit le dommage tissulaire et la fibrose. La protection conférée par MFG-E8 est médiée via la modulation de l'activation de l'inflammasome. De plus, nos résultats illustrent l'importance du phénotype anti-inflammatoire du macrophage médié par le MFG-E8 dans la régulation négative de l'activation de l'inflammasome rénal et du dommage tissulaire.

Cette thèse présente la première description de la relâche Caspase-3-dépendante de MFG-E8 par les cellules apoptotiques. Elle démontre également l'importance du MFG-E8 dans le microenvironnement apoptotique inflammatoire dans l'atténuation du phénotype pro-inflammatoire du macrophage. De plus, nous avons démontré son rôle protecteur dans des modèles *in vivo* de transplantation aortique et de réparation tissulaire, de même que dans un modèle de maladie rénale chronique où nous avons montré que cette protection conférée par MFG-E8 est médiée par la régulation négative de l'inflammasome tissulaire. Nos résultats suggèrent ainsi que le MFG-E8 pourrait être considéré comme un interrupteur inflammatoire et ainsi comme une cible potentielle dans la modulation de maladies inflammatoires.

**Mots-clés** : inflammation, dommage tissulaire, apoptose, MFG-E8, macrophage, phénotype, reprogrammation, cytokines/chimiokines, inflammasome.

## Abstract

Inflammation is an important component of the «response to injury» process, allowing host integrity. In response to injury, released inflammatory mediators from damaged cells play a crucial role in the modification of the inflammatory microenvironment, which can lead to more cellular and tissue damages. Macrophages can be activated by those danger signals, leading to a spectrum of cytokines and chemokines secretion and modulating the tissular microenvironment. Tissue injuries can lead to cell death such as apoptosis. Mediators released during apoptosis contribute to the nature of the microenvironment, by their influence on macrophage amongst others. We have identified that *Milk Fat Globule-Epidermal growth factor 8* (MFG-E8), an important actor in inflammation resolution, is specifically released by apoptotic cells. We hypothesized that tissular apoptotic microenvironment, through MFG-E8 release, modulates macrophage phenotype, resulting in the modification of microenvironment, inflammatory response and tissue injury outcome. Thus, our objectives were to 1) characterize this tissular apoptotic microenvironment by studying MFG-E8 release kinetic by apoptotic cells, to 2) evaluate its role in macrophage phenotype modulation and to 3) study, *in vivo*, its influence on inflammatory environment and tissue damage outcome.

In the first study, we demonstrated that MFG-E8 is released by apoptotic endothelial cells in a caspase-3-dependent manner. When macrophages were exposed to conditioned media from apoptotic endothelial cells, they adopt a high anti-inflammatory, low pro-inflammatory cytokine/chemokine secreting phenotype that is lost if apoptosis is inhibited or if MFG-E8 is absent from the media. Furthermore, MFG-E8 potential to anti-inflammatory macrophage reprogramming has been demonstrated in the experimental peritonitis model. This MFG-E8-mediated reprogramming of macrophages occurs through increased phosphorylation of STAT-3. As apoptotic endothelial cells, apoptotic epithelial cells also release MFG-E8 in an apoptotic-dependent manner. Thus, we investigated more exhaustively an *in vivo* epithelial apoptosis rich model, the unilateral ureteral obstruction. In this second study, we report the positive impact of MFG-E8 in this renal obstructive model. MFG-E8 administration reduced kidney damage and fibrosis compared to the control, whereas its absence in MFG-E8 KO mice was associated with more severe disease. Moreover, we

demonstrated that the protective role of MFG-E8 is mediated through inflammasome activation modulation in the kidney. Furthermore, our results showed the importance of the anti-inflammatory macrophage phenotype that results in decreased inflammasome activation, preventing severe tissue damage.

This thesis presents the first description of apoptosis-dependent release of MFG-E8 by apoptotic cells. It also demonstrate the importance of MFG-E8 in inflammatory apoptotic microenvironment, leading to pro-inflammatory macrophage phenotype attenuation. Moreover, we demonstrated MFG-E8 protective role in an aortic transplantation and a tissue repair models, as well as in a chronic kidney disease model where we showed that this MFG-E8 conferred protection is mediated by negative regulation of tissular inflammasome activation. These data provide valuable insight for identifying MFG-E8 as a novel target in the modulation of inflammatory diseases and could be considerate as an inflammatory switch.

**Keywords** : inflammation, tissu damage, apoptosis, MFG-E8, macrophage, phenotype, reprogramming, cytokines/chemokines, inflammasome.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des encadrés et tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des sigles.....	xiii
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xviii
Introduction.....	1
Le concept moderne de l'inflammation.....	1
Chapitre 1 Inflammation et réponse du macrophage.....	3
1.1 Le macrophage et sa réponse aux médiateurs de l'inflammation.....	3
1.2 Le macrophage sous l'influence du microenvironnement : adoption de profils sécrétoires.....	4
Chapitre 2 Microenvironnement inflammatoire, médiateurs et effet sur le macrophage.....	9
2.1 Microenvironnement inflammatoire : la relâche de médiateurs suite au dommage perçu.....	9
2.1.1 Les alarmines exogènes et leurs récepteurs.....	10
2.1.2 Les alarmines endogènes et leurs récepteurs.....	12
2.2 Activation de l'inflammasome par ces médiateurs : une contribution significative à la nature pro-inflammatoire du microenvironnement.....	15
2.2.1 Cascade d'activation et résultantes.....	15
2.2.2 Régulation négative de l'activation de l'inflammasome.....	17
2.2.3 Les sous-types les plus étudiés et leur implication.....	18
2.2.3.1 Inflammasome et fibrose.....	19
2.3 Étude du microenvironnement inflammatoire : identification potentielle d'un nouveau médiateur relâché suite au dommage.....	20
Chapitre 3 MFG-E8 : acteur important dans la résolution de l'inflammation.....	21



3.1 MFG-E8: Origine, structure, expression, régulation et expression altérée sous conditions pathologiques .....	21
3.2 MFG-E8: Une protéine à la multiplicité fonctionnelle reconnue .....	26
3.2.1 Promotion de la phagocytose : le rôle conventionnel de MFG-E8 dans la résolution de l'inflammation.....	27
3.2.2 Adhésion, prolifération, protection et réparation : un survol rapide de quelques-unes des propriétés non conventionnelles de MFG-E8.....	28
3.2.3 Littérature émergente: un potentiel anti-inflammatoire direct pour MFG-E8 ? ..	29
Chapitre 4 : Introduction des travaux.....	33
4.1 Hypothèse et objectifs de recherche .....	33
4.2 L'obstruction unilatérale urétérale (UUO), un modèle d'insulte rénale chronique ....	34
4.2.1 Les modèles murins alternatifs de l'UUO .....	35
Contribution scientifique .....	37
Chapitre 5: Première description de la relâche apoptose-spécifique du MFG-E8 et caractérisation de son influence sur le macrophage.....	37
Article publié dans PLoS One, avril 2012	
<i>MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming</i>	
Authorship.....	38
Abstract.....	39
Introduction.....	40
Materials and methods .....	42
Results.....	46
Apoptotic endothelial cell-conditioned medium contains MFG-E8 and could program macrophages.....	46
Caspase-3 activation is necessary for MFG-E8 release and subsequent macrophage programming.....	49
MFG-E8 plays an important and sufficient role in macrophage programming.....	51
Apoptotic endothelial cell-conditioned media activated the signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) pathway in macrophages.....	54
Discussion.....	56

Acknowledgments.....	58
References.....	59
Tables.....	61
Chapitre 6: Identification de la propriété anti-inflammatoire de MFG-E8 dans le rein obstrué et son mécanisme associé.....	62
Article en révision au Journal of Leukocyte Biology	
<i>Milk fat globule epidermal growth factor-8 limits tissue damage through inflammasome modulation during renal injury</i>	
Authorship.....	63
Abstract.....	64
Introduction.....	65
Materials and methods.....	67
Results.....	70
MFG-E8 confers protection against kidney damage in UUO.....	70
MFG-E8 protection in UUO is mediated through inflammasome modulation .....	74
MFG-E8-dependent programming of macrophages reduces damage and inflammasome activation in obstructed kidneys.....	76
MFG-E8 promotes CD206 anti-inflammatory macrophage phenotype in obstructed kidneys.....	80
Discussion.....	81
Acknowledgements.....	84
References.....	85
Chapitre 7 : Discussion.....	90
7.1 Sommaire et originalité de la contribution scientifique.....	90
7.1.1 Le microenvironnement endothélial apoptotique et le MFG-E8 dans le devenir du macrophage : une étude <i>in vitro</i> .....	90
7.1.1.1 Limitations de cette étude et perspectives court terme.....	90
7.1.2 Le MFG-E8 et le macrophage dans la progression de l'insulte tissulaire : une étude <i>in vivo</i> .....	95
7.1.2.1 Limitations de cette étude et perspectives court terme.....	96
7.2 Concepts soulevés non discutés et mécanistique potentielle.....	98

7.2.1 La composante fibrotique .....	98
7.2.1.1 L'activation de l'inflammasome et la résultante fibrotique : une association certaine ? .....	100
7.2.1.2 Les macrophages dans la réponse fibrotique : un lien évident ?.....	101
7.2.2 La mécanistique potentielle du MFG-E8.....	104
7.2.3 Le potentiel thérapeutique de MFG-E8 dans la fibrose .....	107
7.2.3.1 La polarisation des macrophages comme outil thérapeutique : qu'en sait-on ? .....	108
7.2.3.2 MFG-E8 : les revers d'une protéine à l'expression pas toujours souhaitable .....	109
7.3 Perspectives : MFG-E8 dans la promotion du macrophage M2 .....	112
7.3.1 La régulation négative de l'inflammasome : un frein à l'inflammation chronique .....	112
7.3.2 Au-delà du phénotype anti-inflammatoire: le phénotype réparateur .....	114
7.3.2.1 Le macrophage et la réparation tissulaire : la conversion de son phénotype et ses fonctions est un déterminant majeur pour la progression du processus de réparation .....	115
7.3.2.2 Le rôle du MFG-E8 dans la réparation tissulaire : des résultats préliminaires d'intérêt.....	118
7.3.2.3 Le MFG-E8 comme outil thérapeutique dans la réparation tissulaire : hypothèses et mécanistique potentielle.....	118
7.3.2.4 La polarisation des macrophages comme outil thérapeutique en réparation tissulaire : une stratégie envisageable ? .....	121
Conclusion .....	122
Bibliographie.....	i
Appendices.....	i
Annexe 1 Regulation of Experimental Peritonitis : A complex orchestration.....	ii
Annexe 2 Effet systémique de MFG-E8.....	viii
A Effet systémique en vasculopathie chronique du transplant .....	viii
B Effet systémique en maladie rénale obstructive.....	viii

Annexe 3 Implication de NFκB dans la programmation anti-inflammatoire du macrophage induite par SSC/MFG-E8.....	ix
A Dégradation de IκBα induite par le MFG-E8 dans le macrophage .....	ix
B Diminution de la production de cytokine anti-inflammatoire par le macrophage suite à l'inhibition de IKKβ .....	ix
Annexe 4 Fenêtre thérapeutique de l'administration du MFG-E8.....	x
Annexe 5 MFG-E8 dans la promotion des allergies.....	xi
<i>Curriculum Vitae</i> .....	xii

## Liste des encadrés et tableaux

<b>Encadré 1: La régulation négative de l'inflammation.</b> .....	2
<b>Encadré 2: Macrophage et phagocytose.</b> .....	4
<b>Encadré 3: Phénotype macrophagien et cancer.</b> .....	5
<b>Encadré 4: TLRs et transplantation.</b> .....	12
<b>Encadré 5: La pyroptose.</b> .....	17
<b>Encadré 6: Inflammasome et cancer.</b> .....	19
<b>Encadré 7: Caspases et pathologies.</b> .....	20
<b>Tableau 1: Facteurs altérant l'expression de MFG-E8.</b> .....	24
<b>Tableau 2: Conditions pathologiques altérant l'expression de MFG-E8.</b> .....	25
<b>Encadré 8: Les maladies chroniques rénales.</b> .....	36

## Liste des figures

<b>Figure 1: Polarisation des macrophages et phénotype fonctionnel.</b> .....	7
<b>Figure 2: Structure de MFG-E8.</b> .....	22
<b>Figure 3: Élimination des cellules apoptotiques par le macrophage médiée par MFG-E8.</b> .....	26
<b>Figure 4: HMGB1 vs MFG-E8 : une résultante déterminante.</b> .....	28
<b>Figure 5: MFG-E8 dans l'environnement endothélial apoptotique.</b> .....	92
<b>Figure 6: Le facteur de transcription NFκB dans la voie de signalisation de l'inflammasome et l'implication mécanistique potentielle de MFG-E8.</b> .....	106
<b>Figure 7: L'absence de MFG-E8 nuit à la fermeture de la plaie.</b> .....	119
<b>Figure 8: MFG-E8 dans la modulation de la réponse inflammatoire.</b> .....	123

## Liste des sigles

ALI : Acute Lung Injury

APC : Antigen Presenting Cell

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD

ASM : Airway Smooth Muscle

BMDM : Bone Marrow Derived Macrophage

BMP-7 : Bone Morphogenic Protein -7

CARD : Caspase Recruitment Domain

COP : CARD-Only Protein

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern

DC : Dendritic Cell

EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition

ER : Endoplasmic reticulum

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2

FSGS : Focal Segmental Glomerulosclerosis

GM-CSF : Granulocytes Monocytes-Colony Stimulating Factor

GRK2 : G protein-coupled receptor kinase 2

HMGB1 : High-Mobility Group protein Box 1

HO-1 : Heme Oxygenase -1

HSP : Heat Shock Protein

IFN $\gamma$  : Interferon gamma

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor -1

LPA : Lysophosphatidic acid

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : Leucine-Rich Repeats

LT : Leukotriene

MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein -1  
MFG-E8 : Milk Fat Globule-Epidermal growth factor 8  
MIP-1 : Macrophage Inflammatory Protein -1  
MIP-2 : Macrophage Inflammatory Protein -2  
MMP : Matrix Metalloproteinase  
NFκB : Nuclear Factor Kappa B  
NK : Natural Killer  
NLR : NOD-Like Receptor  
NO : Nitric Oxide  
NOD : Nucleotid-binding Oligomerization Domain protein  
OPN : Osteopontin  
PAF : Platelet-Activating Factor  
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor -1  
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern  
PDGF : Platelet Derived Growth Factor  
PTEC : Proximal Tubular Epithelial Cells  
PG : Prostaglandine  
PMN : Polymorphonuclear leukocytes  
POP : PYD-Only Protein  
PPARδ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor delta  
PRR : Pathogen Recognition Receptor  
PS : Phosphatidylserine  
RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts  
ROI : Reactive Oxygen Intermediate  
αSMA : alpha Smooth Muscle Actin  
SOCS3 : Suppressor of Cytokine Signaling 3  
SPM : Specialized Pro-resolving Mediator  
SR : Scavenger Receptor  
SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein  
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3



TAM : Tumor Associated Macrophage

TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor beta

TIR : Toll-IL-1 Receptor

TLR : Toll-Like Receptor

TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha

UUO : Unilateral Ureteral Obstruction

VCT : Vasculopathie Chronique du Transplant

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VSMC : Vascular Smooth Muscle Cell

## Liste des abréviations

Ex. : Exemple

Etc. : Et cætera

Vs. : Versus

*À ma mère, qui me manque beaucoup.*

## Remerciements

Mes premiers remerciements se doivent d'aller à mon directeur de recherche, Dr. Jean-François Cailhier, dont l'enthousiasme, l'accessibilité et le dévouement dans la consolidation de ma formation ont été une constante des six dernières années. Outre les co-auteurs des travaux publiés, j'aimerais également souligner le soutien de plusieurs acteurs de ma réussite dont les laboratoires du Dr. Réjean Lapointe et du Dr. John Stagg, de même qu'Isabelle Cousineau, Guillaume Chouinard et Isabelle Clément pour leur camaraderie et leurs nombreux conseils techniques. J'aimerais aussi remercier ma famille pour leur appui, mais aussi pour m'avoir offert un contexte global de développement étant aujourd'hui la source de ma capacité à persévérer. Plus spécifiquement, ma mère Carmen, grâce à qui j'ai développé un souci redoutable du détail, mon père Raymond, grâce à qui j'ai développé une rigueur du travail et un sens logique, ainsi que mon frère Vincent, pour avoir été un modèle de débrouillardise et d'ouverture sur le monde et dont le propre parcours m'a souvent inspiré. Finalement, j'aimerais remercier un coéquipier d'exception, mon amoureux Sébastien, dont la joie de vivre, le support constant et les judicieux conseils ont été les forces dynamisantes essentielles à la complétion de ce travail de doctorat.

Merci à tous.

## Introduction

L'inflammation fait partie des processus réactionnels de défense dont dispose l'organisme en réponse aux agressions, assurant l'intégrité de l'hôte. Son existence est reconnue depuis l'Antiquité, alors qu'on y associait des manifestations physiques telles qu'un gonflement plus ou moins étendu accompagné de chaleur, de rougeur, de douleur et très souvent de fièvre.<sup>1</sup> Déjà à cette époque, l'importance de l'inflammation dans l'initiation du processus de guérison avait été soulevée, un reflet intéressant de la compréhension moderne de la résolution de l'inflammation. Traduisant les connaissances anatomiques et physiologiques de leur temps, plusieurs travaux de nature descriptive relatant la diversité des manifestations potentielles suivant la nature des irritants ont par la suite permis de concevoir plusieurs formes cliniques de ce processus physiologique. Bien que la description de ces symptômes et ces traitements soit rapportée depuis très longtemps, son approche scientifique n'a débuté véritablement qu'au XVIII<sup>e</sup> siècle avec les travaux liant l'inflammation au processus de coagulation. Un siècle plus tard, on retrouve la première description de la cellule inflammatoire et de sa capacité migratoire (*leukocyte rolling*). Quelques travaux d'importance se sont ensuite succédé et parmi ceux s'étant particulièrement illustrés on retrouve l'identification et la description du « macrophage » de même que l'élaboration du concept de « phagocytose » par Metchnikoff.<sup>2</sup> Ses travaux sur l'immunité innée, particulièrement sur les mécanismes de l'infection bactérienne, sont à la base de la progression des connaissances sur l'inflammation, et sont les piliers des conceptions modernes.

### Le concept moderne de l'inflammation

En réponse au dommage tissulaire, plusieurs médiateurs inflammatoires interviennent dans le processus de l'inflammation. Lors de trauma tel que les brûlures, les chutes, les radiations ou les insultes chimiques par exemple, les signaux de dangers endogènes, appelés *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMPs), provenant de cellules endommagées sont relâchés dans l'environnement tissulaire.<sup>3</sup> Ces DAMPs (ou alarmines) peuvent causer des dommages cellulaires et tissulaires. Les DAMPs possèdent des similarités structurelles et fonctionnelles avec les *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), des molécules

reconnues entières ou en partie alertant l'organisme de la présence d'un pathogène intrusif, relâchés des micro-organismes exogènes.<sup>4</sup> Les macrophages, tout comme d'autres cellules, peuvent être activés par des signaux de danger endogènes (DAMPs) ou exogènes (PAMPs). Cette activation du macrophage mène à la sécrétion de molécules, telles que les cytokines et les chimiokines, pouvant modifier le microenvironnement tissulaire. Le macrophage est ainsi influencé par l'environnement dans lequel il se retrouve (discuté au **Chapitre 2**), mais joue aussi un rôle crucial dans le conditionnement de ce microenvironnement (discuté au **Chapitre 1**). La réponse inflammatoire résulte ainsi d'une délicate balance, où les médiateurs présents dans le microenvironnement et la réponse immune face à ceux-ci sont des déterminants de la plus grande influence. Le succès du processus inflammatoire repose également sur la capacité de l'environnement à se réguler négativement, évitant ainsi l'état d'activation chronique et les conséquences potentielles de celui-ci (voir **encadré 1**).

#### **Encadré 1: La régulation négative de l'inflammation.**

Le succès du processus inflammatoire dépend aussi de son inhibition.<sup>5</sup> Pour ce faire, plusieurs mécanismes naturels favorisent cette régulation négative de l'inflammation. Parmi les concepts visant celle-ci ont ainsi été identifiés: l'expression des récepteurs *decoy* visant l'élimination des cytokines après leur production,<sup>6</sup> le contrôle de l'état métabolique (ex. autophagie, apoptose),<sup>7</sup> la production de cytokines anti-inflammatoires (ex. TGF $\beta$ , IL-10),<sup>8-10</sup> la régulation post-transcriptionnelle (ex. la Tristetraproline dans la dégradation d'ARNm cibles pour les médiateurs pro-inflammatoires),<sup>11</sup> la séquestration des PAMPs par les TLRs 2 et 4 solubles ainsi que la régulation négative de la transcription par la suppression de NF $\kappa$ B par l'induction de I $\kappa$ B $\alpha$ ,<sup>12</sup> par la tolérance aux endotoxines (ex. inhibition de l'activation transcriptionnelle après l'exposition au LPS)<sup>13</sup> et par la limitation de la réponse (ex. Bcl-6 compétitionne avec les activateurs de la transcription)<sup>14</sup> n'en sont que quelques exemples. Certains médiateurs lipidiques aux fonctions pro-résolutives, les *Specialized Pro-resolving Mediators* (SPMs) (ex. lipoxines, resolvines, protectines et maresines), permettent aussi une régulation négative de l'inflammation, notamment en réduisant la chimiotaxie et l'infiltration des PMNs, en favorisant la phagocytose et l'efferocytose par les macrophages, en réduisant les cytokines pro-inflammatoires (ex. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) et certains médiateurs lipidiques (ex. PAF, PGs, LTs) ainsi qu'en augmentant les cytokines anti-inflammatoires (ex. IL-10) et certains médiateurs lipidiques (ex. Lipoxine A4).<sup>15</sup>

# Chapitre 1 Inflammation et réponse du macrophage

## 1.1 Le macrophage et sa réponse aux médiateurs de l'inflammation

Le macrophage est une source importante de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires et la sécrétion de celles-ci est essentielle, tant à la protection de l'hôte contre les invasions pathogènes qu'à la modulation inflammatoire limitant un dommage tissulaire par la résolution de l'inflammation ou la réparation tissulaire.<sup>16</sup> Cependant, considérant que plusieurs pathologies inflammatoires aiguës et chroniques sont associées à la production et à la relâche excessive de cytokines, la compréhension des mécanismes régulant la sécrétion de celles-ci est impérative.<sup>17</sup> La relâche de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages cible des récepteurs situés sur d'autres cellules de l'environnement, induisant ainsi l'activation ou l'inhibition des fonctions de celles-ci. Le macrophage est ainsi un grand chef d'orchestre du devenir de la réponse inflammatoire et son rôle dans celle-ci est alors fondamental. La sécrétion des cytokines est régulée temporellement, mais également directionnellement, permettant ainsi une communication optimale entre les cellules (ex. communication lymphocyte T – APC, sécrétion des cytokines à la synapse). En dehors de l'activation de cellules avoisinantes, les cytokines peuvent également favoriser le recrutement (chimiotactisme) d'autres cellules immunes. Les cytokines relâchées par le macrophage peuvent également avoir une incidence sur lui-même, favorisant une boucle amplificative ou sa propre migration. Dans la biologie du macrophage, certaines cytokines possèdent également des rôles fonctionnels particuliers. Par exemple, le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF $\alpha$ ), à sa sortie du complexe Golgi, ne se rend pas directement à la membrane cellulaire.<sup>18</sup> En effet, il est plutôt transporté à l'endosome et participera ensuite à la formation de la coupe phagocytaire, essentielle au processus de phagocytose (voir **encadré 2**).<sup>19</sup>

Contrairement aux lymphocytes T, la sécrétion des cytokines par les macrophages n'est pas médiée par des granules de sécrétion.<sup>20</sup> En effet, les macrophages ne produisent pas à l'avance et n'entreposent pas leurs cytokines. Leur capacité de sécrétion à la suite de leur activation repose donc uniquement sur leur capacité à produire rapidement les cytokines, permettant ainsi la relâche de celles-ci dans les premières minutes/heures suivant l'activation.

Chez le macrophage, la plupart des cytokines sont synthétisées et transportées par la voie classique. En effet, à la sortie du réticulum endoplasmique (ER), elles sont transportées au complexe Golgi puis, alors que certaines cytokines sont directement transportées du *transGolgi network* à la surface cellulaire (ex. IL-10),<sup>21</sup> d'autres transitent par les endosomes (ex. TNF $\alpha$ , IL-6).<sup>22</sup> Certaines cytokines, notamment l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, sont cependant sécrétées par voie non classique, évitant le complexe Golgi.<sup>23</sup> Cet évitement peut être dû à un mécanisme d'adaptation de la protéine pour ses besoins physiologiques spécifiques. En effet, le clivage, la glycosylation, la phosphorylation et la sulfatation pourraient modifier l'activité biologique de la protéine. La sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 demande l'activation de la Caspase-1, qui possède un rôle important dans la sécrétion non conventionnelle de ces cytokines.<sup>24</sup> L'activité de la Caspase-1 est elle-même régulée par l'immunité innée et, dans les macrophages, elle est activée par le complexe inflammasome. La translocation des cytokines à l'intérieur de la cellule peut impliquer les lysosomes ou les microvésicules qui fusionneront directement à la membrane cellulaire. Ce concept de l'inflammasome sera discuté au chapitre suivant.

#### **Encadré 2: Macrophage et phagocytose.**

La phagocytose est la méthode utilisée par les macrophages pour ingérer les micro-organismes, les débris cellulaires, les cellules tumorales ou les cellules apoptotiques. Plusieurs cellules, telles que les cellules épithéliales, ont un potentiel plus ou moins grand de phagocytose. Cependant, les monocytes/macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques sont certainement les plus efficaces. Une phagocytose réussie dépend de la capacité à reconnaître les particules à phagocyter, mais également de la capacité de la cellule au réarrangement du cytosquelette et à la formation du phagosome, assurant ainsi la capture et l'internalisation de celles-ci. Elle demande également l'implication d'endosomes et de lysosomes efficaces, permettant la dégradation des particules ingérées. Parmi les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de ces particules, on retrouve les récepteurs CD14, Tim4 et MerTK de même que les récepteurs *Scavenger* tels que CD36, CD91 et CD163.<sup>25</sup> Par l'opsonisation (MFG-E8, C1q, Gas6, TSP1), d'autres intégrines, telles que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , peuvent promouvoir la phagocytose. Intéressamment, la phagocytose peut contradictoirement mener à la relâche de médiateurs tant pro- qu'anti- inflammatoires.<sup>26</sup>

## **1.2 Le macrophage sous l'influence du microenvironnement : adoption de profils sécrétoires**

Le microenvironnement contribue à la modification du phénotype, visage fonctionnel des macrophages, modulant la réponse inflammatoire. Les monocytes/macrophages peuvent être pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires.<sup>27</sup> Qu'ils soient macrophages résidents ou macrophages dérivés de monocytes, le microenvironnement influence leur phénotype ainsi



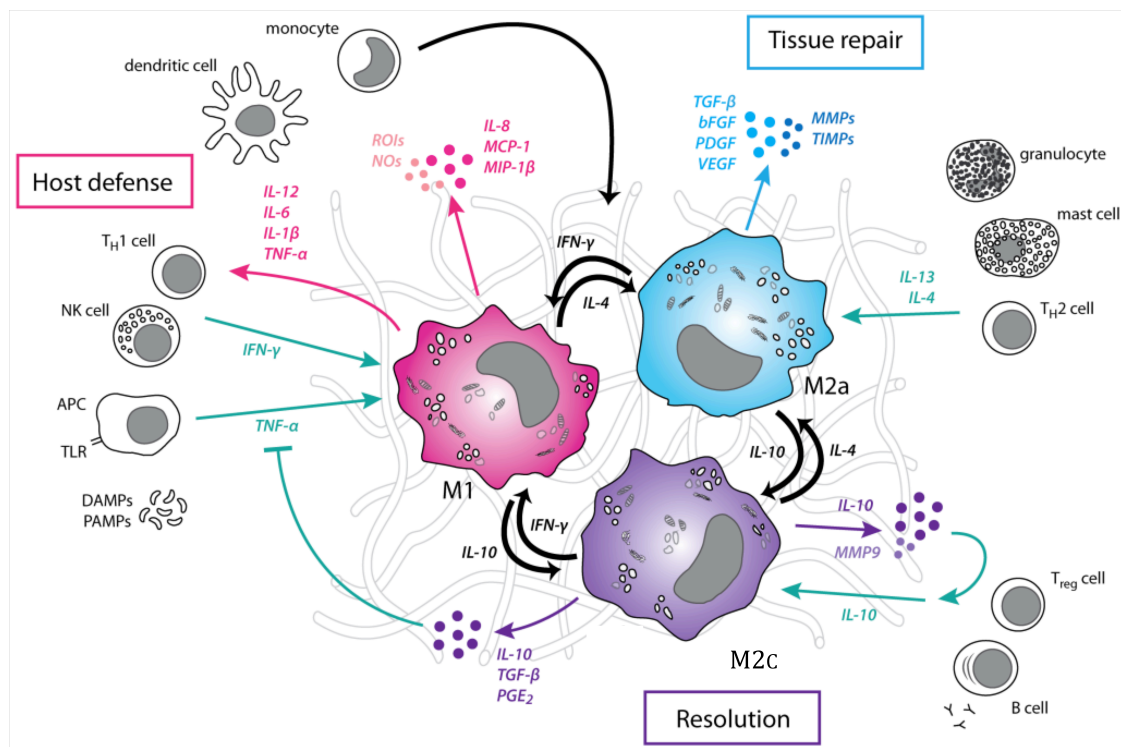
que l'interchangeabilité de celui-ci. Les macrophages sont ainsi programmés ou reprogrammés selon la nature des cytokines présentes dans le microenvironnement (voir **figure 1**).<sup>28</sup> Les macrophages sont anti-inflammatoires (M2), résultant d'une activation alternative ou d'une reprogrammation, s'ils sont stimulés par l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, le *Transforming Growth Factor beta* (TGFβ), par les glucocorticoïdes ou suite à la phagocytose de cellules apoptotiques.<sup>29</sup> Ces sources de stimuli peuvent référer au macrophage lui-même par sa production d'IL-10 ou de TGFβ, mais également à l'activité sécrétoire lymphocytaire de phénotype Th2. En effet, la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 induit notamment l'inhibition du macrophage. Ces macrophages sécrèteront alors des molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), le TGFβ et le *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF). L'IL-10 sécrétée est d'ailleurs impliquée dans l'inhibition de l'activation des macrophages et de la prolifération des lymphocytes T, ainsi que dans la stimulation de la prolifération des lymphocytes B et de leur sécrétion d'immunoglobulines. Le VEGF et le TGFβ sont tous deux des facteurs de croissance et leur implication est démontrée, respectivement, dans la prolifération des cellules endothéliales et des fibroblastes, ces derniers favorisant la réparation tissulaire. Le PDGF est lui aussi un facteur de croissance et favorise la chimiotaxie et la mitose des fibroblastes, promouvant ainsi lui aussi la réparation tissulaire. Chez le macrophage anti-inflammatoire, certains marqueurs de surface sont spécifiquement exprimés. Le récepteur au mannose (CD206) par exemple ainsi que les marqueurs de surface CD163 et CD23 en font partie.<sup>29</sup> On retrouve le phénotype anti-inflammatoire du macrophage notamment au sein des tumeurs, où il est particulièrement étudié (voir **encadré 3**), et l'on reconnaît l'implication de plusieurs cytokines dans la génération du phénotype immunosuppresseur M2.

### **Encadré 3: Phénotype macrophagien et cancer.**

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) peuvent constituer plus de 50% de la masse tumorale. Ils sont associés à un mauvais pronostic ainsi qu'à la promotion de plusieurs fonctions pro-tumorales, dont la survie, la prolifération et la dissémination.<sup>30</sup> Des études utilisant le transfert adoptif de macrophages confirment leur fonction pro-tumorale et associent celle-ci spécifiquement au phénotype anti-inflammatoire (M2).<sup>31</sup> L'attribution de ce phénotype peut s'expliquer notamment par l'absence de stimuli M1 (LPS ou IFNγ), par la surexpression de stimuli M2 (IL-10 et IL-6) dans l'environnement tumoral, ainsi que par l'infiltration de lymphocytes Th2 (source d'IL-4 et d'IL-13). En raison de leur phénotype anti-inflammatoire, les TAMs sécrètent ainsi des cytokines telles que l'IL-10, qui favorise une réponse immunosuppressive Treg et Th2, ainsi que le VEGF, le PDGF et le TGFβ, qui favorisent la prolifération, l'angiogenèse et la migration des TAMs en régions avasculaires.<sup>31,32</sup>

Les macrophages pro-inflammatoires (M1) résultent, quant à eux, d'une activation classique favorisée, entre autres, par l'activité sécrétoire lymphocytaire de profil Th1. Le phénotype Th1, associé à une sécrétion d'IL-2 et d'*Interferon gamma* (IFN $\gamma$ ), est ainsi à l'origine d'un effet d'activation immunitaire en raison de son implication dans l'immunité cellulaire, mais également de par son rôle dans l'activation classique pro-inflammatoire du macrophage par la sécrétion d'IFN $\gamma$ .<sup>29</sup> Au-delà de l'activation par IFN $\gamma$ , l'activation classique des macrophages pro-inflammatoires par les stimuli bactériens a été largement démontrée. Le TNF $\alpha$ , provenant d'*Antigen Presenting Cells* (APCs) ou de macrophages activés, induit également le phénotype inflammatoire du macrophage. En réponse à ces stimuli pro-inflammatoires, les macrophages sécrètent des chimiokines telles que l'IL-8, le *Macrophage Inflammatory Protein -2* (MIP-2), le *Macrophage Inflammatory Protein -1 alpha/beta* (MIP-1 $\alpha/\beta$ ) et le *Monocyte Chemotactic Protein -1* (MCP-1) aux propriétés chimioattractantes.<sup>29</sup> Les macrophages pro-inflammatoires sécrètent également des cytokines telles que l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , l'IL-6, l'IL-12 et le TNF $\alpha$ . Ces cytokines et chimiokines ont démontré leur implication dans l'établissement de la fièvre, dans l'activation lymphocytaire et des cellules *Natural Killers* (NKs), dans la polarisation des lymphocytes T vers un phénotype Th1, dans l'activation de l'endothélium vasculaire rendant celui-ci plus perméable à l'exsudat inflammatoire, ainsi que dans l'induction de l'expression des adhésines endothéliales favorisant l'adhérence et l'extravasation des leucocytes. Les macrophages pro-inflammatoires se caractérisent également par la sécrétion de molécules au potentiel fonctionnel plus complexe, par exemple l'oxyde nitrique (NO).<sup>29</sup> L'effet antimicrobien du NO a été décrit notamment chez les bactéries, les parasites et les virus. Cependant, son implication dans la destruction tissulaire et l'apoptose des cellules résidentes dans le tissu sain environnant peut mener à l'inflammation chronique. Finalement, tout comme les neutrophiles, les macrophages de phénotype pro-inflammatoire peuvent être source d'autres métabolites de l'oxygène (ROIs – *Reactive Oxygen Intermediates*) produits par le stress oxydatif.<sup>29</sup> Tout comme le NO, ces radicaux libres peuvent être très favorables à la destruction des pathogènes. Cependant, ils peuvent également avoir des effets très dommageables sur les cellules du tissu sain. Sur ces macrophages activés, certains marqueurs de surface seront encore ici exprimés, notamment le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II ainsi que le récepteur au mannose (CD206), mais en

moins grande proportion que sur les macrophages alternatifs pour ce dernier. Les macrophages activés peuvent également devenir macrophages reprogrammés en réponse à une stimulation appropriée telle que la phagocytose de cellules apoptotiques, l'IL-10 ou l'IL-4 et ainsi produire entre autres l'IL-10 et le TGFβ. Ainsi, au-delà de la programmation phénotypique, la reprogrammation phénotypique est tout aussi possible.<sup>28</sup> Cette plasticité est favorable à une réponse personnalisée/adaptée au microenvironnement. Cependant, la sensibilité du macrophage à l'environnement dans lequel il se retrouve le rend malheureusement plus susceptible à une réponse démesurée (boucle d'amplification) ou inadéquate. En effet, le plus petit changement dans le microenvironnement tissulaire peut induire un changement majeur dans le phénotype du macrophage.



**Figure 1: Polarisation des macrophages et phénotype fonctionnel.**

Représentation schématique de la plasticité du macrophage. Les macrophages peuvent adapter leur phénotype en réponse aux influences environnementales. Les phénotypes illustrés sont aux extrémités d'un spectre continu d'état de polarisation d'un macrophage. *Adapté et réimprimé avec permission de* <sup>33</sup>.

À l'attribution d'un phénotype, par l'analyse du profil sécrétoire du macrophage, s'extrapolent généralement une ou des fonctions. Ainsi, les macrophages peuvent être dichotomiquement associés à la fois à l'initiation de même qu'à la résolution de l'inflammation, tout comme à la fois à la synthèse de même qu'à la dégradation de la matrice tissulaire (voir **figure 1**). Ils peuvent également coordonner la migration cellulaire, l'angiogenèse, et l'élimination des pathogènes. Outre son rôle dans l'acquisition du phénotype macrophagien, le microenvironnement est également impliqué dans la différenciation tissu-spécifique du macrophage, leur attribuant ainsi des caractéristiques plus spécifiques. La large hétérogénéité de ceux-ci dans des conditions tissulaires distinctes est d'ailleurs le reflet direct de l'influence du microenvironnement tissulaire sur la différenciation des macrophages. De façon intéressante, les macrophages continuellement exposés à des pathogènes ou à des défis environnementaux sont maintenus dans un état basal quiescent, s'illustrant notamment par une diminution de l'activité phagocytaire et l'activité sécrétoire pro-inflammatoire. Cette anergie inflammatoire est favorable puisque le dommage tissulaire qu'aurait potentiellement induit le macrophage activé, compromettant potentiellement la fonctionnalité du tissu, est ainsi diminué. Parmi les macrophages les plus tolérants et les moins susceptibles se trouvent les macrophages alvéolaires,<sup>34</sup> les macrophages intestinaux<sup>35</sup> et les macrophages foeto-maternels.<sup>36,37</sup> La résultante phénotypique du macrophage en fonction de la nature du microenvironnement est adressée plus spécifiquement au chapitre suivant.

## Chapitre 2 Microenvironnement inflammatoire, médiateurs et effet sur le macrophage

### 2.1 Microenvironnement inflammatoire : la relâche de médiateurs suite au dommage perçu

Suivant l'insulte tissulaire, plusieurs médiateurs inflammatoires sont relâchés, amorçant le processus inflammatoire. Les signaux de dangers endogènes (DAMPs) sont relâchés par les cellules nécrotiques ou endommagées, causant des dommages cellulaires et tissulaires.<sup>3</sup> Les DAMPs possèdent des similarités structurelles et fonctionnelles avec les PAMPs relâchés des micro-organismes exogènes. Tout comme d'autres cellules, les macrophages peuvent être activés par ces signaux de danger endogènes ou exogènes. Les DAMPs et les PAMPs sont reconnus par des récepteurs appelés *Pathogen Recognition Receptors* (PRRs). Initialement, le terme « alarmine » fut proposé pour différencier les molécules endogènes (DAMPs) des molécules exogènes (PAMPs) menant aux dommages.<sup>38</sup> Pour recevoir le titre d'alarmine, les molécules candidates devaient :

- 1) être rapidement relâchées passivement à la suite d'une mort cellulaire non programmée (nécrose) et ne pas être relâchées par les cellules apoptotiques;
- 2) être produites et relâchées par les cellules activées du système immunitaire généralement via la voie de sécrétion classique du ER sans engendrer la mort propre de la cellule;
- 3) promouvoir la réponse immunitaire adaptative via l'activation de la réponse immunitaire innée;
- 4) rétablir l'homéostasie en favorisant la reconstruction du tissu endommagé par l'insulte directe ou par l'effet secondaire de l'inflammation.

Cette définition de DAMPs est maintenant utilisée de façon inconstante, c'est-à-dire que les alarmines endogènes et les PAMPs exogènes peuvent maintenant être collectivement classés comme DAMPs (ou alarmines).<sup>3,39-42</sup> Les alarmines peuvent alors, en ce sens, être de source endogène ou exogène. En addition à ce classement incertain s'ajoute également une autre variable : la définition d'alarmine évolue. Les critères de classification précédemment

mentionnés ne sont donc ainsi plus essentiels. Par exemple, depuis quelques années, on reconnaît que les cellules apoptotiques peuvent être source d'alarmines, de DAMPs.<sup>43-45</sup> Cette relâche active par les cellules endommagées peut s'illustrer par des situations comme l'hypoxie, le choc hémorragique, l'acidose et l'ischémie-reperfusion. Plus spécifiquement, la grande famille des DAMPs (alarmines endogènes et exogènes) est reconnue par les cellules de l'immunité innée, principalement les macrophages, notamment via les *Toll-Like Receptors* (TLRs), les récepteurs NODs (*Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins*) appartenant à la grande famille des NLRs (*NOD-like receptors*), le récepteur de l'IL-1 et récepteur RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*), activant les voies de signalisation pro-inflammatoire dont NFκB (*Nuclear Factor Kappa B*) étant la plus commune.

### 2.1.1 Les alarmines exogènes et leurs récepteurs

Lorsqu'un agent pathogène franchit les barrières anatomiques et physiologiques de l'hôte, une infection est alors susceptible de survenir. Le système immunitaire répond à l'infection d'abord par la détection de l'envahisseur pour ensuite en arriver à la destruction de celui-ci. La détection par le système immunitaire survient lorsque l'organisme invasif interagit avec des molécules solubles ou membranaires de l'hôte qui sont capables de discriminer entre le Soi et le non-Soi. Ces détecteurs moléculaires reconnaissent des motifs structuraux variés qui sont très conservés par exemple au sein d'une espèce microbienne, généralement nécessaires pour leur survie, mais la plupart du temps absents de l'hôte. Ces récepteurs sont appelés récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs – *Pattern Recognition Receptors*), car ils reconnaissent des motifs moléculaires particuliers retrouvés chez les pathogènes appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*).<sup>4</sup> Ces PAMPs, reconnus par les PRRs, comprennent des combinaisons de sucres, certaines protéines, des lipides et des motifs d'acides nucléiques. Parmi les PAMPs jusqu'à maintenant identifiés, le lipopolysaccharide (LPS) (bactérie gram négative),<sup>46</sup> l'acide lipoteichoïque (bactérie gram positive),<sup>46</sup> la flagelline (flagelle bactérien)<sup>47</sup> ainsi que l'ADN bactérien<sup>48</sup> sont les plus investigués, notamment dans la pathologie du sepsis.

Pour détecter les produits bactériens, les macrophages tissulaires expriment de nombreux récepteurs appelés les récepteurs *Toll-Like* (TLRs).<sup>49</sup> Douze TLRs ont été décrits

chez la souris et onze chez l'humain, chacun ayant sa propre spécificité en détectant un répertoire distinct de molécules des pathogènes tels que des virus, des bactéries, des champignons et certains protozoaires.<sup>50</sup> La reconnaissance de ces pathogènes par les TLRs induit l'activation de NFκB, menant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. En effet, à la suite de la liaison du ligand au TLR, le macrophage activé sécrète des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNFα qui induisent et maintiennent l'inflammation. Ces cytokines peuvent d'ailleurs influencer la nature de la réponse adaptative pouvant faire suite, favorisant la défense de l'hôte. Les TLRs sont des protéines transmembranaires qui, dans la région extracellulaire, partagent un élément structural commun soit des motifs structuraux appelés répétitions riches en leucine (LRRs - *Leucine-Rich Repeats*), qui permet la discrimination des ligands.<sup>51</sup> Le domaine intracellulaire des TLRs est appelé domaine TIR (*Toll-IL-1 Receptor*) possédant trois séquences d'acides aminés très conservés, boîte 1, 2 et 3, servant de sites de liaison pour les protéines intracellulaires qui participent aux voies de transduction des signaux par les TLRs. En effet, le domaine TIR permet le recrutement des molécules adaptatrices de signalement telles que MYD88 et TRIF, formant le mydosome.<sup>52,53</sup> Les voies de signalisation impliquées sont MAPK et p38.<sup>54</sup> Les TLRs sont retrouvés sous forme hétérodimère ou homodimère. Les TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 11 sont présents à la surface cellulaire et reconnaissent des ligands extracellulaires. Par exemple, en inflammation chronique, les TLRs 2 et 4 jouent un rôle important par la reconnaissance du LPS et de DAMPs.<sup>55</sup> Le TLR 5, quant à lui, est impliqué dans la reconnaissance de la flagelline,<sup>56</sup> alors que les TLRs 1 et 6 sont associés à la reconnaissance des lipopeptides.<sup>57</sup> Les TLRs 3, 7, 8 et 9, quant à eux, sont localisés dans les compartiments internes tels que les endosomes (TLRs 3, 7 et 8) et les lysosomes (TLR 9), et peuvent reconnaître l'ARN viral ou l'ADN bactérien.<sup>58,59</sup> Afin de maximiser leur potentiel fonctionnel, plusieurs TLRs interagissent avec des molécules accessoires. Par exemple, CD14 est impliqué dans l'augmentation de l'activité TLR face au LPS alors que CD36 favorise la discrimination des ligands.<sup>60</sup> Bien que l'activité des TLRs soit souvent associée en premier lieu à la reconnaissance de pathogènes, leur activité dans d'autres domaines est aussi étudiée, notamment dans le domaine de la transplantation (voir **encadré 4**).

#### Encadré 4: TLRs et transplantation.

L'implication des TLRs en transplantation a notamment été étudiée dans le transplant rénal, hépatique et cardiaque où les TLRs sont retrouvés sur les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les podocytes, les macrophages, les lymphocytes T et B, et les cellules dendritiques.<sup>61,62</sup> En transplantation, des DAMPs endogènes et exogènes peuvent être relâchés en contexte de prétransplantation (ex. ischémie froide, mort, infection), de même qu'en contexte de pértransplantation (ex. hypoxie, ischémie-réperfusion). D'ailleurs, en ischémie-réperfusion, une étude a démontré que la protection des souris TLR 4 KO, avec ou sans transplantation.<sup>63,64</sup> La déficience en TLR 4 serait aussi cardioprotective. Les TLRs ont démontré leur association au rejet tant aigu que chronique. Leur activation est associée à l'augmentation de l'activation de NFκB, de la réponse pro-inflammatoire et de la dysfonction endothéliale.

Outre les récepteurs membranaires TLRs des macrophages, la détection des profils moléculaires associés aux pathogènes est également possible par les récepteurs solubles dont ceux permettant l'activation du système du complément par exemple le récepteur lectines spécifiques du mannose (MBL) et le récepteur protéine C-réactive (CRP)).<sup>3</sup> Le système du complément activé peut tuer les cellules visées en les lysant ou en les opsonisant afin de favoriser la phagocytose de celles-ci par les macrophages. D'autres récepteurs ont également été identifiés dont des récepteurs présents à la surface membranaire, les récepteurs *Scavenger* (SRs), ainsi que des protéines cytosoliques NODs (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins*) appartenant à la grande famille des NLRs (*NOD-like receptors*), décrites à la **section 2.2**.

#### 2.1.2 Les alarmines endogènes et leurs récepteurs

Les alarmines endogènes sont de plus en plus étudiées, bien qu'il demeure que les mécanismes d'activation de la réponse immune suivant un dommage tissulaire stérile ont été moins étudiés. Ces alarmines diffèrent substantiellement dans leur mécanisme d'action et leur relâche. Parmi les plus connues se trouve le *High-Mobility Group protein Box 1* (HMGB1), connu comme étant une cytokine pro-inflammatoire.<sup>65</sup> HMGB1 joue un rôle important dans la réponse au dommage stérile présent lors de choc hémorragique ou d'ischémie-réperfusion<sup>66</sup> et est impliqué dans plusieurs pathologies inflammatoires dont l'arthrite<sup>67,68</sup> et le lupus érythémateux systémique (SLE).<sup>69</sup> Relâché activement principalement par les macrophages et monocytes activés en réponse à un stimulus inflammatoire incluant la détection de PAMPs, HMGB1 est également relâché passivement par les cellules nécrotiques ayant été exposées à des cytokines pro-inflammatoires ou à des produits bactériens.<sup>70-72</sup> HMGB1 peut aussi induire une programmation pro-inflammatoire du macrophage, et donc une boucle d'amplification, en



augmentant la production et la sécrétion de TNF $\alpha$ , d'IL-1, d'IL-6 et d'IL-8 par ceux-ci.<sup>73</sup> Son activité chimioattractante sur les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques fut également démontrée.<sup>74-76</sup> Récemment, des études ont démontré que la relâche de HMGB1 est possible en situation d'apoptose tardive à la suite d'une rétention nucléaire initiale de celui-ci.<sup>77</sup> HMGB1 est le ligand de plusieurs TLRs, dont les TLRs 2 et 4, ce dernier étant essentiel pour l'activation pro-inflammatoire des macrophages via l'activation de NF $\kappa$ B.<sup>55,78,79</sup> Outre les TLRs, HMGB1 a aussi comme le *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE), un récepteur multiligand composé d'AGE, S100s, de peptide amyloïde et de HMGB1r.<sup>80-82</sup> D'autres alarmines peuvent également avoir RAGE comme récepteur. Parmi celles-ci, on retrouve les protéines S100, relâchées en réponse au stress cellulaire, induisant également la production de cytokines pro-inflammatoires.<sup>83,84</sup> D'autres protéines intracellulaires alarmines ont également été étudiées, notamment les *Heat Shock Proteins* (HSPs), pouvant être sécrétées activement via la voie non classique par les exosomes, et relâchées passivement par les cellules nécrotiques.<sup>85</sup> Les HSPs peuvent induire elles aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires en interagissant avec différents récepteurs dont CD91, CD14, les TLRs 2 et 4 et les récepteurs *Scavenger*. Les protéines dérivant de la matrice extracellulaire peuvent elles aussi agir comme alarmine. En effet, l'hyaluronan et le biglycan peuvent être reconnus par les TLRs 2 et 4, mais également par les récepteurs P2X, menant à la production de cytokines pro-inflammatoires.<sup>86</sup>

Les DAMPs sont aussi non protéiques tels que l'ATP, l'acide urique et l'ADN. En effet, récemment, les acides nucléiques, tels que l'ADN mitochondrial (mtDNA), ont également été suggérés comme alarmine potentielle. Peu de travaux les ont cependant investigués. Il est toutefois démontré que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages est augmentée après l'exposition à mtDNA.<sup>87</sup> La relâche de mtDNA après trauma active les neutrophiles via le TLR 9.<sup>88,89</sup> Relâchée par les cellules endommagées, l'acide urique (UA) se présente sous forme soluble dans les cellules, mais se retrouve sous forme de cristaux lorsqu'extracellulaire.<sup>90</sup> S'accumulant dans les tissus, l'UA induit la pathologie de la goutte. Ces cristaux d'acide urique sont reconnus via les TLRs 2 et 4 de même que CD14, et engagent une signalisation favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18.<sup>91</sup> Tout comme l'UA, l'ATP peut être perçue

comme une alarmine lorsque celui-ci est retrouvé en espace extracellulaire.<sup>86</sup> Son effet dans le milieu extracellulaire est cependant complexe. En effet, l'ATP peut mener à une production de cytokines pro-inflammatoires par sa liaison au récepteur P2X. Cependant, à très grandes concentrations, il peut aussi bloquer la synthèse de celles-ci.

Les alarmines sont aussi certaines cytokines. En effet, largement étudiée, l'IL-1 $\alpha$  de la famille des interleukines 1 possède à la fois des propriétés anti-inflammatoires ainsi que des propriétés pro-inflammatoires.<sup>92</sup> L'IL-1 $\alpha$ , exprimé par les cellules épithéliales, les kératinocytes, et les fibroblastes, n'est pas sécrété de façon active, mais plutôt de façon passive lorsque l'intégrité cellulaire est perdue. Elle active les lymphocytes, mais induit également la production de médiateurs pro-inflammatoires chez les macrophages et les monocytes.<sup>93</sup> Puisque l'expression d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T dépend largement de leur activation par l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  aurait donc indirectement un effet sur la programmation pro-inflammatoire du macrophage par l'IFN $\gamma$ .<sup>94</sup> D'ailleurs, par l'utilisation d'un modèle murin, des études ont démontré que l'utilisation d'un anticorps bloquant d'IL-1 $\alpha$  inhibe la réponse immune dans l'inflammation stérile confirmant alors son statut d'alarmine.<sup>95</sup> De plus, il fut également démontré qu'après trauma, l'IL-1 $\alpha$  est relâché chez les patients avec inflammation systémique.<sup>96</sup> L'administration d'IL-1 $\alpha$  mène également à des symptômes d'inflammation systémique incluant la fièvre, la myalgie, l'arthralgie et la douleur. Les macrophages déficients en récepteurs de l'IL-1 ont par ce fait une inflammation systémique réduite.<sup>97</sup>

Ainsi, les alarmines endogènes induisent généralement une programmation pro-inflammatoire du macrophage. Il est cependant à considérer que quelques alarmines sont reconnues pour l'effet inverse. En effet, il a été démontré que l'IL-33, suite à sa liaison à l'IL-1R, amplifie la polarisation alternative du macrophage, anti-inflammatoire, et la production de cytokines anti-inflammatoires associées.<sup>98,99</sup> La plupart du temps, la reconnaissance des DAMPs par leur récepteur mène à l'activation de la voie de signalisation NF $\kappa$ B. La plupart des DAMPs précédemment décrits peuvent aussi initier l'activation de l'inflammasome.<sup>100,101</sup> La voie d'activation du complexe inflammasome, discuté à la **section 2.2**, apporte d'ailleurs une contribution significative à l'établissement et au maintien du microenvironnement pro-inflammatoire.

## 2.2 Activation de l'inflammasome par ces médiateurs : une contribution significative à la nature pro-inflammatoire du microenvironnement

### 2.2.1 Cascade d'activation et résultantes

Lors de dommages cellulaires et tissulaires, les signaux de dangers endogènes et exogènes sont reconnus par les PRRs. L'activation de ces PRRs initie des voies de signalisation qui ultimement favoriseront la défense de l'hôte. Une voie majeure d'activation sous les PRRs est celle de l'inflammasome, un complexe multiprotéique intracellulaire, qui par l'activation et le recrutement de cellules inflammatoires, favorisera la défense lors de dommage tissulaire ou d'invasion de pathogène.<sup>102,103</sup> L'inflammasome reconnaît tant les signaux endogènes qu'exogènes, qu'ils soient intracellulaires ou extracellulaires. Son activation a été décrite dans plusieurs tissus et plusieurs types cellulaires dont les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales, les cellules stellaires hépatiques, les myofibroblastes et les kératinocytes. Il a été démontré que l'activation de l'inflammasome des cellules non immunes précède celle des cellules immunes, suggérant ainsi pour ces dernières un rôle d'amplification de la réponse inflammatoire plutôt que de son initiation. Plusieurs inflammasomes ont à ce jour été identifiés : NLRP1, NLRP3, NLRP6/P12, NLRC4, IFI16 (nucléaire) et AIM2 (cytosolique) qui tous, à l'exception d'IFI16 et d'AIM2, sont de la famille des *Nod-Like Receptors* (NLRs).<sup>103</sup> Le domaine terminal effecteur contenant un *Caspase Recruitment Domain* (CARD) ou PYD permet la suite de la cascade d'activation. En l'absence de CARD, permettant la liaison directe à la pro-Caspase-1, PYD nécessite l'adaptateur *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD* (ASC), contenant un CARD, pour lier la pro-Caspase-1. La cascade d'activation de l'inflammasome débute ainsi généralement par la reconnaissance des signaux endogènes/exogènes par les domaines leucines du NLR qui mène à la redistribution d'ASC, précédemment retrouvé sous forme latente au noyau, vers le complexe inflammasome en région périnucléaire.<sup>104</sup> ASC, contenant CARD, permet le recrutement et la liaison de la pro-Caspase-1. Le clivage de celle-ci permet l'activation de Caspase-1 et le clivage de pro-IL-1 $\beta$  et de pro-IL-18, entraînant en la sécrétion de ces deux cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'IL-1 $\beta$  régule la réponse systémique et locale notamment par la vasodilatation, la migration

des neutrophiles, l'activation des lymphocytes ainsi que la fièvre.<sup>92,105</sup> Il a cependant été démontré qu'en absence de la Caspase-1, l'activation d'IL-1 $\beta$  n'est pas nécessairement compromise puisqu'elle peut également avoir lieu via l'activation de Caspase-8 ou de granzyme A.<sup>106-109</sup> Quant à l'IL-18, plusieurs études ont démontré son rôle, en présence d'IL-12, dans l'augmentation de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NKs et les lymphocytes T (polarisation Th1) ainsi que, en présence d'IL-23, dans l'augmentation de la production d'IL-17 par les lymphocytes Th17.<sup>92,110-112</sup>

La sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 n'est cependant pas la seule résultante possible à l'activation de l'inflammasome. Outre la sécrétion de ces cytokines, plusieurs études ont démontré d'autres mécanismes Caspase-1 dépendant tout aussi intéressants.<sup>113</sup> Parmi les autres mécanismes effecteurs de Caspase-1 se retrouve ainsi la sécrétion de DAMPs tels que l'IL1 $\alpha$  favorisant l'inflammation, la sécrétion de facteurs de croissance tels que le *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2) favorisant la réparation tissulaire et l'activation de protéine de survie cellulaire telle que les *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins* (SREBPs).<sup>24</sup> Cependant, l'activation de la Caspase-1 peut aussi mener à l'inhibition de la glycolyse, la perméabilisation membranaire et le clivage de PARP-1, tous menant à la mort cellulaire.<sup>114</sup> En effet, en l'activation de la Caspase-1 peut aussi résulter une mort cellulaire appelée pyroptose, une mort cellulaire Caspase-1-dépendante possédant des caractéristiques à la fois de l'apoptose et de la nécrose (voir **encadré 5**). Selon la littérature actuelle, la présence d'ASC influencerait le devenir de l'activation de la Caspase-1 (cytokines pro-inflammatoires vs pyroptose). L'activation de NLRP3 ou de NLRP6, où ASC y est associé, mène ainsi à une réponse inflammatoire par la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18, alors que l'activation de NLRP1 ou de NLRC4 est plus propice à la pyroptose. L'activation de l'inflammasome peut aussi être indirecte. Le virus de l'influenza A, par exemple, où la reconnaissance d'ARN viral par le TLR7 induit la transcription des composants de NLRP3 et son activation.<sup>115</sup> D'ailleurs, pour éviter l'activation de l'inflammasome, plusieurs pathogènes encodent des inhibiteurs des fonctions de l'inflammasome permettant le contrôle de l'infection.<sup>116</sup> Ainsi, le virus influenza par NS1 et le virus cowpox par Crm1 sont tous deux capables d'inhiber l'activation de la Caspase-1 et la cascade potentielle résultant de l'activation de celle-ci.<sup>117,118</sup>

### Encadré 5: La pyroptose.

La pyroptose est une mort cellulaire programmée pro-inflammatoire.<sup>114,119</sup> Connue pour être Caspase-1 dépendante, elle peut être, en de très rares occasions, indépendante de l'activité de celle-ci via l'activation compensatoire de la Caspase-11 (activation non canonique).<sup>120</sup> La pyroptose est induite en réponse à l'inhibition de la glycolyse, où la conversion du glucose en pyruvate et la formation de l'ATP sont diminuées, menant à une diminution de l'activité métabolique.<sup>121</sup> Elle s'illustre par l'augmentation de volume du compartiment cytoplasmique, par la présence de pores à la membrane plasmique et ultimement par une rupture membranaire favorisant le relargage de l'ensemble du contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire. En condition normale, elle est responsable du contrôle de l'homéostasie, mais aussi, en stade de développement embryonnaire, de la formation des organes. La pyroptose peut avoir lieu en réponse aux stimuli bactériens en permettant la destruction des cellules infectées, mais également en conditions ischémiques. Un exemple bien connu de pyroptose est l'activation de l'inflammasome NLRP1 par la toxine anthrax, où la pyroptose des macrophages infectés favorise la limitation de l'infection.<sup>122,123</sup>

### 2.2.2 Régulation négative de l'activation de l'inflammasome

En condition normale, des médiateurs et des procédés naturels peuvent réguler négativement l'activité de l'inflammasome.<sup>124</sup> Parmi ces antagonistes, on retrouve l'autophagie où les autophagosomes favorisent la dégradation de pro-IL-1 $\beta$  et de pro-IL-18 et où la mitophagie permet l'élimination des dommages à la mitochondrie avant que ceux-ci mènent à l'activation de l'inflammasome. Une augmentation de l'activité de l'inflammasome a d'ailleurs été démontrée chez les souris déficientes en autophagie où l'absence de la clairance des dommages à la mitochondrie augmente l'expression des ROS, résultant en l'activation de NLRP3.<sup>125</sup> Il a aussi été suggéré que l'IL-10, via une signalisation *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3), régule négativement l'expression de pro-IL-1 $\beta$  et de pro-IL-18.<sup>126</sup> La régulation de pro-IL-1 $\beta$  et de pro-IL-18 étant NF $\kappa$ B dépendante, l'inhibition de cette voie de signalisation mène également à la régulation négative des pro-cytokines. Finalement, il a été démontré que les *PYD-only proteins* (POPs) et les *CARD-only proteins* (COPs) sont d'importants antagonistes à l'activité de l'inflammasome.<sup>127,128</sup> En effet, séquestrant ASC, les POPs empêchent ainsi la liaison entre ASC et la pro-Caspase-1 alors que les COPs inhibent cette même liaison via sa liaison à CARD, rendant ce domaine inaccessible à la pro-Caspase-1. L'expression des COPs et des POPs est augmentée durant l'inflammation, suggérant que ces molécules favorisent une boucle négative visant le contrôle et la durée de la réponse inflammatoire. Récemment, il a été démontré que l'assemblage de l'inflammasome et ses fonctions peuvent également être inhibés par des protéines anti-apoptotiques. Par exemple, BCL-2 peut lier directement le NLRP1 prévenant l'interaction avec l'ATP et l'activation subséquente.<sup>129</sup>

### 2.2.3 Les sous-types les plus étudiés et leur implication

Parmi tous les types d'inflammasome, NLRC4 et NLRP3 sont ceux ayant été davantage étudiés. L'importance de NLRC4 a été démontrée dans la reconnaissance des stimuli bactériens, plus spécifiquement chez les macrophages infectés avec les bactéries les plus communes, dont *Salmonella*, *Legionella* et *Pseudomonas*.<sup>130</sup> Des études préliminaires ont également démontré que la flagelline est un ligand permettant l'activation de NLRC4 via le récepteur NAIP5.<sup>131</sup> Une reconnaissance flagelline-indépendante est également possible puisque la protéine PrgJ permet l'activation de NLRC4 via le récepteur NAIP2.<sup>132</sup> NLRC4 favorise la défense de l'hôte par la régulation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18, la dégradation bactérienne et la pyroptose. Dans le cas de NLRC4, le composant ASC peut être présent. Il a d'ailleurs été démontré que la relâche des cytokines est dans ce cas ASC-dépendante alors que la pyroptose est quant à elle indépendante de sa présence.<sup>133</sup>

L'inflammasome NLRP3, aussi connu sous les noms de *Cryopyrin* ainsi que NALP3, peut être activé par les PAMPs, notamment par le LPS, mais également par les DAMPs.<sup>134-138</sup> En effet, il peut être activé par des molécules endogènes tel l'acide urique (UA) précédemment décrit, des acides nucléiques, de la matrice extracellulaire (hyaluronan, biglycan) et les ROS.<sup>139,140</sup> Son activation a également été décrite en réponse aux irradiations UV et lors d'inefficacité des phagolysosomes menant à la relâche non désirée de cathepsines par les lysosomes endommagés. Finalement, l'activation de NLRP3 en réponse à la reconnaissance de l'ATP extracellulaire, via le récepteur P2X7, a été décrite dans différentes pathologies inflammatoires.<sup>141</sup> De par la reconnaissance très diverse de ligands, l'implication de NLRP3 a ainsi été démontrée dans plusieurs pathologies, dont le diabète,<sup>142</sup> la goutte,<sup>91</sup> l'athérosclérose,<sup>143</sup> la silicose,<sup>144</sup> l'ostéoarthrite,<sup>145</sup> l'ischémie-réperfusion,<sup>146</sup> les maladies rénales,<sup>147,148</sup> la fibrose<sup>149</sup> (voir **section 2.2.3.1**) et le cancer (voir **encadré 6**). Il a d'ailleurs été démontré qu'une mutation NLRP3 engendre l'apparition de maladies inflammatoires telles que la fièvre méditerranéenne.<sup>150</sup> L'activation de NLRP3 via le ligand d'activation n'est cependant pas suffisante pour la mise en branle d'une cascade d'activation efficace. En effet, un premier signal visant l'activation de la voie de signalisation NF $\kappa$ B, par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  par exemple, est essentiel à l'augmentation de l'expression de NLRP3, mais également de la

pro-IL-1 $\beta$  et de la pro-IL-18.<sup>151</sup> Une première stimulation par une liaison au TLR ou au récepteur TNF assure ainsi la potentialité de l'activation de l'inflammasome.

#### **Encadré 6: Inflammasome et cancer.**

L'implication de l'activation de l'inflammasome dans le cancer a déjà été décrite.<sup>152</sup> En effet, plusieurs études démontrent son rôle favorable à l'inflammation, la croissance tumorale, les métastases et l'angiogenèse. De ce fait, plusieurs stratégies menant à son inhibition sont maintenant utilisées comme traitements thérapeutiques. Par exemple, des anticorps neutralisants IL-1 $\beta$  sont utilisés dans l'inhibition du développement du cancer du sein de même que dans l'inhibition de la prolifération cellulaire dans le mélanome.<sup>153</sup> Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps bloquants le récepteur IL-1 $\beta$  (anakinra) mène à l'inhibition de la croissance des nouveaux vaisseaux. De plus, l'implication d'IL-18 dans la suppression de l'action anti-métastatique des cellules NKs, par la stimulation de PD-1 à leur surface, suggère que la neutralisation d'IL-18 pourrait également être bénéfique.<sup>154</sup> Par contraste, plusieurs études pré-cliniques associent à l'administration systémique d'IL-18 un effet anti-tumoral significatif.<sup>155</sup> Il fut également démontré que l'activation de l'inflammasome peut favoriser la mort cellulaire et l'immunosurveillance anti-cancer.<sup>156</sup> En effet, l'activation de NLRP3 induit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  qui, avec IL-23, stimule les cellules T $\gamma\delta$  à produire l'IL-17. Cette dernière mène à la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les CD8, favorisant la lyse des cellules tumorales.

#### *2.2.3.1 Inflammasome et fibrose*

Globalement, l'activation de l'inflammasome a été associée à la fibrose dans plusieurs modèles animaux, notamment dans un modèle de transplantation d'îlots pancréatiques, où l'activation de NLRP3 dans les adipocytes augmente les niveaux d'IL-1 $\beta$  et de ROS.<sup>157</sup> Dans le modèle d'emphysème induit par bléomycine, les cristaux d'acide urique (UA) cytosoliques solubles mènent à l'activation de l'inflammasome, à la relâche d'IL-1 $\beta$  et à la fibrose pulmonaire.<sup>140</sup> Les souris ASC KO présentent d'ailleurs une réponse atténuée à la bléomycine. En fibrose pulmonaire, les souris déficientes en récepteur à l'IL-1 $\beta$  présentent une réponse atténuée à la bléomycine, une stimulation profibrotique. Dans ce contexte, l'administration de recombinant IL-1 $\beta$  dans les poumons résulte en une destruction tissulaire et une augmentation de l'inflammation et du dépôt de collagène.<sup>158</sup> L'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'activation de NLRP3 ont été associés à la progression de la fibrose hépatique.<sup>159,160</sup> Dans un modèle de sclérodémie, utilisant un inhibiteur de la Caspase-1, il a aussi été démontré que la sécrétion inflammasome-dépendante du collagène par les myofibroblastes peut être inhibée.<sup>161</sup> Dans un modèle d'ischémie-réperfusion cardiaque, l'augmentation de ROS et de l'efflux de potassium mène à l'activation de l'inflammasome et les souris ASC KO présentent une réponse atténuée à l'insulte et un niveau diminué de cellules infiltrantes.<sup>162</sup> Il a également été démontré que

l'administration d'IL-18 augmente la fibrose interstitielle du myocarde<sup>163,164</sup> et la production de collagène de type I et de type III par les fibroblastes.<sup>165</sup>

### **2.3 Étude du microenvironnement inflammatoire : identification potentielle d'un nouveau médiateur relâché suite au dommage**

Les insultes au tissu sain peuvent entraîner la mort cellulaire. Les molécules pouvant être relâchées lors de celle-ci contribuent au microenvironnement. L'apoptose, une mort cellulaire programmée, peut être physiologique (ex. morphogenèse, homéostasie, défense contre l'infection), mais aussi pathologique lorsque dérégulée ou induite en réponse au dommage.<sup>166</sup> Les caspases jouent un rôle important dans les morts cellulaires, notamment l'apoptose, et sont aussi impliquées les processus normaux d'inflammation, de prolifération des lymphocytes T et de différenciation cellulaire (voir **encadré 7**). Dans des contextes pathologiques tels que la vasculopathie chronique du transplant (VCT), la sclérose systémique et l'athérosclérose, des études ont démontré l'augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales et la diminution de l'apoptose des cellules neointimales.<sup>167-169</sup> Visant à démontrer la relation entre les médiateurs relâchés par les cellules endothéliales apoptotiques et le phénotype anti-apoptotique des cellules neointimales, des collaborateurs ont caractérisé la relâche apoptose spécifique des cellules endothéliales apoptotiques. Utilisant un modèle *in vitro*, des cellules endothéliales ont été rendues apoptotiques par la déprivation de sérum, un modèle où la nécrose n'est pas ou très peu induite. Une approche protéomique par spectrométrie de masse (SDS-PAGE) a ensuite été utilisée et plusieurs médiateurs ont ainsi été identifiés. Parmi ceux-ci figure le *Milk Fat Globule-Epidermal growth factor 8* (MFG-E8), un acteur important dans la résolution de l'inflammation, discuté au chapitre suivant.

#### **Encadré 7: Caspases et pathologies.**

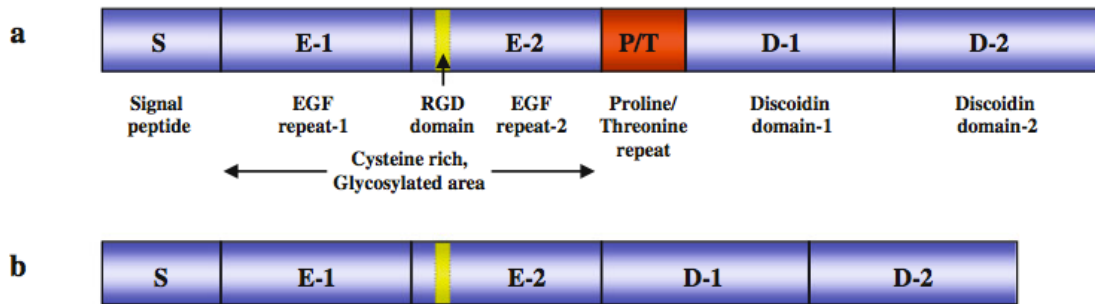
La dérégulation des caspases est particulièrement étudiée dans les contextes de cancer, de la maladie autoimmune et de maladie neurodégénérative.<sup>170-173</sup> Des bénéfices thérapeutiques peuvent être obtenus à la fois en les inhibant de même qu'en les activant.<sup>174</sup> En effet, l'inhibition des caspases permet le contrôle de la production de cytokines dans les pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, la sclérose multiple et le sepsis, mais est aussi favorable dans les pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie d'Huntington. L'activation des caspases peut quant à elle être favorable dans les contextes de cancer, de contrôle viral d'une infection ainsi que dans la pathologie du psoriasis.



## Chapitre 3 MFG-E8 : acteur important dans la résolution de l'inflammation

### 3.1 MFG-E8: Origine, structure, expression, régulation et expression altérée sous conditions pathologiques

Situé sur le chromosome 15 chez l'humain et sur le chromosome 7 chez la souris, le *Milk Fat Globule-Epidermal growth factor 8* (MFG-E8) est une glycoprotéine aussi connue sous les noms de lactadhérine, p47, BA-46, SED ainsi que sous son homologue Del-1. Initialement découverte chez la souris en 1990, cette molécule fut nommée de par la description de sa localisation à la surface apicale des glandes mammaires en lactation.<sup>175</sup> Son étymologie réfère également à ses deux domaines EGF répétitifs (EGF1-EGF2) en N-terminal ainsi qu'à l'homologie structurelle des domaines discoidin (C1 et C2) en C-terminal avec les facteurs sanguins V/VIII.<sup>176</sup> Chez l'humain, l'insertion de 37 acides aminés entre le deuxième domaine EGF (EGF2) et le premier domaine discoidin (C1) d'une région riche en résidus proline/thréonine est toujours présente. Bien que la fonction de cette région demeure inconnue, certains émettent l'hypothèse d'un rôle potentiel dans l'efficacité de la liaison aux phospholipides<sup>176</sup> alors que d'autres pointent plutôt la possibilité d'un rôle dans l'efficacité de la sécrétion de la protéine.<sup>177</sup> Chez la souris, cependant, la présence de cette région proline/thréonine dépend de l'épissage alternatif résultant ainsi en la possibilité de deux variants d'ARN messager. La forme longue (MFG-E8L) contient le domaine proline/thréonine possède un poids moléculaire de 66kDa alors que la forme courte (MFG-E8S), sans domaine proline/thréonine, possède un poids moléculaire de 53kDa (voir **figure 2**).<sup>176-178</sup> Ces poids moléculaires sont plutôt théoriques puisqu'en pratique, due à la variabilité de l'état de glycosylation après modifications post-translacionnelles, le poids moléculaire de la forme longue se situe entre 64 et 75kDa et celui de la forme courte entre 50 et 66kDa. Alors que l'expression de MFG-E8S est largement distribuée, l'expression de MFG-E8L est spécifique et associée aux macrophages activés, aux cellules dendritiques immatures, aux cellules de Langerhans ainsi qu'aux kératinocytes.



**Figure 2: Structure de MFG-E8.**

Basé sur la présence de la région proline/thréonine, 2 isoformes sont possibles: (a) long et (b) court.  
Réimprimé avec permission de *Apoptosis* (2011) 16 :1077-1086

Exprimé par plusieurs types cellulaires d'origine murine et humaine, l'expression de MFG-E8 a notamment été décrite chez les monocytes, macrophages, les cellules dendritiques immatures, les cellules épидидymales, les spermatozoïdes, les astrocytes, les microglies, les cellules endothéliales et épithéliales, les fibroblastes, les ostéoblastes, les ostéoclastes, les splénocytes, les cellules vasculaires musculaires lisses (VSMC – *Vascular Smooth Muscle Cells*) ainsi que les kératinocytes.<sup>176,179-187</sup> Davantage étudié chez la souris que chez l'humain, son expression fut démontrée entre autres dans le cœur, le rein, le poumon, le cerveau, le colon, les organes reproducteurs, les ganglions lymphatiques, la rétine, la rate, la peau, les glandes mammaires, les intestins et le foie.<sup>179-181,188-191</sup> La multiplicité fonctionnelle de MFG-E8 varie selon le tissu et le microenvironnement s'y associant, expliquant ainsi l'étendue des domaines de recherche dans lesquels il peut s'illustrer.

Jusqu'à maintenant, plusieurs facteurs régulant l'expression de MFG-E8 ont été documentés. Le *Granulocytes Monocytes-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), essentiel à la différenciation des cellules souches en granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) et en monocytes, augmente l'expression de MFG-E8 chez les monocytes. Le GM-CSF est aussi un joueur important dans la maturation du monocyte en macrophage et augmente également l'expression du MFG-E8 chez le macrophage exposé à celui-ci.<sup>184</sup> Produite pendant la lactation par les glandes mammaires ainsi que retrouvée en circulation, l'hormone prolactine favorise l'augmentation de l'expression de MFG-E8 chez les macrophages et les cellules épithéliales mammaires.<sup>181,182,192</sup> Exprimée par les astrocytes et les cellules endothéliales, la fractalkine (CX3CL1) est une protéine membranaire relâchée dans le microenvironnement du

cerveau suite à l'activation de la protéase TACE. De par sa liaison subséquente au récepteur CX(3)CR1 retrouvé à la surface des cellules microgliales, la fractalkine augmente non seulement le niveau d'expression de MFG-E8 chez les microglies, mais également leur potentiel de phagocytose et ce, même en condition inflammatoire avec LPS.<sup>183,193</sup> Orchestrant l'élimination des cellules apoptotiques par les macrophages, le *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-δ* (PPARδ) est un facteur de transcription essentiel pour la phagocytose par son rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes opsonines, accélérant le potentiel phagocytaire des macrophages. Ainsi, la déplétion génétique de PPAR-δ diminue l'expression d'opsonines telles que C1q, Gas6, thrombospondin-1, mais également MFG-E8.<sup>194</sup> Outre ces facteurs régulant favorablement l'expression de MFG-E8, il a été démontré, *in vitro*, que les cellules apoptotiques elles-mêmes augmentent l'expression de MFG-E8 chez les macrophages.<sup>194</sup> Ceci pourrait s'expliquer par la nature du sécrétome apoptotique, induisant l'activation ou la reprogrammation du macrophage. En effet, l'expression de MFG-E8 est régulée différemment à la suite d'une activation classique vs alternative du macrophage. De plus, une étude récente a aussi suggéré que la curcumine pourrait également augmenter l'expression de MFG-E8 dans les cellules microgliales, s'expliquant potentiellement par l'inhibition de la réponse pro-inflammatoire via les voies de signalisation NFκB et STAT-3.<sup>195</sup>

Plusieurs facteurs ont également été décrits comme régulateurs négatifs de l'expression de MFG-E8. D'abord, la simple maturation diminue l'expression du MFG-E8 au sein du macrophage, résultant en une diminution de la capacité d'élimination des cellules apoptotiques ainsi qu'une augmentation de la réponse au LPS (augmentation de la sécrétion de TNFα) au fil de cette maturation.<sup>196</sup> L'exposition des macrophages au LPS diminue également l'expression de MFG-E8 chez les macrophages péritonéaux via une signalisation TLR4/CD14 et réduit significativement le niveau d'expression de MFG-E8 retrouvé dans le sérum et dans la rate.<sup>197</sup> De plus, utilisant un modèle murin de néphropathie diabétique, un groupe a démontré que le *Grape Seed Procyanidin B2* (GSPB2) régule négativement, de façon dose-dépendante, l'expression de MFG-E8 par la régulation de sa transcription et de sa translation.<sup>198</sup> Finalement, la connexin43, une protéine de jonction favorisant la prolifération tumorale, diminue l'expression de MFG-E8 dans les cellules gliales menant à une diminution de la

croissance tumorale.<sup>199</sup> Récemment, l'alcool a aussi été proposé comme un facteur de régulation de l'expression de MFG-E8.<sup>200</sup> Cependant, ces observations peuvent s'opposer. Il est déjà établi que l'abus d'alcool peut causer l'inflammation et le dommage tissulaire, mais également une diminution du potentiel d'efferoctose des macrophages. Alors que l'exposition de macrophage à l'alcool diminue l'expression de MFG-E8 ainsi que la capacité d'efferoctose, l'exposition chronique de macrophage à l'alcool augmente l'expression de MFG-E8 dans les macrophages ainsi que leur capacité *in vitro* d'efferoctose.

Finalement, le tout dernier facteur de régulation de l'expression de MFG-E8 à avoir été démontré est l'utilisation de glucocorticoïdes. En effet, l'utilisation de prednisone induit l'expression de MFG-E8 chez les monocytes circulants.<sup>201</sup> Dans un modèle murin de lupus érythémateux disséminé (SLE), cette induction est dépendante des récepteurs aux glucocorticoïdes. Chez la souris, l'augmentation de l'expression de MFG-E8 est particulièrement favorable puisque l'expression de MFG-E8, étant altérée dans un modèle de SLE, y est réduite. Il serait cependant intéressant de voir si les résultats obtenus sont applicables chez l'humain considérant que l'expression de MFG-E8 dans ce contexte y est trop élevée, masquant à la fois la phosphatidylserine (PS) et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et ne permettant pas la possibilité d'un pont entre la cellule apoptotique et le macrophage.<sup>191,202</sup> L'augmentation de l'expression de MFG-E8 serait ainsi défavorable.

**Tableau 1: Facteurs altérant l'expression de MFG-E8.**

Facteurs	Cellules/tissus/organes	MFG-E8 expression	Références
Prolactine	Cellules épithéliales mammaires, Macrophages, Endomètre	Augmentée	181,182,192
Fractalkine	Macrophages péritonéaux, Cellules gliales	Augmentée	183,193
Connexin43	Gliome	Diminuée	199
GM-CSF	Macrophages	Augmentée	184
PPAR $\delta$	PBMC	Augmentée	194
LPS	Macrophages, Rate, Sang	Diminuée	197
Cellules apoptotiques	Macrophages	Augmentée	194
GSPB2	Aorte, Sang	Diminuée	198
Curcumine	Cellules gliales	Augmentée	195
Alcool	Macrophages	Diminuée	200
Alcool (chronique)	Macrophages	Augmentée	200
Glucocorticoïdes	Monocytes/Macrophages	Augmentée	201
Maturation	Macrophages péritonéaux	Diminuée	196

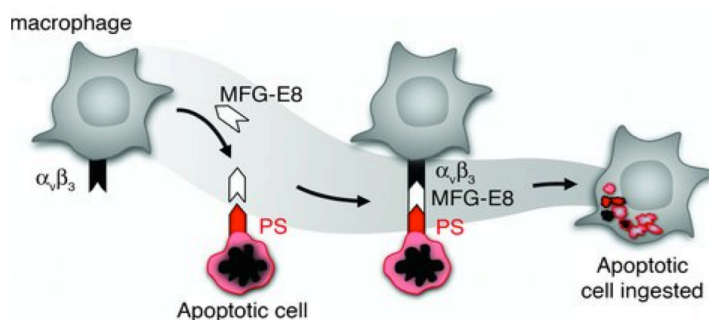
Le SLE n'est pas la seule condition pathologique présentant une expression de MFG-E8 altérée. En effet, l'expression de MFG-E8 est pathologiquement diminuée à la fois chez la souris et chez l'humain notamment lors de colite,<sup>203,204</sup> de sepsis,<sup>197,205</sup> d'athérosclérose,<sup>206,207</sup> d'ischémie-réperfusion,<sup>190,208,209</sup> de maladies neurodégénératives,<sup>210,211</sup> d'insulte intestinale<sup>189,212</sup> et pulmonaire,<sup>208</sup> ainsi que d'asthme<sup>213</sup>. L'expression de MFG-E8 est cependant augmentée dans les conditions pathologiques telles que le cancer du sein (carcinome),<sup>214,215</sup> le mélanome,<sup>216,217</sup> le cancer de l'ovaire (carcinome),<sup>218</sup> le cancer de la prostate (carcinome),<sup>219</sup> le cancer du foie (cholangiocarcinome),<sup>220</sup> de même qu'en pancréatite chronique<sup>221</sup>. Un seul variant humain de MFG-E8 a été décrit. Retrouvée chez une population de femmes taïwanaises, une mutation C-terminal s'illustrant par un codon de terminaison prématuré mène ainsi à une protéine tronquée chez les patients avec un lupus érythémateux disséminé.<sup>191,222</sup>

**Tableau 2: Conditions pathologiques altérant l'expression de MFG-E8.**

Conditions pathologiques	Cellules/tissus/organes	MFG-E8 expression	Références
Sepsis	Macrophages, Rate, Sang	Diminuée	197,205
I/R			
- Intestinale	Intestin, Rate	Diminuée	208
- Rénale	Rein, Foie		190
- Hépatique	Foie		209
Insulte intestinale	Intestin	Diminuée	189,212
Insulte pulmonaire	Poumon	Diminuée	208
Colite	Colon distal	Diminuée	203,204
SLE (humain)	Sang	Augmentée	191,202
Athérosclérose	Plaque endothéliale	Diminuée	206,207
Maladies neurodégénératives	Plaques séniles	Diminuée	210,211
Cancer			
- Ovaire	Cellules épithéliales		218
- Sein	Cellules épithéliales	Augmentée	214,215
- Prostate	Prostate, Sang		219
- Mélanome	Couche basale de la peau		216,217
- Foie	Foie, Sang		220
Pancréatite chronique	Cellules stellaires hépatiques	Augmentée	221
Asthme	Bronches	Diminuée	213

### 3.2 MFG-E8: Une protéine à la multiplicité fonctionnelle reconnue

La liaison du MFG-E8 aux molécules de surface est rendue possible grâce à ses domaines EGF et discoidin. Ainsi, le deuxième domaine EGF contient le motif RGD (arginine-glycine-aspartate) permettant la liaison à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (aussi appelée récepteur vitronectine) et  $\alpha_v\beta_5$  retrouvé notamment à la surface des cellules phagocytaires.<sup>176</sup> Les domaines discoidin constituent quant à eux deux ou trois boucles hypervariables où les acides aminés composant ces boucles et exposés déterminent la liaison spécifique de la protéine (phospholipides, matrice extracellulaire). Ces domaines C-terminal permettent ainsi la liaison à la phosphatidylsérine (PS) externalisée à la surface des cellules apoptotiques. C'est alors par les fonctions respectives de ses motifs qu'il a été démontré en 2002 que MFG-E8 est crucial dans le processus d'élimination des cellules apoptotiques en permettant ce pont entre les cellules apoptotiques et les cellules phagocytaires (voir **figure 3**), mais également par la cascade de signalisation s'en résultant permettant la formation de la coupe phagocytaire.<sup>176</sup> Cette étude marqua ainsi un tournant dans la recherche sur la réponse inflammatoire, ouvrant la voie à plusieurs études portant sur l'implication de MFG-E8 dans la résolution de l'inflammation et le contrôle de la progression de plusieurs maladies inflammatoires (voir **section 3.2.1**). S'ajoutant à celles-ci, quelques études se démarquent également en suggérant l'implication bénéfique de MFG-E8 dans d'autres processus tels que l'adhésion, la prolifération ainsi que la réparation tissulaire (voir **section 3.2.2**). Récemment, quelques études ont également démontré un nouveau rôle anti-inflammatoire du MFG-E8 indépendamment de l'élimination des cellules apoptotiques, suggérant ainsi la propriété anti-inflammatoire directe de cette molécule (voir **section 3.2.3**).



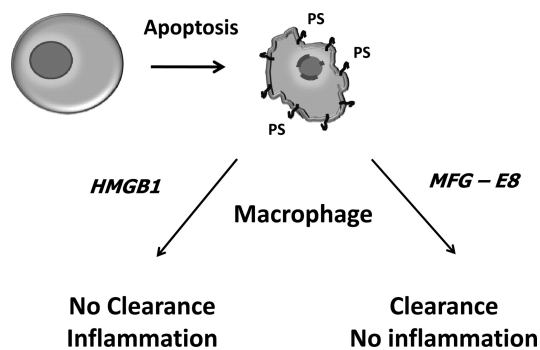
**Figure 3: Élimination des cellules apoptotiques par le macrophage médiée par MFG-E8.**  
*Adapté et réimprimé avec permission de J Clin Invest. 2007;117(7):1902-1913.*

### 3.2.1 Promotion de la phagocytose : le rôle conventionnel de MFG-E8 dans la résolution de l'inflammation

MFG-E8 a précédemment été décrit comme une glycoprotéine sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques activés suivant leur recrutement aux sites d'insulte et a été associé à la résolution de l'inflammation médiée par la phagocytose des cellules apoptotiques.<sup>176,187,223-225</sup> D'autres études ont démontrées la relation entre l'expression de MFG-E8 et les maladies auto-immunes, où l'auto-immunité chez les souris MFG-E8 déficientes a été associée au « trafficking » altéré et à l'augmentation de la présentation croisée des antigènes de cellules apoptotiques.<sup>226,227</sup> En effet, la clairance MFG-E8-dépendante des cellules apoptotiques est cruciale dans la prévention de la transition des cellules d'un stade apoptotique à celui de nécrose secondaire menant à la relâche du contenu intracellulaire cytotoxique et antigénique promouvant le microenvironnement inflammatoire.<sup>204-206,210,211,228-234</sup> La propriété anti-inflammatoire de MFG-E8 de par la création d'un pont entre le phagocyte et la cellule apoptotique menant à l'élimination de celle-ci est déjà bien explorée.<sup>176</sup> La liaison entre le récepteur intégrine  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  et la PS opsonisée par MFG-E8 porte à un changement conformationnel du récepteur intégrine menant au recrutement de p130-CrkII-DOCK180 et à l'activation de Rac1, résultant en une réorganisation du cytosquelette du macrophage permettant la formation du phagosome.<sup>223</sup> L'importance de MFG-E8 dans l'élimination des cellules apoptotiques a ainsi été démontrée dans l'élimination des cellules épithéliales mammaires en involution,<sup>235</sup> des lymphocytes B apoptotiques dans des modèles de maladie auto-immune,<sup>226</sup> des photorécepteurs de l'oeil,<sup>178,236</sup> des neutrophiles sénescents,<sup>237</sup> des plaques  $\beta$ -amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer,<sup>210,211</sup> des cellules du sang notamment les érythrocytes et les plaquettes,<sup>238,239</sup> des fibres de collagène lors de fibrose pulmonaire,<sup>240</sup> des neurones apoptotiques,<sup>188</sup> des débris cellulaires et des cellules apoptotiques dans les vaisseaux athérosclérotiques<sup>206,233</sup> ainsi que dans des conditions pathologiques inflammatoires telles que le sepsis et l'ischémie-réperfusion.<sup>190,209,231</sup> Acteur crucial dans la promotion de la phagocytose, l'absence de MFG-E8 chez les souris MFG-E8 KO engendre leur susceptibilité au développement d'une pathologie auto-immune similaire au SLE de par l'infiltration de cellules B apoptotiques de la rate, au développement d'une glomérulonéphrite de par les

dépôts d'anticorps IgG circulants dans le rein, à l'augmentation sérique d'anticorps contre l'ADN et les protéines du Soi de même qu'à une splénomégalie âge-dépendante.<sup>226-228</sup>

Médiant l'inflammation et l'insulte tissulaire dans plusieurs pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, la colite, l'ischémie-reperfusion, le sepsis, le SLE, l'insulte pulmonaire aiguë (ALI) et les brûlures sévères, le HMGB1 est relâché dans le milieu extracellulaire.<sup>66,70,77</sup> Tout comme MFG-E8, HMGB1 possède des propriétés chimioattractantes, favorisant l'accumulation des leucocytes.<sup>74</sup> De par sa liaison à  $\alpha_v\beta_3$ , HMGB1 compétitionne MFG-E8 en diminuant le potentiel phagocytaire du macrophage. Supprimant l'interaction entre MFG-E8 et  $\alpha_v\beta_3$ , HMGB1 inhibe la phosphorylation de ERK et l'activation de Rac-1, permettant ainsi aux cellules apoptotiques de progresser en stade de nécrose secondaire, favorisant la relâche d'alarmines.<sup>241</sup> HMGB1 n'a pas de séquence RGD et son mécanisme de liaison à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  demeure inconnu. Inversement, puisque MFG-E8 peut inhiber l'interaction entre HMGB1 et  $\alpha_v\beta_3$ , MFG-E8 favorise le potentiel phagocytaire du macrophage menant à une diminution de la nécrose secondaire et de sa relâche d'alarmines engendrées par HMGB1.<sup>241</sup>



**Figure 4: HMGB1 vs MFG-E8 : une résultante déterminante.**  
Adapté de *Am J Physiol Cell Physiol* 299 : C1253-C1255, 2010

### 3.2.2 Adhésion, prolifération, protection et réparation : un survol rapide de quelques-unes des propriétés non conventionnelles de MFG-E8

Depuis sa description, en dehors de la régulation de l'inflammation par la promotion de la phagocytose des cellules apoptotiques, plusieurs autres propriétés de MFG-E8 ont été documentées, illustrant la polyvalence fonctionnelle de cette protéine. Par exemple, MFG-E8 a été décrit comme un acteur crucial dans l'interaction ovule-spermatozoïde,<sup>242</sup> l'implantation endométriale,<sup>243,244</sup> la maintenance de l'épithélium épидидymaire,<sup>245,246</sup> la morphogénèse de la



glande mammaire,<sup>247</sup> l'homéostasie des ostéoclastes,<sup>248,249</sup> l'inactivation de rotavirus pendant la lactation,<sup>250,251</sup> la formation et la sécrétion des exosomes par les cellules dendritiques<sup>187</sup> ainsi que la maintenance et la réparation de la barrière épithéliale intestinale en condition normale ainsi qu'en condition inflammatoire.<sup>189</sup> Cette réparation intestinale est notamment expliquée par la promotion de la migration des entérocytes (cellules épithéliales intestinales) par le MFG-E8. On associe souvent, à tort, la présence de phosphatidylserine (PS) externalisée à la surface cellulaire à une manifestation du statut apoptotique de la cellule. En réalité, les cellules en migration externalisent transitoirement elles aussi la PS. Cette étude a démontré que la liaison à celle-ci par le MFG-E8 permet la réorientation du squelette d'actine, nécessaire au mouvement migratoire. De plus, parmi les études les plus récentes, on retrouve son implication lors d'insulte cérébrale après hémorragie subarachnoïdienne où l'administration de MFG-E8 diminue l'insulte tissulaire et améliore les fonctions neurologiques par la réduction du stress oxydatif.<sup>252</sup> Une étude a tout récemment démontré le potentiel thérapeutique de MFG-E8 en condition d'ischémie cérébrale, où celui-ci favorise la prolifération et la migration des cellules souches neurales.<sup>253</sup> MFG-E8 est aussi d'intérêt de par son potentiel de néovascularisation contrant l'ischémie et favorisant la réparation tissulaire cutanée. En effet, dans un modèle murin cutané d'ischémie/réperfusion, MFG-E8 favorise la prolifération des cellules endothéliales et inhibe l'infiltration de macrophages, spécialement de phénotype M1, et de la production de cytokines et chimiokines proinflammatoires, résultant en la protection contre la formation d'ulcères de pression et l'inflammation tissulaire cutanée.<sup>254</sup>

### **3.2.3 Littérature émergente: un potentiel anti-inflammatoire direct pour MFG-E8 ?**

Dans les dernières années, quelques études ont démontré le rôle anti-inflammatoire de MFG-E8 indépendant de la phagocytose des cellules apoptotiques, suggérant le potentiel anti-inflammatoire direct de cette protéine. L'implication de MFG-E8 dans l'atténuation de l'inflammation non reliée à l'élimination de cellules apoptotiques a pour la première fois été démontrée en 2009, dans un modèle murin d'inflammation intestinale, la colite expérimentale.<sup>203</sup> Alors que l'expression de MFG-E8 est diminuée au cours de la période d'induction proportionnellement à la sévérité de l'atteinte, son expression est augmentée en période de réparation tissulaire. Lors de la réparation tissulaire intestinale (phase de guérison), les ligands de  $\alpha_v\beta_3$  sont la vitronectine et la fibronectine alors qu'en période d'initiation de la

pathologie (phase d'induction), l'ostéopontine (OPN) est le ligand principal. En condition inflammatoire (LPS), le blocage du récepteur OPN résulte en la diminution de la production d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  par les macrophages. Ayant une plus grande affinité de liaison à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  en comparaison à l'OPN, MFG-E8 compétitionne avec succès pour l'inhibition de l'activation de NF $\kappa$ B  $\alpha_v\beta_3$ -dépendante engendrant la régulation NF $\kappa$ B-dépendante subséquente des gènes pro-inflammatoires, suggérant le potentiel anti-inflammatoire direct de MFG-E8. De plus, alors que les souris OPN KO présentent une diminution de la sévérité de la pathologie, les souris MFG-E8 KO présentent une insulte augmentée. Toujours dans un modèle de colite intestinale, une étude a proposé la propriété anti-apoptotique de MFG-E8.<sup>204</sup> Utilisant un modèle *in vitro* sur cellules épithéliales intestinales, cette étude a démontré que le *knockdown* de MFG-E8 augmente le niveau d'apoptose, de la protéine proapoptotique BAX et diminue le niveau de la protéine anti-apoptotique BCL-2. Par *scratch assay*, une diminution de la capacité de réparation ainsi qu'une diminution de l'expression de l'*Intestinal Trefoid Factor 3* (ITF3), un facteur important dans la migration cellulaire, ont également été observées. L'ajout de MFG-E8 recombinant diminuerait le niveau d'activation de la Caspase-3, le niveau d'expression de BAX et augmenterait le niveau de BCL-2. Par cette propriété anti-apoptotique, MFG-E8 diminue le niveau de médiateurs relâchés par les cellules apoptotiques et les cellules apoptotiques secondaires pouvant favoriser une réponse inflammatoire. Cependant, il demeure difficile d'interpréter si la diminution d'apoptose et les observations relatées sont associées à un potentiel effet anti-apoptotique direct de MFG-E8 ou si cela est simplement dû à une diminution de la phagocytose.

Lors de pneumonie, de sepsis ou d'ischémie-réperfusion, une insulte pulmonaire aiguë (ALI – *Acute Lung Injury*) peut se présenter. Menant à une réponse inflammatoire excessive, l'ALI favorise le recrutement de neutrophiles via leur récepteur CXCR2 et la relâche de MPO et de ROS. Ce dernier tue les pathogènes, mais si non contrôlé, ROS peut également rompre la barrière endothéliale et causer l'apoptose des cellules épithéliales, détruisant ainsi le tissu pulmonaire. Dans cette pathologie inflammatoire, la production de cytokine par les macrophages activés s'illustre principalement par IL-8 chez l'humain et MIP-2 chez la souris. Dans le poumon, MFG-E8 se localise dans l'interstitium alvéolaire ainsi que dans les

vaisseaux. Les cellules endothéliales ainsi que les cellules épithéliales l'expriment. Par un modèle d'ALI induit par l'administration de LPS dans la trachée, l'augmentation de l'expression de TNF $\alpha$  et de MIP-2, la congestion alvéolaire, l'infiltration neutrophilique (MPO), des dommages architecturaux, de l'apoptose ainsi que de l'expression de CXCR2 à la surface des neutrophiles ont été observées chez les souris MFG-E8 KO vs WT, suggérant le rôle anti-inflammatoire direct de MFG-E8.<sup>255</sup> L'administration de MFG-E8 résout l'ensemble des processus en diminuant l'infiltration des neutrophiles, l'expression de CXCR2 et en favorisant l'expression de la *G protein-coupled receptor kinase 2* (GRK2), permettant ainsi la translocation intracellulaire de CXCR2 et de ce fait sa désensibilisation. MFG-E8 atténue ainsi l'infiltration des neutrophiles par l'activation de GRK2, médiant l'internalisation de CXCR2, résultant en l'inhibition de la chimiotaxie médiée par MIP-2. Plus récemment, toujours au cours de l'inflammation pulmonaire, une étude a démontré le potentiel anti-inflammatoire direct du MFG-E8 dans un modèle d'asthme.<sup>213</sup> Chez l'humain, des biopsies de patients asthmatiques démontrent une diminution de l'expression de MFG-E8. L'asthme allergique se définit par l'hypercontractilité des muscles lisses bronchiques (ASMs – *Airway Smooth Muscles*). De l'inflammation des voies respiratoires découle une relâche de cytokine menant à une augmentation de l'activité de RhoA (*Ras homolog gene family member A*), qui augmente la contraction des ASMs. Dans un modèle expérimental murin d'asthme, les souris MFG-E8 KO développent une hyperactivité bronchique lors de traitement avec l'IL-13, l'IL-17A ou le TNF $\alpha$ . Chez ces souris, l'administration de recombinant MFG-E8 réduit l'induction de RhoA, la contraction des ASM ainsi que l'activation de NF $\kappa$ B et de l'inflammation induits par l'IL-13.

Outre l'inhibition des gènes pro-inflammatoires via la régulation de NF $\kappa$ B, le contrôle de la réponse inflammatoire par MFG-E8 a aussi été associé à la modulation d'autres voies de signalisation. En effet, dans un modèle murin de péritonite induite par LPS, l'administration de rmMFG-E8 induit la phosphorylation de STAT3 et augmente l'expression du *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3) dans les macrophages et les cellules péritonéales, menant à l'inhibition de la production de TNF $\alpha$  induite par le LPS.<sup>256</sup> Plus récemment, illustrant de nouveau son potentiel anti-inflammatoire direct, l'implication de MFG-E8 a également été démontrée dans la réduction du dommage tissulaire après ischémie cérébrale via la modulation

de l'activation de l'inflammasome dans les macrophages.<sup>257</sup> L'ischémie cérébrale se caractérise par la présence importante de cellules apoptotiques et par des zones d'infarctus avec nécrose. Cette nécrose augmente la libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP est un activateur bien connu de l'inflammasome via sa liaison au récepteur P2X7, résultant en la production d'IL-1 $\beta$  lequel est un médiateur pro-inflammatoire. Une étude utilisant un modèle murin d'ischémie cérébrale a démontré une augmentation de la production d'IL-1 $\beta$ , de TNF $\alpha$ , ainsi qu'une diminution de TGF $\beta$  et de la phagocytose des neurones apoptotiques dans le cerveau ischémique des souris MFG-E8 KO vs WT.<sup>257</sup> Cependant, l'administration de rmMFG-E8 diminue la production d'IL-1 $\beta$ , mais augmente la production de TGF $\beta$  et de la phagocytose. La diminution de la production d'IL-1 $\beta$  a également été observée par une modélisation *in vitro* utilisant une coculture de cellules nécrotiques ou ATP et de macrophages dérivés de moelle osseuse de souris (BMDMs – *Bone Marrow Derived Macrophages*) traités avec LPS et rmMFG-E8. Ciblant l'implication de l'inflammasome, une diminution du niveau d'activation de la Caspase-1 a également été démontrée. Puisque la production d'IL-1 $\beta$  est dépendante du récepteur P2X7 sur les macrophages, ceci suggère une interaction potentielle entre l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et le récepteur P2X7. En effet, après stimulation LPS, une augmentation de l'expression du récepteur intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est observée ainsi qu'une augmentation de sa proximité avec le récepteur P2X7. Sur les cerveaux ischémiques de souris intégrine  $\alpha_v\beta_3$  KO, l'administration de rmMFG-E8 ne réduit pas le dommage tissulaire et l'inflammation. Les mêmes résultats ont été obtenus sur les cerveaux ischémiques de souris P2X7 KO, confirmant le possible interaction entre les deux récepteurs. Cette étude a ainsi identifié le MFG-E8 comme régulateur négatif de la réponse inflammatoire et du dommage tissulaire résultant par la modulation de l'activation de l'inflammasome dans le macrophage.

## Chapitre 4 : Introduction des travaux

### 4.1 Hypothèse et objectifs de recherche

Notre laboratoire s'intéresse à la contribution du microenvironnement inflammatoire comme source de MFG-E8 et à son impact sur le macrophage, cellule essentielle à la fois dans l'initiation de la réponse inflammatoire ainsi que dans la résolution de l'inflammation créée par celle-ci. Le macrophage pro-inflammatoire peut induire un dommage tissulaire en induisant l'apoptose des cellules de l'environnement inflammatoire. Ce milieu tissulaire module le phénotype du macrophage s'y retrouvant. Toutefois, la nature exacte des médiateurs présents dans l'environnement apoptotique de même que l'influence de ceux-ci sur le macrophage est inconnue. **Nous avons émis l'hypothèse que le microenvironnement apoptotique tissulaire, via la relâche de MFG-E8, module le phénotype du macrophage, modifiant le microenvironnement, la réponse inflammatoire ainsi que le devenir de l'insulte tissulaire.**

Nous avons ainsi :

**1) Caractérisé le microenvironnement apoptotique en étudiant la cinétique de relâche du MFG-E8 par les cellules endothéliales apoptotiques et son rôle dans la modulation du phénotype du macrophage (Contribution scientifique, Chapitre 5)**

Afin de modéliser le microenvironnement apoptotique, des cellules endothéliales d'origine murine ou humaine ont été cultivées sans sérum pour créer un milieu conditionné par les cellules endothéliales apoptotiques. La validité de ce modèle fut confirmée par Ho/PI. Les cellules endothéliales et leur surnageant ont été analysées pour en évaluer la cinétique de sécrétion de MFG-E8 par Western Blot. De plus, dans le but d'évaluer le phénotype apoptose-spécifique du macrophage, nous avons également créé des milieux où l'apoptose était inhibée par l'utilisation de DEVD, un inhibiteur de la Caspase-3 et des milieux où l'apoptose n'était pas inhibée (DMSO). L'évaluation phénotypique des macrophages a été évaluée par ELISA. La contribution spécifique de MFG-E8 a été étudiée par des méthodes de *silencing* et d'immunoprécipitation ainsi que par l'utilisation de souris MFG-E8 KO. La signalisation cellulaire induite par MFG-E8 a aussi été étudiée.

## **2) Étudié le rôle du MFG-E8 dans l'environnement inflammatoire rénal par un modèle d'obstruction rénale chronique, l'obstruction urétérale unilatérale (Contribution scientifique, Chapitre 6)**

Nous avons étudié l'importance du MFG-E8 dans le microenvironnement apoptotique dans l'insulte rénale et le phénotype des macrophages *in vivo*. Cet environnement peut modifier leurs fonctions, de la phase cytotoxique pro-inflammatoire à la phase de résolution de l'inflammation. Nous avons utilisé un modèle murin de maladie rénale chronique, l'obstruction urétérale unilatérale (UUO) (voir **section 4.2**). Afin de déterminer l'importance du MFG-E8 dans les dommages tissulaires et la fibrose, nous avons administré du MFG-E8, avant l'obstruction jusqu'à la fin de l'expérience, afin d'inhiber la programmation initiale pro-inflammatoire des macrophages, phénotype connu de l'infiltrat dans l'obstruction urétérale. Ces expériences ont été réalisées sur des souris MFG-E8 KO et WT. Les reins des souris ont fait l'objet d'analyses histopathologiques (P.A.S. et Sirius Red) afin d'évaluer la modulation du dommage et de la fibrose par le MFG-E8. La mécanistique responsable de l'effet conféré par le MFG-E8 a été investiguée par Western Blot. De plus, le phénotype résultant des macrophages rénaux a été évalué par immunofluorescence.

### **4.2 L'obstruction unilatérale urétérale (UUO), un modèle d'insulte rénale chronique**

Le modèle de l'UUO est largement utilisé afin de modéliser, dans un court temps, les maladies chroniques rénales liées par exemple chez l'adulte au diabète et à l'hypertension, et chez l'enfant à l'obstruction urinaire congénitale (voir **encadré 8**).<sup>258,259</sup> En effet, sa rapidité et sa reproductibilité de même que l'absence d'utilisation de toxine exogène ainsi que la disponibilité du rein contre-latéral comme contrôle en font un modèle de choix, bien que certains questionnent la possibilité de changements cellulaires, métaboliques et fonctionnels du rein contre-latéral que pourrait entraîner l'hyperfiltration compensatoire par celui-ci.<sup>260-262</sup> L'obstruction urétérale résulte en des changements hémodynamiques rénaux suivis d'insulte tubulaire, de mort cellulaire par apoptose ou par nécrose et d'infiltration interstitielle de macrophages.<sup>263</sup> La prolifération de fibroblastes interstitiels ainsi que la transformation des myofibroblastes mènent au dépôt excessif de matrice extracellulaire ainsi qu'à la fibrose

rénale illustrée par l'augmentation de l'expression de collagène et de fibronectine.<sup>264</sup> La transition phénotypique des cellules tubulaires rénales résidentes,<sup>265</sup> des cellules endothéliales<sup>266</sup> ainsi que des péricytes<sup>267</sup> a également démontré son implication dans ce processus. Chez la souris, suivant 14 jours d'obstruction urétérale, une perte de 20% du parenchyme rénal ainsi qu'une diminution de 65% des tubules proximaux peuvent être observées.<sup>264</sup> Chez la souris, la cinétique de l'établissement de la pathologie et de la fibrose résultante varie en fonction de la souche.<sup>268</sup> Un effet du genre a également été démontré.<sup>269</sup> Chez le rat, les mâles démontrent une insulte rénale augmentée.<sup>270</sup> De plus, un effet de l'âge a également été rapporté. L'utilisation de l'opossum dans la recherche fœtale a démontré que l'obstruction rénale embryonique interfère avec la morphogénèse du rein et de l'uretère.<sup>271</sup> Chez le rat et la souris, seulement 10% des néphrons sont fonctionnels à la naissance, soulevant l'hypothèse que l'obstruction urétérale chez le nouveau-né pourrait aussi avoir des répercussions négatives sur la croissance et la maturation du rein.<sup>272</sup> Cependant, puisque chez l'humain la néphrogénèse est complète avant la naissance, il est plus difficile d'extrapoler chez l'humain les résultats murins obtenus. Bien que le modèle de l'UUO soit largement utilisé, l'insulte agressive que représente l'UUO mène à se questionner quant à sa pertinence comme modélisation des maladies rénales humaines. En effet, les obstructions partielles, puisqu'elles étendent l'insulte sur plusieurs semaines, sont davantage représentatives de la réalité clinique et comptent parmi les modèles alternatifs de l'UUO (voir **section 4.2.1**). Quelques limitations du modèle de l'UUO sont également à considérer. Par exemple, l'absence d'urine du rein obstrué empêche l'évaluation de biomarqueurs reflétant une protéinurie. Ce modèle ne permet pas de toute façon l'étude fonctionnelle du rein de par la présence compensatoire du rein contre-latéral.

#### **4.2.1 Les modèles murins alternatifs de l'UUO**

Outre le modèle de l'UUO, quelques modèles alternatifs murins peuvent être utilisés pour modéliser les maladies chroniques rénales. Parmi ceux-ci figurent des modèles génétiques tels que le modèle de syndrome d'Alport (Col4 $\alpha$ 3 KO)<sup>273</sup> où la délétion du gène qui code pour la chaîne  $\alpha$ 3 du collagène 4 a permis la compréhension de plusieurs mécanismes régulant le processus fibrotique tels que les MMPs,<sup>274</sup> le récepteur du collagène DDR1<sup>275</sup> et le système rénine-angiotensine.<sup>276</sup> La néphropathie induite par adriamycine est également un

modèle souvent utilisé et modélise plus particulièrement la *Focal Segmental Glomerulosclerosis* (FSGS) et où le macrophage joue un rôle crucial dans le développement de la pathologie.<sup>277</sup> D'autres modèles sont également utilisés tels que la néphrectomie partielle et la néphrotoxicité induite par l'acide folique.<sup>278,279</sup>

#### **Encadré 8: Les maladies chroniques rénales.**

Le rein joue un rôle crucial dans plusieurs fonctions physiologiques telles que le contrôle de la pression sanguine et l'homéostasie du sel et de l'eau. La dysfonction rénale touche environ 2% de la population et les pathologies cliniques liées à celle-ci sont typiquement inflammatoires et classifiées comme étant aiguës ou chroniques.<sup>280</sup> Les maladies chroniques rénales résultent notamment de l'hypertension, de complications liées au diabète, de l'obésité et de l'auto-immunité.<sup>281,282</sup> Quelques composants clés ont été identifiés comme étant impliqués dans la progression de la pathologie incluant le système du complément, les TLRs, les DCs, les macrophages, les NKs et les cytokines inflammatoires. L'inflammation rénale favorisée par ces composants contribue au déséquilibre des fluides et des électrolytes, au développement du diabète et à l'hypertension. Les principales stratégies de traitements ciblent les cellules immunes et le contrôle de l'inflammation. Évidemment, le traitement des pathologies responsables de l'atteinte rénale telles que l'hypertension et le diabète, par le contrôle glycémique ou de la pression sanguine, est également d'intérêt.<sup>283,284</sup>



## **Contribution scientifique**

### **Chapitre 5: Première description de la relâche apoptose-spécifique du MFG-E8 et caractérisation de son influence sur le macrophage**

Article publié dans PLoS One, avril 2012

#### ***MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming***

Running Title: Macrophage Programming by Apoptosis-derived MFG-E8

Brissette MJ<sup>\*,†</sup>, Lepage S<sup>\*,†</sup>, Lamonde AS<sup>\*,†</sup>, Sirois I<sup>\*</sup>, Groleau, J<sup>\*</sup>, Laurin LP<sup>\*,‡</sup> and Cailhier, JF<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>\*</sup>Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>†</sup>Institut du Cancer de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

<sup>‡</sup> Nephrology Division, CHUM and Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Address for correspondence and reprint requests to Jean-François Cailhier, MD, PhD, FRCP(c), CRCHUM and Institut du Cancer de Montréal. Pavillon J.-A. DeSève, Y-4622. 2099, rue Alexandre DeSève, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1  
Telephone: 514-890-8000 extension 25617, Fax: 514-412-7591

## **Authorship**

MJB carried out the acquisition, analysis and interpretation of data, performed the statistical analysis and drafted the manuscript.

SL participated to the collection and analysis of human data (unpublished).

ASL participated to the collection of data in figure 1B.

IS suggested that apoptotic cells could release MFG-E8.

JG carried out the experience in figure 1A.

LPL provided writing assistance.

JFC has been involved in writing assistance and revising critically the manuscript for important intellectual content.

All authors read and approved the final manuscript.

## **Abstract**

Apoptotic endothelial cells are an important component of the “response to injury” process. Several atherosclerosis risk factors such as hyperglycemia and oxidized low-density lipoproteins, and immune injuries, such as antibodies and complement, induce endothelial cell apoptosis. While endothelial cell apoptosis is known to affect neighboring vascular wall cell biology, its consequences on macrophage reprogramming are ill defined. In this study, we report that apoptosis of human and mouse endothelial cells triggers the release of milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFG-E8) and reprograms macrophages into an anti-inflammatory cells. We demonstrated that MFG-E8 is released by apoptotic endothelial cells in a caspase-3-dependent manner. When macrophages were exposed to conditioned media from serum-starved apoptotic endothelial cells, they adopt a high anti-inflammatory, low pro-inflammatory cytokine/chemokine secreting phenotype that is lost if MFG-E8 is absent from the media. Macrophage treatment with recombinant MFG-E8 recapitulates the effect of conditioned media. Finally, we showed that MFG-E8-mediated reprogramming of macrophages occurs through increased phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3). Taken together, our study suggests a key role of MFG-E8 release from apoptotic endothelial cells in macrophage reprogramming and demonstrates the importance of the apoptotic microenvironment in anti-inflammatory macrophage responses.

## Introduction

Apoptosis, an ubiquitous form of cell death, occurs during embryogenesis in normal tissues and during inflammation. It has been classically associated with a silent form of cell dismissal<sup>1</sup>. However, recent evidence suggests that apoptotic cells can modulate their microenvironment and neighboring cell biology. Apoptotic cells are known to release “eat-me” and “find-me” signals aimed at coordinating the non-phlogistic recruitment of professional phagocytes to allow swift clearance of apoptotic cells and inhibition of neutrophil influx<sup>2-7</sup>. Mounting evidence indicates that the paracrine component of the apoptotic program is not limited to the regulation of leukocyte trafficking, but also prepares the cellular microenvironment for remodeling after apoptotic cell deletion. Apoptotic endothelial cells (EC) are a key component of the “response to injury” process. It is recognized that most atherosclerosis risk factors (such as hypertension<sup>8</sup>, hyperglycemia<sup>9</sup> and oxidized low-density lipoproteins<sup>10</sup>) and antibody-complement-mediated immune injuries<sup>11</sup> induce EC apoptosis, which can generate a local microenvironment that will affect cell survival<sup>12-15</sup>, activation<sup>16,17</sup> and differentiation<sup>13,18</sup> of neighboring vascular wall cells. Apoptotic cells can modify their local environment through classical and non-classical secretion of various biological agents<sup>15</sup>. However, the reprogramming consequences of this apoptotic microenvironment on macrophages have not yet been fully characterized.

Macrophages are essential for initiating both inflammation and the repair of injured tissues<sup>19</sup>. In inflammation, they respond destructively to the damage identified; they also promote resolution of inflammation and contribute to tissue repair<sup>20</sup>. Initiation of inflammation, tissue damage and fibrosis are promoted by macrophages through reprogramming induced by the local microenvironment<sup>11,20-23</sup>. Indeed, the macrophage phenotype is affected by various signaling cues that vary according to the inflammation phase when they are recruited<sup>20,23</sup>. The injury-inducing and repair-promoting role of macrophages has been well described: macrophage depletion during the fibrosis phase reduces scarring, but depletion during recovery inhibits matrix degradation<sup>24</sup>. Furthermore, there is evidence to suggest that macrophages have a crucial role in conditions where endothelial apoptosis is present<sup>25-28</sup>.

The local environment can affect macrophage phenotype and influence the nature of its inflammatory response. Phenotypes are dynamic; they can switch from pro-inflammatory to anti-inflammatory and *vice versa*<sup>29</sup>. Therefore, two macrophage phenotypes can be identified: pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2). Pro-inflammatory M1 macrophages stem from classical and innate activation. They produce pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2). Anti-inflammatory, pro-repair M2 macrophages derive from alternative activation or reprogramming induced by the phagocytosis of apoptotic cells. This phenotype is characterized by the production of anti-inflammatory molecules such as interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor (TGF)- $\beta_1$ , and vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>30-32</sup>. However, considering phenotype as described is a simplistic view, as these macrophage phenotypes represent a continuum where transitional states are possible<sup>33</sup>.

Our previous work, via a proteomic approach, suggested that milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFG-E8) could be secreted by apoptotic EC<sup>15</sup>. It could be produced by various cell types and, essentially, by activated macrophages. MFG-E8 is crucial for the phagocytosis of apoptotic cells<sup>34</sup> and in macrophage activation<sup>35,36</sup>. We have further investigated MFG-E8 release by apoptotic endothelial cells due to its importance in inflammation and especially in macrophage function.

Here, we show MFG-E8 release by apoptotic EC. We propose that apoptotic EC may be the initial cellular source of MFG-E8, before its production by activated macrophages<sup>34</sup>. Our study suggests that apoptotic cell-conditioned media contributes to macrophage reprogramming into anti-inflammatory, pro-repair macrophages, via MFG-E8 release in a phagocytosis-independent manner.

## **Materials and methods**

### *Cell culture and generation of conditioned media*

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Clonetics, San Diego, CA, USA) were cultured as described elsewhere<sup>37</sup> and used at passages 4-5. Serum-free media conditioned by apoptotic or caspase-inhibited EC, were obtained as described. Equal EC numbers ( $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) were preincubated for 2 h in normal medium containing either DMSO (vehicle) or DEVD-FMK (100 $\mu$ M) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for caspase-3 inhibition, washed and the culture medium was changed for serum-free RPMI medium (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) and then EC were serum-starved for 4 h to obtain SSC-DMSO and SSC-DEVD respectively. To induce apoptosis in another way, EC were treated with MMC (0.01 mg/ml, Sigma, Oakville, Ontario, Canada) for 15 h. Conditioned media were collected and stored at -20°C. Conditioned media were centrifuged at 50 kG to eliminate apoptotic bodies. Necrotic conditioned media were produced by submitting EC to 3 freeze-thaw cycles. Sequential centrifugation protocol was done with 30 mL of SSC with proteases inhibitors (PMSF, Pepstatine A 2mM, Leupeptine 2 mM), 10 mL of total SSC unfractionated was kept. 20 mL of this total SSC was then centrifuged at 50 000g at 4°C for 15 min, blebs pellets was then resuspend in 20 mL of SS supplemented of proteases inhibitors and 10 mL were kept aside. The residual 10 mL were then ultracentrifuged at 200 000g at 4°C for 18 h. Supernatants were kept and small membrane vesicle pellets were resuspended in 10 mL of SS supplemented with proteases inhibitors.

### *Murine endothelial cell (MEC) isolation*

Thoracic aortae were removed surgically from anaesthetized mice, the endothelial side was placed on Matrigel (BD Bioscience, Mississauga, Ontario, Canada) for approximately a week, or until endothelial spreading was sufficient, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with fetal bovine serum (FBS)(Wisent, St-Bruno, Québec, Canada), calf serum (Gibco, Burlington, Ontario, Canada), endothelial cell growth supplement (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), heparine (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), fugizon (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) and penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada). When the desired confluence

was reached, MEC were harvested after dispase treatment and seeded on plastic flasks (BD Bioscience, Mississauga, Ontario, Canada). Cultured MEC were expanded between passages 4 and 6 and tested experimentally.

#### *Isolation of blood monocyte-derived macrophages and Preparation of Bone Marrow-Derived Macrophages*

Peripheral monocytes were isolated from healthy donors by Ficoll gradient (Wisent, St-Bruno) followed by CD14<sup>+</sup> immunomagnetic selection (Stem Cell, Vancouver). Both CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> and CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>+</sup> monocyte populations were collected. HMDM were matured in Iscove DMEM (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) with penicillin/streptomycin (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada), glutamine (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) and 10% decomplexed autologous human serum for 5-7 days before being exposed to experimental media for 24h. Informed written consent was obtained from healthy donors according to the hospital ethics committee (comité d'éthique de la recherche du CHUM). The data were not shown. Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were prepared from C57BL/6 mice. Bone marrow was isolated from femurs by standard sterile techniques and matured for 7 days in culture plastic in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) with 10% FBS (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada), penicillin/streptomycin (100 µg/ml) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada), and 20% L929 cell-conditioned medium as a source of macrophage-colony stimulating factor. BMDM were more than 96% positive for the macrophage marker F4/80 by flow cytometry.

#### *Immunoblotting and reagents*

In all experiments, equal volumes of all conditioned media were concentrated by centrifugation in a 10-kD vivaspin concentrator, according to the manufacturer's specifications (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) as described previously<sup>37</sup> or by a trichloroacetic acid (TCA) precipitation protocol of supernatants 9:1, washed with cold acetone and solubilization in sample buffer<sup>15</sup>. A fixed volume in all conditions was loaded onto gel. Proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Western blotting was performed<sup>37</sup> and the membranes probed with anti-human MFG-E8 and anti-mouse MFG-E8 antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN,

USA and Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, respectively). Ponceau red staining of membranes served as protein-loading control. Proteins were extracted from cell pellets with protease or phosphatase inhibitor cocktail separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose or PVDF membranes, and probed. The membranes were probed with anti-active caspase-3 (Cell Signaling Technology, Pickering, Ontario, Canada), anti-beta actin (Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-phospho STAT3 and STAT3 total antibodies (Cell Signaling Technology, Pickering, Ontario, Canada).

*Fluorescence microscopy for quantification of cells with chromatin condensation and cell membrane permeabilization.*

For fluorescence microscopy, unfixed/unpermeabilized adherent EC were stained with Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole) (HO) and PI. They were grown to confluence in 24-well culture plates (BD Bioscience, Mississauga, Ontario, Canada). HO (1 µg/ml) was added to a final concentration of 5 µg/ml immediately before fluorescence microscopy analysis (excitation filter I=360-425 nm). Apoptotic cells show increased HO fluorescence in the absence of PI positivity. Secondary and primary necrotic cells present PI positivity.

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Human IL-6, -8, active TGF-β<sub>1</sub>, MCP-1 protein levels, as well as murine IL-10, MCP-1, macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured by ELISA) according to the supplier's protocol (BD Bioscience, Mississauga, Ontario, Canada and R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

*MFG-E8 immunoprecipitation from MEC and HUVEC SSC.*

SSC were incubated with specific antibodies against MFG-E8 or control antibody for 6 h. Protein A/G linked beads were incubated overnight at 4°C under agitation. SSC were then centrifuged and immunoblotted for MFG-E8 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).



### *Recombinant murine MFG-E8.*

BMDM matured for 7 days were stimulated with rmMFG-E8 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 1 ng/mL in serum-free media (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) for 48 h. PBS added to serum-free media (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) served as negative control. Cytokines/chemokines from the supernatants were evaluated by ELISA.

### *Experimental animals and induction of experimental peritonitis*

C57BL/6 and BALB/c mice were bought from Charles River (Canada). We acquired the MFG-E8 KO mice on the C57BL/6 background were generously donated to us by Professor S. Nagata. Caspase-3 KO mice were obtained from Jackson Laboratory. Mice were housed in CRCHUM animal facilities. They were injected intraperitoneally (IP) with 0.5mL of conditioned media or rmMFG-E8 (0.6µg) for 3h and then injected with 3% Brewer's thioglycollate (BTG) (Difco) and underwent peritoneal lavage with 5mL of phosphate buffered saline (PBS) (Wisent, St-Bruno, Québec, Canada) at 2h thereafter. Peritoneal lavage fluid was centrifuged and stored at -80°C until analyzed for cytokine/chemokine production by ELISA. Macrophages were immunomagnetically-isolated with magnetic beads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA) after the peritoneal lavages and kept for immunoblotting. Performed animal experiments were approved by our institutional Animal Care Committee (Comité institutionnel de protection des animaux, CRCHUM).

### *Statistical analysis*

The results are expressed as mean  $\pm$  SD were analyzed by Student's *T*-test (with Bonferroni correction when appropriate) or ANOVA, as appropriate.  $p < 0.05$  was deemed to be significant for all tests.

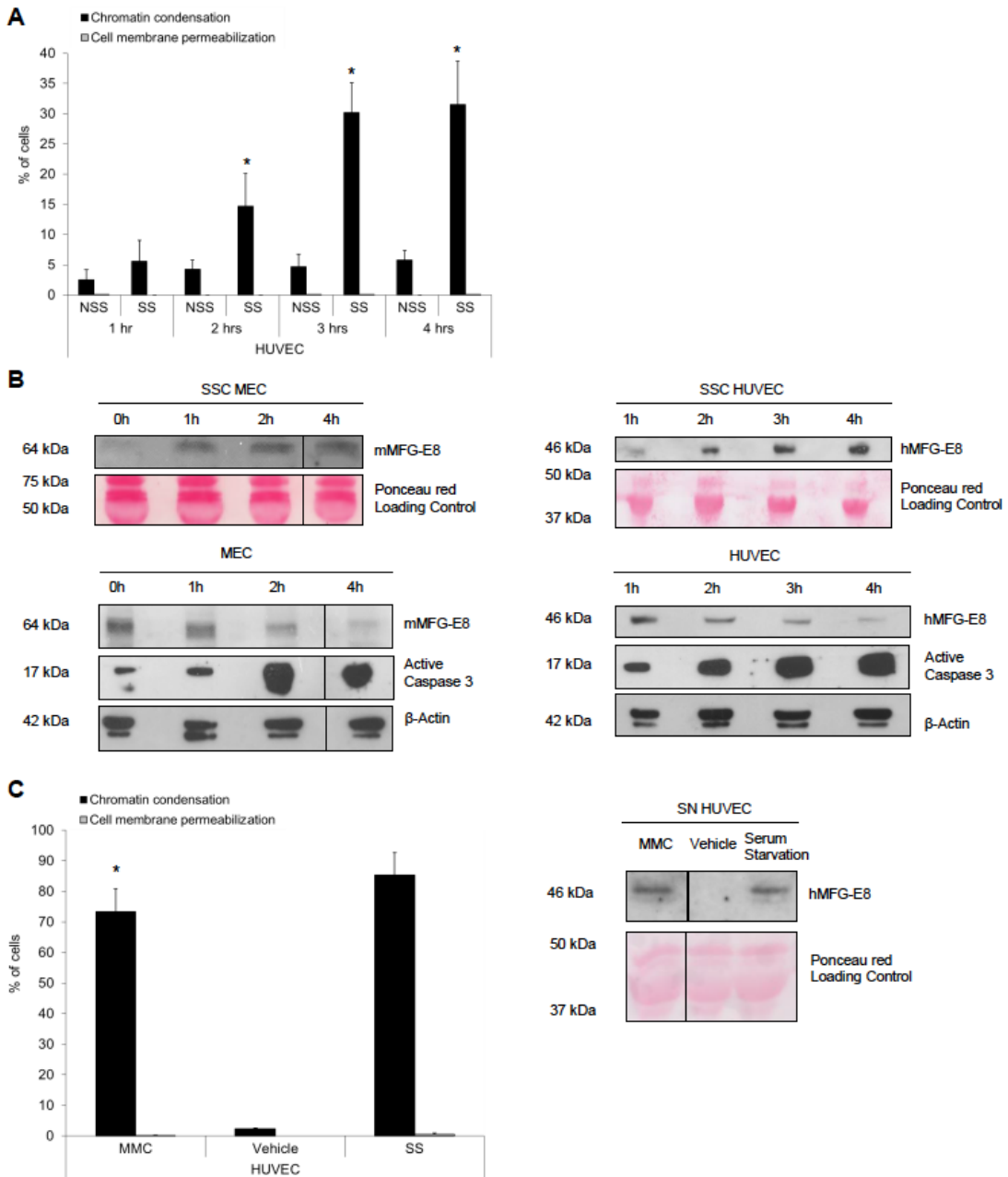
## Results

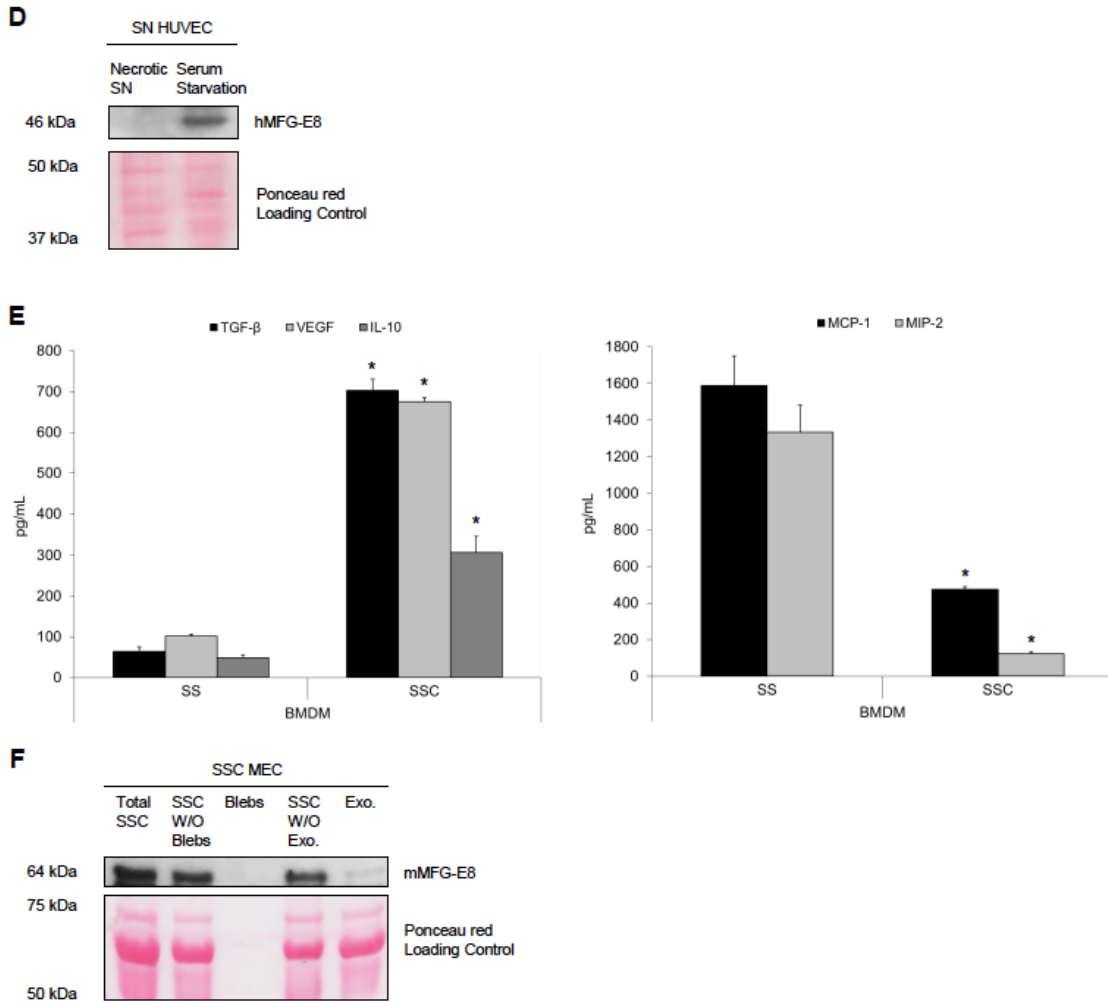
### *Apoptotic endothelial cell-conditioned medium contains MFG-E8 and could program macrophages*

We first assessed whether apoptotic EC could release MFG-E8. Apoptosis was induced *in vitro* by serum starvation (SS) for 4 h as reported previously<sup>12,13,15,37,38</sup>. This model is relevant to situations where EC apoptosis is found: chronic transplant vasculopathy and ischemia-reperfusion<sup>11,39</sup>. In our study, serum-starved human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Figure 1a), evaluated with Hoechst 33342 (HO) and propidium iodide (PI) staining, showed a progressive time-dependent increase of chromatin condensation in the absence of cell membrane permeabilization, indicative of apoptosis, as described elsewhere<sup>12,13,15,37,38</sup>. Necrosis, indicated by cell membrane permeabilization (inclusion of PI), was not significantly induced by SS. Chromatin condensation was present after 2 h of SS (Figure 1a), concomitantly to caspase-3 activation (Figure 1b, lower left panel). HUVEC and murine EC (MEC) apoptosis was associated with MFG-E8 release in the serum starved-conditioned media (SSC) (Figure 1b, upper panels), whereas the intracellular MFG-E8 content declined in EC, whilst simultaneously exhibiting heightened expression of active caspase-3 fragments (Figure 1b, lower panels). No significant differences were found in MFG-E8 release between BALB/c and C57BL/6 serum-starved EC (data not shown). We used mitomycin C (MMC) as another pro-apoptotic stimulus<sup>15,37</sup>. MMC treatment of EC augmented the percentage of cells with chromatin condensation and promoted MFG-E8 release (Figure 1c). Furthermore, MFG-E8 was absent from media conditioned by necrotic EC suggesting that this protein is not released passively as a consequence of cell membrane permeabilization (Figure 1d). Since MFG-E8 can be secreted as a soluble or as a small membrane vesicle protein (like exosomes), we then investigated which form serum-starved EC released MFG-E8. Equal volumes of total unfractionated SSC were centrifuged at 50 000g to remove apoptotic bodies and apoptotic cells. Supernatants and bleb pellets were collected. Obtained supernatants were then ultracentrifuged at 200 000g to sediment small membrane vesicles, the resulting supernatants and vesicle pellets were harvested. MFG-E8 levels were detected in total unfractionated SSC, in supernatants from the centrifugation at 50 000g and in supernatants

from the 200 000g ultracentrifugation (Figure 1f). The small membrane vesicle fraction contained MFG-E8, but at lower levels than in the supernatants. MFG-E8 was absent in the apoptotic blebs fraction (Figure 1f). These results suggest that MFG-E8 is mostly released by apoptotic EC as a soluble molecule rather than associated to small membrane vesicles.

**FIGURE 1**





**Figure 1: Apoptotic EC-conditioned media contain MFG-E8 and reprogram macrophages.**

**A** Percentage of cells with increased chromatin condensation and cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in HUVEC exposed to normal medium with growth factors without serum (normal serum-starved, NSS) or serum starvation (SS) for 1 h to 4 h ( $*p < 0.001$  versus Normal,  $n = 3$ ). Example of HO/PI staining on serum starved HUVEC for 4h showing chromatin condensation, right panel. **B** MEC and HUVEC were serum-starved for 1 h to 4 h. Supernatants (upper panels) and cells (lower panels) were harvested. Immunoblotting of MEC protein extracts showed that MFG-E8 levels decreased over time in parallel with increased active caspase-3 levels (lower left panel). HUVEC also exhibited reduced intracellular MFG-E8 levels over time (lower right panel). MFG-E8 levels increased over time in serum-starved conditioned medium (SSC) from EC (upper panels).  $\beta$ -Actin and Ponceau red staining were loading controls. Representative of 3 experiments. **C** Percentage of cells with increased chromatin condensation and cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in HUVEC exposed to MMC 0.01 mg/mL or vehicle in normal medium and serum starvation (as positive control) for 15 h (left panel),  $*p < 0.0001$  versus vehicle,  $n = 3$ . Immunoblot for hMFG-E8 in supernatant of EC treated with MMC (right panel). Ponceau red staining is shown as loading control. Representative of 2 experiments. **D** Immunoblot for hMFG-E8 in supernatant of HUVEC conditioned by necrotic EC (3 freeze-thaw cycles) and serum starvation as positive control. Ponceau red staining included as loading control. Representative of 2 experiments. **E** MEC were serum-starved for 4 h, the SSC were harvested, centrifuged to remove apoptotic cells. Murine macrophages were exposed to SSC or serum starvation (SS) for 24 h. ELISA were performed for TGF- $\beta_1$ , VEGF, IL-10, (left panel) MCP-1 and MIP-2 (right panel),  $*p < 0.05$ , representative of  $n = 14, 12, 4, 7$  and 9 separate experiments respectively. **F** Immunoblot for mMFG-E8 from total medium conditioned by apoptotic EC (Total SSC), supernatant after removal of apoptotic blebs by centrifugation at 50 000g (SSC without (W/O) blebs) and apoptotic blebs (Blebs) purified from total SSC by centrifugation, supernatant obtained from the supernatant after 50 000g and 200 000g centrifugation (SSC W/O exo.) and exosome-like nanovesicle fraction pelleted after the 200 000g centrifugation (Exo.). Proteins from equal initial volumes were precipitated by TCA. Ponceau red staining is shown as loading control of samples. Representative of 2 experiments.

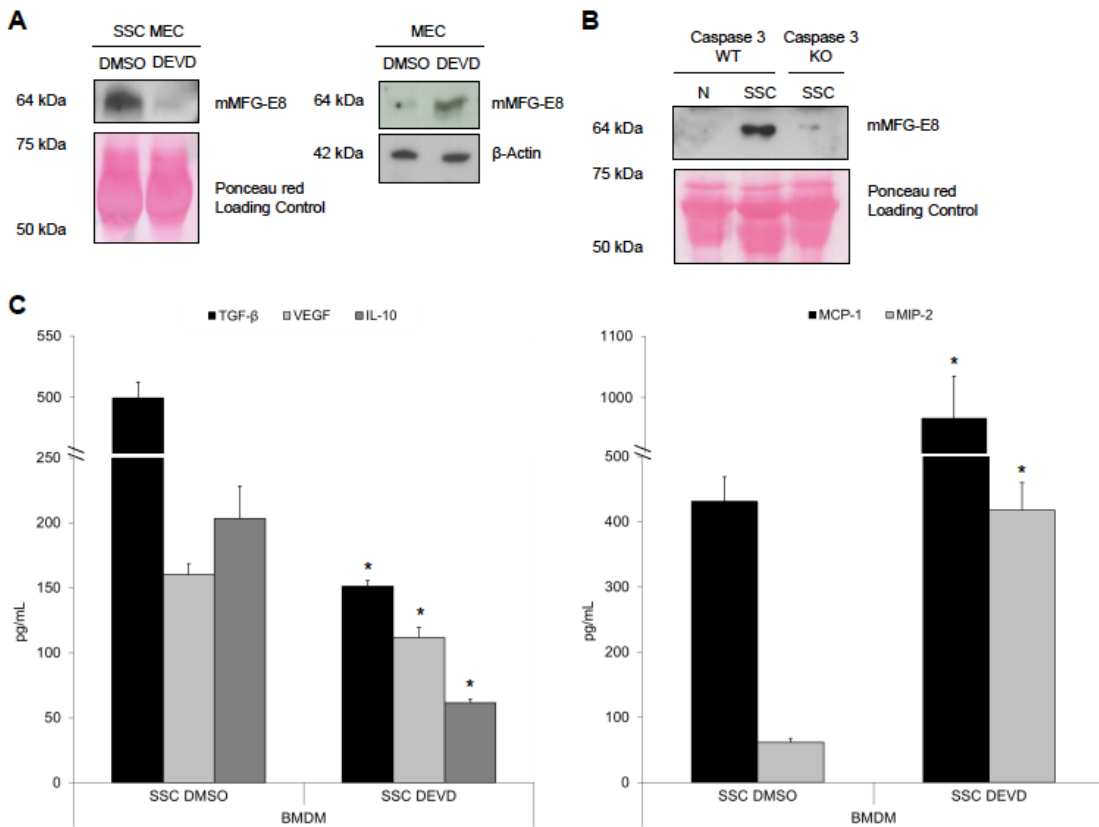
To evaluate the phenotypic consequences of SSC on macrophage reprogramming, murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) were stimulated with SSC for 24 h. Experiments performed with BMDM from C57BL/6 and BALB/c mice showed no differences in cytokine production between strains (data not shown). They produced more TGF- $\beta_1$ , VEGF and IL-10 in response to SSC from apoptotic EC than control serum-starved macrophages (Figure 1e, left panel, values in Table 1). Furthermore, the production of pro-inflammatory chemokines MCP-1 and MIP-2 was significantly lower with SSC than with SS exposure (Figure 1e, right panel, values in Table 1). Similar results were obtained with human monocytes-derived macrophages (HMDM). TGF- $\beta$  production by HMDM was increased 2.5 times in response to SSC from apoptotic EC compared to serum starvation alone whereas production of pro-inflammatory cytokine IL-8, MCP-1 and IL-6 were 90%, 93% and 97% reduced respectively with SSC exposure compared to SS ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ). Therefore, macrophages exposed to conditioned media from serum-starved apoptotic endothelial cells, adopt a high anti-inflammatory, low pro-inflammatory cytokine/chemokine secreting phenotype.

*Caspase-3 activation is necessary for MFG-E8 release and subsequent macrophage programming*

Employing pre-treatment with an irreversible caspase-3 specific inhibitor, DEVD (SSC-DEVD), to inhibit EC apoptosis before SS, we investigated whether MFG-E8 liberation was dependent on caspase-3 activation. As illustrated in Figure 2a (left panel), MFG-E8 release from serum-starved MEC was greatly reduced after caspase-3 inhibition using DEVD compared to control (dimethylsulfoxide (DMSO)) pre-treated serum-starved MEC (SSC-DMSO). As expected, intracellular MFG-E8 levels were higher in DEVD than in DMSO-treated MEC (Figure 2a right panel). Furthermore, serum starvation of MEC from caspase-3 knockout (KO) mice was associated with the absence of MFG-E8 release in comparison to MEC from wild type (WT) mice (Figure 2b). Moreover, MEC apoptosis plays a role in macrophage reprogramming as the anti-inflammatory phenotype of macrophages was inhibited when exposed to serum-starved MEC treated with the caspase-3 inhibitor. As depicted in Figure 2c (left panel), the production of TGF- $\beta_1$ , VEGF and IL-10 was significantly decreased in BMDM subjected to SSC-DEVD compared to SSC-DMSO (Figure

2c, left panel, values in Table 2). However, we observed increased MCP-1 and MIP-2 production by SSC-DEVD-treated BMDM versus the control (Figure 2c, right panel, values in Table 2). Similar results were obtained with HMDM. IL-8, MCP-1 and IL-6 production were 1.5, 2 and 10 times increased respectively in response to SSC-DEVD compared to SSC-DMSO ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ). These results suggest that caspase-3-dependent MFG-E8 production from apoptotic EC programs macrophages into an anti-inflammatory phenotype.

**FIGURE 2**



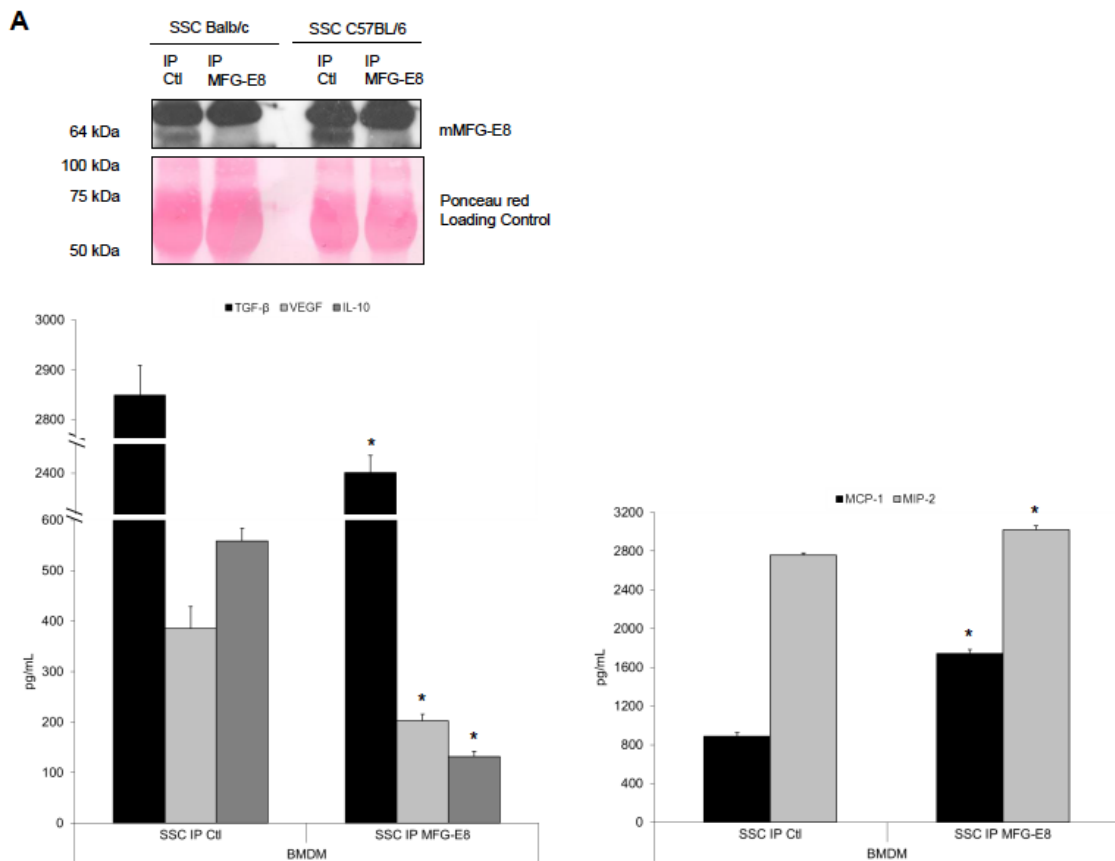
**Figure 2: Caspase-3 activation is necessary for MFG-E8 release and subsequent macrophage reprogramming.**

MEC were pre-treated with an irreversible caspase-3 inhibitor, DEVD-FMK (SSC-DEVD, 100 $\mu$ M) to prevent apoptosis, and then serum-starved for 4 h. Control MEC were pre-treated with vehicle (DMSO) for 2 h, washed and serum-starved for 4 h **A** Murine MFG-E8 was immunoblotted in SSC and cell extracts. DEVD-FMK-treated murine EC released less MFG-E8 compared to the vehicle (DMSO) (left panel), whereas their intra-cellular content remained higher than DMSO-treated EC (right panel). Ponceau red and  $\beta$ -Actin were loading controls. Representative of 3 experiments. **B** Immunoblot for murine MFG-E8 of SSC from caspase-3 KO EC compared to EC from WT mice. Representative of 2 experiments. **C** Murine macrophages produced more TGF- $\beta_1$ , VEGF, IL-10 (left panel) and less pro-inflammatory chemokines MCP-1 and MIP-2 (right panel) when exposed to media where apoptosis was not inhibited. \* $p < 0.05$ , representative of  $n = 11, 9, 3, 5$  and 8 separate experiments respectively.

*MFG-E8 plays an important and sufficient role in macrophage programming*

To clearly establish that macrophage programming in response to apoptotic MEC is dependent on MFG-E8 release from apoptotic MEC, we immunoprecipitated MFG-E8 from apoptotic MEC-conditioned media. Figure 3 demonstrates that the absence of MFG-E8 significantly inhibited macrophage reprogramming by apoptotic EC. Indeed, MFG-E8-immunodepleted SSC (Figure 3, upper panel) attenuated the production of the anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta_1$ , VEGF and IL-10 (Figure 3, lower left panel, values in Table 3) and increased the production of the pro-inflammatory chemokine MCP-1 and MIP-2 (Figure 3, lower right panel, values in Table 3) compared to control.

**FIGURE 3**



**Figure 3: MFG-E8 immunoprecipitation from SSC alters macrophage reprogramming.**

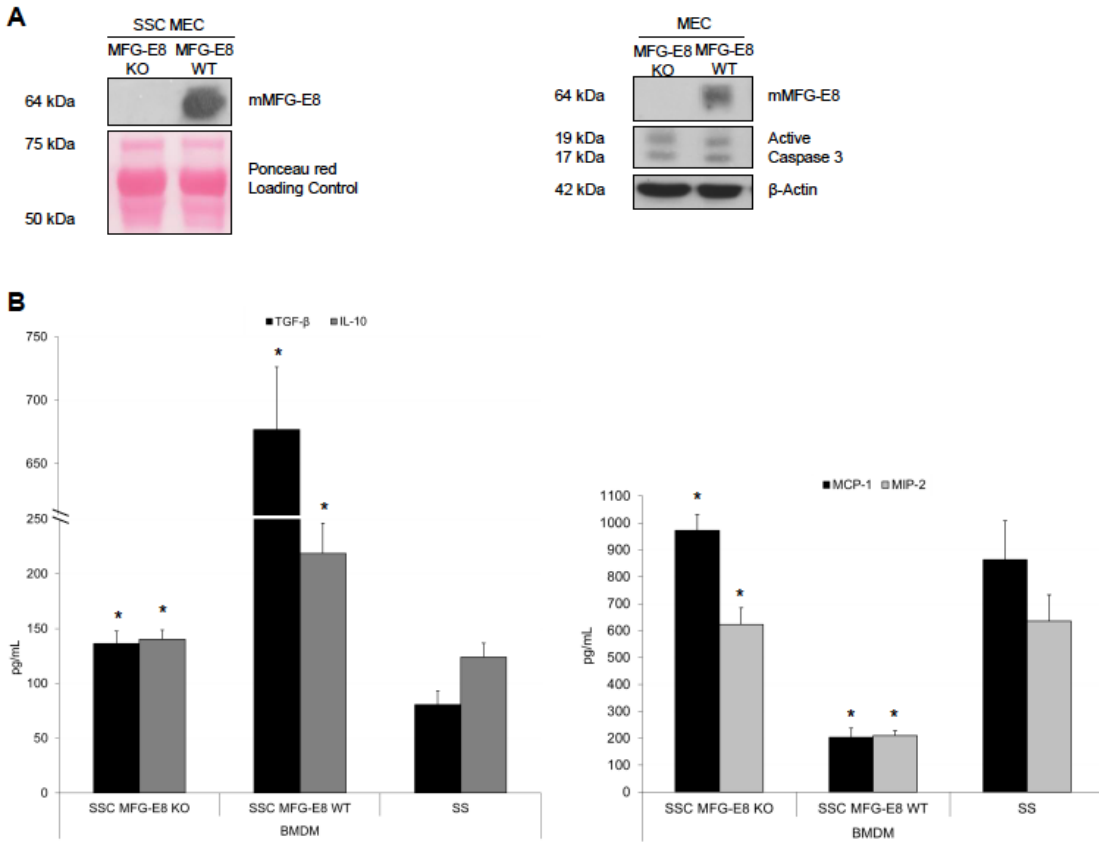
Serum-Starved Conditioned medium (SSC) from MEC were treated with an anti-MFG-E8 antibody (or isotype control) to deplete the MFG-E8 content. A Immunoblotting of MFG-E8 protein in SSC is shown for MEC (top panel). BMDM treated with SSC depleted of MFG-E8 produced less TGF- $\beta_1$ , VEGF, IL-10 (lower left panel), and more MCP-1 and MIP-2 (lower right panel). \* $p < 0.05$ , representative of  $n=2, 2, 3, 5$  and  $3$  separate experiments respectively.

To further highlight the importance of EC-derived MFG-E8 in macrophage programming, we studied MEC derived from MFG-E8 KO mice. Immunoblotting for MFG-E8 content in supernatants and cell extracts from serum-starved KO and WT EC confirmed the absence of MFG-E8 in the KO (Figure 4a, upper panels). In addition, immunoblotting revealed similar active caspase-3 levels in both KO and WT MEC (Figure 4a, upper right panel). SSC from MFG-E8 KO mice attenuated the production of anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta_1$  and IL-10 and increased the pro-inflammatory chemokines, MCP-1 and MIP-2, compared to SSC from MFG-E8 WT mice (Figure 4b, values in Table 4). SSC MFG-E8 KO-induced cytokine/chemokine production by macrophages was similar to that observed with the SS control (Figure 4b, values in Table 4). This suggests that the absence of MFG-E8 significantly altered macrophage programming by inducing comparable cytokine/chemokine production as seen in SS-stimulated macrophages.

To demonstrate the essential role of MFG-E8 in reprogramming macrophage phenotype, we performed studies with recombinant murine (rm)MFG-E8 at the same concentration as found in SSC, 1ng/ml (data not reported). Macrophages were stimulated with rmMFG-E8 (1ng/mL), phosphate buffered saline (PBS) (vehicle for rmMFG-E8), SS or SSC for 48 h and the supernatants were harvested. Stimulation of macrophages with rmMFG-E8 increased production of the anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta_1$ , VEGF and IL-10 and decreased the production of pro-inflammatory chemokines MCP-1 and MIP-2 compared to control PBS-treated macrophages (Figure 5, values in Table 5). Chemokine/cytokine production by macrophages treated with rmMFG-E8 was similar to that seen with SSC-treated macrophages. Similar results were obtained with HMDM. TGF- $\beta$  production by HMDM was increased by 46% in response to rhMFG-E8, whereas production of pro-inflammatory cytokines IL-8 and MCP-1 were reduced by 73% and 70% respectively with rhMFG-E8 treatment compared to control PBS-treated macrophages ( $p < 0.001$ ,  $n = 2$ ). Taken together, these results demonstrated the importance of MFG-E8 in the induction of an anti-inflammatory macrophage phenotype.

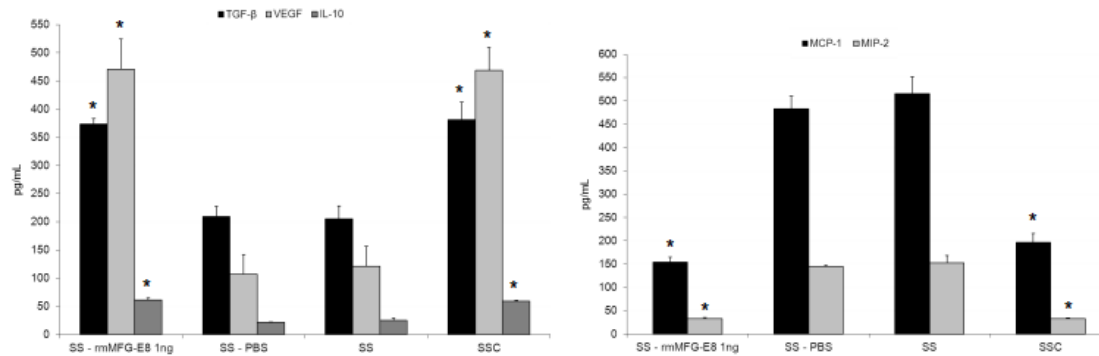


**FIGURE 4**



**Figure 4: SSC from MFG-E8 KO mice do not reprogram macrophages into anti-inflammatory macrophages.** **A** MFG-E8 KO or WT MEC were serum-starved for 4 h. Supernatants and cell extracts were immunoblotted for mMFG-E8 confirming KO status. Caspase-3 activation was similar between the 2 groups. **B** Murine macrophages were stimulated with Serum-Starved Conditioned medium (SSC) from MFG-E8 KO or WT EC. Supernatant were analyzed by ELISA. The results indicate that MFG-E8 in SSC is necessary to induce an anti-inflammatory macrophage phenotype. \* $p < 0.05$ , representative of  $n = 5$  separate experiments.

**FIGURE 5**

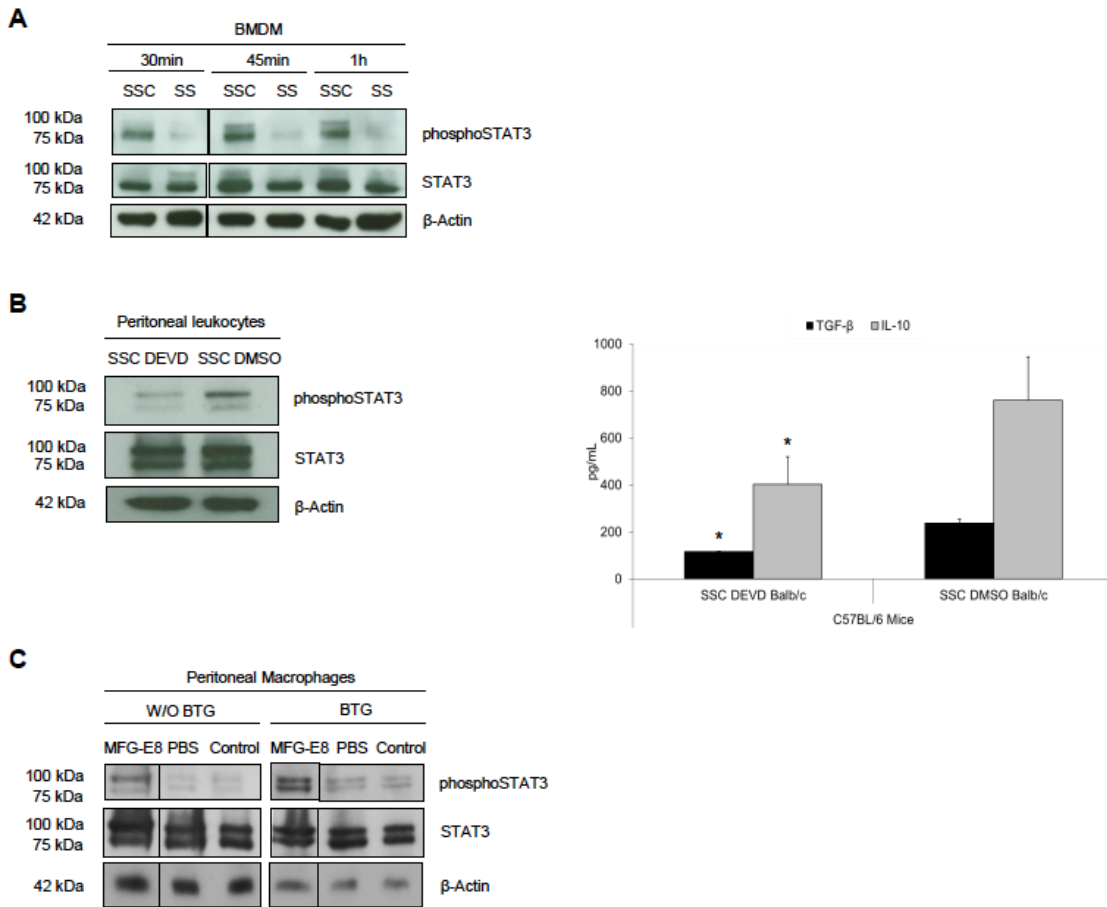


**Figure 5: Recombinant murine MFG-E8 recapitulates SSC-induced macrophage reprogramming.** Murine macrophages were stimulated with rmMFG-E8 (1 ng/mL) resuspended in RPMI (SS), vehicle (PBS), SS or SSC for 48 h and supernatant were harvested. rmMFG-E8 induced an anti-inflammatory macrophage phenotype with an increased production of TGF- $\beta$ , VEGF and IL-10 and reduced MCP-1 and MIP-2 compared to the vehicle control (PBS resuspended in SS). \* $p < 0.05$  vs respective controls, mean  $\pm$  SD, representative of  $n = 3$  separate experiments.

*Apoptotic endothelial cell-conditioned media activated the signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) pathway in macrophages*

STAT family of transcription factors are involved in reprogramming of macrophages. STAT-1 activation is classically associated with the pro-inflammatory cytotoxic macrophage phenotype, whereas STAT-3 activation characterizes the pro-repair macrophages<sup>20</sup>. We, therefore, studied STAT-3 activation in macrophage reprogramming by apoptosis-conditioned media. Phosphorylated STAT-3 levels were higher after SSC stimulation compared to SS in BMDM (Figure 6a). We tested an experimental peritonitis model to assess the *in vivo* reprogramming of macrophages by SSC. Pre-conditioning of peritoneal leukocytes with SSC-DMSO for 3 h increased STAT-3 phosphorylation in the cellular extracts 2 h after the induction of Brewer thioglycollate (BTG) peritonitis in mice compared to SSC-DEVD (Figure 6b, left panel). This, in turn, resulted in increased production of TGF- $\beta_1$  and IL-10 (Figure 6b, right panel, see Table 6 for values). In additional studies, we determined the role of rmMFG-E8 (0.6 $\mu$ g) in resident peritoneal macrophage pre-conditioning in STAT-3 activation. The administration of rmMFG-E8 increased the levels of STAT-3 phosphorylation in immunomagnetically-isolated peritoneal macrophages compared to PBS and unmanipulated control, prior to BTG injection. This STAT-3 activation persisted and increased further after BTG-induced peritonitis in isolated peritoneal macrophages compared to both controls (Figure 6c), indicating that MFG-E8 activated the STAT-3 pathway. Altogether, these results suggest that STAT-3 activation is present in the observed anti-inflammatory reprogramming of macrophages.

**FIGURE 6**



**Figure 6: STAT-3 activation in macrophage reprogramming by apoptosis-conditioned media.**

**A** BMDM were stimulated with Serum-Starved Conditioned medium (SSC) or serum starvation (SS) for 30 minutes to 1 h. Total protein extracts were harvested and immunoblotted for phospho-STAT-3, STAT-3 and  $\beta$ -actin as loading control. Phosphorylated STAT-3 levels are higher after SSC stimulation compared to SS. Representative of 4 experiments. **B** C57BL/6 mice were pre-conditioned with SSC-DEVD or SSC-DMSO intraperitoneally for 3 h. Experimental peritonitis was induced with thioglycollate for 2 h and followed by peritoneal lavage to harvest peritoneal cellular exudates and supernatants. Protein extracts from the cellular exudates showed increased STAT-3 phosphorylation in mice pre-conditioned with SSC-DMSO compared to SSC-DEVD (b, left panel). ELISA of the supernatants revealed that SSC-DMSO pre-treatment increased TGF- $\beta_1$  and IL-10 production compared to SSC-DEVD (b, right panel). \* $p < 0.05$ , representative of  $n=3$  separate experiments. **C** MFG-E8 pre-conditioning increased STAT-3 phosphorylation compared to PBS pre-conditioned or control immunomagnetically-isolated peritoneal macrophages prior to Brewer thioglycollate (BTG) administration (W/O BTG). STAT-3 activation persisted and increased further 2 h following the induction of BTG peritonitis (BTG) in pre-conditioned macrophages. Total STAT-3 levels are depicted.  $\beta$ -Actin were loading controls. Representative of 2 experiments.

## Discussion

Apoptotic cells release various elements that modify their microenvironment. This includes numerous chemokines or chemokine-like compounds, such as lysophosphatidylcholine<sup>3</sup>, fractalkine<sup>40</sup> and nucleotides<sup>41</sup>. Existing evidence indicates that apoptotic EC induces resistance to apoptosis and contributes to changes in the phenotype of neighboring vascular wall cells<sup>12,13</sup>. EC apoptosis, through cathepsin L release, degrades perlecan and generates the pro-fibrotic fragment LG3<sup>37</sup>. Recently, other reports have suggested that the apoptotic milieu could also promote survival<sup>14</sup> and increase the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages<sup>42</sup>.

Apoptotic cells could activate classical and non-classical secretion pathways involving the exosomal release of proteins. Using proteomic analysis of media conditioned by apoptotic cells, we have previously suggested that MFG-E8 could be secreted, perhaps from the exosomal compartment<sup>15</sup>. However, this observation warranted further evaluation as presented here. Dendritic cells can secrete MFG-E8 through the release of exosomes<sup>43</sup>. Macrophages produce MFG-E8 upon activation whereas resident macrophages do not<sup>34</sup>.

Our data highlights caspase-3-dependent MFG-E8 release by apoptotic EC as the primary source of an important protein introducing a novel mechanism of macrophage programming by the microenvironment. This apoptosis-conditioned microenvironment induces a phenotypic switch in macrophages, promoting anti-inflammatory and pro-repair macrophages, independent of apoptotic cell phagocytosis-induced reprogramming of macrophages. It suggests that, in addition to the anti-inflammatory function of apoptotic cells *per se* through their engulfment by macrophages and subsequent reprogramming<sup>30,31</sup>, the apoptotic microenvironment could similarly reprogram the neighboring resident and recruited macrophages as a consequence of MFG-E8 secretion. Considering the pro-inflammatory mediators that can be produced by apoptotic EC, such as extra-cellular matrix fragments<sup>37</sup>, a local dampening molecule could be essential to attenuate the local inflammatory response due to tissue injury. Apoptotic cells could constitute the initial source of MFG-E8 in the early inflammatory response, before production by activated macrophages<sup>34</sup>. The new role we are postulating for MFG-E8 could be important to maintain local tissue homeostasis by cellular

death itself, to promote the pro-repair programming of macrophages and ensure the early presence of a potent apoptotic cell-opsinizing molecule<sup>34</sup>. This would endow MFG-E8 with another potentially crucial function. Indeed, MFG-E8 is critical for apoptotic cell phagocytosis<sup>34</sup> and in macrophage biology<sup>35,36</sup>. During apoptotic cell engulfment, MFG-E8 opsonizes phosphatidylserine, allowing its recognition by macrophages through  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  integrins<sup>34</sup>. This process seems to occur in activated macrophages through a granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor induced mechanism of MFG-E8 expression<sup>35</sup>. In response to bacterial lipopolysaccharides (LPS) stimulation, MFG-E8 has been shown to reduce macrophage activation by modulating integrin signaling<sup>36</sup>. Data from an ischemia-reperfusion injury model indicates that MFG-E8 administration protects mice by promoting apoptotic cell engulfment<sup>44</sup>. MFG-E8 may bind lung collagen to facilitate its clearance in pulmonary fibrosis<sup>45</sup>. The role of MFG-E8 in inflammation extends beyond phagocytosis. Effectively, local release of TGF- $\beta_1$  and CCL22 through MFG-E8 expression may foster the recruitment and maintenance of FoxP3+ Tregs, promoting allograft tolerance<sup>35</sup>. MFG-E8 can modify macrophage behavior by increasing IL-10 production<sup>36</sup>. Significantly, most of these studies have implicated macrophages as the main source of MFG-E8 production and studied its role as an inhibitor of LPS stimulation. We suggest here that apoptotic cell-conditioned media and MFG-E8 reprogram macrophages through increased STAT-3 phosphorylation. However, the signaling pathways involved in STAT-3 activation by MFG-E8 during SS are still unknown. After LPS treatment, MFG-E8 could induce STAT-3 and suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) activation to attenuate the pro-inflammatory stimulation of macrophages<sup>46</sup>. STAT-3 has recently been implicated in MFG-E8 stimulation of cancer stem cells produced by tumor-associated macrophages<sup>47</sup>.

In clinical situations, such as transplant vasculopathy and highly proliferative cancers, where EC apoptosis is important, the constant presence of apoptotic EC could promote an unregulated repair response by macrophages with the constant production of pro-fibrotic and immunosuppressive mediators. This could lead to tissue fibrosis and/or impaired immune response. Therefore, better understanding of MFG-E8's role in macrophage reprogramming and associated signaling pathway activated by the apoptotic cell microenvironment, is central to the development of new therapeutic approaches in transplantation and cancer biology.

## **Acknowledgments**

Footnote: This work was funded in part by a research grants from the Kidney Foundation of Canada, from le Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), la Fondation du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) and from l'Institut du Cancer de Montréal. JFC was the recipient of a Kidney Foundation of Canada scholarship and is now a FRSQ clinician-scientist scholar. The authors thank the J.-L. Lévesque Foundation and the CHUM Renal Division for their support. However, the funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Thanks are also due to M. Soulez for her help with the EC culture and to Mr. O. Da Silva for editing this manuscript.

## References

1. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2: 965-975.
2. Schaub FJ, Han DK, Liles WC, Adams LD, Coats SA, et al. (2000) Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells. *Nat Med* 6: 790-796.
3. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, et al. (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113: 717-730.
4. Bournazou I, Pound JD, Duffin R, Bournazos S, Melville LA, et al. (2009) Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest* 119: 20-32.
5. Ravichandran KS (2010) Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of experimental medicine* 207: 1807-1817.
6. Ravichandran KS (2011) Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35: 445-455.
7. Chekeni FB, Ravichandran KS (2011) The role of nucleotides in apoptotic cell clearance: implications for disease pathogenesis. *Journal of molecular medicine* 89: 13-22.
8. Hamet P, deBlois D (2001) Endothelial and myocyte apoptosis--role of angiotensin II. *Can J Cardiol* 17 Suppl A: 26A-28A.
9. Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, et al. (1995) High-glucose--triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 44: 1323-1327.
10. Sata M, Walsh K (1998) Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 102: 1682-1689.
11. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ (2006) Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant* 6: 247-253.
12. Raymond M, Désormeaux A, Laplante P, Vigneault N, Filep J, et al. (2004) Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 18: 705-707 doi:710.1096/fj.1003-0573fje.
13. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AMJ, et al. (2005) Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 174: 5740-5749.
14. Weigert A, Johann AM, von Knethen A, Schmidt H, Geisslinger G, et al. (2006) Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the anti-apoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. *Blood*.
15. Sirois I, Raymond MA, Brassard N, Cailhier JF, Fedjaev M, et al. (2011) Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for antiapoptotic intercellular communication. *Cell Death Differ* 18: 549-562.
16. Chen W, Frank ME, Jin W, Wahl SM (2001) TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14: 715-725.
17. Lepage S, Cailhier JF (2009) Chronic transplant vasculopathy microenvironment present in the renal allograft reprograms macrophage phenotype. *Transplant Proc* 41: 3311-3313.
18. Rovere P, Vallinoto C, Bondanza A, Crosti MC, Rescigno M, et al. (1998) Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J Immunol* 161: 4467-4471.
19. Sean Eardley K, Cockwell P (2005) Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int* 68: 437-455.
20. Kluth DC, Erwig LP, Rees AJ (2004) Multiple facets of macrophages in renal injury. *Kidney Int* 66: 542-557.
21. Cailhier JF, Sawatzky DA, Kipari T, Houlberg K, Walbaum D, et al. (2006) Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 540-547.
22. Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, et al. (2005) Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol* 174: 2336-2342.
23. Lin SL, Castano AP, Nowlin BT, Lupper ML, Jr., Duffield JS (2009) Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *J Immunol* 183: 6733-6743.
24. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, et al. (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 115: 56-65.

25. Martinet W, Verheye S, De Meyer GR (2007) Selective depletion of macrophages in atherosclerotic plaques via macrophage-specific initiation of cell death. *Trends in cardiovascular medicine* 17: 69-75.
26. De Meyer I, Martinet W, De Meyer GR (2012) Therapeutic strategies to deplete macrophages in atherosclerotic plaques. *British journal of clinical pharmacology*.
27. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
28. Kitchens WH, Chase CM, Uehara S, Cornell LD, Colvin RB, et al. (2007) Macrophage depletion suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Am J Transplant* 7: 2675-2682.
29. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, et al. (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175: 342-349.
30. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, et al. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells [letter]. *Nature* 390: 350-351.
31. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, et al. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101: 890-898.
32. Golpon HA, Fadok VA, Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Sauer C, et al. (2004) Life after corpse engulfment: phagocytosis of apoptotic cells leads to VEGF secretion and cell growth. *Faseb J* 18: 1716-1718.
33. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
34. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, et al. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417: 182-187.
35. Jinushi M, Nakazaki Y, Dougan M, Carrasco DR, Mihm M, et al. (2007) MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *J Clin Invest* 117: 1902-1913.
36. Aziz MM, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, et al. (2009) MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling. *J Immunol* 182: 7222-7232.
37. Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, Lepage S, Raymond MA, et al. (2008) Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *J Biol Chem*.
38. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, et al. (2010) Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell death and differentiation* 17: 291-303.
39. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB (2008) Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annual review of pathology* 3: 189-220.
40. Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, et al. (2008) CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*.
41. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, et al. (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461: 282-286.
42. Scannell M, Flanagan MB, deStefani A, Wynne KJ, Cagney G, et al. (2007) Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 178: 4595-4605.
43. Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, et al. (1999) Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 147: 599-610.
44. Cui T, Miksa M, Wu R, Komura H, Zhou M, et al. (2010) Milk fat globule epidermal growth factor 8 attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia and reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 238-246.
45. Atabai K, Jame S, Azhar N, Kuo A, Lam M, et al. (2009) Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages. *J Clin Invest* 119: 3713-3722.
46. Aziz M, Jacob A, Matsuda A, Wu R, Zhou M, et al. (2011) Pre-treatment of recombinant mouse MFG-E8 downregulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages via STAT3-mediated SOCS3 activation. *PLoS One* 6: e27685.
47. Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, Masutomi K, Kinoshita I, et al. (2011) Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.



## Tables

**Table 1. Phenotypic analysis of murine bone-marrow-derived macrophages exposed to SSC vs SS**

	TGF- $\beta$	VEGF	IL-10	MIP-2	MCP-1
SSC	703.2 $\pm$ 27.65	675.74 $\pm$ 8.95	307.15 $\pm$ 39.07	121.72 $\pm$ 14.77	474.20 $\pm$ 14.77
SS	64.29 $\pm$ 10.99	101.25 $\pm$ 4.69	49.23 $\pm$ 5.83	1332.96 $\pm$ 148.46	1589.45 $\pm$ 160.07

Data are presented as value mean  $\pm$  SD in pg/mL; SSC: apoptotic serum-starved conditioned medium; SS: serum-starved medium; TGF: transforming growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL: interleukin; MIP: macrophage inflammatory protein; MCP: monocyte chemotactic protein.

**Table 2. Caspase-3 dependent production of MFG-E8 in EC reprograms bone-marrow-derived macrophages**

	TGF- $\beta$	VEGF	IL-10	MIP-2	MCP-1
SSC-DEVD	151.28 $\pm$ 4.17	111.49 $\pm$ 7.89	61.64 $\pm$ 2.69	417.33 $\pm$ 42.48	966.94 $\pm$ 67.87
SSC-DMSO	499.45 $\pm$ 13.11	160.06 $\pm$ 8.60	203.25 $\pm$ 24.90	61.61 $\pm$ 5.86	431.43 $\pm$ 37.06

Data are presented as value mean  $\pm$  SD in pg/mL; SSC: apoptotic serum-starved conditioned medium; TGF: transforming growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL: interleukin; MIP: macrophage inflammatory protein; MCP: monocyte chemotactic protein.

**Table 3. Immunoprecipitation of MFG-E8 in SSC reduces the anti-inflammatory reprogramming of macrophages by SSC**

	TGF- $\beta$	VEGF	IL-10	MIP-2	MCP-1
SSC IPMFG-E8	2401.33 $\pm$ 34.79	202.78 $\pm$ 13.12	131.91 $\pm$ 10.40	3021.53 $\pm$ 38.68	1743.41 $\pm$ 41.15
SSC IPctl	2849.18 $\pm$ 60.47	385.23 $\pm$ 43.70	558.26 $\pm$ 25.46	2757.97 $\pm$ 23.73	887.54 $\pm$ 38.36

Data are presented as value mean  $\pm$  SD in pg/mL; SSC: apoptotic serum-starved conditioned medium; TGF: transforming growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL: interleukin; MIP: macrophage inflammatory protein; MCP: monocyte chemotactic protein.

**Table 4. SSC from MFG-E8 KO mice reduces the anti-inflammatory reprogramming of macrophages**

	TGF- $\beta$	IL-10	MIP-2	MCP-1
SSC MFG-E8 KO	136.56 $\pm$ 11.06	140.11 $\pm$ 8.61	622.70 $\pm$ 62.00	972.82 $\pm$ 58.59
SSC MFG-E8 WT	676.93 $\pm$ 49.23	218.72 $\pm$ 27.32	209.42 $\pm$ 19.16	203.65 $\pm$ 33.51
SS	80.80 $\pm$ 12.49	124.01 $\pm$ 12.90	635.39 $\pm$ 97.45	863.23 $\pm$ 145.10

Data are presented as value mean  $\pm$  SD in pg/mL; SSC: apoptotic serum-starved conditioned medium; TGF: transforming growth factor; IL: interleukin; MIP: macrophage inflammatory protein; MCP: monocyte chemotactic protein.

**Table 5. rmMFG-E8 reproduces the anti-inflammatory macrophage phenotype**

	TGF- $\beta$	VEGF	IL-10	MIP-2	MCP-1
SS+ rmMFG-E8	373.16 $\pm$ 10.02	470.82 $\pm$ 53.29	61.14 $\pm$ 3.69	32.65 $\pm$ 3.02	154.69 $\pm$ 10.61
SS+ PBS	209.27 $\pm$ 18.04	107.35 $\pm$ 34.55	21.94 $\pm$ 0.70	145.13 $\pm$ 2.75	483.50 $\pm$ 27.13

Data are presented as value mean  $\pm$  SD in pg/mL; TGF: transforming growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL: interleukin; MIP: macrophage inflammatory protein; MCP: monocyte chemotactic protein.

**Table 6. Apoptosis-conditioned media in vivo pre-conditioning reprograms peritoneal macrophages**

	TGF- $\beta$	IL-10
SSC-DEVD	116.54 $\pm$ 1.21	401.88 $\pm$ 108.47
SSC-DMSO	237.55 $\pm$ 17.64	760.50 $\pm$ 184.76

Data are presented as value mean  $\pm$  SD in pg/mL; SSC: apoptotic serum-starved conditioned medium; TGF: transforming growth factor; IL: interleukin.

## **Chapitre 6: Identification de la propriété anti-inflammatoire de MFG-E8 dans le rein obstrué et son mécanisme associé**

**Article en révision au Journal of Leukocyte Biology**

***Milk fat globule epidermal growth factor-8 limits tissue damage through inflammasome modulation during renal injury***

Marie-Joëlle Brissette<sup>\*†</sup>, Patrick Laplante<sup>\*†</sup>, Shijie Qi<sup>\*</sup>, Mathieu Latour<sup>§</sup> and Jean-François Cailhier<sup>\*†‡</sup>.

\* Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

† Montreal Cancer Institute, Montreal, Quebec, Canada

§ Department of Pathology, CHUM, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

‡ Nephrology Division, CHUM and Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Running Title: MFG-E8 decreases NLRP3 activation in UUO

Word count for abstract: 210

Word count for text: 3443

Address correspondence and reprint requests to Jean-François Cailhier, MD, PhD, FRCP(c), CRCHUM and Montreal Cancer Institute

900, rue St-Denis, Montreal, Quebec, Canada H2X 0A9

Telephone: 514-890-8000, extension 31302; Fax: 514-412-7591

## **Authorship**

MJB carried out the design of experiments, acquisition, analysis and interpretation of data, performed the statistical analysis and drafted the manuscript.

PL participated to the collection of data and provided writing assistance.

SQ performed mice ureteral obstructions.

ML has been involved in tissue damage analysis.

JFC has been involved in revising critically the manuscript for important intellectual content.

All authors read and approved the final manuscript.

## **Abstract**

Mediators released by apoptotic renal resident cells play a crucial role in the modification of the inflammatory microenvironment. We have demonstrated that milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFG-E8) is released by apoptotic cells, resulting in reduced pro-inflammatory cytokine production by macrophages. The present study was designed to study the role of MFG-E8 on the modulation of tissue damage and macrophage phenotype in a renal inflammatory model, unilateral ureteral obstruction (UUO). C57BL/6 WT or MFG-E8 KO mice underwent ureteral ligation for 3, 7 and 14 days to evaluate renal injury. MFG-E8 (30 $\mu$ g/kg) or vehicle was also administered intra-peritoneally. MFG-E8 administration reduced kidney damage and fibrosis compared to the control, whereas its absence in MFG-E8 KO mice was associated with more severe disease. Moreover, MFG-E8 administration was associated with decreased inflammasome activation in the kidney. Furthermore, adoptive transfer of MFG-E8-stimulated macrophages reduced the activation of inflammasome and tissue damage. In all cases, both the systemic administration of MFG-E8 and MFG-E8-treated macrophages promoted the accumulation of anti-inflammatory CD206 positive macrophages. We propose that the protective role of MFG-E8 is mediated through anti-inflammatory macrophage reprogramming that results in decreased inflammasome activation, preventing severe tissue damage. These data provide valuable insight for identifying MFG-E8 as a novel target in the modulation of inflammatory diseases.

## Introduction

Inflammation is a response to tissue injury. It is characterized by the rapid influx of leukocytes to remove the offending mediators present in the inflammatory environment. However, this leads to cell death. Cellular injury and death release endogenous mediators such as danger-associated molecular patterns (DAMPs) that can amplify an inflammatory response through NOD-like receptors (NLRs) activation, involved in host innate immune responses to microbial and non-microbial stimuli.<sup>1</sup> Upon activation, the NLRP3 proteins oligomerize and recruit the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain), and the protease caspase-1 to form a protein complex called the “inflammasome” leading the release of mature pro-inflammatory IL-1 $\beta$  and IL-18 cytokine.<sup>2</sup> Increased expression of NLRP3 has been observed in acute and chronic diseases.<sup>3</sup> It also has been suggested to be important in unilateral ureteral obstruction (UUO).<sup>4,5</sup> During UUO, the entire nephron is subjected to increased hydrostatic pressure gradients, oxidative stress and increased vascular permeability.<sup>6,7</sup> This leads to interstitial inflammatory cell infiltration,<sup>8</sup> essentially by monocytes,<sup>9-11</sup> but also by lymphocytes<sup>12</sup> and dendritic cells.<sup>13</sup> Studies have shown that infiltrating macrophages play a crucial role in the production of pro-apoptotic stimuli such as TNF and NO (through inducible Nitric Oxide Synthetase, iNOS), leading to tubular atrophy.<sup>9,10,14-16</sup>

The UUO model has been widely used to study mechanisms leading to interstitial fibrosis.<sup>17,18</sup> Renal fibrosis is the hallmark of progressive chronic renal diseases. Fibrosis results from parenchymal cell death and excessive matrix deposition. Through a process of phenotypic transition and remodeling, various cell types<sup>19-23</sup> convert into myofibroblasts promoting extracellular matrix accumulation and collagen synthesis, ultimately leading to kidney dysfunction.<sup>24</sup> Moreover, the UUO model is characterized by constant apoptosis of renal resident cells (initially in the epithelium and then in the endothelium), where released mediators contribute to the modification of the renal microenvironment.<sup>25,26</sup>

We published that apoptosis of endothelial cells triggers in a caspase-3 dependent manner the release of milk fat globule epidermal growth factor-8 (MFG-E8), which was found to play a crucial role in the control of the inflammatory response by reprogramming

macrophage into anti-inflammatory phagocytes.<sup>27</sup> We also found that apoptotic epithelial cells, similarly to apoptotic endothelial cells, release MFG-E8. MFG-E8 is a glycoprotein secreted by activated macrophages and dendritic cells and has been associated with resolution of inflammation through apoptotic cell phagocytosis<sup>28-32</sup> and its absence to autoimmunity.<sup>33,34</sup> However, some recent reports have attributed a direct anti-inflammatory role to MFG-E8 in various animal models of inflammation, extending its importance beyond phagocytosis of apoptotic cells.<sup>35-41</sup>

Here we show, using an experimental mouse model of UUO, that MFG-E8 confers strong protection against kidney obstruction by reducing renal injury and extracellular matrix deposition. Moreover, adoptive transfer of MFG-E8-stimulated macrophages prior to UUO attenuates renal damage, highlighting the importance of macrophage programming by MFG-E8. Our results suggest a protective role for MFG-E8-reprogrammed macrophages leading to reduced inflammasome activation and renal injury.

## **Materials and methods**

### *Experimental animals and surgical procedures:*

Male mice of the C57BL/6J strain were bought from Jackson Laboratory (Bay Harbor, ME) and MFG-E8 KO mice (on the C57BL/6J background) were generously donated to us by Professor S. Nagata. Animals were housed in the CRCHUM animal facility. Twelve-week-old mice were subjected to complete UUO<sup>42</sup> for 3, 7 and 14 days. Surgeries were performed according to the animal protocol approved by our institutional Animal Care Committee (Comité institutionnel de protection des animaux, CRCHUM).

### *Recombinant murine MFG-E8:*

Mice were subjected to rmMFG-E8 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) intraperitoneal administration 30ug/kg (100µL), 1 day prior to UUO surgery and every 3 days thereafter. PBS administration served as a negative control.

### *Tissue collection, processing and staining:*

Kidneys were removed 3, 7 or 14 days after surgery and fixed by immersion in 10% phosphate-buffered formalin. Formalin-fixed kidneys were dehydrated, embedded in paraffin, and sagittally sectioned at 4µm. To delineate general morphology and identify structural damage such as necrotic lesion, sagittal sections of kidneys were stained with Periodic acid-Schiff (PAS) staining. A renal pathologist, blinded to the experimental conditions, identified morphological damage. Picrosirius Red staining was used to identify collagen deposition. This staining was chosen for assessing fibrosis severity through its capacity to identify fibrillar collagen (types I and III) as well as tubular basal membrane collagen (type IV).<sup>43</sup> The relative content of collagen fibers was assessed by two blinded observers using an independent scoring index. Interobserver agreements have been assessed using Kappa statistic as a measure of concordance and coefficients have showed to be higher than 0,7. Picrosirius Red staining was evaluated using polarized light microscopy. PKH26 Red Fluorescent Cell Linker kit (Sigma-aldrich, St-Louis, MO, USA) was used to label BMDMs before transfer in mice. Labeling was done following product recommendations and performed on frozen tissue in O.C.T. CD206 immunofluorescence was performed using citrate antigen retrieval method followed by primary antibody anti-CD206 (Abcam, Cambridge, MA, USA) and secondary anti-rabbit A.Fluor 647 and Dapi staining. Imaging

was done using fluorescence microscopy (Axio observer.Z1, Zeiss). Image acquisitions were done using 10 fields (5 cortex, 5 medulla, 2 poles and 3 radials per area) on median sagittal section of each kidney (AxioVision 4.8.2 software). Image analysis was done using ImageJ and Fidji software.

*Preparation of Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDMs):*

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were prepared from C57BL/6J WT and C57BL/6J MFG-E8 KO mice. Bone marrow was isolated from femurs by standard sterile techniques and matured for 7 days *ex vivo* in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada) with 5% FBS (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada), penicillin/streptomycin (100 µg/ml) (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada), and 5% L929 cell-conditioned medium as a source of macrophage-colony stimulating factor as previously described.<sup>27</sup> BMDMs were above 96% positive for the macrophage marker F4/80 by flow cytometry.<sup>27</sup> BMDMs matured for 7 days and were then stimulated with rmMFG-E8 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in serum-free media (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada) for 24 h. PBS added to serum-free media (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada) served as a negative control. BMDMs were washed from their stimulation media before being administrated (ip) in mice at  $1 \times 10^6$  cells/injection.

*Immunoblotting and reagents:*

Proteins were extracted from kidneys with a protease and phosphatase inhibitor cocktail separated by SDS-PAGE electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, and probed as previously described.<sup>27</sup> The antibodies used were: anti-NLRP3 (Adipogen, Liestral, Switzerland), anti-ASC (N-15) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-active Caspase-1 (BioVision, Milpitas, CA, USA), anti-IL1 $\beta$  (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) and anti-IL18 (M-19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). For immunoblots, equivalent amounts of total proteins extracts were loaded for each samples. Densitometric analysis was performed using Ponceau Red staining, which has been done systematically on each membrane before antibody incubation. Ponceau Red staining was used as protein-loading control, because of variations in levels of housekeeping proteins (e.g. actin, tubulin) induced by experimental conditions rather than protein concentration. Only one Ponceau Red from each specific experience is illustrated per figure. The protein expression for each sample has been reported on its corresponding Ponceau Red staining for



densitometric analysis using ImageJ. The values for each experimental group (MFG-E8-treated group and BMDMs MFG-E8-treated group) were compared to the results obtained in the control group. In each graph, the control was either the PBS group or the BMDMs PBS-treated group; their values were set to 100%.

*Statistical analysis:*

The results, expressed as mean  $\pm$  SD, were analyzed by Student's T-test with extreme studentized deviate (Grubb's test) correction when appropriate. Statistical significance was defined as \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

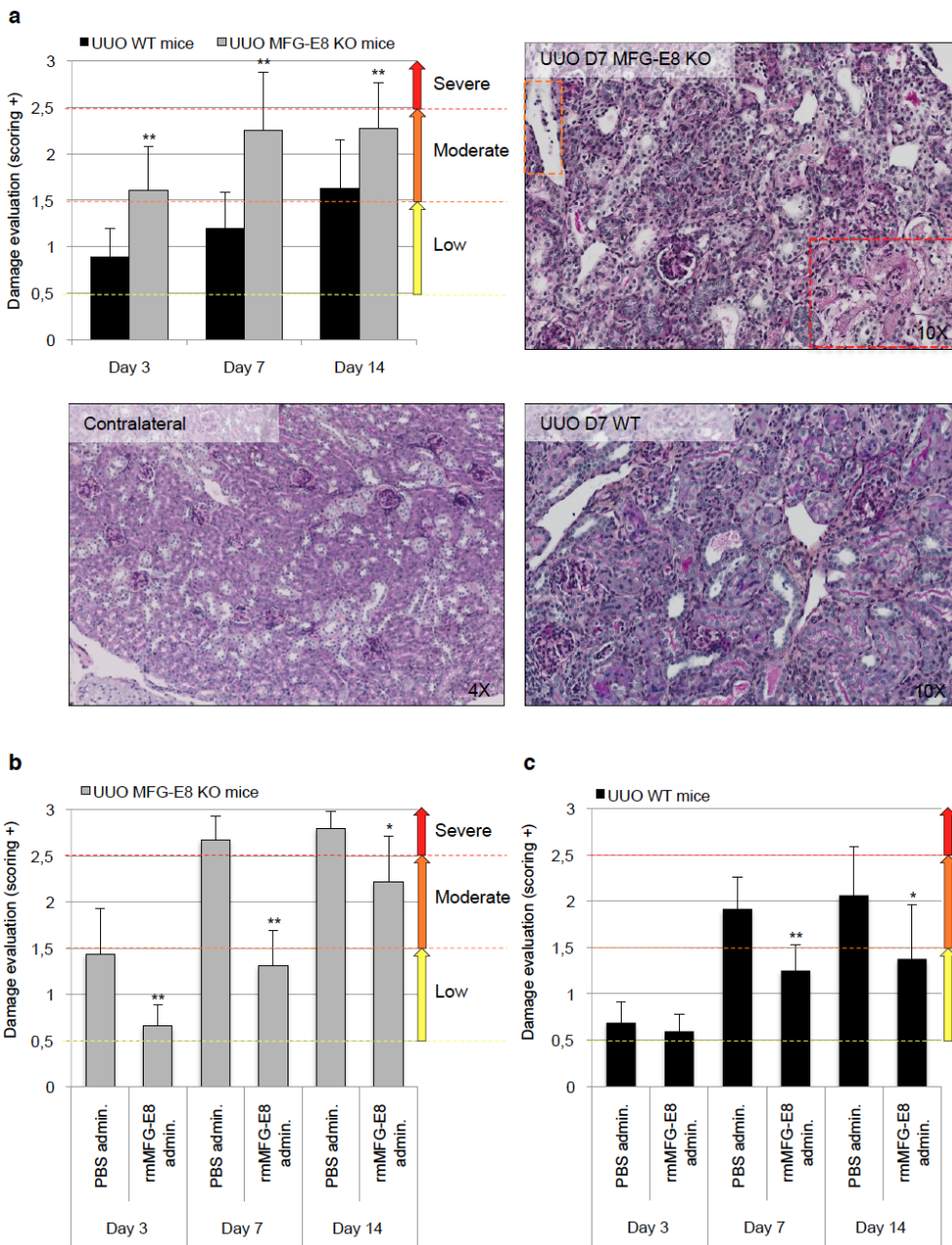
## Results

### *MFG-E8 confers protection against kidney damage in UUO*

C57BL/6 WT mice and MFG-E8 KO mice underwent left ureteral ligation for 3, 7 and 14 days. A pathologist blinded to the experimental conditions evaluated levels of renal injury using an arbitrary scale of damage, with regards to the relevant pathologic features in the different compartments (i.e. tubules, interstitium and blood vessels) of the kidney. Low renal damage refers to small dilatation in the proximal tubular compartment with some infiltrating inflammatory cells. Moderate damage refers to increased interstitial cellular infiltrates, significant tubular dilatation with flattened epithelial cells, regional edema and tubular atrophy or presence of alteration of tubules where apical microvilli loss can be observed in proximal tubules due to degeneration of tubular epithelium. Severe renal damage is defined by the additional presence of tubular necrosis area, as observed in UUO.<sup>7,17</sup> Renal morphopathological alterations found using histochemical Periodic Acid Schiff (PAS) staining showed that kidney injury was significantly increased in MFG-E8 KO mice compared to WT mice for all the time points evaluated (Fig 1A, upper left panel). Severe damage has been only observed in MFG-E8 KO mice (Fig 1A, upper right panel), suggesting a protective role for intrinsic MFG-E8 (in WT phenotype) in the UUO model. We also found that intraperitoneal recombinant murine (rm)MFG-E8 administration, prior to ureteral ligation and every 3 days thereafter, reduced renal damage compared to PBS administration for both MFG-E8 KO and WT mice (Fig 1B-C).

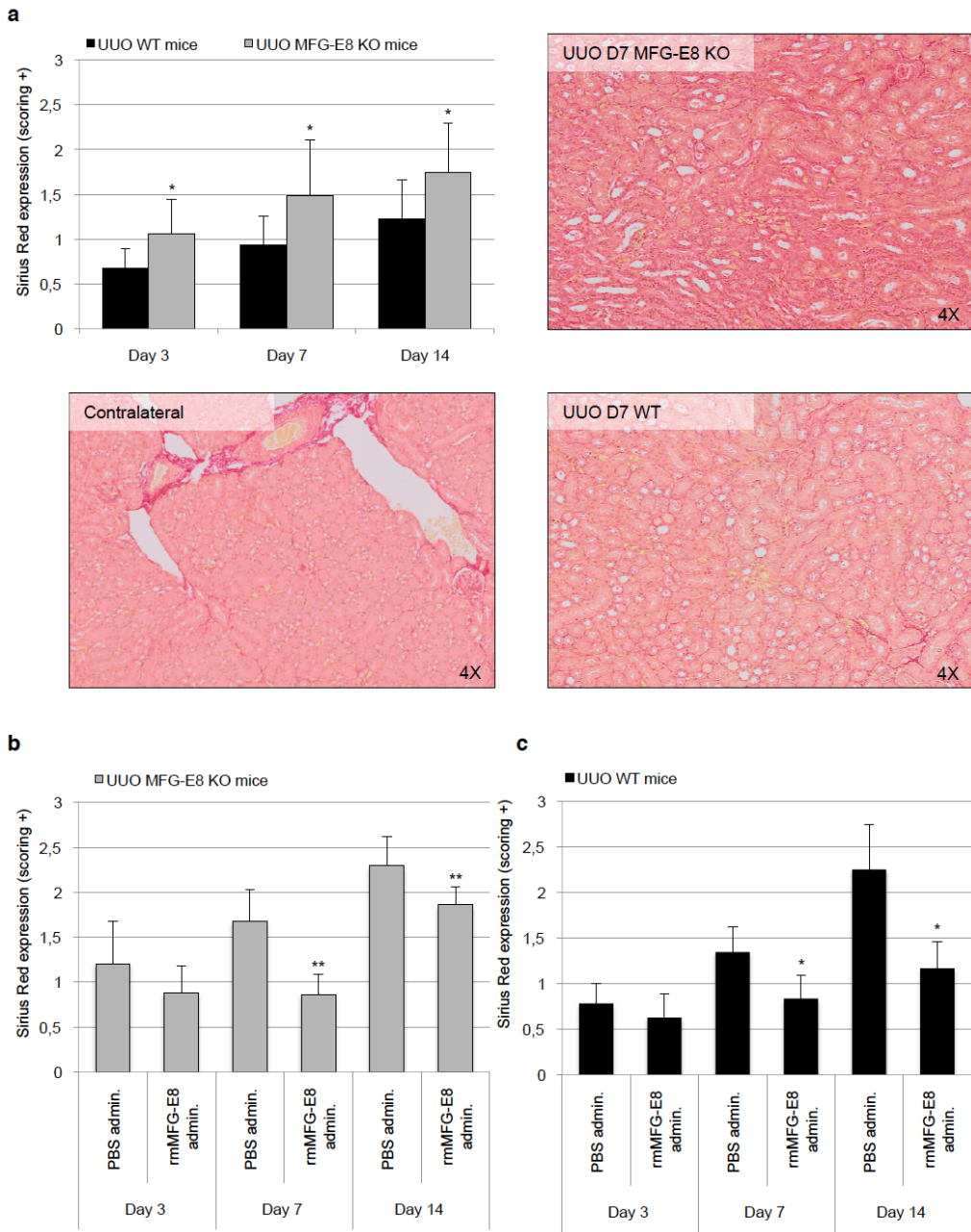
Production of collagen is an essential step following kidney injury. However, this process becomes maladaptive when uncontrolled and can potentially lead to a fibrotic response associated with loss of nephron integrity. We used Sirius Red staining to assess fibrosis severity as a marker of collagen deposition in UUO. In contralateral kidneys, collagen is largely restricted to arteriole walls (Fig 2A, lower left panel), whereas in the obstructed kidneys (Fig 2A, right panels), scattered accumulations of collagen are seen in the medulla as well as in the cortex, and more abundantly in kidneys from MFG-E8 KO mice (Fig 2A, upper right panel). Two blinded independent observers evaluated levels of Sirius Red staining using an arbitrary scale of expression. Medulla restricted staining from low to strong

**Figure 1**



**Figure 1: Evaluation of damage in kidneys after 3, 7 and 14 days of UUO.** (a) Upper left panel: kidney damage, using PAS staining, in MFG-E8 KO mice is increased compared to WT mice. Damage fold increases in MFG-E8 KO mice relative to WT mice are 1.81 (Day 3), 1.88 (Day 7) and 1.40 (Day 14). Upper right panel: representative picture from MFG-E8 KO mice with severe damage. Red box represents an area with tubular necrosis, whereas orange box surrounds a vessel with inflammatory cells infiltrate. Lower right panel: representative picture from WT mice with no necrotic area and less extensive damage. Lower left panel: representative picture of contralateral kidney without damage. Magnification 4X, 10X. (b) Damage evaluation in MFG-E8 KO mice: decreased damage in rmMFG-E8-treated mice compared to PBS-treated mice. Damage fold decreases in rmMFG-E8 administrated mice relative to PBS administrated mice are 2.19 (Day 3), 2.03 (Day 7) and 1.26 (Day 14). (c) Damage evaluation in WT mice: decreased damage in rmMFG-E8-treated mice compared to PBS-treated mice. Damage fold decreases in rmMFG-E8 administrated mice relative to PBS administrated mice are 1.16 (Day 3), 1.53 (Day 7) and 1.50 (Day 14). Results are expressed in scoring + as explained in the text. Average of 2 (c-d) or 3 (a) independent experiments.  $n \geq 8$  mice per group, per time point. Values are mean  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  or \*\* $p < 0,01$  vs. control mice.

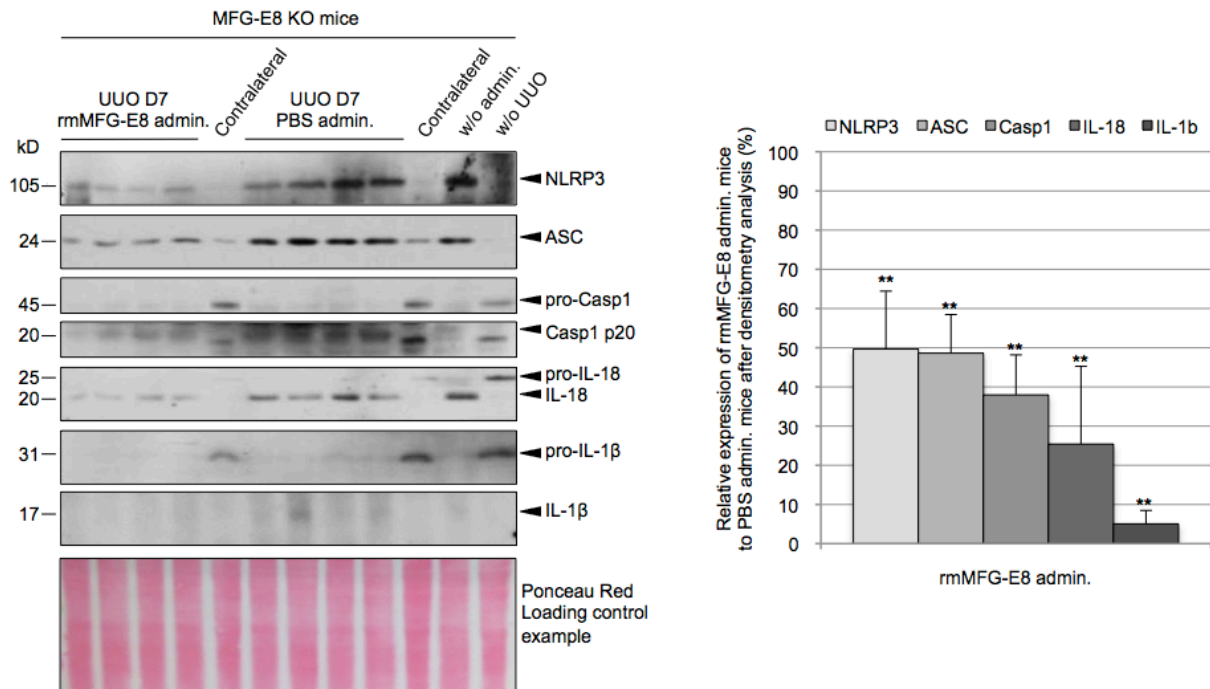
**Figure 2**



**Figure 2: Expression of collagen in kidneys after 3, 7 and 14 days of UUO.** (a) Upper left panel: renal collagen expression, detected with Sirius Red staining, in MFG-E8 KO mice is increased compared to WT mice. Collagen expression fold increases in MFG-E8 KO mice relative to WT mice are 1.55 (Day 3), 1.60 (Day 7) and 1.43 (Day 14). Upper right panel is a representative picture from MFG-E8 KO mice with stronger Sirius Red staining compared to lower right panel, a representative picture from WT mice. Lower left panel showed a representative picture of contralateral kidney without collagen expression. Magnification 4X. (b) Collagen expression in MFG-E8 KO mice: decreased fibrosis in rmMFG-E8-treated mice compared to PBS-treated mice. Collagen expression fold decreases in rmMFG-E8 administrated mice relative to PBS administrated mice are 1.38 (Day 3), 1.95 (Day 7) and 1.24 (Day 14). (c) Collagen expression in WT mice: decreased fibrosis in rmMFG-E8-treated mice compared to PBS-treated mice. Collagen expression fold decreases in rmMFG-E8 administrated mice relative to PBS administrated mice are 1.25 (Day 3), 1.61 (Day 7) and 1.93 (Day 14). Results are expressed in scoring + as explained in the text. Average of 2 (c-d) or 3 (a) independent experiments.  $n \geq 8$  mice per group, per time point. Values are mean  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  or \*\* $p < 0,01$  vs. control mice. Cohen's Kappa coefficients  $> 0,7$ .

is identified as 0,5+ to 1,5+. Addition of a positive staining in the cortex to a strong staining in the medulla is identified as 2+ to 3+. A significant time-dependent increased in the expression of collagen was observed in MFG-E8 KO compared to WT mice for all the evaluated time points (Fig 2A, upper left panel). Here also, intraperitoneal rmMFG-E8 administration was successful in preventing the increased collagen deposition found in the PBS-treated WT mice (Fig 2C). These protective effects with rmMFG-E8 were observed to a lesser extent in MFG-E8 KO mice (Fig 2B). Taken together, these results indicate that MFG-E8, endogenous and/or exogenous, confers a strong protection against renal injury and fibrosis in UUO.

**Figure 3**

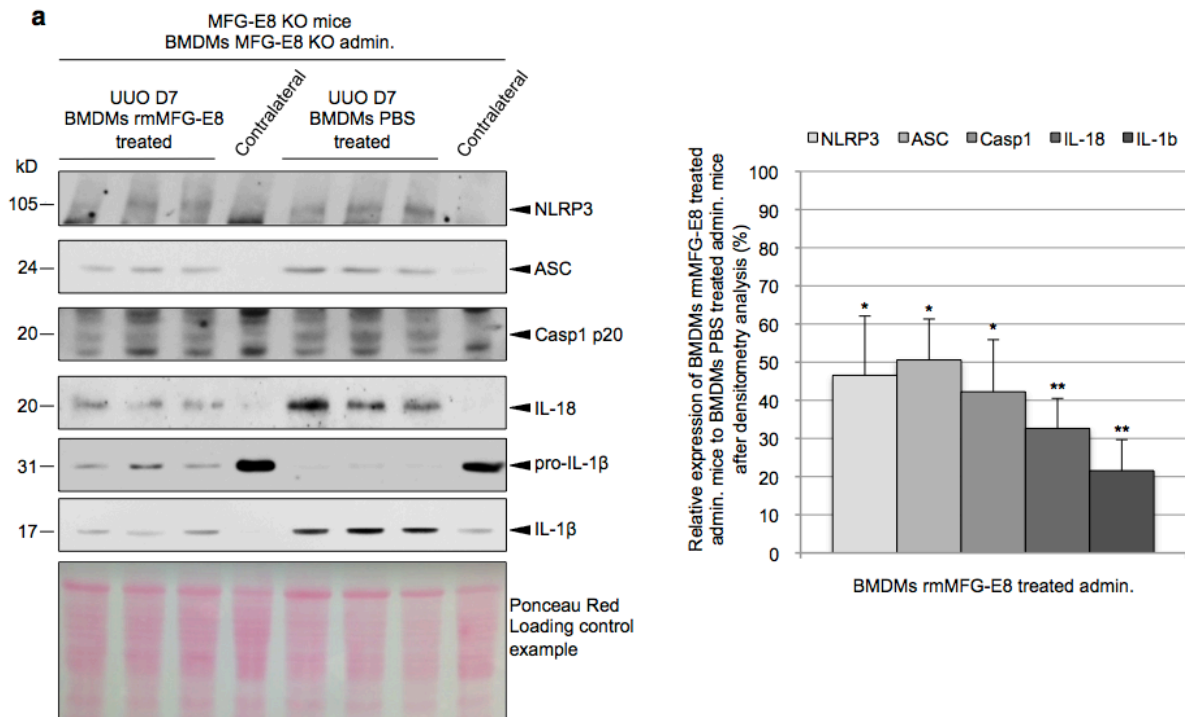


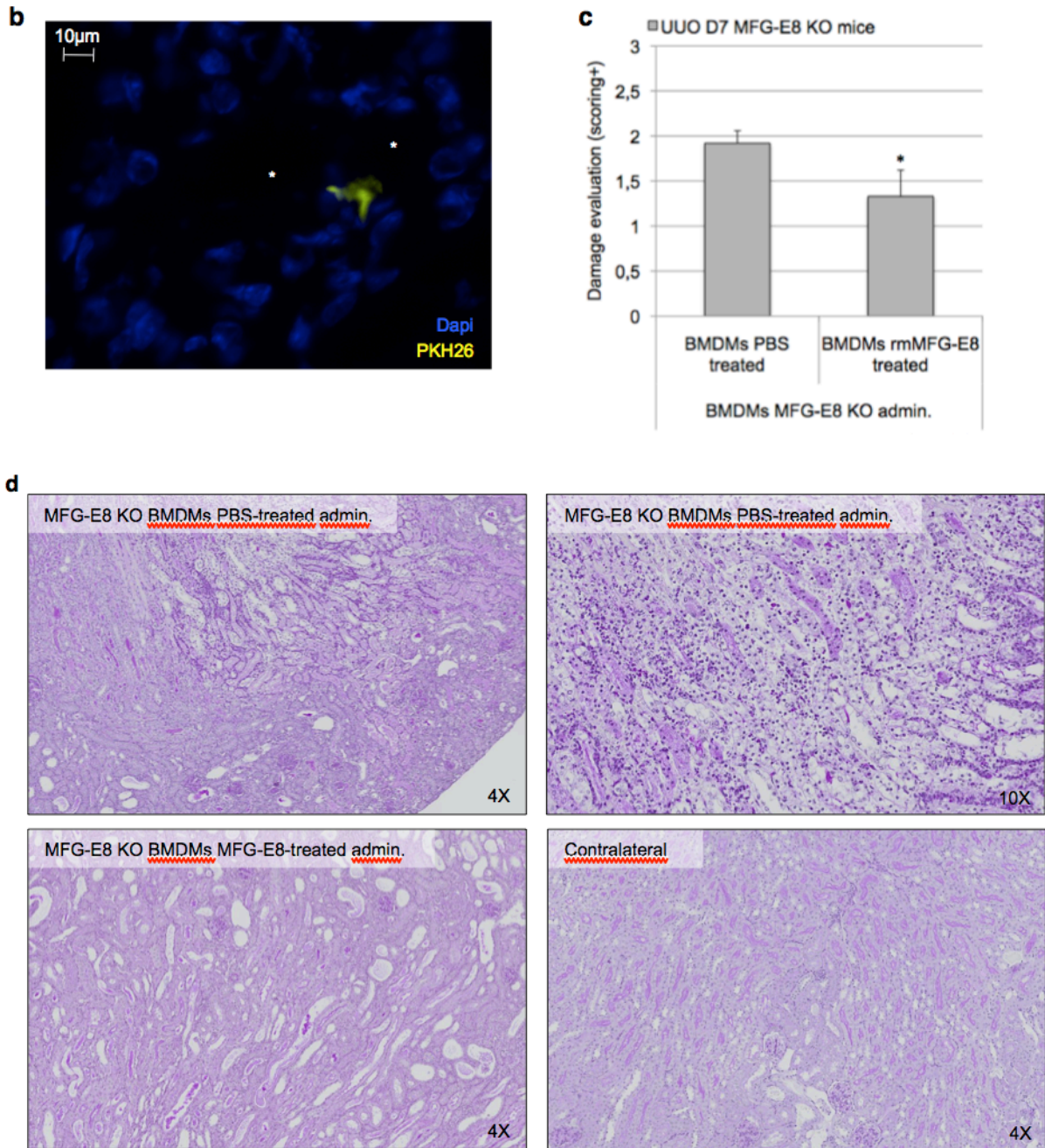
**Figure 3: Inflammation component expression in MFG-E8 KO mice.** Mice subjected to UUO for 7 days were either treated with rmMFG-E8 or PBS. Left panel: NLRP3, ASC, Casp1 p20, IL-18 and IL-1β protein expression was decreased in rmMFG-E8-treated mice compared to PBS-treated mice in total kidney using western blot. Ponceau Red represents the loading control. Right panel: Densitometric analyses were performed using the corresponding Ponceau Red and were significant for all inflammation components. Mice treated with PBS are the control condition set at 100%. n=4 mice per group, W.B. performed in duplicate. Representative of 2 independent experiments. Values are mean ± SD. \*\*p<0,01 vs. control mice.

### MFG-E8 protection in UUO is mediated through inflammasome modulation

In order to explore the molecular mechanisms behind the protective effect of MFG-E8, we examined the role of MFG-E8 in the regulation of innate immune responses, specifically on inflammasome activation, by performing immunoblotting analyses using total kidney protein extracts. We decided to only use MFG-E8 KO mice at day 7 following UUO here, since the protective effects observed with rmMFG-E8 were greater than in WT mice. PAS staining was used to compare and confirm disease severity. Compared to PBS-treated mice, rmMFG-E8-treated mice showed reduced NLRP3 and ASC expression, decreased caspase-1 activation and decreased maturation of IL-18 and, to a lesser extent, IL-1 $\beta$  (Fig 3, left panel). Densitometric analyses were significant for all the components of the inflammasome (Fig 3, right panel). Our data suggest that MFG-E8 contributes to the attenuation of kidney injury through downregulation of NLRP3-dependent inflammasome activation and pro-inflammatory cytokine production.

**Figure 4**





**Figure 4: Inflammasome component expression in MFG-E8 KO mice after adoptive transfer of MFG-E8 KO BMDMs.** Mice subjected to UUO for 7 days were adoptively transferred with either rmMFG-E8-treated BMDMs or PBS-treated BMDMs from MFG-E8 KO mice. (a) Left panel: NLRP3, ASC, Casp1 p20, IL-18 and IL-1 $\beta$  protein expression was decreased in rmMFG-E8-treated BMDMs mice compared to PBS-treated BMDMs mice in total kidney using western blot. Ponceau Red represents the loading control. Right panel: Densitometric analyses were performed using the corresponding Ponceau Red and were significant for all components. Mice adoptively transferred with PBS-treated BMDMs are the control condition set at 100%. n=3 mice per group, W.B. performed in duplicate. Values are mean  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  or \*\* $p < 0,01$  vs. control mice. (b) PKH26 phagocytic cell labeling. Labeled macrophages were found between tubules (identified with asterisks) of obstructed kidney. (c) Kidney injury significant increase in PBS-treated BMDMs administered mice compared to MFG-E8-treated BMDMs administered mice. (d) Representative picture of kidney damage using PAS staining showing extended damage in adoptively transferred PBS-treated BMDMs than rmMFG-E8-treated BMDMs from MFG-E8 KO mice.

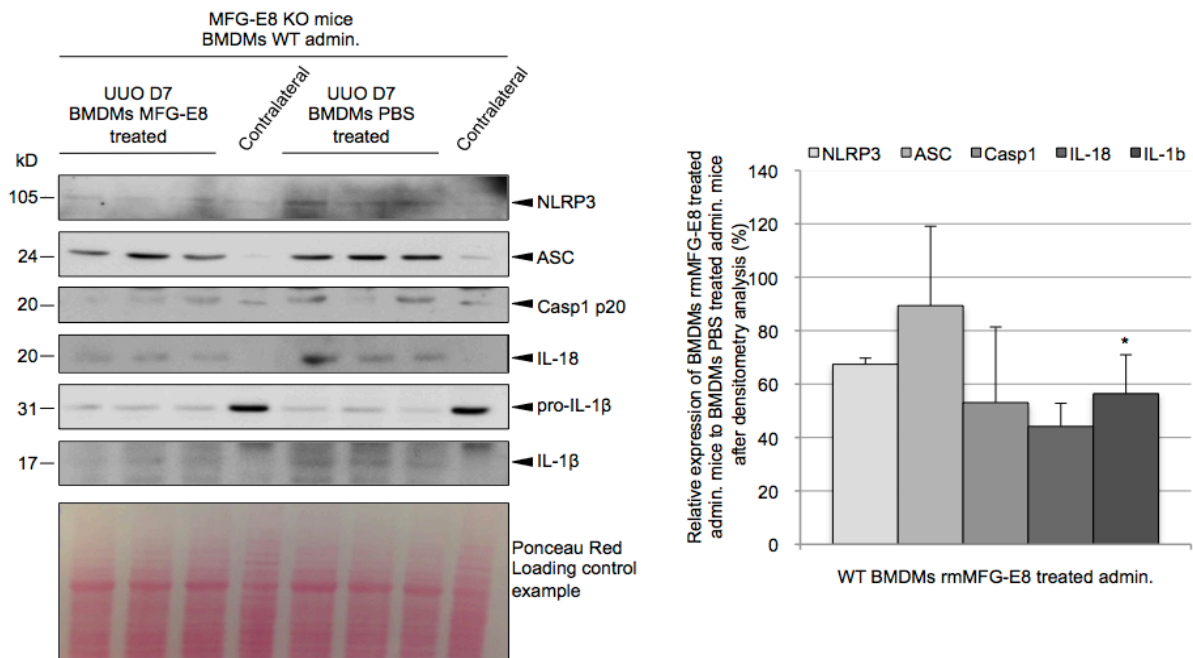
*MFG-E8-dependent programming of macrophages reduces damage and inflammasome activation in obstructed kidneys*

Since MFG-E8 attenuates pro-inflammatory phenotype and promotes anti-inflammatory phenotype of macrophages<sup>27</sup> and that these cells are key players in renal injury, we investigated whether MFG-E8 macrophage reprogramming could confer the same renal protection. In order to do so, we performed adoptive transfer of MFG-E8- or PBS-treated macrophages in our UUO model. MFG-E8- or PBS-treated bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from MFG-E8 KO mice were administrated intraperitoneally prior to ureteral ligation and every 3 days thereafter in MFG-E8 KO mice. Recombinant MFG-E8-treatment of macrophages recapitulated macrophage reprogramming by the MFG-E8 released by apoptotic cells present in the renal microenvironment. MFG-E8- and PBS-treated BMDMs from KO mice showed the same level of inflammasome activation prior to transfer, suggesting that MFG-E8 does not directly modulate NLRP3 activation in macrophages during *ex vivo* treatment (data not shown). Administrated cell localization to the obstructed kidney was confirmed using PKH26 phagocytic cell labeling (Fig 4B). Tracking of labeled macrophages showed positive cells staining between tubules (asterisks in Fig 4B) in the obstructed kidney, but not in contralateral kidney. Again, PAS staining has been used to compare and confirm disease severity among the studied groups (Fig 4D). Kidney injury was significantly increased in PBS-treated BMDMs recipient mice compared to MFG-E8-treated BMDMs recipient mice (Fig 4C). Compared to administration of PBS-treated BMDMs, administration of rmMFG-E8-treated BMDMs in MFG-E8 KO mice reduced NLRP3 and ASC expression, decreased caspase-1 activation and maturation of IL-18 and IL-1 $\beta$  in the obstructed kidney (Fig 4A, left panel). Densitometric analyses were significant for all components of the inflammasome (Fig 4A, right panel). To evaluate the additional contribution of MFG-E8 from macrophages, we then proceeded to adoptive transfer of MFG-E8- or PBS-treated WT BMDMs. For all inflammasome components, same trends of inhibition were observed (Fig 5) but interestingly, to a lesser extent than the level of inhibition obtained using MFG-E8 KO BMDMs (Fig 4). Densitometric analyses were only significant for IL-1 $\beta$  (Fig 5, right panel). It is also correlated with similar reduced level in kidney damage (PAS staining). This suggests that MFG-E8 produced by activated



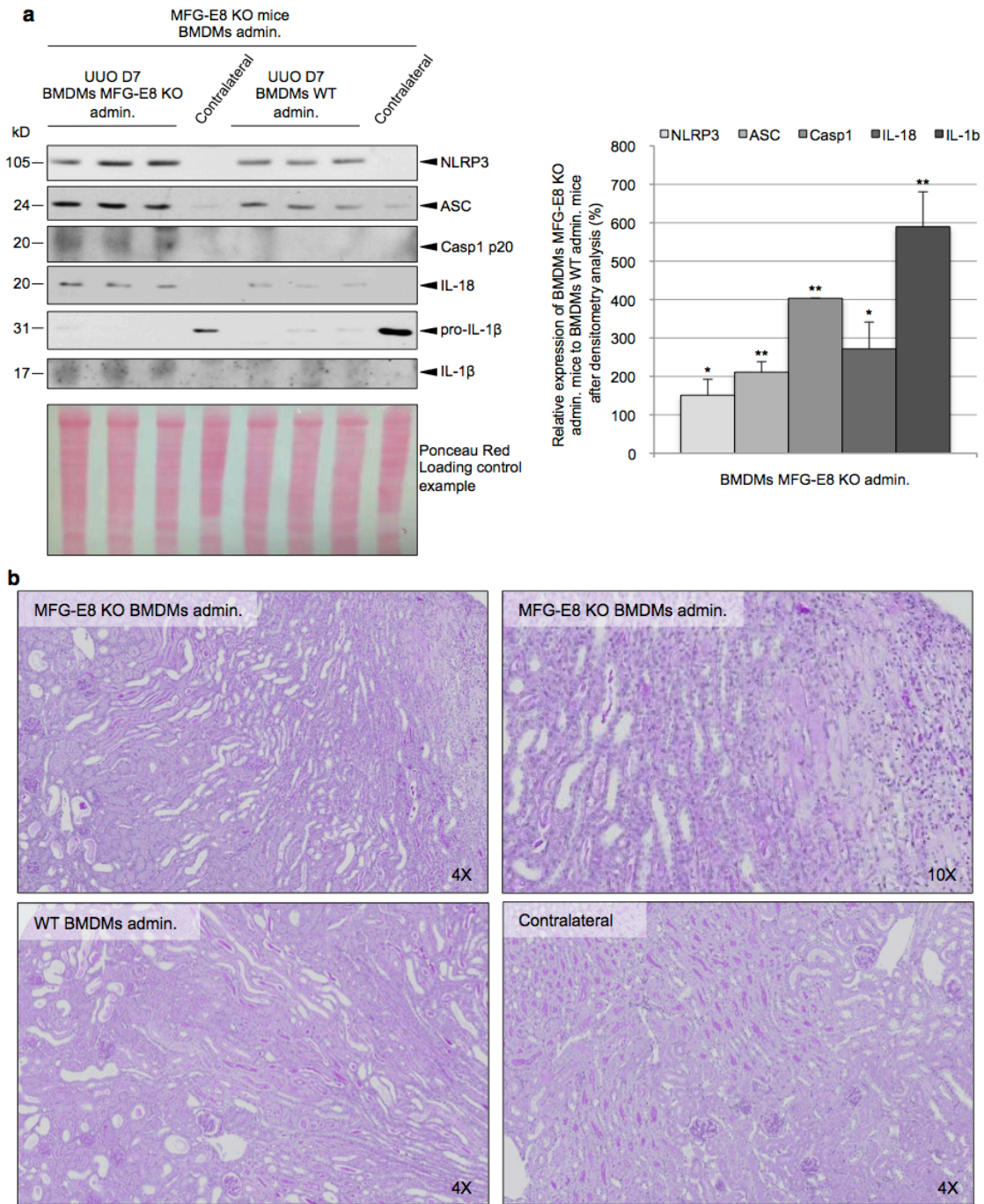
macrophages (WT BMDMs) *per se* generates an anti-inflammatory microenvironment that attenuates the activation of the tissular inflammasome. Thus, to investigate whether endogenous MFG-E8 production from macrophages is sufficient to inhibit inflammasome activation and renal damage in UUO, untreated BMDMs from MFG-E8 KO and WT mice were adoptively transferred into obstructed MFG-E8 KO mice. Administration of WT BMDMs showed reduced NLRP3 and ASC expression, decreased caspase-1 activation and maturation of IL-18 and IL-1 $\beta$  compared to KO BMDMs (Fig 6, left panel). It was also correlated with a decrease in kidney damage (Fig 6B). Densitometric analyses were significant for all components of the inflammasome (Fig 6, right panel). These results suggest that MFG-E8-mediated anti-inflammatory programming of macrophages prevents kidney damage by decreasing inflammasome activation in UUO.

**Figure 5**



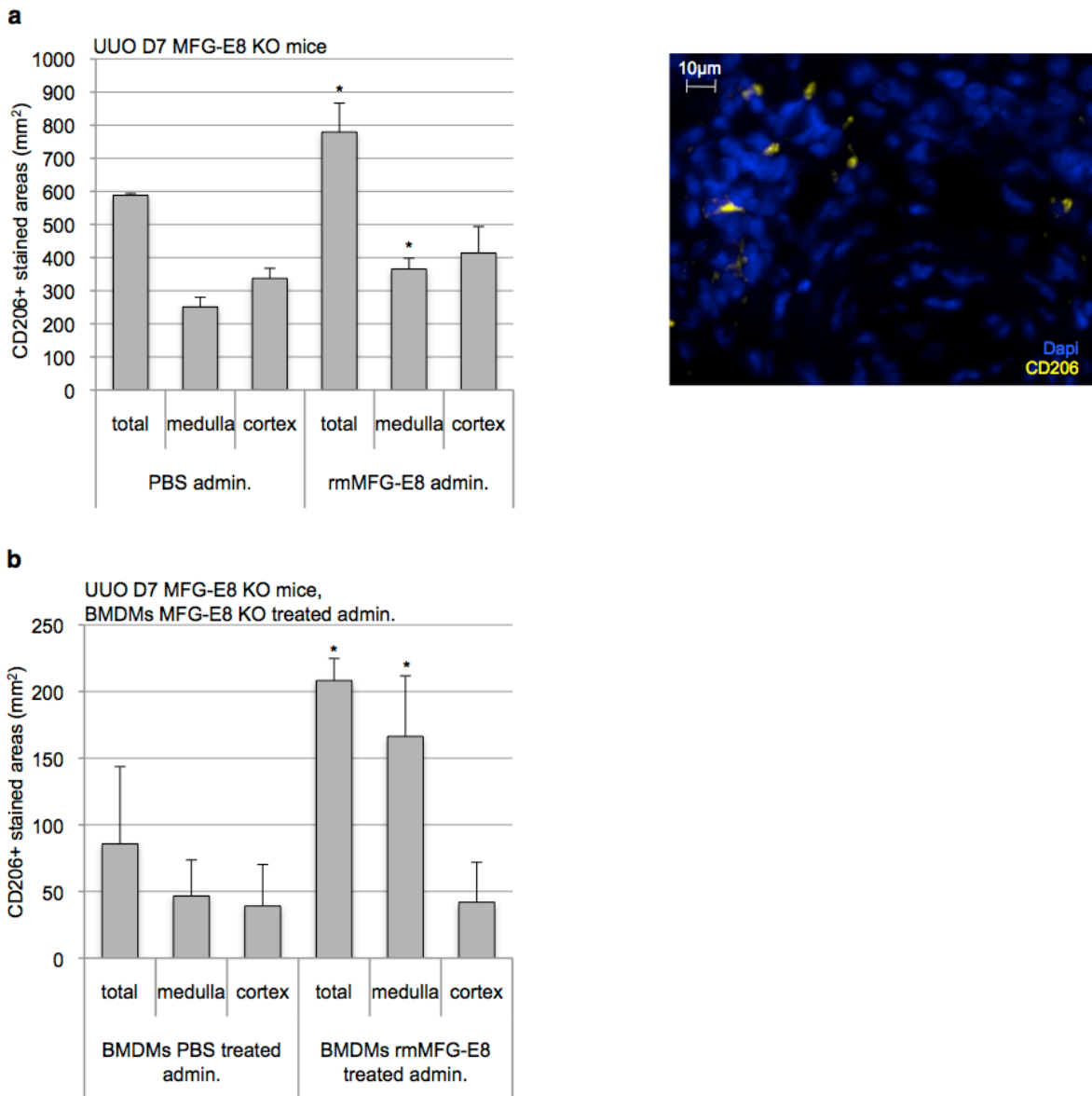
**Figure 5: Inflammasome component expression in MFG-E8 KO mice after adoptive transfer of WT BMDMs.** Mice subjected to UUO for 7 days were adoptively transferred with either rmMFG-E8-treated BMDMs or PBS-treated BMDMs from WT mice. Left panel: Trends for reduction in NLRP3, ASC, Casp1 p20, IL-18 and IL-1 $\beta$  protein expression in rmMFG-E8-treated BMDMs mice compared to PBS-treated BMDMs mice in total kidney using western blot. Ponceau Red represents the loading control. Right panel: Densitometric analyses were performed using the corresponding Ponceau Red demonstrating a significant decrease for IL-1 $\beta$  protein level in rmMFG-E8-treated BMDMs administered mice. Mice adoptively transferred with PBS-treated BMDMs are the control condition set at 100%. n=3 mice per group, W.B. performed in duplicate. Values are mean  $\pm$  SD. \*p<0,05 vs. control mice.

**Figure 6**



**Figure 6: Inflammasome component expression in MFG-E8 KO mice after adoptive transfer of MFG-E8 KO and WT BMDMs.** Mice subjected to UUO for 7 days were adoptively transferred with either MFG-E8 KO or WT BMDMs. Left panel: Strong indication of increased NLRP3, ASC, Casp1 p20, IL-18 and IL-1β protein expression in MFG-E8 KO BMDMs-treated mice compared to WT BMDMs-treated mice in total kidney using western blot. Ponceau Red represents the loading control. Right panel: Densitometric analyses were performed using the corresponding Ponceau Red and were significant for all components. Mice adoptively transferred with WT BMDMs are the control condition set at 100%. n=3 mice per group, performed in duplicate. Values are mean ± SD. \*p<0,05 or \*\*p<0,01 vs. control mice. (b) Representative picture of kidney damage using PAS staining showing extended damage in adoptively transferred MFG-E8 KO BMDMs than WT BMDMs from MFG-E8 KO mice.

**Figure 7**



**Figure 7: CD206 expression in the obstructed kidney of MFG-E8 KO mice.** (a) *In vitro* MFG-E8 treatment of BMDMs increased CD206 expression in macrophages. Left panel: Increased CD206 expression in MFG-E8-treated mice compared to PBS-treated mice. Significant results obtained for medulla area. Right panel: Example of CD206 positive staining in an obstructed kidney of MFG-E8-treated mice. (b) Mice subjected to UUO for 7 days were adoptively transferred with MFG-E8 KO BMDMs either MFG-E8-treated or PBS-treated. Increased CD206 expression in MFG-E8-treated BMDMs administrated mice compared to PBS-treated BMDMs administrated mice. Significant results obtained for medulla area. n=3 mice per group. Values are mean  $\pm$  SD. \*p<0,05 vs. control mice.

*MFG-E8 promotes CD206 anti-inflammatory macrophage phenotype in obstructed kidneys*

We previously showed MFG-E8 promotes an anti-inflammatory macrophage phenotype<sup>27</sup> and confirmed that *in vitro* MFG-E8 treatment of BMDMs increased CD206 expression in macrophages, a M2 anti-inflammatory macrophage marker (data not shown). We then went on to investigate if the protective effect conferred by MFG-E8 in our UUO model occurs through the promotion of anti-inflammatory macrophage reprogramming. Obstructed kidneys from rmMFG-E8-treated and PBS-treated MFG-E8 KO mice were stained with CD206 (Fig 7A, right panel). Compared to PBS-treated mice, rmMFG-E8-treated mice had more CD206+ cells, as assessed by surface evaluation. Specifically, significant differences have been observed between medullas whereas no significant difference has been observed between cortices (Fig 7A, left panel). Moreover, administration of MFG-E8-treated BMDMs compared to PBS-treated BMDMs also induced an increase in CD206+ staining. Here again, significant difference was only obtained between medullas (Fig 7B). Altogether, these results suggest that MFG-E8 induces a microenvironment promoting the anti-inflammatory programming of macrophages that attenuates renal injury.

## Discussion

We published that MFG-E8 stimulation induced an anti-inflammatory macrophage phenotype.<sup>27</sup> Here, we have identified MFG-E8 as a promoter of anti-inflammatory reprogramming of macrophages that attenuates tissue injury. We showed that both administration of exogenous MFG-E8 and the presence of endogenous MFG-E8 reduced renal injury in association with a reduction of inflammasome activation. Increased anti-inflammatory CD206+ phagocytes were found with MFG-E8 administration in MFG-E8 KO mice. Furthermore, adoptive transfer of MFG-E8-treated macrophages was able to recapitulate all the findings; reduced injury, attenuated inflammasome activation and increased numbers of CD206+ phagocytes.

Our findings suggested that local MFG-E8 plays an important role in modulation of the renal injury and macrophage reprogramming. Inflammatory microenvironments play a crucial role in the modulation of cells phenotype and final outcome depends on a fine-tuning balance of pro- and anti-inflammatory mediators conditioning these microenvironments. These microenvironmental signals have reprogramming consequences on macrophages, either pro-inflammatory or anti-inflammatory. In order to reduce renal injury, understanding the local cues that are responsible of attenuating the tissue damaging cells is crucial to prevent renal fibrosis. Current studies have delineated the macrophage phenotype spectrum from its role in the promotion of kidney injury (called macrophage M1) to resolution and renal repair (called macrophage M2).<sup>44-49</sup> The involvement of mononuclear inflammatory cells in damaged renal interstitium is a universal finding in failing kidneys, correlating inversely with renal function.<sup>9,50-52</sup> Monocytes and macrophages are known to play a crucial role in the early phases of inflammation in the kidney, where they promote tubular apoptosis and renal fibrosis development.<sup>9,49</sup> However, macrophages play an important role in both phases of the inflammatory process, i.e. initiation and resolution.<sup>53</sup> As literature linking macrophage activation to inflammatory kidney diseases emerged, regulatory proteins controlling macrophage activation have become lately of high interest. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) has been described to influence macrophages toward a reparative state, leading to renal repair with interstitial fibrosis attenuation and functional recovery.<sup>54</sup> Its

signaling inhibition has shown blocked macrophages proliferation, decreased M2 polarization and inhibited recovery in acute kidney injury (AKI).<sup>55</sup> GM-CSF has been recently reported to be released by tubular epithelial cells to play an important role in M2 macrophage reprogramming and tissue repair after ischemic injury, similarly to what was found with netrin-1.<sup>56,57</sup> Mesenchymal stem cells have been shown to induce M2 macrophages protecting mice from AKI renal.<sup>58</sup> These observations highlight the role of renal microenvironment and MFG-E8 in the modulation of macrophage phenotypes acting as analarmin, opposing the alarmins present in the renal environment.

MFG-E8 appears to be beneficial in UUO. However, the exact role of MFG-E8 in other kidney diseases is unclear. A recent study identified that up-regulation of MFG-E8 in diabetic kidney may aggravate diabetic renal injury, whereas MFG-E8 silencing using shRNA accentuated renal damage in kidneys of db/db mice, a model of type 2 diabetes.<sup>59</sup> However, in a renal ischemia-reperfusion (I/R) model, treatment with rmMFG-E8 after I/R injury attenuated renal tubular injury and renal edema.<sup>60</sup> MFG-E8 protective effect, in this case, appeared to be mediated through the enhancement of apoptotic cell clearance and improvement of capillary functions in the kidneys. Moreover, MFG-E8 attenuated intestinal inflammation in a murine experimental colitis model by modulating osteopontin-dependent  $\alpha\beta3$  integrin (MFG-E8 receptor on macrophages) signaling, leading to reduced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  cytokine production.<sup>36</sup> MFG-E8 also attenuated neutrophil recruitment and infiltration.<sup>37</sup> This highlights the complex role of MFG-E8 in renal diseases and confirms its importance as a modulator of inflammatory signaling.

We found that reduced tissue injury was associated with an attenuated NLRP3 inflammasome activation. It was previously published that MFG-E8 can inhibit macrophage inflammasome activation and tissular cytokine levels in a cerebral inflammation model, however total inflammasome levels were not looked at.<sup>38</sup> The NLRP3 inflammasome has been implicated in the pathogenesis of various non-microbial diseases and recent data now suggest its involvement in kidney diseases.<sup>2</sup> Additionally, a positive correlation between increased creatinine level and NLRP3 expression has been reported in renal patients, suggesting its importance in clinical nephrology.<sup>3</sup> Inflammasome has a complex and important role in inflammation and tissue repair. Its activation has benefits for control of

infections, but it can also drive fibrosis if unregulated.<sup>61-66</sup> There are evidences that both IL-1 $\beta$  and IL-18, end-products of inflammasome activation, are potent pro-fibrogenic cytokines.<sup>67-75</sup> In the kidney, the cell type-specific expression of NLRP3 inflammasome components has not been fully characterized. Interstitial fibrosis in UUO depends on NLRP3 expression in immune and non-immune cells.<sup>3</sup> A recent report also suggests that non-immune renal parenchymal cells do not release IL-1 $\beta$ <sup>76</sup>, whereas tubular epithelial cells release IL-18.<sup>77</sup> In a UUO model, IL-18 neutralization prevents renal injury and fibrosis in mice.<sup>78</sup> Interestingly, depletion of macrophages did not alter IL-18 cytokine level in kidney after UUO, suggesting that IL-18 release is macrophage-independent.<sup>79</sup> In our work, using MFG-E8, we have shown decreased IL-1 $\beta$  and IL-18 levels, suggesting reduction of both immune and non-immune inflammasome activation. These observations were associated with an increased presence of an anti-inflammatory CD206+ phagocytes.

Therefore, we propose that the protective role of MFG-E8 on renal inflammasome signaling occurs through the generation of a favorable microenvironment, consequence to the anti-inflammatory macrophage reprogramming. A greater understanding of the physiological and cellular effects of MFG-E8 on inflammatory response as seen in renal injuries could lead to new therapeutic approaches preventing progressive renal fibrosis and promoting adequate renal repair.

## **Acknowledgements**

We would like to thank H. Cardinal for guidance with statistical analysis and M-C Therrien for technical assistance in surgical procedures. We acknowledge the Montreal Cancer Institute IHC Core (I. Clément, V. Barrès and L.Meunier) for assistance with imaging analysis and Kathe Lieber for manuscript proofing. MJB is a recipient of Canderel and National Assembly scholarships and JFC is a FRSQ scholar Jr2. This work has been funded by Kidney Foundation of Canada and the ICM.



## References

1. Tolle, L. B., and T. J. Standiford. 2013. Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. *The Journal of pathology* 229: 145-156.
2. Rathinam, V. A., S. K. Vanaja, and K. A. Fitzgerald. 2012. Regulation of inflammasome signaling. *Nature immunology* 13: 333-342.
3. Vilaysane, A., J. Chun, M. E. Seamone, W. Wang, R. Chin, S. Hirota, Y. Li, S. A. Clark, J. Tschopp, K. Trpkov, B. R. Hemmelgarn, P. L. Beck, and D. A. Muruve. 2010. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21: 1732-1744.
4. Li, H., A. Ambade, and F. Re. 2009. Cutting edge: Necrosis activates the NLRP3 inflammasome. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183: 1528-1532.
5. Goncalves, R. G., L. Gabrich, A. Rosario, Jr., C. M. Takiya, M. L. Ferreira, L. B. Chiarini, P. M. Persechini, R. Coutinho-Silva, and M. Leite, Jr. 2006. The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney international* 70: 1599-1606.
6. Dendooven, A., D. A. Ishola, Jr., T. Q. Nguyen, D. M. Van der Giezen, R. J. Kok, R. Goldschmeding, and J. A. Joles. 2011. Oxidative stress in obstructive nephropathy. *International journal of experimental pathology* 92: 202-210.
7. Forbes, M. S., B. A. Thornhill, J. J. Minor, K. A. Gordon, C. I. Galarreta, and R. L. Chevalier. 2012. Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis. *American journal of physiology. Renal physiology* 303: F120-129.
8. Schreiner, G. F., K. P. Harris, M. L. Purkerson, and S. Klahr. 1988. Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney. *Kidney international* 34: 487-493.
9. Kitamoto, K., Y. Machida, J. Uchida, Y. Izumi, M. Shiota, T. Nakao, H. Iwao, T. Yukimura, T. Nakatani, and K. Miura. 2009. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *Journal of pharmacological sciences* 111: 285-292.
10. Sean Eardley, K., and P. Cockwell. 2005. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney international* 68: 437-455.
11. Le Meur, Y., G. H. Tesch, P. A. Hill, W. Mu, R. Foti, D. J. Nikolic-Paterson, and R. C. Atkins. 2002. Macrophage accumulation at a site of renal inflammation is dependent on the M-CSF/c-fms pathway. *Journal of leukocyte biology* 72: 530-537.
12. Liu, L., P. Kou, Q. Zeng, G. Pei, Y. Li, H. Liang, G. Xu, and S. Chen. 2012. CD4+ T Lymphocytes, especially Th2 cells, contribute to the progress of renal fibrosis. *American journal of nephrology* 36: 386-396.
13. Snelgrove, S. L., J. Y. Kausman, C. Lo, C. Lo, J. D. Ooi, P. T. Coates, M. J. Hickey, S. R. Holdsworth, C. Kurts, D. R. Engel, and A. R. Kitching. 2012. Renal dendritic cells adopt a pro-inflammatory phenotype in obstructive uropathy to activate T cells but do not directly contribute to fibrosis. *The American journal of pathology* 180: 91-103.
14. Misseri, R., D. R. Meldrum, C. A. Dinarello, P. Dagher, K. L. Hile, R. C. Rink, and K. K. Meldrum. 2005. TNF-alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling. *American journal of physiology. Renal physiology* 288: F406-411.
15. Lenda, D. M., E. Kikawada, E. R. Stanley, and V. R. Kelley. 2003. Reduced macrophage recruitment, proliferation, and activation in colony-stimulating factor-1-deficient mice results in decreased tubular apoptosis during renal inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170: 3254-3262.
16. Miyajima, A., J. Chen, D. P. Poppas, E. D. Vaughan, Jr., and D. Felsen. 2001. Role of nitric oxide in renal tubular apoptosis of unilateral ureteral obstruction. *Kidney international* 59: 1290-1303.
17. Chevalier, R. L., M. S. Forbes, and B. A. Thornhill. 2009. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney international* 75: 1145-1152.
18. Eddy, A. A., J. M. Lopez-Guisa, D. M. Okamura, and I. Yamaguchi. 2012. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 27: 1233-1247.
19. Iwano, M., D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada, and E. G. Neilson. 2002. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 110: 341-350.

20. Zeisberg, E. M., S. E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg, and R. Kalluri. 2008. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19: 2282-2287.
21. Lin, S. L., T. Kisseleva, D. A. Brenner, and J. S. Duffield. 2008. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *The American journal of pathology* 173: 1617-1627.
22. Humphreys, B. D., S. L. Lin, A. Kobayashi, T. E. Hudson, B. T. Nowlin, J. V. Bonventre, M. T. Valerius, A. P. McMahon, and J. S. Duffield. 2010. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology* 176: 85-97.
23. Sakai, N., T. Wada, K. Matsushima, R. Bucala, M. Iwai, M. Horiuchi, and S. Kaneko. 2008. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *Journal of hypertension* 26: 780-790.
24. Mackensen-Haen, S., R. Bader, K. E. Grund, and A. Bohle. 1981. Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate. *Clinical nephrology* 15: 167-171.
25. Docherty, N. G., O. E. O'Sullivan, D. A. Healy, J. M. Fitzpatrick, and R. W. Watson. 2006. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *American journal of physiology. Renal physiology* 290: F4-13.
26. Truong, L. D., Y. J. Choi, C. C. Tsao, G. Ayala, D. Sheikh-Hamad, G. Nassar, and W. N. Suki. 2001. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases. *Kidney international* 60: 924-934.
27. Brissette, M. J., S. Lepage, A. S. Lamonde, I. Sirois, J. Groleau, L. P. Laurin, and J. F. Cailhier. 2012. MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming. *PLoS one* 7: e36368.
28. Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miwa, A. Shinohara, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 2002. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417: 182-187.
29. Miyasaka, K., R. Hanayama, M. Tanaka, and S. Nagata. 2004. Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. *European journal of immunology* 34: 1414-1422.
30. Akakura, S., S. Singh, M. Spataro, R. Akakura, J. I. Kim, M. L. Albert, and R. B. Birge. 2004. The opsonin MFG-E8 is a ligand for the alphavbeta5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Experimental cell research* 292: 403-416.
31. Kranich, J., N. J. Krautler, E. Heinen, M. Polymenidou, C. Bridel, A. Schildknecht, C. Huber, M. H. Kosco-Vilbois, R. Zinkernagel, G. Miele, and A. Aguzzi. 2008. Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. *The Journal of experimental medicine* 205: 1293-1302.
32. Baghdadi, M., S. Chiba, T. Yamashina, H. Yoshiyama, and M. Jinushi. 2012. MFG-E8 regulates the immunogenic potential of dendritic cells primed with necrotic cell-mediated inflammatory signals. *PLoS one* 7: e39607.
33. Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama, and S. Nagata. 2004. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)* 304: 1147-1150.
34. Peng, Y., and K. B. Elkon. 2011. Autoimmunity in MFG-E8-deficient mice is associated with altered trafficking and enhanced cross-presentation of apoptotic cell antigens. *The Journal of clinical investigation* 121: 2221-2241.
35. Friggeri, A., Y. Yang, S. Banerjee, Y. J. Park, G. Liu, and E. Abraham. 2010. HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the alphavbeta3-integrin. *American journal of physiology. Cell physiology* 299: C1267-1276.
36. Aziz, M. M., S. Ishihara, Y. Mishima, N. Oshima, I. Moriyama, T. Yuki, Y. Kadowaki, M. A. Rumi, Y. Amano, and Y. Kinoshita. 2009. MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182: 7222-7232.
37. Aziz, M., A. Matsuda, W. L. Yang, A. Jacob, and P. Wang. 2012. Milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 attenuates neutrophil infiltration in acute lung injury via modulation of CXCR2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189: 393-402.
38. Deroide, N., X. Li, D. Lerouet, E. Van Vre, L. Baker, J. Harrison, M. Poittevin, L. Masters, L. Nih, I. Margaille, Y. Iwakura, B. Ryffel, M. Pocard, A. Tedgui, N. Kubis, and Z. Mallat. 2013. MFG-E8 inhibits

- inflammasome-induced IL-1 $\beta$  production and limits postischemic cerebral injury. *The Journal of clinical investigation* 123: 1176-1181.
39. Liu, F., Q. Hu, B. Li, A. Manaenko, Y. Chen, J. Tang, Z. Guo, J. Tang, and J. H. Zhang. 2014. Recombinant milk fat globule-EGF factor-8 reduces oxidative stress via integrin  $\beta$ 3/nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 45: 3691-3697.
  40. Uchiyama, A., K. Yamada, B. Perera, S. Ogino, Y. Yokoyama, Y. Takeuchi, O. Ishikawa, and S. Motegi. 2014. Protective Effect of MFG-E8 after Cutaneous Ischemia-Reperfusion Injury. *The Journal of investigative dermatology*.
  41. Aziz, M., A. Jacob, A. Matsuda, R. Wu, M. Zhou, W. Dong, W. L. Yang, and P. Wang. 2011. Pre-treatment of recombinant mouse MFG-E8 downregulates LPS-induced TNF- $\alpha$  production in macrophages via STAT3-mediated SOCS3 activation. *PloS one* 6: e27685.
  42. Kipari, T., J. F. Cailhier, D. Ferenbach, S. Watson, K. Houlberg, D. Walbaum, S. Clay, J. Savill, and J. Hughes. 2006. Nitric oxide is an important mediator of renal tubular epithelial cell death in vitro and in murine experimental hydronephrosis. *The American journal of pathology* 169: 388-399.
  43. Hironaka, K., I. Sakaida, K. Uchida, and K. Okita. 2000. Correlation between stellate cell activation and serum fibrosis markers in choline-deficient L-amino acid-defined diet-induced rat liver fibrosis. *Digestive diseases and sciences* 45: 1935-1943.
  44. Braga, T. T., M. Correa-Costa, Y. F. Guise, A. Castoldi, C. D. de Oliveira, M. I. Hyane, M. A. Cenedeze, S. A. Teixeira, M. N. Muscara, K. R. Perez, I. M. Cuccovia, A. Pacheco-Silva, G. M. Goncalves, and N. O. Camara. 2012. MyD88 signaling pathway is involved in renal fibrosis by favoring a TH2 immune response and activating alternative M2 macrophages. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 18: 1231-1239.
  45. Mantovani, A., S. K. Biswas, M. R. Galdiero, A. Sica, and M. Locati. 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* 229: 176-185.
  46. Lopez-Guisa, J. M., X. Cai, S. J. Collins, I. Yamaguchi, D. M. Okamura, T. H. Bugge, C. M. Isacke, C. L. Emson, S. M. Turner, S. J. Shankland, and A. A. Eddy. 2012. Mannose receptor 2 attenuates renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23: 236-251.
  47. Kushiyama, T., T. Oda, M. Yamada, K. Higashi, K. Yamamoto, Y. Sakurai, S. Miura, and H. Kumagai. 2011. Alteration in the phenotype of macrophages in the repair of renal interstitial fibrosis in mice. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 16: 522-535.
  48. Wang, Y., Y. P. Wang, G. Zheng, V. W. Lee, L. Ouyang, D. H. Chang, D. Mahajan, J. Coombs, Y. M. Wang, S. I. Alexander, and D. C. Harris. 2007. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney international* 72: 290-299.
  49. Lee, S., S. Huen, H. Nishio, S. Nishio, H. K. Lee, B. S. Choi, C. Ruhrberg, and L. G. Cantley. 2011. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22: 317-326.
  50. Sung, S. A., S. K. Jo, W. Y. Cho, N. H. Won, and H. K. Kim. 2007. Reduction of renal fibrosis as a result of liposome encapsulated clodronate induced macrophage depletion after unilateral ureteral obstruction in rats. *Nephron. Experimental nephrology* 105: e1-9.
  51. Shen, B., X. Liu, Y. Fan, and J. Qiu. 2014. Macrophages Regulate Renal Fibrosis Through Modulating TGF $\beta$  Superfamily Signaling. *Inflammation*.
  52. Duffield, J. S., P. G. Tipping, T. Kipari, J. F. Cailhier, S. Clay, R. Lang, J. V. Bonventre, and J. Hughes. 2005. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. *The American journal of pathology* 167: 1207-1219.
  53. Duffield, J. S., S. J. Forbes, C. M. Constantinou, S. Clay, M. Partolina, S. Vuthoori, S. Wu, R. Lang, and J. P. Iredale. 2005. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *The Journal of clinical investigation* 115: 56-65.
  54. Alikhan, M. A., C. V. Jones, T. M. Williams, A. G. Beckhouse, A. L. Fletcher, M. M. Kett, S. Sakkal, C. S. Samuel, R. G. Ramsay, J. A. Deane, C. A. Wells, M. H. Little, D. A. Hume, and S. D. Ricardo. 2011. Colony-stimulating factor-1 promotes kidney growth and repair via alteration of macrophage responses. *The American journal of pathology* 179: 1243-1256.
  55. Zhang, M. Z., B. Yao, S. Yang, L. Jiang, S. Wang, X. Fan, H. Yin, K. Wong, T. Miyazawa, J. Chen, I. Chang, A. Singh, and R. C. Harris. 2012. CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation* 122: 4519-4532.

56. Huen, S. C., L. Huynh, A. Marlier, Y. Lee, G. W. Moeckel, and L. G. Cantley. 2014. GM-CSF Promotes Macrophage Alternative Activation after Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*.
57. Ranganathan, P. V., C. Jayakumar, and G. Ramesh. 2013. Netrin-1-treated macrophages protect the kidney against ischemia-reperfusion injury and suppress inflammation by inducing M2 polarization. *American journal of physiology. Renal physiology* 304: F948-957.
58. Geng, Y., L. Zhang, B. Fu, J. Zhang, Q. Hong, J. Hu, D. Li, C. Luo, S. Cui, F. Zhu, and X. Chen. 2014. Mesenchymal stem cells ameliorate rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via the activation of M2 macrophages. *Stem cell research & therapy* 5: 80.
59. Zhang, Z., B. Y. Li, X. L. Li, M. Cheng, F. Yu, W. D. Lu, Q. Cai, J. F. Wang, R. H. Zhou, H. Q. Gao, and L. Shen. 2013. Proteomic analysis of kidney and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice indicate MFG-E8 as a key molecule in the development of diabetic nephropathy. *Biochimica et biophysica acta* 1832: 805-816.
60. Matsuda, A., R. Wu, A. Jacob, H. Komura, M. Zhou, Z. Wang, M. M. Aziz, and P. Wang. 2011. Protective effect of milk fat globule-epidermal growth factor-factor VIII after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Critical care medicine* 39: 2039-2047.
61. Youm, Y. H., A. Adijiang, B. Vandanmagsar, D. Burk, A. Ravussin, and V. D. Dixit. 2011. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology* 152: 4039-4045.
62. Gasse, P., N. Riteau, S. Charron, S. Girre, L. Fick, V. Petrilli, J. Tschopp, V. Lagente, V. F. Quesniaux, B. Ryffel, and I. Couillin. 2009. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179: 903-913.
63. Watanabe, A., M. A. Sohail, D. A. Gomes, A. Hashmi, J. Nagata, F. S. Sutterwala, S. Mahmood, M. N. Jhandier, Y. Shi, R. A. Flavell, and W. Z. Mehal. 2009. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296: G1248-1257.
64. Gieling, R. G., K. Wallace, and Y. P. Han. 2009. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296: G1324-1331.
65. Artlett, C. M., S. Sassi-Gaha, J. L. Rieger, A. C. Boesteanu, C. A. Feghali-Bostwick, and P. D. Katsikis. 2011. The inflammasome activating caspase 1 mediates fibrosis and myofibroblast differentiation in systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 63: 3563-3574.
66. Kawaguchi, M., M. Takahashi, T. Hata, Y. Kashima, F. Usui, H. Morimoto, A. Izawa, Y. Takahashi, J. Masumoto, J. Koyama, M. Hongo, T. Noda, J. Nakayama, J. Sagara, S. Taniguchi, and U. Ikeda. 2011. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 123: 594-604.
67. Postlethwaite, A. E., R. Raghov, G. P. Stricklin, H. Poppleton, J. M. Seyer, and A. H. Kang. 1988. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *The Journal of cell biology* 106: 311-318.
68. Luo, D. D., C. Fielding, A. Phillips, and D. Fraser. 2009. Interleukin-1 beta regulates proximal tubular cell transforming growth factor beta-1 signalling. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24: 2655-2665.
69. Vesey, D. A., C. W. Cheung, L. Cuttle, Z. A. Endre, G. Gobe, and D. W. Johnson. 2002. Interleukin-1beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney international* 62: 31-40.
70. Jones, L. K., K. M. O'Sullivan, T. Semple, M. P. Kuligowski, K. Fukami, F. Y. Ma, D. J. Nikolic-Paterson, S. R. Holdsworth, and A. R. Kitching. 2009. IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24: 3024-3032.
71. Platis, A., Q. Yu, D. Moore, E. Khojeini, P. Tsau, and D. Larson. 2008. The effect of daily administration of IL-18 on cardiac structure and function. *Perfusion* 23: 237-242.
72. Xing, S. S., H. W. Tan, X. P. Bi, M. Zhong, Y. Zhang, and W. Zhang. 2008. Felodipine reduces cardiac expression of IL-18 and perivascular fibrosis in fructose-fed rats. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 14: 395-402.

73. Fix, C., K. Bingham, and W. Carver. 2011. Effects of interleukin-18 on cardiac fibroblast function and gene expression. *Cytokine* 53: 19-28.
74. Yu, Q., R. Vazquez, E. V. Khojeini, C. Patel, R. Venkataramani, and D. F. Larson. 2009. IL-18 induction of osteopontin mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 297: H76-85.
75. Liang, D., H. F. Liu, C. W. Yao, H. Y. Liu, C. M. Huang-Fu, X. W. Chen, S. H. Du, and X. W. Chen. 2007. Effects of interleukin 18 on injury and activation of human proximal tubular epithelial cells. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 12: 53-61.
76. Lichtnekert, J., O. P. Kulkarni, S. R. Mulay, K. V. Rupanagudi, M. Ryu, R. Allam, V. Vielhauer, D. Muruve, M. T. Lindenmeyer, C. D. Cohen, and H. J. Anders. 2011. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS one* 6: e26778.
77. Faust, J., J. Menke, J. Kriegsmann, V. R. Kelley, W. J. Mayet, P. R. Galle, and A. Schwarting. 2002. Correlation of renal tubular epithelial cell-derived interleukin-18 up-regulation with disease activity in MRL-Fas<sup>lpr</sup> mice with autoimmune lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 46: 3083-3095.
78. Bani-Hani, A. H., J. A. Leslie, H. Asanuma, C. A. Dinarello, M. T. Campbell, D. R. Meldrum, H. Zhang, K. Hile, and K. K. Meldrum. 2009. IL-18 neutralization ameliorates obstruction-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Kidney international* 76: 500-511.
79. Franke, E. I., B. A. Vanderbrink, K. L. Hile, H. Zhang, A. Cain, F. Matsui, and K. K. Meldrum. 2012. Renal IL-18 production is macrophage independent during obstructive injury. *PLoS one* 7: e47417.

## Chapitre 7 : Discussion

### 7.1 Sommaire et originalité de la contribution scientifique

#### 7.1.1 Le microenvironnement endothélial apoptotique et le MFG-E8 dans le devenir du macrophage : une étude *in vitro*

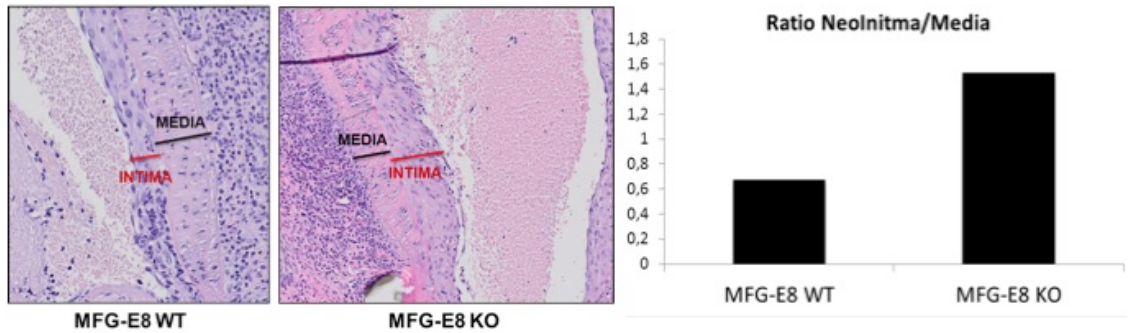
Dans le premier article présenté, nous avons caractérisé le microenvironnement apoptotique et son rôle dans la modulation du phénotype du macrophage. **Cet article constitue la première description de la relâche Caspase-3-dépendante de MFG-E8 par les cellules endothéliales. De plus, il rapporte pour la première fois qu'un type cellulaire autre que les monocytes/macrophages/cellules dendritiques (DCs) peut être source de MFG-E8.** Les cellules endothéliales apoptotiques relâchent le MFG-E8 de façon Caspase-3 dépendante. La stimulation des macrophages par l'environnement conditionné par les cellules endothéliales apoptotiques mène à l'adoption d'un profil macrophagien davantage anti-inflammatoire et moins pro-inflammatoire. Ce phénotype est réduit par l'inhibition de la Caspase-3 et il dépend de la présence de MFG-E8. De plus, le potentiel du MFG-E8 à la reprogrammation du macrophage pro-inflammatoire a été démontré via un modèle expérimental de péritonite (*review* de ce modèle inflammatoire, voir **annexe 1**). Ce changement phénotypique médié par MFG-E8 implique une signalisation STAT3. **Ces résultats démontrent pour la première fois qu'MFG-E8 induit un phénotype anti-inflammatoire chez le macrophage indépendamment de la phagocytose.** L'insulte tissulaire peut induire la mort cellulaire telle que l'apoptose. Cette apoptose des cellules endothéliales peut être provoquée par les facteurs de risques de l'athérosclérose tels que l'hypertension et l'hyperglycémie. Elle peut également avoir lieu lors de pathologies ischémiques ou à réponse immune (ex. activation du complément) telles que la vasculopathie du transplant ou les cancers hautement prolifératifs.

##### 7.1.1.1 Limitations de cette étude et perspectives court terme

Alors que cet article démontre l'importance *in vitro* de l'environnement endothélial apoptotique et du MFG-E8 dans le devenir macrophagien, la contribution *in vivo* de cet

environnement et du MFG-E8 n'a pas été évaluée. Ce manque de corrélation *in vivo* est assurément la limitation majeure de cet article. Ainsi, nous travaillons actuellement à l'optimisation d'un modèle de vasculopathie chronique du transplant (VCT), un modèle où l'apoptose des cellules endothéliales joue un rôle crucial. La VCT, se caractérisant par une prolifération myointimale oblitérative, est une cause importante de la dysfonction de l'allogreffe caractérisée par une fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire.<sup>285-288</sup> Elle est aussi une cause majeure de dysfonction chronique en transplantation cardiaque. La VCT se caractérise également par la présence, mais plus particulièrement par la persistance de l'apoptose endothéliale, dont nous avons associé à cette dernière la relâche de MFG-E8.<sup>289-291</sup> Pour évaluer comment l'environnement endothélial apoptotique, par la relâche de MFG-E8, peut moduler l'apparition de la VCT, nous avons déjà procédé à des transplantations aortiques complètement non apparentées. Des aortes de souris C57BL/6 MFG-E8 KO vs WT ont été transplantées dans des souris Balb/C. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'absence de MFG-E8 dans l'aorte transplantée favorise la VCT. En effet, par immunohistochimie, nous pouvons observer que la prolifération myointimale est davantage présente chez les souris transplantées avec l'aorte provenant de souris MFG-E8 KO (résultats non publiés, voir **figure 5**). De plus, l'analyse des leucocytes du sang périphérique démontre une diminution du phénotype monocytaire pro-inflammatoire classique de même qu'une diminution de l'activation des cellules T CD8+ chez les souris transplantées avec l'aorte provenant de souris WT, suggérant que la présence locale de MFG-E8 est suffisante pour moduler la réponse inflammatoire systémique (résultats non publiés, voir **annexe 2A**).

Considérant les résultats *in vitro* publiés reflétant le potentiel d'atténuation du phénotype pro-inflammatoire des macrophages par le MFG-E8, ces résultats *in vivo* suggèrent qu'il pourrait être possible que l'absence de MFG-E8 de l'environnement endothélial apoptotique de la VCT favorise l'augmentation du phénotype pro-inflammatoire des macrophages recrutés au site de l'allogreffe. Ce phénotype pro-inflammatoire serait à long terme délétère par la promotion du dommage tissulaire, menant ultimement à la prolifération myointimale. Ainsi, afin de confirmer ces hypothèses, plusieurs éléments peuvent être investigués. Plus spécifiquement, nous pouvons :



**Figure 5: MFG-E8 dans l'environnement endothélial apoptotique.**

Des aortes de souris MFG-E8 KO vs WT ont été transplantées dans des souris Balb/C. Les aortes ont été récoltées 9 semaines après transplantation. Le développement de la VCT a été évalué par coloration H&E. L'analyse histopathologique suggère une augmentation du ratio neointima/media chez les souris transplantées avec aortes provenant de souris MFG-E8 KO, suggérant le rôle protecteur du MFG-E8 dans le microenvironnement endothélial apoptotique de la VCT.

**Objectif 1 : Évaluer l'implication locale du MFG-E8 dans la programmation/reprogrammation *in vivo* du macrophage dans l'environnement tissulaire du transplant aortique.**

L'analyse de biopsies d'allogreffe rénale de patients transplantés a démontré qu'à un an post-transplantation, la majorité des macrophages infiltrants présentent des marqueurs de macrophage M2, tels que CD68 et CD204, et que cet infiltrat corrèle fortement avec le développement subséquent de la fibrose rénale pathologique.<sup>292</sup> La perte de greffon semble ainsi être associée à la présence de macrophages anti-inflammatoires et nous avons démontré que le MFG-E8 favorise ce phénotype anti-inflammatoire. Cependant, le rôle du phénotype lors des phases distinctes de la pathologie du rejet doit être pris en considération. Ainsi, bien que le phénotype anti-inflammatoire n'est pas souhaitable en phase tardive de par le potentiel pro-fibrotique du phénotype, ce phénotype anti-inflammatoire pourrait être favorable en phase périgransplantation. À ce moment, la programmation/reprogrammation du macrophage pro-inflammatoire en macrophage anti-inflammatoire favoriserait l'atténuation d'une inflammation persistante promouvant la destruction tissulaire. Cette contribution phénotypique distincte des monocytes/macrophages d'un environnement tissulaire avec MFG-E8 ou sans MFG-E8 de même que l'association de celui-ci avec le devenir du greffon pourrait être investiguée.



Utilisant la modélisation animale précédemment décrite (c.-à.-d. des segments aortiques provenant de souris C57BL/6 MFG-E8 KO ou WT transplantés dans des souris non apparentées Balb/c, et présentant une formation de neointima à 9 semaine post-transplantation), la reprogrammation *in vivo* du macrophage dans les tissus peut être évaluée par immunofluorescence. L'infiltration tissulaire des macrophages sera évaluée par un marquage F4/80 et le phénotype associé sera établi par l'expression des marqueurs iNOS (M1) et CD206 (M2). Afin d'associer le changement phénotypique obtenu à la présence de MFG-E8 dans l'environnement apoptotique endothélial, l'expression de Caspase-3 associée à un marqueur endothélial tel que CD31 sera évaluée par immunofluorescence. De plus, l'expression aortique du MFG-E8 sera également évaluée par immunofluorescence. Les résultats de phénotype macrophagien, d'apoptose endothéliale et de relâche de MFG-E8 seront associés à l'évaluation du ratio intima-media. L'influence phénotypique du macrophage sur l'infiltration d'autres cellules immunes pourrait également être évaluée par un marquage CD3 (cellules T), B220 (cellules B) et NK1.1 (cellules NK).

Puisque nous avons démontré que le transfert de macrophages traités avec MFG-E8 est suffisant pour atténuer l'insulte tissulaire rénale dans un modèle d'obstruction urétérale, il serait intéressant d'évaluer si ces mêmes macrophages pourraient réduire le rejet aortique. Des BMDMs traités avec MFG-E8 ou PBS seront administrés intra-péritonéal précédemment la transplantation et tous les 3 jours suivants celle-ci (même cédure d'administration qu'en UUO). À 9 semaines post-transplantation, les mêmes paramètres histologiques décrits précédemment seront évalués.

**Objectif 2 : Déterminer le mécanisme associé à l'effet protecteur conféré par le MFG-E8 : investiguer la modulation potentielle de l'activation de l'inflammasome.**

Le rôle de l'inflammasome en transplantation est très peu étudié. Dans ce contexte clinique, les DAMPs potentiels dans l'induction de l'inflammasome incluent principalement l'ATP extracellulaire,<sup>293</sup> les ROS,<sup>294</sup> l'UA<sup>91</sup> mais également C3a, une protéine obtenue suite à l'activation du complément et induisant l'augmentation des cellules Th17.<sup>295</sup> L'activation de l'inflammasome a récemment été associée dans un modèle de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD - *Graft Versus Host Disease*).<sup>296</sup> Son implication a aussi été observée en transplantation d'organe solide. En effet, chez la souris, l'augmentation de l'expression d'ASC

est associée à l'inflammation induite suite à la transplantation cardiaque.<sup>297</sup> Chez l'humain, toujours en transplantation cardiaque, l'activation de l'inflammasome a été associée au rejet aigu.<sup>298</sup> En contexte d'ischémie-réperfusion, une condition retrouvée pérित्रansplantation et associée à l'induction de DAMPs, la sécrétion pathologique d'IL-1 $\beta$  menant entre autres à l'inflammation neutrophilique a été démontrée. Mis ensemble, ces études suggèrent le potentiel thérapeutique de l'inhibition de l'activation de l'inflammasome. En transplantation, le MFG-E8 pourrait ainsi être bénéfique son potentiel d'atténuation de l'activation de l'inflammasome.

Ainsi, utilisant les mêmes échantillons provenant des modélisations animales de l'objectif 1 (Expérience 1 : des segments aortiques provenant de souris C57BL/6 MFG-E8 KO ou WT transplantés dans des souris non apparentées Balb/c. Expérience 2 : transfert de macrophages traités avec MFG-E8 ou PBS dans des souris Balb/c transplantées avec des segments aortiques provenant de souris C57BL/6 MFG-E8 KO.), la modulation de l'activation de l'inflammasome sera évaluée par immunohistochimie ainsi que par Western Blot pour les différents composants de l'inflammasome tels que NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$  ainsi qu'IL-18. De plus, afin d'évaluer la contribution précise de l'inflammasome tissulaire vs macrophagien, des souris NLRP3 KO pourraient être utilisées.

### **Objectif 3 : Évaluer la contribution du phénotype macrophagien induit par le MFG-E8 sur la réponse Th17, un type cellulaire crucial dans le devenir du greffon.**

Les cellules Th17 sont d'une importance cruciale dans l'immunité, notamment en transplantation. Par la sécrétion d'IL-17, ces cellules contribuent au recrutement de cellules immunes au site d'inflammation ainsi qu'à la maturation des APCs.<sup>299</sup> La différenciation Th17 est dépendante de la présence de TGF $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-23. Dans différents modèles animaux, des études ont démontré que les souris IL-17, IL-6 ou IL-23 KO présentent une pathologie moins sévère ou absente.<sup>300-302</sup> En transplantation rénale, quelques études ont associé l'expression d'IL-17 et l'infiltration de cellules Th17 à une insulte tissulaire augmentée associée à une dysfonction du greffon.<sup>303,304</sup> En transplantation cardiaque, l'IL-17 contribue à l'inflammation<sup>305</sup> et les cellules Th17 contribuent au rejet aigu.<sup>306</sup>

L'influence du MFG-E8 dans le phénotype macrophagien obtenu et plus précisément dans son profil sécrétoire exact est d'une importance capitale puisque la délicate distinction entre l'atténuation d'un phénotype pro-inflammatoire et la promotion d'un phénotype anti-inflammatoire mène à des résultantes totalement opposées quant à différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th17. En effet, l'atténuation du phénotype pro-inflammatoire du macrophage par le MFG-E8, associée à une diminution de sa sécrétion d'IL-6 et d'IL-23, pourrait réduire la différenciation Th17. À l'inverse, la promotion du phénotype anti-inflammatoire du macrophage par le MFG-E8 augmenterait la sécrétion de TGFβ, ce qui favoriserait la différenciation Th17. Il est également à considérer que cette sécrétion de TGFβ pourrait également être favorisée par le MFG-E8 via la promotion de la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. Ainsi, utilisant les mêmes échantillons provenant des modélisations animales de l'objectif 1, l'influence de la reprogrammation macrophagienne par le MFG-E8 sur la genèse de cellules Th17 pourrait être évaluée. En effet, la modulation des phénotypes lymphocytaires devrait être étudiée. L'impact de l'absence du MFG-E8 sur la présence de lymphocytes Th17 comparée aux Th1 pourra être évalué par des études d'immunofluorescence sur le transplant et en cytométrie en flux sur les ganglions lymphatiques drainant le transplant et dans la rate.

### **7.1.2 Le MFG-E8 et le macrophage dans la progression de l'insulte tissulaire : une étude *in vivo***

Ayant démontré que les cellules épithéliales apoptotiques, à l'instar des cellules endothéliales apoptotiques, relâchent elles aussi de façon apoptose-dépendante le MFG-E8, nous avons étudié plus exhaustivement un modèle *in vivo* riche en apoptose épithéliale, l'obstruction urétérale unilatérale (UUO). Dans le deuxième article présenté, nous avons ainsi évalué le rôle du MFG-E8 provenant du microenvironnement apoptotique dans la modulation de l'insulte tissulaire rénale dans un modèle de maladie rénale chronique, l'UUO. **Cet article rapporte l'implication bénéfique de MFG-E8 dans ce modèle de pathologie rénale obstructive.** Nous avons démontré que la présence ou l'administration de MFG-E8 réduit le dommage tissulaire et la fibrose. **La protection conférée par MFG-E8 est médiée via la modulation de l'activation de l'inflammasome, et constitue la première suggestion de la modulation de cette voie par le MFG-E8 dans un type cellulaire autre que le**

**macrophage.** La contribution de l'inflammasome dans la promotion des maladies chroniques rénales avait cependant été précédemment rapportée. De plus, **nos résultats démontrent l'importance du phénotype anti-inflammatoire du macrophage médié par le MFG-E8 dans la modulation de l'activation de l'inflammasome rénal et dans la modulation du dommage tissulaire.**

#### *7.1.2.1 Limitations de cette étude et perspectives court terme*

Alors que cet article démontre l'importance *in vivo* de l'environnement apoptotique et du MFG-E8 dans le devenir de l'insulte tissulaire via la promotion du phénotype anti-inflammatoire du macrophage, l'analyse phénotypique demeure superficielle et représente une limitation majeure. En effet, bien que les conclusions du manuscrit sont basées sur ce changement phénotypique macrophagien, seul l'expression de CD206 (M2) a été évaluée. Une évaluation phénotypique du macrophage plus élaborée aurait pu inclure une analyse de l'expression d'autres marqueurs tels que CD124 (M2) et iNOS (M1). De plus, la contribution de la modulation par le MFG-E8 de l'activation de l'inflammasome macrophagien *vs* tissulaire (ex. cellules épithéliales) dans le devenir de l'insulte tissulaire et la mécanistique précise derrière l'inhibition de l'activation de l'inflammasome demeurent inexplorées. Ainsi, nous pouvons :

**Objectif 1 : Évaluer l'influence du MFG-E8 sur l'inflammasome épithélial : le potentiel direct et indirect.**

Alors que l'inhibition directe de l'activation de l'inflammasome par MFG-E8 a été démontrée chez les macrophages dans un modèle d'ischémie cérébrale, aucune littérature n'a suggéré son potentiel chez un autre type cellulaire que le macrophage.<sup>257</sup> Pourtant, l'expression de NLRP3, d'ASC de même que de Caspase-1 ont été rapportées à la fois chez les macrophages et chez les cellules épithéliales tubulaires.<sup>307,308</sup> Tout comme les macrophages, les cellules épithéliales rénales possèdent l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , rendant ainsi l'interaction de celles-ci avec le MFG-E8 possible. La diminution de l'activation de l'inflammasome des cellules épithéliales rénales par MFG-E8 est ainsi envisageable. Ainsi, utilisant une culture primaire de cellules épithéliales rénales (PTECs – *Proximal Tubular Epithelial Cells*), une étude *in vitro* pourrait élucider cette question. Par exemple, l'étude de

l'expression des différents composants de l'inflammasome par Western Blot peut être accomplie avec des extraits protéiques provenant de PTECs pré-conditionnées avec le MFG-E8 ou le PBS, suivi d'une stimulation activant l'inflammasome (ex. LPS) et pourrait ainsi permettre d'évaluer le potentiel direct d'inhibition de l'activation de l'inflammasome par le MFG-E8.

L'effet de MFG-E8 sur l'activation de l'inflammasome épithélial rénal peut aussi être indirect. En effet, nous avons démontré que l'administration de macrophages M2, traités par le MFG-E8, mène à une diminution de l'expression rénale des composants de l'inflammasome. Le conditionnement du microenvironnement inflammatoire rénal par ceux-ci est suffisant pour reproduire l'effet protecteur conféré par l'administration de MFG-E8. Ainsi, une étude *in vitro* similaire à la précédente, mais substituant le pré-conditionnement des PTECs avec le MFG-E8 par un pré-conditionnement des PTECs avec le surnageant de macrophages stimulés avec le MFG-E8 ou le PBS évaluerait alors l'influence de l'environnement créé par le macrophage sur les PTECs.

## **Objectif 2 : Déterminer le mécanisme précis associé à l'inhibition de l'activation de l'inflammasome par MFG-E8 : un rôle potentiel pour NFκB.**

Les voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'inflammasome suite à l'UUO sont inconnues. Cependant, la voie de signalisation de NFκB a été rapportée comme étant centrale dans la cascade de signalisation de l'inflammasome. En effet, l'activation de l'inflammasome résulte en 2 signaux : 1) un signal initial activant NFκB lequel à son tour; 2) favorise l'activation de l'inflammasome (voir **section 7.2.2**). Dans la résolution de l'inflammation, il a été démontré que tant l'activation d'IKKβ (voie canonique) que l'activation d'IKKα (voie non-canonique) peuvent être liés à la résolution de l'inflammation.<sup>309-314</sup> En effet, IKKα, par sa liaison au composant de l'inflammasome ASC, empêche la relocalisation de celui-ci du noyau vers le complexe inflammasome situé dans le cytoplasme et aurait ainsi un rôle potentiel dans la modulation des interactions durant la signalisation de l'inflammasome, tel que son assemblage, affectant l'activation de l'inflammasome. L'influence de MFG-E8 sur l'activation de la voie de IKKα pourrait alors être investiguée. Ainsi, pour évaluer la contribution respective des IKKs dans l'effet

d'inhibition par MFG-E8 de l'activation de l'inflammasome, des études *in vitro* indépendantes utilisant des macrophages et des PTECs peuvent être envisagées. Par exemple, les macrophages peuvent être transfectés avec des siRNA pour IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  ou les deux. Les macrophages seront ensuite pré-conditionnés avec le MFG-E8 ou le PBS, avant une stimulation activant l'inflammasome (ex. LPS). Les extraits protéiques de ces macrophages permettront d'évaluer l'activation de l'inflammasome résultante. Parallèlement, dans le but de recréer l'influence plus représentative de l'environnement de l'UUO, le pré-conditionnement des macrophages avec le MFG-E8 pourrait être substitué par un pré-conditionnement des macrophages avec le surnageant de PTECs apoptotiques. Ces mêmes expériences de siRNA pourraient être effectués sur des PTECs.

## **7.2 Concepts soulevés non discutés et mécanistique potentielle**

### **7.2.1 La composante fibrotique**

Le MFG-E8 administré précédemment l'insulte peut atténuer la fibrose et les dommages tissulaires résultants. Toutefois, cette réponse fibrotique et ces dommages tissulaires ne sont pas diminués lorsque le MFG-E8 est administré suivant l'insulte. Ceci suggère les mécanismes responsables de la détérioration fibrotique sont déjà entamés et que le MFG-E8 pourrait agir sur ceux-ci. La fibrose est la signature de la présence de l'insulte rénale en réponse à l'UUO, favorisant la perte du parenchyme et menant à la perte de la fonction du rein atteint.<sup>264,315</sup> La fibrose est un processus progressif s'illustrant par l'accumulation et l'expansion de la matrice extracellulaire interstitielle. Corrélant avec le degré de la perte fonctionnelle du rein, la fibrose est due à une augmentation de la synthèse de collagène, essentiellement, et de fibronectine par les fibroblastes activés ainsi que par les myofibroblastes. D'autres molécules cumulant dans l'interstitium ont également été identifiées telles que la vitronectine, bien qu'une déficience génétique en celle-ci n'affecterait pas ultimement l'état fibrotique. Cependant, parallèlement au développement de la fibrose, d'autres processus favorisant sa formation ont été rapportés tels que la diminution de la dégradation de la matrice et plus intéressamment, la transdifférenciation des cellules rénales en myofibroblastes. Cette transdifférenciation, amplifiant et ainsi favorisant la résultante fibrotique, a inspiré plusieurs études sur l'origine des myofibroblastes dans l'établissement de

la fibrose rénale. En effet, des études ont démontré l'existence de transitions phénotypiques des cellules épithéliales, des cellules endothéliales, des fibroblastes résidents, des péricytes et des fibrocytes en myofibroblastes.<sup>265-267,316,317</sup> Il fut également démontré que les métalloprotéinases matricielles (MMPs) 2 et 9 favorisent la fibrose interstitielle en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT – *Epithelial-Mesenchymal Transition*) et en favorisant l'infiltration des macrophages.

Nous avons démontré que le MFG-E8 favorise la production de TGF $\beta$  par les macrophages.<sup>318</sup> Par son potentiel pro-fibrotique, la production de TGF $\beta$  peut avoir un impact positif lors d'insulte aiguë, sachant qu'une petite quantité de fibrose peut participer à une réparation tissulaire saine et ordonnée.<sup>319</sup> Toutefois, en situation d'insulte chronique, cette réponse fibrotique peut être maladaptée et se produire aux dépens de l'intégrité du néphron. En effet, en fibrose rénale, l'implication de la voie de signalisation de TGF $\beta$  a été rapportée. Son activation peut être causée par le diabète, l'hypertension, l'ischémie, les insultes aiguës et les obstructions urologiques. Le niveau élevé de TGF $\beta$  est relié à l'activation de la réponse profibrotique initiée par l'angiotensine 2, le glucose et le stress oxydatif.<sup>320</sup> L'angiotensine 2 stimule l'expression de plusieurs éléments structurels de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la fibronectine, la laminine et des inhibiteurs de la dégradation de la matrice menant à la fibrose.<sup>321</sup> L'activation de la voie de signalisation de TGF $\beta$  résulte en l'activation du *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1) et du *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), favorisant la production de matrice extracellulaire, l'EMT, la différenciation des myofibroblastes et la progression de la pathologie.<sup>322</sup> L'administration seule de TGF $\beta$  est en fait suffisante pour initier la réponse fibrotique.<sup>323</sup> En fait, dans l'UUO, la fibrose interstitielle est dépendante de la surexpression de TGF $\beta$  dans l'interstitium.<sup>324</sup> L'inhibition de TGF $\beta$  réduit l'inflammation, l'apoptose tubulaire, l'expression de collagène et la fibrose interstitielle.<sup>324-329</sup> La voie de signalisation TGF $\beta$  peut être médiée par les protéines SMADs, mais aussi indépendamment de celles-ci.<sup>330</sup> Il a été démontré que les souris déficientes en SMAD3 sont protégées de la fibrose rénale ou du moins démontrent une EMT, un dépôt de collagène et une apoptose tubulaire diminués.<sup>331-334</sup> Les SMADs 6 et 7 sont des antagonistes connus de la signalisation TGF $\beta$ . Il est démontré que la présence de SMAD7 réduit dramatiquement la fibrose dans l'UUO.<sup>335,336</sup> D'ailleurs, dans les néphropathies obstructives

ou dans les maladies chroniques rénales, le niveau de SMAD7, de Ski et de SnoN, deux autres régulateurs négatifs de SMAD, sont réduits.<sup>337,338</sup> Ainsi, en plus de la production constante de TGF $\beta$  par les macrophages suite à la production chronique de MFG-E8 par les cellules apoptotiques lors des maladies rénales progressives, ceci favorise la persistance de la signalisation TGF $\beta$ .<sup>339</sup> L'activation de TGF $\beta$  régule ainsi plusieurs gènes impliqués dans la plasticité épithéliale, la transdifférenciation et le remodelage du stroma.<sup>340-343</sup> Le plus surexprimé parmi ceux-ci est PAI-1, ayant un rôle crucial dans la diminution de la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant son accumulation et contribuant ainsi à la fibrose rénale.<sup>344,345</sup> Dans l'UUO, la déficience en PAI-1 a un effet protecteur alors que sa surexpression favorise une réponse fibrotique associée à un recrutement de macrophages.<sup>344,346</sup> D'autres voies de signalisation impliquées dans la promotion de la fibrose ont également été décrites telles que la voie de signalisation de Wnt, impliquée dans le contrôle de la transcription de la fibronectine et de PAI-1.<sup>347,348</sup> Il a été démontré que l'inhibition de l'expression de Wnt/ $\beta$ caténine réduit l'activation des myofibroblastes ainsi que l'expression de collagène et de fibronectine, résultant en une amélioration de la fibrose.<sup>349</sup>

#### *7.2.1.1 L'activation de l'inflammasome et la résultante fibrotique : une association certaine ?*

Nous avons démontré que le MFG-E8 module l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production intra-rénale d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. L'augmentation de l'expression de NLRP3 a été observée dans plusieurs pathologies chroniques rénales telles que la néphropathie à IgA, à changements minimes, la néphropathie lupique, la hyalinose focale et segmentaire secondaire et la néphroangiosclérose, de même que dans les pathologies aiguës rénales, telles que la nécrose tubulaire aiguë.<sup>147</sup> L'activation de l'inflammasome est bénéfique durant une infection, mais peut aussi favoriser la réponse fibrotique si dérégulée. Cependant, la fibrose n'est pas nécessairement associée à l'activation de l'inflammasome. En effet, elle dépend de plusieurs facteurs tels que la variation intracellulaire de la proIL-1 $\beta$  et de la proIL-18, le niveau de cytokines sécrétées, la durée de l'activation de l'inflammasome (chronique *vs* aiguë) et le type cellulaire lui-même (leucocytes *vs* cellules stromales *vs* cellules du parenchyme). Dans des contextes très particuliers, notamment en inflammation stérile, quelques études ont cependant démontré le lien entre l'activation de l'inflammasome et la fibrose. En pathologies rénales



chroniques, l'IL-1 $\beta$  est un stimulateur dose-dépendant de la sécrétion de collagène par les fibroblastes,<sup>350</sup> mais peut aussi, en addition au TGF $\beta$ , augmenter la signalisation profibrotique TGF $\beta$ /SMAD dans les cellules épithéliales tubulaires.<sup>351</sup> Il a été démontré que l'IL-1 $\beta$  induit un dommage tubulaire, l'expression de l'*alpha Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ SMA) et la production de la fibronectine par les fibroblastes,<sup>352</sup> alors que la déficience en récepteur de l'IL-1 $\beta$  améliore la fibrose interstitielle précoce.<sup>353</sup> Les cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 régulées par l'activation de l'inflammasome sont directement impliquées dans la fibrose présente dans les pathologies rénales chroniques. Elles induisent l'expression de marqueurs mésenchymaux dans les cellules tubulaires épithéliales, menant à l'EMT et à la fibrose rénale.<sup>354</sup> Dans le modèle de l'UUO, la neutralisation d'IL-18 prévient l'insulte rénale et la fibrose chez la souris.<sup>355</sup> Dans ce modèle, il a été démontré que les cellules tubulaires épithéliales sont source d'IL-18 alors que la déplétion de macrophages ne modifie pas le niveau d'IL-18 rénal, suggérant que les macrophages ne sont pas impliqués dans la fibrose dépendante d'IL-18.

#### 7.2.1.2 *Les macrophages dans la réponse fibrotique : un lien évident ?*

Nous avons démontré que le MFG-E8 favorise la présence des phagocytes M2 CD206+ associée à une fibrose rénale et à une insulte tissulaire diminuées. Ce type cellulaire et le phénotype de celui-ci sont des composants essentiels au devenir fibrotique. En effet, le processus fibrotique fait appel à plusieurs types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les myofibroblastes activés et les macrophages. Plusieurs études ont rapporté la modulation de la fibrose par les macrophages. En pathologies rénales, plusieurs études ont démontré l'association entre l'infiltration des macrophages et la sévérité de l'atteinte rénale, suggérant le rôle délétère de ceux-ci. De plus, leur rôle pathologique a été confirmé dans plusieurs modèles rénaux expérimentaux via leur déplétion ou leur réplétion. Par exemple, dans un modèle de fibrose rénale, il a été démontré que la déplétion des macrophages par clodronate élimine l'apoptose tubulaire et la fibrose rénale induites par l'obstruction, via des mécanismes dépendants du TNF $\alpha$  et du TGF $\beta$ , alors que le transfert adoptif des macrophages augmente la fibrose.<sup>356</sup> Il a également été démontré que les souris TLR2, TLR4 et MyD88 KO sont protégées des dommages induits par l'obstruction, suggérant le rôle crucial des TLRs des macrophages dans la fibrose tissulaire. Dans un modèle de fibrose

hépatique, le moment de la déplétion des macrophages est crucial pour un remodelage tissulaire efficace.<sup>357</sup> La déplétion précoce diminue le dommage tissulaire et la mort cellulaire, alors que la déplétion tardive durant la phase de réparation résulte en une inflammation pancréatique non résolue, suggérant le rôle important joué par les macrophages dans les 2 phases du processus inflammatoire, c.-à-d. initiation et résolution.<sup>357</sup> Quelques études en pathologies rénales ont également rapporté leur rôle réparateur, notamment en ischémie-réperfusion. En effet, la déplétion des macrophages au moment de l'insulte atténue celle-ci, alors que la déplétion en phase de réparation délaie la réparation tissulaire.<sup>358</sup> Ces études suggèrent ainsi que les macrophages peuvent ainsi moduler de façon opposée la fibrose en fonction du temps. Les études rapportent que cette modulation fibrotique par le macrophage en fonction du temps corrèle avec un phénotype macrophagien distinct, suggérant l'importance du phénotype au-delà de la présence cellulaire elle-même.

En sclérose systémique, il a été démontré que l'expression de CD163, une protéine généralement exprimée par les macrophages de phénotype M2, est corrélée au niveau de sévérité de la fibrose.<sup>359</sup> Des biopsies cutanées provenant de patients ont également démontré une augmentation marquée des marqueurs macrophagiens M2 CD163 et CD204.<sup>360</sup> En fibrose pulmonaire, plusieurs études ont démontré l'association entre les macrophages M2 et la progression et la sévérité de la fibrose.<sup>361</sup> En fibrose hépatique, la polarisation M2 des macrophages a été associée au développement de la fibrose pathologique.<sup>362</sup>

En fibrose rénale, l'expression et la sécrétion de la Galectine-3, associée au phénotype M2, ont lié les macrophages à la promotion de la fibrose,<sup>363</sup> alors qu'une étude a démontré la corrélation de son expression avec la persistance des tubules et le remodelage matriciel réduisant la fibrose.<sup>364</sup> Dans un modèle de maladie chronique rénale induit par l'adriamycine, on a également rapporté l'amélioration de la pathologie suite à l'administration de macrophage M2, stimulés *ex vivo* avec l'IL-4 et l'IL-13.<sup>365</sup> De plus, dans ce même modèle, une comparaison du potentiel de protection des deux types de macrophages alternatifs M2a (induit par IL-4/IL-13) et M2c (induit par IL-10/TGF $\beta$ ) a démontré que bien que les deux types diminuent significativement le dommage tissulaire rénal, les macrophages de type M2c diminuent plus efficacement l'atrophie tubulaire, l'expansion interstitielle, le niveau de protéinurie, l'infiltration des lymphocytes T CD4 et la fibrose rénale.<sup>366</sup> L'induction *in vivo* du

phénotype anti-inflammatoire du macrophage par l'administration d'IL-25 s'est démontrée comme étant bénéfique dans la réduction du dommage rénal induit par l'adriamycine.<sup>367</sup> Cependant, dans un modèle de maladie d'Alport, la progression de la pathologie a été associée à l'infiltration de macrophage M2.<sup>368</sup> Dans ce contexte, une amélioration de la fibrose a été obtenue par l'inhibition du récepteur CCR1 à la surface des macrophages.<sup>369</sup> Une étude *in vitro* avait d'ailleurs précédemment suggéré l'implication du phénotype macrophagien M2 dans l'activation des myofibroblastes en démontrant que des macrophages différenciés M2 *ex vivo* induisaient un changement phénotypique chez les fibroblastes, favorisant l'expression d' $\alpha$ SMA.<sup>365</sup> Cependant, il a été démontré que l'expression du récepteur au mannose (CD206), un marqueur M2, est associée à une fibrose diminuée.<sup>370</sup> En effet, ce récepteur permet la liaison et l'internalisation du collagène, favorisant la réduction de la fibrose. Plus récemment, l'analyse de biopsies d'allogreffe rénale de patients transplantés a démontré que, à un an post-transplantation, la majorité des macrophages infiltrants présentent des marqueurs de macrophage M2, tels que CD68 et CD204, et que cet infiltrat corrèle fortement avec le développement subséquent de la fibrose rénale pathologique.<sup>292</sup> L'investigation du rôle du changement phénotypique du macrophage dans la pathogenèse fibrotique rénale en est ainsi encore qu'à ses débuts et l'attribution exacte du rôle du phénotype lors des phases distinctes de la pathologie doit être prise en considération (voir **section 7.2.1.2.1**). Les fenêtres d'intérêt thérapeutique pour ces changements phénotypiques demeurent à déterminer. Ainsi, beaucoup reste à explorer quant aux mécanismes précis impliqués dans la contribution des monocytes/macrophages et de leur polarisation dans l'initiation et la progression du processus fibrotique.

#### 7.2.1.2.1 La diversité des macrophages dans la progression des maladies rénales

Récemment, Anders et Ryu ont proposé 4 types de macrophages pouvant être trouvés *in vivo*, définis en fonction de leur rôle prédominant dans les différentes phases des maladies rénales, soit les macrophages pro-inflammatoires, anti-inflammatoires, profibrotiques et fibrolytiques.<sup>371</sup> Ainsi, dans l'environnement tissulaire rénal, bien qu'il y aille coexistence de types distincts de macrophages, certains types dominant plus spécifiquement certaines phases de la pathologie. Les mécanismes par lesquels les macrophages sont polarisés en phénotype anti-inflammatoire suite à l'insulte sont peu décrits. Une étude rapporte que des macrophages

M1 (induit par une stimulation avec l'IFN $\gamma$ ) administrés durant la phase de réparation sont reprogrammés *in situ* en phénotype anti-inflammatoire M2, suggérant la présence dans le microenvironnement tissulaire de médiateurs promouvant ce phénotype anti-inflammatoire à cette phase pathologique.<sup>358</sup> Des études *in vitro* utilisant des cocultures démontrent que la reprogrammation phénotypique des macrophages est induite par des médiateurs provenant des cellules tubulaires, démontrant une fois de plus l'importance du microenvironnement tissulaire dans le devenir de la réponse inflammatoire.<sup>372</sup>

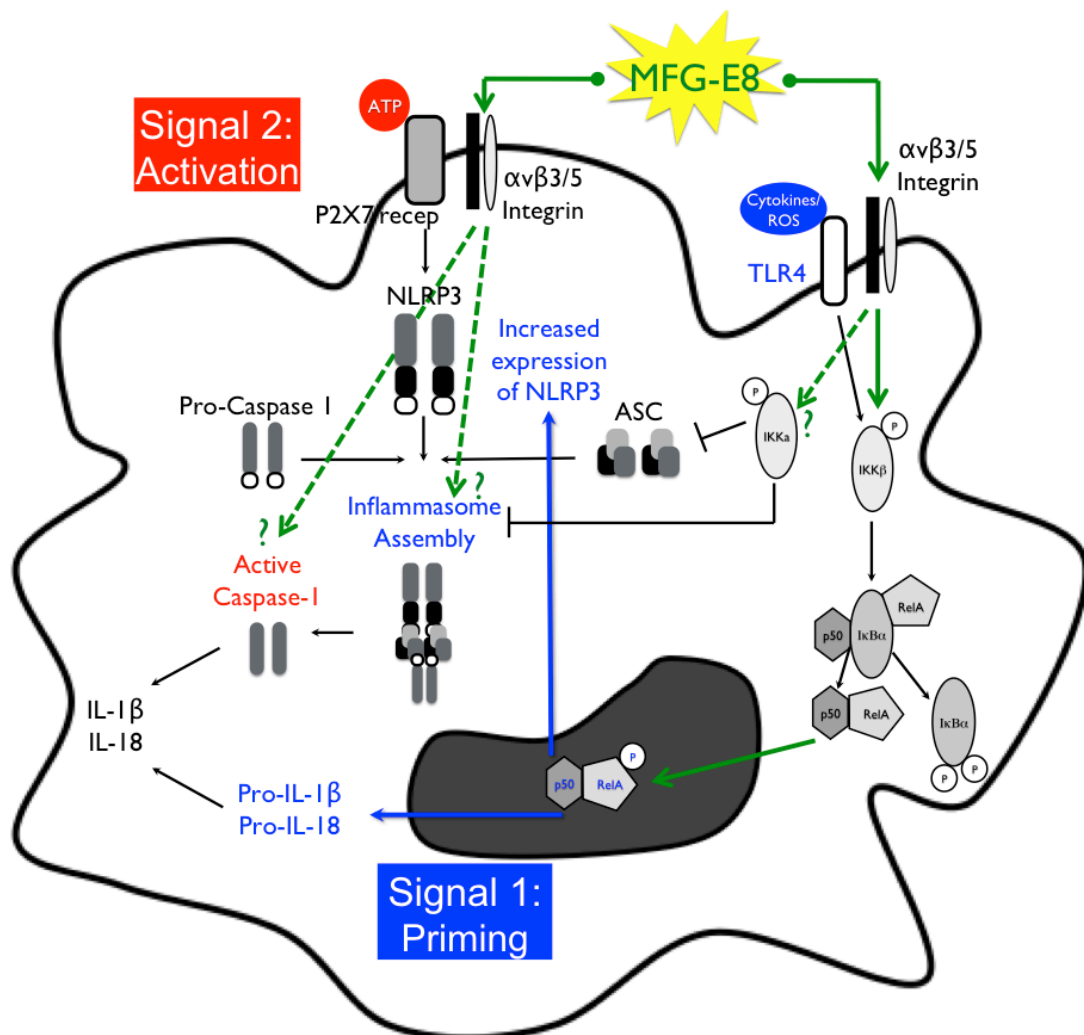
### 7.2.2 La mécanistique potentielle du MFG-E8

Les DAMPs capables d'activer l'inflammasome NLRP3 incluent les ROS, l'ATP extracellulaire, des cristaux d'acide urique, le HMGB1, les HSPs, les acides nucléiques, les efflux de potassium et les composants de la matrice extracellulaire, dont plusieurs peuvent être retrouvés dans l'UUO (voir **figure 6**).<sup>102</sup> Dans le modèle de l'UUO, l'activation de NLRP3, initiée par les fragments de matrice extracellulaire ou par l'ATP, contribue au dommage rénal.<sup>373</sup> En effet, chez les souris avec le récepteur ATP purinergique 2X7 (P2X7) KO, une diminution de l'insulte tubulaire de même qu'une diminution de l'inflammation et de la fibrose après l'UUO est notée.<sup>374</sup> La formation de l'inflammasome induit l'autoactivation de la Caspase-1 qui résulte en la génération des cytokines pro-inflammatoires matures IL-1 $\beta$  et IL-18.<sup>375</sup> Ces deux cytokines de même que l'agoniste du récepteur de l'IL-1 ont démontré leur contribution à l'inflammation et à la fibrose rénale.<sup>376</sup> L'inhibition directe de l'activation de l'inflammasome par MFG-E8 a été seulement démontrée dans les macrophages dans un modèle d'ischémie cérébrale.<sup>257</sup> Cependant, NLRP3, ASC de même que la Caspase-1 ont toutes été rapportées comme étant exprimé à la fois par les macrophages et par les cellules épithéliales tubulaires.<sup>307,308</sup> La diminution de l'activation de l'inflammasome des cellules épithéliales rénales par MFG-E8 est possible puisque ces cellules possèdent l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . De plus, lors de l'EMT, les cellules épithéliales rénales expriment de façon transitoire la PS. De par l'expression des deux « récepteurs » ou ligands du MFG-E8 par les cellules épithéliales rénales, nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse qu'une interaction directe entre les cellules épithéliales rénales et le MFG-E8 est fort probable. L'effet de MFG-E8 sur l'activation de l'inflammasome épithélial rénal peut aussi être indirect. En effet, nous avons démontré que l'administration de macrophages M2, traités par le MFG-E8, mène à une diminution de

l'expression rénale des composants de l'inflammasome. Le conditionnement du microenvironnement inflammatoire rénal par ceux-ci est suffisant pour reproduire l'effet protecteur conféré par l'administration de MFG-E8.

Les voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'inflammasome suite à l'UUO sont inconnues. Nous avons démontré que le MFG-E8 atténue le phénotype pro-inflammatoire du macrophage via l'activation de STAT3<sup>318</sup> et via une signalisation NFκB (résultats non publiés, voir **annexe 3**). Il a aussi été démontré que MFG-E8 atténue l'activation de NFκB associée à l'activation de STAT3 dans un modèle d'activation des TLRs en sepsis ou par le LPS.<sup>256</sup> La voie de signalisation de NFκB est centrale dans la cascade de signalisation de l'inflammasome. En effet, précèdent l'activation de NLRP3 par son ligand, par exemple l'ATP (signal no2), un signal d'activation par des cytokines/ROS ou via les récepteurs TLR/TNF menant à l'activation de NFκB permettant l'expression de NLRP3, l'assemblage de l'inflammasome et la translation des procytokines telles que la pro-IL1β est essentiel (signal no1) (voir **figure 6**).<sup>103,377,378</sup> L'activation de NFκB a été associée à l'augmentation de la fibrose dans l'UUO.<sup>379,380</sup> Dans la biologie du macrophage, le rôle du facteur de transcription NFκB est bien décrit. Des résultats préliminaires démontrent cependant que le MFG-E8 favorise la phosphorylation de p65 et la dégradation d'IκBα suite à une stimulation des macrophages par le MFG-E8 (résultats non publiés, voir **annexe 3A**). De plus, nous avons démontré via l'inhibition de IKKβ que la production d'une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10, par le macrophage M2 est dépendante de l'activation d'IKKβ, suggérant que l'activation de NFκB (voie canonique) peut également favoriser la réponse anti-inflammatoire (résultats non publiés, voir **annexe 3B**). Nos résultats sont en accord avec une littérature émergente quant au rôle de NFκB dans la résolution de l'inflammation. En effet, bien que son activation fût souvent associée à la promotion de l'inflammation, l'association de son activation est maintenant aussi suggérée dans la résolution de l'inflammation.<sup>309</sup> D'une part, il a été démontré que l'activation de IKKβ (voie canonique) contrôle le phénotype M2 du macrophage par l'inhibition de STAT1,<sup>310,311</sup> et qu'IKKα (voie non-canonique) est aussi lié à la résolution de l'inflammation.<sup>312</sup> Il a été démontré que l'activité basale d'IKKα dans les macrophages quiescents prévient l'activation spontanée de l'inflammasome.<sup>313</sup> En effet, IKKα, par sa liaison au composant de l'inflammasome ASC, empêche la relocalisation de celui-ci du noyau

vers le complexe inflammasome situé dans le cytoplasme. Cette régulation négative a été démontrée chez les sous-types d'inflammasome NLRP3, NLRC4 et AIM2. Ceci explique les premières observations obtenues concernant le potentiel de résolution de l'inflammation d'IKK $\alpha$ .<sup>312,314</sup> L'influence de MFG-E8 sur l'activation de la voie de IKK $\alpha$  (voie non-canonique) demeure à investiguer. MFG-E8 pourrait ainsi jouer un rôle important dans la modulation des interactions durant la signalisation de l'inflammasome, tel que son assemblage, affectant l'activation de l'inflammasome (voir **figure 6**). L'implication potentielle de MFG-E8 dans la régulation d'autres voies de signalisation profibrotique telles que TGF- $\beta$ /SMAD<sup>331,334,381,382</sup> et Wnt<sup>349</sup>, est cependant totalement inexplorée.



**Figure 6:** Le facteur de transcription NF $\kappa$ B dans la voie de signalisation de l'inflammasome et l'implication mécanistique potentielle de MFG-E8.

Avant son activation, NLRP3 doit être pré-activé. L'activation d'NLRP3 implique ainsi deux étapes distinctes : un signal de pré-activation (en bleu) et un signal d'activation (en rouge). Le signal de pré-activation (en bleu) implique un stimulus activant NFκB, tel que la liaison d'une cytokine au TLR4, menant à l'augmentation de l'expression de NLRP3 et des pro-cytokines IL-1β et IL-18. Cette pré-activation induit également l'assemblage des composants de l'inflammasome NLRP3 et ASC. Suite à la pré-activation, un second signal est nécessaire à l'activation de l'inflammasome (en rouge). Le signal d'activation (en rouge), tel que la liaison de l'ATP au récepteur P2X7, induit l'activation de la pro-caspase-1. La caspase-1, par son interaction CARD-CARD avec ASC, permet la formation du complexe inflammasome et la relâche subséquente des cytokines IL-1β et IL-18. MFG-E8 favorise la phosphorylation de p65 et la dégradation d'IκBα suite à une stimulation des macrophages par le MFG-E8 (en vert, flèches pleines). L'implication potentielle du MFG-E8 dans l'activation de la voie non-canonique de NFκB et son rôle potentiel dans l'activation d'IKKα menant à l'inhibition de l'assemblage de l'inflammasome demeurent à investiguer (en vert, flèches pointillées).

### 7.2.3 Le potentiel thérapeutique de MFG-E8 dans la fibrose

Nos résultats suggèrent que le MFG-E8 a un effet protecteur sur le dommage tissulaire induit par l'UUO, via la réduction de l'activation de l'inflammasome. Les facteurs régulant l'expression de MFG-E8, tels que décrits au chapitre 3, pourraient ainsi être considérés comme cibles thérapeutiques potentielles. Cependant, nous savons que la fenêtre d'administration du MFG-E8 est cruciale à son activité biologique. En effet, l'administration de MFG-E8 après le début de l'insulte rénale ne peut résoudre le dommage déjà établi (résultats non publiés, voir **annexe 4**), contrairement à d'autres protéines rapportées telles que l'*Heme Oxygenase-1* (HO-1)<sup>383</sup> et le *Bone Morphogenic Protein-7* (BMP-7).<sup>384,385</sup> Les avantages de cette stratégie par rapport aux stratégies actuellement utilisées en traitement des pathologies fibrotiques demeurent à déterminer. De plus, puisque le MFG-E8 peut aussi favoriser la production et la relâche de TGFβ par les macrophages, la production (ou l'administration) constante de MFG-E8 pourrait favoriser la fibrose tissulaire. Aussi, il est à considérer que la présence de MFG-E8 est loin d'être toujours favorable et sa promotion peut avoir des conséquences désastreuses (voir **section 7.2.3.2**). La promotion de son expression comme stratégie thérapeutique doit être envisagée avec modération et prudence. Cependant, certaines stratégies contournant ces limitations pourraient être envisagées. En effet, nous avons démontré que l'effet protecteur du MFG-E8 est notamment médié via la modulation du macrophage et que la modulation de celui-ci est suffisante pour recréer l'effet protecteur de l'administration du MFG-E8, favorisant une diminution globale de l'activation de l'inflammasome rénal. Ainsi, une stratégie thérapeutique plus ciblée pourrait être envisagée via le transfert de macrophages stimulés avec le MFG-E8. Le succès de cette stratégie serait

évidemment dépendant d'une fenêtre thérapeutique définie, considérant les contributions potentielles distinctes du phénotype du monocyte/macrophage dans l'initiation, l'établissement ou la progression du processus fibrotique tel qu'expliqué précédemment (**section 7.2.1.2**).

### 7.2.3.1 La polarisation des macrophages comme outil thérapeutique : qu'en sait-on ?

Le transfert de macrophages polarisés peut être utilisé pour conditionner l'environnement tissulaire ciblé et par ce conditionnement, altérer le devenir phénotypique des monocytes infiltrant ce même environnement. Bien que la possibilité que le phénotype des macrophages transférés pouvant être reprogrammé *in situ* par le microenvironnement de destination ait déjà été soulevé dans un contexte de protection rénale,<sup>386</sup> nos résultats démontrent dans ce même organe que cette stratégie peut être fonctionnelle et bénéfique. La possibilité de cibler le recrutement des monocytes, basé sur l'expression différentielle des récepteurs des chimiokines par les sous-populations de monocytes afin d'encourager la migration et l'accumulation au tissu de la sous-population bénéfique ou de prévenir le recrutement de la sous-population profibrotique a également été avancé. En effet, les récepteurs CCR1 et CCR2 sont davantage exprimés sur les monocytes inflammatoires M1 (Ly6C<sup>hi</sup>) alors que l'expression de CCR5 et CX3CR1 est davantage rapportée chez les monocytes anti-inflammatoires/profibrotiques M2 (Ly6C<sup>low</sup>).<sup>387,388</sup> Une étude sur la mobilisation des monocytes de la moelle osseuse vers les sites inflammatoires a déjà démontré que cibler le récepteur CCR2 est efficace pour contrer le recrutement de monocytes inflammatoires.<sup>389,390</sup> Cette approche n'assure cependant pas, ultimement, la modification du phénotype macrophagien tissulaire puisqu'un monocyte Ly6C<sup>hi</sup>, par exemple, peut se différencier *in situ* en un macrophage Ly6C<sup>low</sup>.<sup>386</sup> Un monocyte Ly6C<sup>hi</sup> n'est ainsi pas garant d'un devenir macrophagien pro-inflammatoire. Finalement, l'utilisation d'anticorps ciblant des marqueurs spécifiques d'une sous-population phénotypique macrophagienne conjugués à des microparticules aux fonctions particulières peut être envisagée.<sup>391-393</sup> Par exemple, dans un modèle murin, un conjugué proapoptotique a déjà démontré son efficacité dans la réduction du nombre de TAMs, connus pour leur phénotype M2 ainsi que pour leur implication dans la promotion tumorale (voir **encadré 3**), menant à une diminution de la mortalité.<sup>394</sup> Cependant, bien que non rapportées dans cette stratégie, nous devrions appréhender les conséquences que



pourrait engendrer une apoptose massive, via la relâche apoptose-dépendante de médiateurs (le MFG-E8, par exemple), sur la reprogrammation des macrophages non ciblés initialement. Une meilleure compréhension des propriétés différentielles des sous-populations monocytaires et macrophagiennes dans les différentes étapes de la réponse fibrotique est sans aucun doute le premier pas vers le développement de stratégies thérapeutiques visant la fibrose pathologique.

#### 7.2.3.2 MFG-E8 : les revers d'une protéine à l'expression pas toujours souhaitable

Depuis sa description initiale, en dehors de la régulation de l'inflammation, la multiplicité fonctionnelle de MFG-E8 a été grandement documentée. Tel que décrit au chapitre 3 (**section 3.2.2**), MFG-E8 a été démontré comme pouvant être crucial notamment dans la prolifération, l'adhésion, la protection et la réparation. Bien que ces propriétés possèdent un potentiel thérapeutique, elles peuvent également mener à une résultante délétère. L'impact prolifératif néfaste du MFG-E8 sur les cellules vasculaires musculaires lisses (VSMC – *Vascular Smooth Muscle Cells*) en est d'ailleurs un bel exemple. Les VSMCs servent à maintenir le tonus vasculaire et la prolifération de celles-ci est souvent rapportée dans les pathologies du vieillissement, de l'hypertension et de l'athérosclérose. Le processus de vieillissement est associé au dépôt de collagène, à la rupture des fibres d'élastines par la MMP-2 ou la Calpaïne-1 relâchée par les VSMCs, de même qu'à l'épaississement intimal dû à l'invasion et la prolifération des VSMCs dans l'intima. Il a été démontré qu'avec l'âge le niveau d'expression d'MFG-E8 augmente de 2 à 3 fois. La prolifération des VSMCs avec l'âge est également présente. Alors que l'utilisation de recombinant MFG-E8 sur les VMSCs résulte en une augmentation de l'activation dose-dépendante de ERK1/2, important dans le processus mitotique, via l'augmentation de l'expression de PDGF ainsi qu'une augmentation de CDK4 et de PCNA, le blocage de l'intégrine via un anti- $\alpha_v\beta_5$  mène à l'inhibition de toutes ces observations. MFG-E8 aurait ainsi un rôle dans la prolifération cellulaire des VSMCs de par son implication dans l'activation du cycle cellulaire via une cascade  $\alpha_v\beta_5$ -ERK1/2-CDK4/PCNA.<sup>395</sup>

À sa découverte, MFG-E8 (BA46) a d'abord été associé à la promotion du cancer à cause de son expression élevée dans le cancer du sein<sup>214,215</sup> alors que, plus récemment, cette augmentation a été spécifiquement associée au carcinome primaire et métastatique ER

(*Estrogen Receptor*) négatif du sein.<sup>396</sup> Des études subséquentes ont également démontré son implication dans la survie cellulaire tumorale et l'invasion, notamment dans le mélanome, où MFG-E8 augmente la résistance à l'apoptose ainsi que l'EMT.<sup>217</sup> Toutefois, sa suppression favorise une diminution de la croissance tumorale. Le blocage des intégrines associées à MFG-E8 diminue également cette croissance tumorale. Dans la carcinogenèse du colon, les effets négatifs des fonctions de MFG-E8 dépendent de la signalisation cellulaire médiée par les intégrines, où MFG-E8 a été associé à la promotion de la prolifération des cellules épithéliales.<sup>397</sup> Le rôle biologique du MFG-E8 a également été étudié dans le carcinome épidermoïde de la bouche (SCC - *oral Squamous Cell Carcinoma*), où son expression corrèle avec des caractéristiques clinico-pathologiques telles que la taille de la tumeur, le stade pathologique, la récurrence et l'invasion.<sup>398</sup> Les propriétés protumorales de MFG-E8 ont également démontré par un modèle murin Rip1-Tag2, un modèle tumoral où l'angiogenèse est critique.<sup>399</sup> Chez les souris MFG-E8 KO, les îlots pancréatiques tumoraux ainsi que la perméabilité vasculaire favorisant la dissémination sont diminués. Ainsi, ceci suggère que MFG-E8 est un acteur important dans l'angiogenèse associée à la tumeur. De plus, le rôle immunosuppresseur de MFG-E8 a également été suggéré alors que, combiné aux traitements conventionnels, l'inhibition de MFG-E8 augmente l'apoptose des cellules tumorales ainsi que la présentation croisée des cellules tumorales par les DCs et diminue le *pool* de cellules régulatrices FoxP3+.<sup>400</sup> Une étude récente a démontré qu'à cause de l'affinité élevée de MFG-E8 pour la PS, le potentiel de la SapC-DOPS (*Saposin C-diolelyphosphatidylserine*) à lier la PS, abondamment présente au feuillet externe membranaire d'une variété de cellules tumorales et à la vasculature associée à la tumeur, pour ainsi cibler efficacement et tuer les cellules cancéreuses, *in vitro* et *in vivo*, est inhibé.<sup>401</sup> Récemment, une étude dans le cancer de la prostate a démontré que la co-culture de macrophages avec des cellules tumorales apoptotiques augmente l'efferocytose et le niveau d'expression de MFG-E8, favorisant une polarisation du macrophage en phénotype alternatif protumoral M2.<sup>219</sup>

D'autres situations où MFG-E8 aurait des propriétés nuisibles ont aussi été décrites. En condition inflammatoire, MFG-E8 favorise la phagocytose de neurones non apoptotiques exposant la PS.<sup>402</sup> Bien que cela pourrait suggérer que ces neurones sont en état préapoptotique, exposant prématurément la PS, on démontre plutôt par le blocage de MFG-E8

que ces neurones sont bien viables dans le temps. De plus, une étude a démontré que MFG-E8 est impliqué dans la promotion de l'obésité de par la médiation de la phagocytose des gras via la phosphorylation dépendante des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  de Akt par la phosphatidylinositide-3 kinase et le complexe mTOR.<sup>403</sup> Les souris MFG-E8 KO sont protégées de l'obésité induite par la diète ainsi que de ses complications. Finalement, il a été démontré dans un modèle de pancréatite chronique que la présence de MFG-E8 favorise l'inflammation, la fibrose et potentiellement, la douleur.<sup>221</sup> L'augmentation des cellules inflammatoires, menant à la sécrétion de PDGF, TNF $\alpha$  et de TGF $\beta$  par celles-ci, favorise l'activation des cellules stellaires hPSCs qui non seulement contribuent à leur propre activation par la sécrétion de TGF $\beta$  et de périostine, mais également à la relâche de protéines extracellulaires membranaires promouvant la fibrose. Lors de pancréatite chronique, l'augmentation de l'expression de la fractalkine est associée à l'augmentation de douleurs viscérales, au recrutement de cellules inflammatoires ainsi qu'à la fibrose. Ayant déjà été démontrée dans la pathologie du sepsis, l'expression de MFG-E8 peut être induite par la stimulation à la fractalkine. Une augmentation de l'expression de MFG-E8 est également démontrée lors de la stimulation des hPSCs avec la fractalkine. Ainsi, l'augmentation de l'expression de fractalkine augmente l'expression de MFG-E8. Il a ainsi été récemment démontré qu'en condition de pancréatite chronique, la fibrose et la douleur sont directement proportionnelles avec l'expression de MFG-E8. La corrélation entre le niveau d'expression de MFG-E8 et la douleur est certainement très intéressante et le blocage de MFG-E8 comme traitement contre la douleur pourrait être envisagé. Récemment, nous avons également démontré l'implication du MFG-E8 présent dans le lait maternel comme élément favorable au développement d'allergie chez le bébé (résultats non publiés, voir **annexe 5**). Bien que le MFG-E8 ne peut interagir directement avec les lymphocytes T de par l'absence des intégrines médiant cette liaison, son implication dans la programmation d'un phénotype macrophagien de type M2 favorise la relâche d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les lymphocytes Th2. Cette relâche promeut la synthèse des IgE par les lymphocytes B et, ultimement, la dégranulation des basophiles et des mastocytes.

## 7.3 Perspectives : MFG-E8 dans la promotion du macrophage M2

### 7.3.1 La régulation négative de l'inflammasome : un frein à l'inflammation chronique

Jusqu'à maintenant, la dérégulation de l'activation de l'inflammasome a été impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires associées à la production excessive d'IL-1 $\beta$  incluant le SLE, le vitiligo, l'arthrite rhumatoïde, la goutte, le syndrome de Muckle-Wells de même que dans le syndrome métabolique.<sup>404-406</sup> L'implication du MFG-E8 comme régulateur négatif de l'activation de l'inflammasome et la promotion du phénotype anti-inflammatoire du macrophage dans ces pathologies pourrait ainsi être étudiée. Nous avons d'ailleurs déjà démontré l'impact systémique favorable de l'administration de MFG-E8, par la promotion d'un phénotype monocytaire anti-inflammatoire (résultats non publiés, voir **annexe 2B**). Ainsi, dans la pathologie auto-immune de l'arthrite rhumatoïde par exemple, on pourrait envisager le potentiel thérapeutique du MFG-E8 dans la régulation négative du phénotype pro-inflammatoire du monocyte/macrophage, néfaste notamment de par leur production de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6. En effet, bien que la pathologie soit davantage associée à la production auto-anticorps favorisée par l'activation dysfonctionnelle des cellules T suivant leur stimulation par l'antigène « étranger » présenté par les APCs, on reconnaît maintenant le rôle crucial de l'apport inflammatoire macrophagien. Ainsi, au-delà des stratégies visant la neutralisation de TNF $\alpha$ , les antagonistes des récepteurs IL-1 et IL-6 ainsi que les stratégies plus élaborées telles que prévention du signal de costimulation par la liaison des récepteurs CD80/CD86 et CD28 ou l'utilisation d'anti-CD20, promouvoir la présence du MFG-E8 favorisait d'un même front l'inhibition de la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Cependant, dû au caractère immunosuppresseur de cette stratégie, des complications telles que des infections pouvant mener à un sepsis fatal forcent un suivi des plus rigoureux. En utilisant un modèle murin d'arthrite rhumatoïde, des études ont démontré l'implication de l'activation de l'inflammasome dans le développement de la pathologie, renforçant l'hypothèse du potentiel bénéfique du MFG-E8 dans cette condition inflammatoire. Ce potentiel bénéfique du MFG-E8 pourrait aussi bien s'étendre à l'ostéoarthrite. En effet, dans l'articulation, l'implication néfaste d'IL-1 $\beta$  a été démontrée dans la réduction de la synthèse de protéoglycan, l'augmentation de la synthèse de MMPs de même que la relâche de

NO par les chondrocytes, menant à la perte de cartilage induite par l'inflammation. D'ailleurs, contrairement aux souris déficientes en TNF $\alpha$ , les souris déficientes en IL-1 $\beta$  sont protégées de cette manifestation pathologique. Ainsi, via la régulation négative par MFG-E8 de la production d'IL-1 $\beta$ , MFG-E8 pourrait avoir un potentiel bénéfique dans la pathologie de l'ostéoarthritis.

La dérégulation de l'activation de l'inflammasome a également été impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires associées à la production excessive d'IL-18.<sup>407</sup> En effet, parmi celles-ci se retrouvent quelques pathologies aussi associées à la production excessive d'IL-1 $\beta$  telles que le SLE, l'arthrite rhumatoïde et le diabète. Cependant, certaines pathologies inflammatoires telles que le psoriasis et la sclérose en plaques (MS – *Multiple Sclerosis*) sont davantage associées à la production excessive d'IL-18. En effet, un niveau élevé d'IL-18 est détecté dans les lésions psoriasiques de même que dans le sérum de ces patients.<sup>408-410</sup> Des modèles murins de MS (EAE- *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) ont également démontrés que les souris IL-18 KO sont résistantes à l'induction de l'EAE.<sup>411,412</sup> Ainsi, un rôle protecteur pour MFG-E8 dans ces pathologies pourrait aussi être envisagé et investigué.

En dehors de modèles inflammatoires stériles, la modulation de l'activation de l'inflammasome en réponse inflammatoire systémique à l'infection pourrait aussi être bénéfique. En effet, le sepsis se caractérise par la production dérégulée et prolongée de cytokines pro-inflammatoires engendre une cascade inflammatoire médiée notamment par le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8. Cette augmentation de cytokines pro-inflammatoires favorise le dommage capillaire et tissulaire menant à une perte fonctionnelle des organes et ultimement, au décès. Le sepsis s'illustre également par l'apoptose excessive et des études en modèle murin y ont déjà rapporté l'expression diminuée de MFG-E8, notamment dans la rate, le foie, les intestins et le sang.<sup>209</sup> L'inhibition de la production de MFG-E8 a lieu via une signalisation LPS dépendante de CD14 et du TLR4.<sup>197</sup> D'ailleurs, lors de sepsis, l'absence de CD14 et du TLR4 prévient la diminution de l'expression de MFG-E8. L'administration de MFG-E8 a déjà démontré ses effets bénéfiques dans la pathologie du sepsis par la promotion de la clairance des cellules apoptotiques, menant à une meilleure survie.<sup>205</sup> La promotion de la phagocytose des cellules apoptotiques par le MFG-E8 prévient l'entrée en nécrose secondaire de celles-ci et la relâche de molécules favorisant le dommage tissulaire telles que les HSPs et

le HMGB1. L'identification du rôle du MFG-E8 dans la régulation négative de l'activation de l'inflammasome et dans la promotion du phénotype anti-inflammatoire du macrophage pourrait ainsi aussi expliquer le potentiel bénéfique de MFG-E8. D'ailleurs, en sepsis, plusieurs études ont démontré l'effet protecteur associé à l'inhibition de l'activation de la Caspase-1. En effet, lors de choc septique induit par endotoxine, les souris Caspase-1 KO présentent un avantage de survie. De plus, les souris IL-1 $\beta$  et IL-18 KO ne sont pas protégées, suggérant qu'un autre médiateur dépendant de l'activation de la Caspase-1 soit impliqué dans le développement du sepsis.<sup>413</sup> À ce sujet, la relâche de HMGB1, hautement exprimé dans le sepsis, a été démontré comme étant dépendante de NLRP3, d'ASC ainsi que de la Caspase-1.<sup>414</sup> Curieusement, en stade précoce du sepsis, des échantillons sanguins de patients ont démontré une diminution de l'activation de la Caspase-1. Bien que ceci puisse suggérer la non pertinence de l'inactivation de la Caspase-1 comme cible thérapeutique, ces résultats peuvent s'expliquer par la gestion active du pathogène, menant à la pyroptose, diminuant ainsi la composante cellulaire et ainsi, le niveau d'expression global de la Caspase-1.

### **7.3.2 Au-delà du phénotype anti-inflammatoire: le phénotype réparateur**

Nous avons démontré que le MFG-E8 provenant de l'environnement apoptotique endothélial ou épithélial diminue l'insulte tissulaire obtenue dans un modèle *in vivo* de VCT et d'UUO. Dans ce dernier, nous avons également démontré que l'administration de macrophages programmés par le MFG-E8 est suffisante pour recréer l'effet de protection conféré par MFG-E8, via l'atténuation de l'activation de l'inflammasome rénal. Les monocytes/macrophages sont impliqués de l'initiation à la résolution de l'insulte tissulaire. Leur contribution peut s'illustrer par des rôles à l'apparence contradictoire de par le spectre de phénotypes fonctionnels possibles médiés par les médiateurs présents dans le microenvironnement de la phase où ils se trouvent.<sup>27,415-417</sup> La réparation tissulaire est un microenvironnement complexe dont la plasticité du phénotype du macrophage va bien au-delà de la dichotomie M1/M2. Les médiateurs responsables de la régulation phénotypique *in vivo* du macrophage y sont très peu décrits. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la contribution du MFG-E8 dans ce contexte.

La réparation cutanée est un procédé qui requiert une réponse coordonnée de plusieurs types cellulaires, incluant les cellules endothéliales, les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules immunes.<sup>319,418-420</sup> Elle implique une succession de phases se chevauchant telles que la phase inflammatoire, la phase de prolifération ainsi que la phase de remodelage. La cinétique de chaque phase dépend de la sévérité de l'insulte et peut être influencée par des facteurs tels que l'infection, l'âge avancé ou le diabète.<sup>421-424</sup> La dérégulation du processus de réparation tissulaire peut mener à une fibrose tissulaire. La phase inflammatoire, débutant quelques heures après l'insulte, s'illustre notamment par le processus de thrombogenèse et par le recrutement de cellules inflammatoires incluant les neutrophiles, où l'accumulation est maximale au jour 1, et les monocytes, où l'accumulation de macrophages est maximale entre le jour 3 et le jour 10.<sup>425,426</sup> Ces accumulations cellulaires semblent suivre la même course du temps dans les modèles murins que chez l'humain, ce qui en fait de bons modèles pour l'étude de cette pathologie.<sup>427</sup> Cette étape, visant l'élimination des facteurs ayant initié l'insulte de même que les débris cellulaires et les tissus nécrotiques, est médiée par la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de ROS. La phase proliférative, quant à elle, vise à la prolifération et à la migration des kératinocytes pour une ré-épithélialisation de la plaie sur une matrice provisoire protectrice.<sup>428</sup> De plus, la prolifération des fibroblastes permet la déposition de cette matrice alors que la prolifération des cellules endothéliales favorise la néoangiogenèse visant le rétablissement de l'apport sanguin à la zone lésée.<sup>429</sup> Finalement, la phase de remodelage implique le remplacement de la matrice provisoire par une matrice plus durable et pour une aire de cicatrisation aussi petite que possible, l'apoptose des myofibroblastes et des cellules recrutées ainsi qu'une régression contrôlée de la vascularisation ramenant la densité capillaire au même niveau que celle retrouvée dans un tissu normal.<sup>429,430</sup> Les monocytes/macrophages jouent un rôle dans la progression du processus de réparation et leur implication dans l'orchestration d'une réparation tissulaire réussie est rapportée dans plusieurs publications.<sup>357,425,426,431,432</sup>

### *7.3.2.1 Le macrophage et la réparation tissulaire : la conversion de son phénotype et ses fonctions est un déterminant majeur pour la progression du processus de réparation*

Plusieurs études ont démontré l'importance du recrutement des monocytes circulants dans la promotion de l'accumulation des macrophages au niveau du tissu lésé. En effet,

l'insulte aiguë du tissu engendre l'influx rapide de neutrophiles suivi de l'augmentation du potentiel d'adhésion des monocytes circulants et de l'extravasation de ceux-ci dans l'espace interstitiel. La contribution des monocytes à l'infiltrat tissulaire s'illustre d'ailleurs par une diminution des monocytes circulants CCR2<sup>hi</sup>/Ly6C<sup>hi</sup> dans les 6 heures suivant l'injure.<sup>433</sup> Il a aussi été démontré que ce sont ces monocytes circulants, plutôt que les macrophages résidents, qui sont les premiers contributeurs à l'infiltrat inflammatoire.<sup>434</sup> Chez la souris, 2 sous-populations de monocytes peuvent être identifiées via l'expression élevée (monocytes pro-inflammatoires) ou basse (monocytes anti-inflammatoires) de Ly6C.<sup>387,435,436</sup> Chez l'humain, 3 sous-populations de monocytes peuvent être identifiées via l'expression de CD14 et de CD16 : pro-inflammatoires (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>), anti-inflammatoires (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) et intermédiaires (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>).<sup>387,437,438</sup> Le phénotype résultant des macrophages est grandement déterminé par les stimuli (ex. les cytokines, les DAMPs) présents dans le microenvironnement de destination.<sup>28,52,439,440</sup> Cependant, la contribution du phénotype du monocyte comme déterminant du phénotype du macrophage a aussi été suggérée.<sup>437</sup> Il a ainsi été démontré que les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> sont prédisposés aux fonctions inflammatoires et phagocytaires du macrophage, alors que les monocytes Ly6C<sup>low</sup> sont davantage prédisposés aux fonctions anti-inflammatoires et réparatives du macrophage.<sup>441</sup> Les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> sont ainsi les premiers infiltrants du tissu injurié et, au fil du processus de réparation, sont graduellement remplacés par les monocytes/macrophages Ly6C<sup>low</sup>.<sup>361,421,433,441-445</sup>

En phase inflammatoire, les fonctions principales du macrophage sont l'élimination des débris nécrotiques et des cellules apoptotiques.<sup>446-448</sup> La phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages est un élément important dans l'homéostasie tissulaire.<sup>448</sup> Le macrophage priorise cependant la gestion des pathogènes par une réponse inflammatoire prononcée avant la clairance des cellules apoptotiques. Puisqu'elle mène à une repolarisation anti-inflammatoire (M2), la phagocytose contribue à la résolution de la phase inflammatoire et favorise la transition à la phase proliférative.<sup>449-452</sup> De plus, en phase inflammatoire, les monocytes/macrophages favorisent la réparation épithéliale. En effet, les cytokines pro-inflammatoires produites telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-6 ont démontré leur potentiel bénéfique sur la régulation de la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes.<sup>453-457</sup> Les macrophages de cette phase ne reflètent cependant pas totalement le phénotype M1.<sup>458,459</sup> En



effet, les macrophages de cette phase expriment un niveau élevé d'Arginase-1 et de Ym-1, deux protéines davantage associées au phénotype M2, connues pour favoriser la production de collagène, la migration et la prolifération cellulaire.<sup>415,460-462</sup> Ces macrophages produisent également le VEGF, aussi associé au profil phénotypique M2, favorisant ainsi la formation du tissu de granulation et la néoangiogenèse.<sup>433</sup> Malheureusement, ces subtilités d'intérêt ne sont pas prises en considération lors des études *in vitro* visant l'investigation du concept de reprogrammation du macrophage en réparation tissulaire. Des macrophages activés par l'IFN $\gamma$  et le LPS ne représentent ainsi aucunement le macrophage de phase inflammatoire et ces conditions ne reflètent définitivement pas le microenvironnement de la réparation tissulaire.<sup>459</sup> Plusieurs études ont démontré que la déplétion du macrophage en phase inflammatoire nuit au processus de réparation tissulaire.<sup>421,426</sup> Cette déplétion affecte également le niveau de collagène, où à la fois l'ARNm et le niveau protéique du collagène sont diminués.<sup>463</sup> La présence de collagène serait ainsi contrôlée par les macrophages de phase inflammatoire plutôt que les macrophages des phases ultérieures.

Au fil du déclin de la phase inflammatoire et de la progression de la phase de prolifération, l'expression des cytokines inflammatoires est diminuée alors que celle des cytokines anti-inflammatoires, telles que le TGF $\beta$ , l'IL-10 et l'*Insulin-like Growth Factor -1* (IGF-1), est augmentée.<sup>421,433,444,460</sup> Ce changement de polarisation du microenvironnement tissulaire peut s'expliquer notamment, comme mentionné précédemment, par la reprogrammation du macrophage obtenu à la suite de la phagocytose de cellules apoptotiques. La déplétion des macrophages en phase de prolifération démontre que ces macrophages anti-inflammatoires favorisent la prolifération des cellules endothéliales et sont essentiels dans l'initiation de la transition du tissu de granulation à la cicatrisation.<sup>426</sup> Dans plusieurs modèles de réparation tissulaire, il est souvent rapporté que la déplétion de macrophage en phase de prolifération réduit la fibrose, suggérant que les macrophages sont profibrotiques. Les macrophages anti-inflammatoires n'induisent cependant pas nécessairement directement la fibrogenèse. Toutefois, il existe des macrophages anti-inflammatoires au potentiel profibrotique plus grand, les macrophages profibrotiques. Ces macrophages sont une source majeure de cytokines profibrotiques telles que le TGF $\beta$  et relâchent notamment la fibronectine, favorisant la prolifération des fibroblastes.<sup>464,465</sup> Ils sont souvent associés au

facteur de transcription STAT6, en comparaison aux macrophages anti-inflammatoires associés au facteur de transcription STAT3. Cependant, en culture, les macrophages M2 anti-inflammatoires ou profibrotiques augmentent tous deux la production de collagène par les fibroblastes via leur production de TGF $\beta$ .<sup>464</sup> La contribution exacte du phénotype *in vivo* anti-inflammatoire vs profibrotique à la déposition du collagène et à la maturation tissulaire demeure inexplorée.

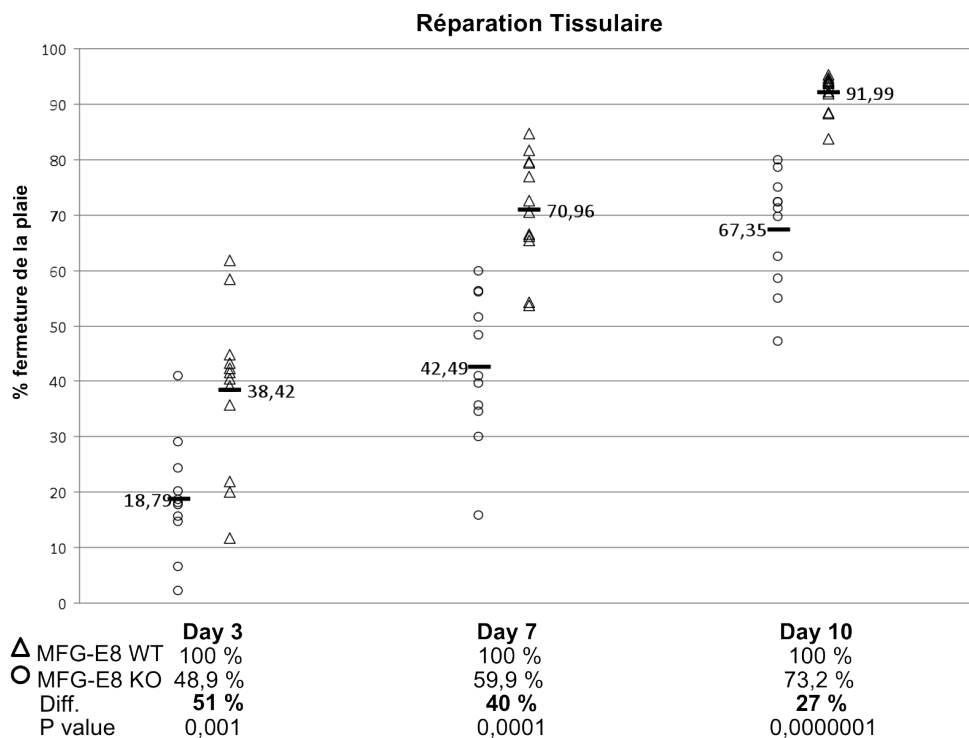
### 7.3.2.2 Le rôle du MFG-E8 dans la réparation tissulaire : des résultats préliminaires d'intérêt

Afin d'évaluer le rôle du MFG-E8 dans un modèle de réparation tissulaire, nous avons opté pour le modèle de réparation de plaies cutanées (*wound healing*). Ce modèle implique une succession d'événements tels que l'infiltration de neutrophiles (jour 1), l'infiltration de macrophages et la création du tissu de granulation (jour 3), l'achèvement de ce tissu avec collagène, fibroblaste et l'initiation d'angiogenèse (jour 7), la fermeture de la plaie (jour 10) et la cicatrisation (jour 14). Nous avons effectué des biopsies à l'emporte-pièce sur des souris MFG-E8 KO vs WT. Nos résultats préliminaires démontrent que l'absence de MFG-E8 nuit à la fermeture de la plaie (résultats non publiés, voir **figure 7**). Les mécanismes responsables de cette modification sont encore à l'étude.

### 7.3.2.3 Le MFG-E8 comme outil thérapeutique dans la réparation tissulaire : hypothèses et mécanistique potentielle

La présence du MFG-E8 dans l'environnement tissulaire suivant l'insulte cutanée est favorable à la fermeture de la plaie, suggérant son implication dans le succès de la réparation tissulaire. Le mécanisme responsable de cet effet bénéfique n'a pas été démontré, mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées. En phase inflammatoire, aucun médiateur expliquant la favorabilité de la reprogrammation phénotypique du macrophage n'a été identifié jusqu'à maintenant. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le MFG-E8 pourrait être impliqué dans la conversion *in situ* du phénotype des monocytes/macrophages pro-inflammatoires en anti-inflammatoires (Ly6C<sup>hi</sup> en Ly6C<sup>low</sup>), favorisant la transition en phase de prolifération. De plus, MFG-E8 pourrait jouer un rôle crucial dans l'élimination des débris cellulaires et dans la phagocytose des cellules apoptotiques, suggérant que le MFG-E8, via la promotion de la phagocytose, favorise la transition de la phase inflammatoire à la phase de

prolifération. Le rôle de MFG-E8 dans la promotion de la néoangiogenèse a déjà été démontré.<sup>466</sup> En phase de prolifération, MFG-E8 pourrait jouer un rôle crucial dans la vascularisation et son implication favorable à celle-ci a récemment été suggérée.<sup>254</sup> Finalement, en phase de remodelage, il a été démontré dans un modèle de fibrose hépatique réversible que les macrophages associés à cette phase présentent un phénotype post-phagocytose et que ce phénotype réparateur/fibrolytique est favorable à la dégradation matricielle.<sup>357,467</sup> Ainsi, promouvoir ce phénotype *in vivo* par l'administration de liposomes et de MFG-E8 pourrait favoriser le phénotype réparateur/fibrolytique du macrophage et accélérer la résolution de la fibrose. L'implication bénéfique du MFG-E8 au microenvironnement inflammatoire pourrait ainsi s'expliquer, d'une part, par la modulation phénotypique des macrophages (reprogrammation anti-inflammatoire), mais aussi par son rôle dans la promotion de l'angiogenèse et dans la promotion du phénotype fibrolytique du macrophage favorisant la résolution de la fibrose.



**Figure 7: L'absence de MFG-E8 nuit à la fermeture de la plaie.**

La fermeture de la plaie est inférieure chez les souris MFG-E8 KO vs WT au jour 3, 7 et 10 suivant la biopsie à l'emporte-pièce. Les résultats mis en graphique représentent le pourcentage de fermeture de la plaie en référence à l'aire initiale de la plaie. Dans le tableau inférieur, le pourcentage de fermeture de la plaie chez les souris WT a été normalisé à 100% en référence à une réparation tissulaire normale.

Reflétant potentiellement les mécanismes précédemment identifiés dans le modèle de l'UUO, la possibilité de la modulation de l'activation de l'inflammasome par le MFG-E8 pourrait être envisagée. MFG-E8 pourrait être impliqué dans la modulation de l'activation de l'inflammasome des macrophages, favorisant la reprogrammation phénotypique menant à la transition entre la phase inflammatoire et proliférative, mais pourrait aussi être impliqué dans la modulation de l'activation de l'inflammasome des cellules épithéliales et des cellules endothéliales. Peu d'études ont démontré l'implication de l'inflammasome dans la réparation tissulaire cutanée. Dans un modèle de réparation de plaies cutanées, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  a été rapportée comme étant maximale au jour 1 alors qu'elle décline au jour 3, coïncidant avec l'apparition des macrophages. Les souris au récepteur IL-1 KO présentent d'ailleurs une fermeture de plaies accélérée. L'expression d'IL-18 est associée à une augmentation de la sécrétion de TGF $\beta$  et d'IFN $\gamma$  par les cellules inflammatoires. La sécrétion d'IL-18 est maximale au jour 5 et revient à la normale au jour 13. La présence de macrophages ne semble ainsi pas modifier le niveau d'IL-18 cutané, reflet de la littérature rénale. Utilisant des souris NLRP3 KO et Caspase-1 KO, une étude récente a démontré chez celles-ci un niveau de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  diminué comparé au souris WT et présentent une accumulation réduite de neutrophiles et de macrophages.<sup>468</sup> Cependant, le processus de réparation tissulaire des souris NLRP3 KO ou Caspase-1 KO, s'illustrant par la ré-épithélialisation, la formation du tissu de granulation et l'angiogenèse, sont retardés en comparaison aux souris WT, suggérant que la voie de signalisation de NLRP3 est importante en première phase de réparation tissulaire. Investigant davantage sa mécanistique, une récente étude a démontré que l'activité de la Caspase-1 est régulée par la voie de signalisation NF $\kappa$ B. D'ailleurs, l'inhibition de l'activation de NF $\kappa$ B supprime les effets négatifs de l'activation de la Caspase-1 dans la réparation tissulaire.<sup>469</sup> Dans le diabète, la réparation tissulaire ordonnée est compromise. Dans celle-ci, quelques études ont associé la persistance de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages de la peau, contribuant à l'insuccès de cette réparation tissulaire. L'utilisation d'inhibiteur de l'activation de l'inflammasome induit une reprogrammation du macrophage pro-inflammatoire en phénotype réparateur, menant à la production de facteurs de croissance favorisant la guérison et suggérant ainsi la polarisation des macrophages comme outil thérapeutique potentiel.<sup>470</sup>

#### 7.3.2.4 La polarisation des macrophages comme outil thérapeutique en réparation tissulaire : une stratégie envisageable ?

La dérégulation du phénotype du macrophage et de ses fonctions peut mener à l'échec de la réparation tissulaire. Par exemple, dans le diabète, les macrophages présentent un phénotype prolongé pro-inflammatoire s'illustrant par une production soutenue d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  affectant négativement la réparation tissulaire.<sup>421,422,471</sup> Le blocage de ces cytokines accélère le processus de réparation tissulaire. Dans cette pathologie, les macrophages présentent un potentiel de phagocytose diminué et l'accumulation de cellules nécrotiques contribue à l'échec de la réparation tissulaire.<sup>472</sup> On pourrait ainsi émettre l'hypothèse que la promotion d'une reprogrammation anti-inflammatoire du macrophage, par le MFG-E8 par exemple, pourrait être bénéfique dans ce contexte. Cependant, une réparation tissulaire dérégulée n'est pas toujours associée au phénotype pro-inflammatoire. En effet, dans le cas d'une reprogrammation anti-inflammatoire prématurée du macrophage, l'accomplissement fonctionnel de la phase inflammatoire est ainsi compromis et la progression normale du processus de réparation tissulaire l'est tout autant.

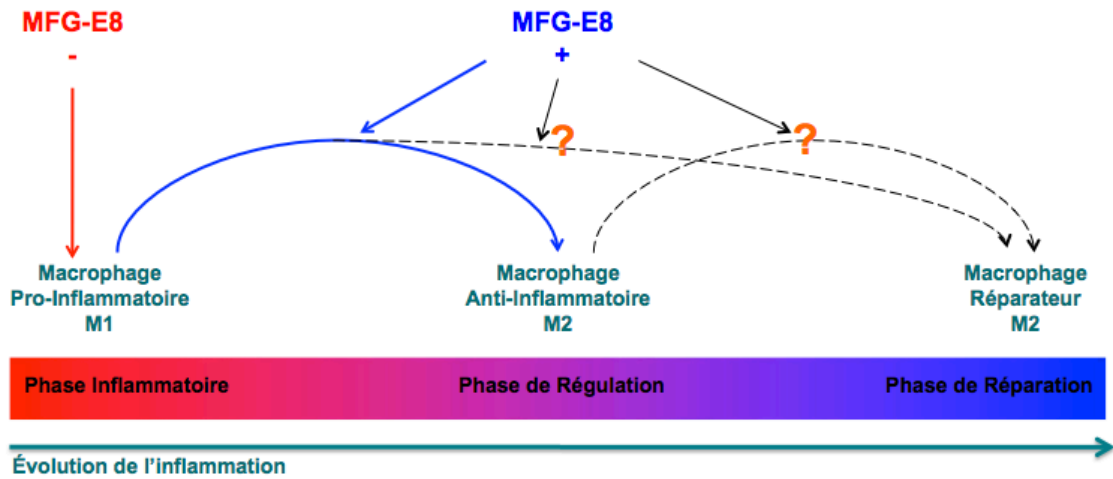
Le phénotype optimal pour la promotion de la réparation tissulaire dépendant de la phase de réparation et pouvant varier selon les microenvironnements tissulaires, l'utilisation d'une thérapeutique basée sur la manipulation phénotypique des macrophages pourrait être jugée comme trop complexe. Toutefois, puisque le macrophage joue un rôle crucial dans l'orchestration de la réparation tissulaire, les efforts pour l'investigation de celui-ci comme outil thérapeutique sont d'une pertinence incontestable et doivent être investis. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a investigué le potentiel de programmation *ex vivo* du macrophage et l'administration de ceux-ci dans la promotion d'une réparation tissulaire réussie. Cependant, dans un modèle murin, l'administration locale de macrophages péritonéaux démontre une fermeture accélérée de la plaie cutanée.<sup>473</sup> Chez l'humain, la réponse à la thérapie cellulaire macrophagique a également été rapportée, suggérant le potentiel thérapeutique de celle-ci.<sup>474-</sup>

476

## Conclusion

Cette thèse présente la première description de la relâche Caspase-3-dépendante de MFG-E8 par les cellules apoptotiques. Elle démontre également l'importance du MFG-E8 dans le microenvironnement apoptotique inflammatoire dans l'atténuation du phénotype pro-inflammatoire cytotoxique du macrophage. De plus, nous avons démontré son rôle protecteur dans des modèles *in vivo* de VCT et de réparation tissulaire, de même que dans un modèle *in vivo* de maladie rénale chronique (UUO) où nous avons démontré que cette protection conférée par MFG-E8 est médiée par la régulation négative de l'activation de l'inflammasome tissulaire. Nos résultats suggèrent ainsi que le MFG-E8 pourrait être considéré comme un interrupteur inflammatoire.

Bien que la fenêtre thérapeutique puisse sembler limitante, une façon de cibler celle-ci pourrait être de déterminer en premier lieu la nature du phénotype macrophagien présent. Ainsi, en contexte inflammatoire où la dominance du macrophage de phénotype M1 est attribuée, le MFG-E8 pourrait permettre une (re)programmation pro-résolutive de l'inflammation en favorisant un phénotype M2. Toutefois, en situation de dominance du macrophage de phénotype M2, promouvoir la présence de MFG-E8 dans ce contexte pourrait être défavorable, de par le potentiel d'induction d'un phénotype pro-fibrotique. Ce modèle proposé est supporté par les conclusions tirées des deux manuscrits présentés dans cette thèse, mais également d'ébauches de plusieurs autres projets interrompus ou actuellement en cours. Cet apprentissage mène à de nouvelles interrogations sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la reprogrammation des macrophages induite par le MFG-E8 présent lors de transplantation d'organes, des maladies rénales ou d'insultes tissulaires, et pourrait être un tremplin vers un nouveau style de pratique médicale personnalisé au contexte inflammatoire présent au sein du microenvironnement tissulaire. Par le développement de stratégies thérapeutiques mieux planifiées, construites sur des analyses histopathologiques solides et interprétées avec discernement de même que sur la correspondance des paramètres phénotypiques systémiques, une thérapie ciblée visant la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire ordonnée serait ainsi à notre portée.



**Figure 8: MFG-E8 dans la modulation de la réponse inflammatoire.**

L'absence de MFG-E8 favorise le dommage tissulaire par la promotion d'une réponse inflammatoire chronique défavorable. L'administration de MFG-E8 permet une reprogrammation du monocyte/macrophage pro-inflammatoire en phénotype anti-inflammatoire, permettant la résolution de l'inflammation.

## Bibliographie

1. Laurentii N. Celsus AC. De Medicina. Florence 1478.
2. Nathan C. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nature immunology* 2008;9:695-8.
3. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:1-5.
4. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 2002;20:197-216.
5. Murray PJ, Smale ST. Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways. *Nature immunology* 2012;13:916-24.
6. Wilson MS, Elnekave E, Mentink-Kane MM, et al. IL-13 $\alpha$ 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:2941-51.
7. Ino T, Inomata M, Takayama E, Takigawa T. Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. *Cellular signalling* 2012;24:1150-62.
8. Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, et al. Immune dysregulation in TGF- $\beta$  1-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1994;153:1936-46.
9. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.
10. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$  1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-9.
11. Kratochvill F, Machacek C, Vogl C, et al. Tristetraprolin-driven regulatory circuit controls quality and timing of mRNA decay in inflammation. *Molecular systems biology* 2011;7:560.
12. Ruland J. Return to homeostasis: downregulation of NF- $\kappa$ B responses. *Nature immunology* 2011;12:709-14.
13. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 2007;447:972-8.
14. Barish GD, Yu RT, Karunasiri M, et al. Bcl-6 and NF- $\kappa$ B cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response. *Genes & development* 2010;24:2760-5.
15. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 2014;510:92-101.
16. Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Current opinion in immunology* 2006;18:49-53.
17. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science (New York, NY)* 2013;339:166-72.
18. Manderson AP, Kay JG, Hammond LA, Brown DL, Stow JL. Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNF $\alpha$ . *The Journal of cell biology* 2007;178:57-69.
19. Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science (New York, NY)* 2005;310:1492-5.
20. Murray RZ, Stow JL. Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking. *Frontiers in immunology* 2014;5:538.
21. De Matteis MA, Luini A. Exiting the Golgi complex. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008;9:273-84.



22. Hsu VW, Prekeris R. Transport at the recycling endosome. *Current opinion in cell biology* 2010;22:528-34.
23. Monteleone M, Stow JL, Schroder K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* 2015;74:213-8.
24. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 2008;132:818-31.
25. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature reviews Immunology* 2002;2:965-75.
26. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998;392:86-9.
27. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 2005;5:953-64.
28. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:787-95.
29. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 2003;3:23-35.
30. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006;124:263-6.
31. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 2002;23:549-55.
32. Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in cancer biology* 2008;18:349-55.
33. S. L. M. van Loon, A. I. P. M. Smits, A. Driessen-Mol, F. P. T. Baaijens and C. V. C. Bouten (2013). *The Immune Response in In Situ Tissue Engineering of Aortic Heart Valves, Calcific Aortic Valve Disease*, Dr. Elena Aikawa (Ed.), ISBN: 978-953-51-1150-4, InTech, DOI: 10.5772/54354. Available from: <http://www.intechopen.com/books/calcific-aortic-valve-disease/the-immune-response-in-in-situ-tissue-engineering-of-aortic-heart-valves>.
34. Lambrecht BN. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 2006;24:366-8.
35. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:66-75.
36. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science (New York, NY)* 1998;281:1191-3.
37. Mues B, Langer D, Zwadlo G, Sorg C. Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta. *Immunology* 1989;67:303-7.
38. Proceedings of the 2006 EMBO Workshop on Innate Danger Signals and HMGB1. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:1-136.
39. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current opinion in immunology* 2005;17:359-65.
40. Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma-associated inflammation. *Current opinion in critical care* 2006;12:595-601.
41. Yang D, Tewary P, de la Rosa G, Wei F, Oppenheim JJ. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2010;1799:157-63.
42. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Current opinion in immunology* 2001;13:114-9.

43. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO journal* 2012;31:1062-79.
44. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal* 2009;28:578-90.
45. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature medicine* 2007;13:54-61.
46. Xiang M, Fan J. Pattern recognition receptor-dependent mechanisms of acute lung injury. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2010;16:69-82.
47. Matzinger P, Kamala T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nature reviews Immunology* 2011;11:221-30.
48. Lipford GB, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends in microbiology* 1998;6:496-500.
49. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature reviews Immunology* 2014;14:546-58.
50. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology* 2003;21:335-76.
51. Kang JY, Lee JO. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annual review of biochemistry* 2011;80:917-41.
52. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 2010;11:373-84.
53. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 2007;7:353-64.
54. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews Immunology* 2007;7:179-90.
55. Yu M, Wang H, Ding A, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock (Augusta, Ga)* 2006;26:174-9.
56. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
57. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology* 2001;13:933-40.
58. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, NY)* 2004;303:1526-9.
59. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5.
60. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nature reviews Immunology* 2012;12:168-79.
61. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2005;5:969-75.
62. Liu G, Wu Y, Gong S, Zhao Y. Toll-like receptors and graft rejection. *Transplant immunology* 2006;16:25-31.
63. Bergler T, Hoffmann U, Bergler E, et al. Toll-like receptor 4 in experimental kidney transplantation: early mediator of endogenous danger signals. *Nephron Experimental nephrology* 2012;121:e59-70.

64. Kim BS, Lim SW, Li C, et al. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation* 2005;79:1370-7.
65. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science (New York, NY)* 1999;285:248-51.
66. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *The Journal of experimental medicine* 2005;201:1135-43.
67. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis and rheumatism* 2003;48:971-81.
68. Kokkola R, Li J, Sundberg E, et al. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis and rheumatism* 2003;48:2052-8.
69. Popovic K, Ek M, Espinosa A, et al. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 2005;52:3639-45.
70. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature reviews Immunology* 2005;5:331-42.
71. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports* 2002;3:995-1001.
72. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *The EMBO journal* 2003;22:5551-60.
73. Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group 1 protein (HMGB-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of experimental medicine* 2000;192:565-70.
74. Dumitriu IE, Bianchi ME, Bacci M, Manfredi AA, Rovere-Querini P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:84-91.
75. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:59-66.
76. Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends in immunology* 2005;26:381-7.
77. Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nature reviews Rheumatology* 2012;8:195-202.
78. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *American journal of physiology Cell physiology* 2006;290:C917-24.
79. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:11942-7.
80. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2005;83:876-86.

81. Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999;97:889-901.
82. Hori O, Brett J, Slattery T, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:25752-61.
83. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:28-37.
84. Bianchi R, Adami C, Giambanco I, Donato R. S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:108-18.
85. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:15-27.
86. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *The Journal of biological chemistry* 2014;289:35237-45.
87. Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, Jonsson IM, Tarkowski A. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *Journal of leukocyte biology* 2004;75:995-1000.
88. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock (Augusta, Ga)* 2010;34:55-9.
89. West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual review of cell and developmental biology* 2006;22:409-37.
90. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516-21.
91. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237-41.
92. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews Immunology* 2010;10:89-102.
93. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77:1627-52.
94. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature medicine* 2007;13:851-6.
95. Hurgin V, Novick D, Werman A, Dinarello CA, Rubinstein M. Antiviral and immunoregulatory activities of IFN-gamma depend on constitutively expressed IL-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:5044-9.
96. Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Critical care medicine* 1993;21:839-45.
97. Dinarello CA. Anti-cytokine therapies in response to systemic infection. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 2001;6:244-50.
98. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature reviews Immunology* 2010;10:103-10.

99. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, et al. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 2009;183:6469-77.
100. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140:821-32.
101. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology* 2011;29:707-35.
102. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology* 2009;27:229-65.
103. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature immunology* 2012;13:325-32.
104. Bryan NB, Dorfleutner A, Rojanasakul Y, Stehlik C. Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 2009;182:3173-82.
105. Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *European journal of immunology* 2010;40:599-606.
106. Joosten LA, Netea MG, Fantuzzi G, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis and rheumatism* 2009;60:3651-62.
107. Irmeler M, Hertig S, MacDonald HR, et al. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *The Journal of experimental medicine* 1995;181:1917-22.
108. Maelfait J, Vercammen E, Janssens S, et al. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:1967-73.
109. Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, et al. Caspase-1 independent IL-1beta production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 2010;184:3326-30.
110. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* 2009;27:519-50.
111. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-88.
112. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* 2005;6:1123-32.
113. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer HD. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate immunity* 2014;20:115-25.
114. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews Microbiology* 2009;7:99-109.
115. Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nature immunology* 2010;11:404-10.
116. Taxman DJ, Huang MT, Ting JP. Inflammasome inhibition as a pathogenic stealth mechanism. *Cell host & microbe* 2010;8:7-11.
117. Stasakova J, Ferko B, Kittel C, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *The Journal of general virology* 2005;86:185-95.

118. Ray CA, Black RA, Kronheim SR, et al. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 1992;69:597-604.
119. Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews* 2011;243:206-14.
120. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 2011;479:117-21.
121. Shao W, Yeretssian G, Doiron K, Hussain SN, Saleh M. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:36321-9.
122. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature genetics* 2006;38:240-4.
123. Terra JK, Cote CK, France B, et al. Cutting edge: resistance to *Bacillus anthracis* infection mediated by a lethal toxin sensitive allele of Nalp1b/Nlrp1b. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010;184:17-20.
124. Chen S, Sun B. Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling. *Protein & cell* 2013;4:251-8.
125. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 2008;456:264-8.
126. Guarda G, Braun M, Staehli F, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 2011;34:213-23.
127. Stehlik C, Krajewska M, Welsh K, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. The PAAD/PYRIN-only protein POP1/ASC2 is a modulator of ASC-mediated nuclear-factor-kappa B and pro-caspase-1 regulation. *The Biochemical journal* 2003;373:101-13.
128. Lee SH, Stehlik C, Reed JC. Cop, a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:34495-500.
129. Bruey JM, Bruey-Sedano N, Luciano F, et al. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* 2007;129:45-56.
130. Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, Flavell RA. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:3235-45.
131. Lightfield KL, Persson J, Brubaker SW, et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nature immunology* 2008;9:1171-8.
132. Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature* 2011;477:592-5.
133. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004;430:213-8.
134. Munoz-Planillo R, Franchi L, Miller LS, Nunez G. A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009;183:3942-8.
135. Meixenberger K, Pache F, Eitel J, et al. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta, depending on listeriolysin O and NLRP3. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010;184:922-30.

136. Duncan JA, Gao X, Huang MT, et al. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009;182:6460-9.
137. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell host & microbe* 2009;5:487-97.
138. Allen IC, Scull MA, Moore CB, et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 2009;30:556-65.
139. Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, et al. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:12762-71.
140. Gasse P, Riteau N, Charron S, et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009;179:903-13.
141. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228-32.
142. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine* 2011;17:179-88.
143. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464:1357-61.
144. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* 2008;9:847-56.
145. Denoble AE, Huffman KM, Stabler TV, et al. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:2088-93.
146. Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular research* 2013;99:164-74.
147. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010;21:1732-44.
148. Wang W, Wang X, Chun J, et al. Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF-beta signaling in kidney epithelium. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2013;190:1239-49.
149. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2014;59:898-910.
150. Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERs, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nature reviews Immunology* 2006;6:183-95.
151. Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009;183:792-6.
152. Saxena M, Yeretssian G. NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Frontiers in immunology* 2014;5:327.

153. Dinarello CA. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer metastasis reviews* 2010;29:317-29.
154. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, et al. IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer research* 2011;71:5393-9.
155. Srivastava S, Salim N, Robertson MJ. Interleukin-18: biology and role in the immunotherapy of cancer. *Current medicinal chemistry* 2010;17:3353-7.
156. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nature immunology* 2012;13:343-51.
157. Youm YH, Adijiang A, Vandanmagsar B, Burk D, Ravussin A, Dixit VD. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology* 2011;152:4039-45.
158. Gasse P, Mary C, Guenon I, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:3786-99.
159. Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA, et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2009;296:G1248-57.
160. Gieling RG, Wallace K, Han YP. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2009;296:G1324-31.
161. Artlett CM, Sassi-Gaha S, Rieger JL, Boesteanu AC, Feghali-Bostwick CA, Katsikis PD. The inflammasome activating caspase 1 mediates fibrosis and myofibroblast differentiation in systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 2011;63:3563-74.
162. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011;123:594-604.
163. Platis A, Yu Q, Moore D, Khojeini E, Tsau P, Larson D. The effect of daily administration of IL-18 on cardiac structure and function. *Perfusion* 2008;23:237-42.
164. Xing SS, Tan HW, Bi XP, Zhong M, Zhang Y, Zhang W. Felodipine reduces cardiac expression of IL-18 and perivascular fibrosis in fructose-fed rats. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2008;14:395-402.
165. Fix C, Bingham K, Carver W. Effects of interleukin-18 on cardiac fibroblast function and gene expression. *Cytokine* 2011;53:19-28.
166. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging* 2012;4:330-49.
167. Jun JB, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Current opinion in rheumatology* 2003;15:756-60.
168. Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P, et al. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004;18:705-7.
169. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2005;174:5740-9.
170. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *The New England journal of medicine* 2003;348:1365-75.



171. Puck JM, Zhu S. Immune disorders caused by defects in the caspase cascade. *Current allergy and asthma reports* 2003;3:378-84.
172. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews Molecular cell biology* 2000;1:120-9.
173. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Experimental oncology* 2004;26:82-97.
174. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nature reviews Drug discovery* 2002;1:111-21.
175. Oshima K, Aoki N, Kato T, Kitajima K, Matsuda T. Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *European journal of biochemistry / FEBS* 2002;269:1209-18.
176. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002;417:182-7.
177. Oshima K, Aoki N, Negi M, Kishi M, Kitajima K, Matsuda T. Lactation-dependent expression of an mRNA splice variant with an exon for a multiply O-glycosylated domain of mouse milk fat globule glycoprotein MFG-E8. *Biochemical and biophysical research communications* 1999;254:522-8.
178. Burgess BL, Abrams TA, Nagata S, Hall MO. MFG-E8 in the retina and retinal pigment epithelium of rat and mouse. *Molecular vision* 2006;12:1437-47.
179. Aoki N, Ishii T, Ohira S, et al. Stage specific expression of milk fat globule membrane glycoproteins in mouse mammary gland: comparison of MFG-E8, butyrophilin, and CD36 with a major milk protein, beta-casein. *Biochimica et biophysica acta* 1997;1334:182-90.
180. Watanabe T, Totsuka R, Miyatani S, et al. Production of the long and short forms of MFG-E8 by epidermal keratinocytes. *Cell and tissue research* 2005;321:185-93.
181. Franchi A, Bocca S, Anderson S, Riggs R, Oehninger S. Expression of milk fat globule EGF-factor 8 (MFG-E8) mRNA and protein in the human endometrium and its regulation by prolactin. *Molecular human reproduction* 2011;17:360-71.
182. Aziz MM, Ishihara S, Rumi MA, et al. Prolactin induces MFG-E8 production in macrophages via transcription factor C/EBPbeta-dependent pathway. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2008;13:609-20.
183. Leonardi-Essmann F, Emig M, Kitamura Y, Spanagel R, Gebicke-Haerter PJ. Fractalkine-upregulated milk-fat globule EGF factor-8 protein in cultured rat microglia. *Journal of neuroimmunology* 2005;160:92-101.
184. Jinushi M, Nakazaki Y, Dougan M, Carrasco DR, Mihm M, Dranoff G. MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:1902-13.
185. Han X, Bolcato AL, Amar S. Identification of genes differentially expressed in cultured human osteoblasts versus human fibroblasts by DNA microarray analysis. *Connective tissue research* 2002;43:63-75.
186. Kranich J, Krautler NJ, Falsig J, et al. Engulfment of cerebral apoptotic bodies controls the course of prion disease in a mouse strain-dependent manner. *The Journal of experimental medicine* 2010;207:2271-81.
187. Miyasaka K, Hanayama R, Tanaka M, Nagata S. Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. *European journal of immunology* 2004;34:1414-22.

188. Fuller AD, Van Eldik LJ. MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 2008;3:246-56.
189. Bu HF, Zuo XL, Wang X, et al. Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:3673-83.
190. Matsuda A, Jacob A, Wu R, Zhou M, Aziz M, Wang P. Milk fat globule--EGF factor VIII ameliorates liver injury after hepatic ischemia-reperfusion. *The Journal of surgical research* 2013;180:e37-46.
191. Yamaguchi H, Fujimoto T, Nakamura S, et al. Aberrant splicing of the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus. *European journal of immunology* 2010;40:1778-85.
192. Nakatani H, Aoki N, Nakagawa Y, et al. Weaning-induced expression of a milk-fat globule protein, MFG-E8, in mouse mammary glands, as demonstrated by the analyses of its mRNA, protein and phosphatidylserine-binding activity. *The Biochemical journal* 2006;395:21-30.
193. Miksa M, Amin D, Wu R, Ravikumar TS, Wang P. Fractalkine-induced MFG-E8 leads to enhanced apoptotic cell clearance by macrophages. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2007;13:553-60.
194. Mukundan L, Odegaard JI, Morel CR, et al. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nature medicine* 2009;15:1266-72.
195. He GL, Liu Y, Li M, et al. The amelioration of phagocytic ability in microglial cells by curcumin through the inhibition of EMF-induced pro-inflammatory responses. *Journal of neuroinflammation* 2014;11:49.
196. Miksa M, Amin D, Wu R, et al. Maturation-induced down-regulation of MFG-E8 impairs apoptotic cell clearance and enhances endotoxin response. *International journal of molecular medicine* 2008;22:743-8.
197. Komura H, Miksa M, Wu R, Goyert SM, Wang P. Milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII is down-regulated in sepsis via the lipopolysaccharide-CD14 pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009;182:581-7.
198. Yu F, Li BY, Li XL, et al. Proteomic analysis of aorta and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice reveal a critical role of milk fat globule epidermal growth factor-8 in diabetic arterial damage. *PloS one* 2012;7:e52541.
199. Goldberg GS, Bechberger JF, Tajima Y, et al. Connexin43 suppresses MFG-E8 while inducing contact growth inhibition of glioma cells. *Cancer research* 2000;60:6018-26.
200. Wang X, Bu HF, Zhong W, Asai A, Zhou Z, Tan XD. MFG-E8 and HMGB1 are involved in the mechanism underlying alcohol-induced impairment of macrophage efferocytosis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2013;19:170-82.
201. Lauber K, Keppeler H, Munoz LE, et al. Milk fat globule-EGF factor 8 mediates the enhancement of apoptotic cell clearance by glucocorticoids. *Cell death and differentiation* 2013;20:1230-40.
202. Yamaguchi H, Takagi J, Miyamae T, et al. Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *Journal of leukocyte biology* 2008;83:1300-7.

203. Aziz MM, Ishihara S, Mishima Y, et al. MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009;182:7222-32.
204. Zhao QJ, Yu YB, Zuo XL, Dong YY, Li YQ. Milk fat globule-epidermal growth factor 8 is decreased in intestinal epithelium of ulcerative colitis patients and thereby causes increased apoptosis and impaired wound healing. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2012;18:497-506.
205. Shah KG, Wu R, Jacob A, et al. Recombinant human milk fat globule-EGF factor 8 produces dose-dependent benefits in sepsis. *Intensive care medicine* 2012;38:128-36.
206. Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, et al. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. *Circulation* 2007;115:2168-77.
207. Thorp E, Tabas I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *Journal of leukocyte biology* 2009;86:1089-95.
208. Cui T, Miksa M, Wu R, et al. Milk fat globule epidermal growth factor 8 attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia and reperfusion. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;181:238-46.
209. Matsuda A, Jacob A, Wu R, et al. Milk fat globule-EGF factor VIII in sepsis and ischemia-reperfusion injury. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2011;17:126-33.
210. Boddaert J, Kinugawa K, Lambert JC, et al. Evidence of a role for lactadherin in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 2007;170:921-9.
211. Li E, Noda M, Doi Y, et al. The neuroprotective effects of milk fat globule-EGF factor 8 against oligomeric amyloid beta toxicity. *Journal of neuroinflammation* 2012;9:148.
212. Chogle A, Bu HF, Wang X, Brown JB, Chou PM, Tan XD. Milk fat globule-EGF factor 8 is a critical protein for healing of dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2011;17:502-7.
213. Kudo M, Khalifeh Soltani SM, Sakuma SA, et al. Mfge8 suppresses airway hyperresponsiveness in asthma by regulating smooth muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:660-5.
214. Larocca D, Peterson JA, Urrea R, Kuniyoshi J, Bistrain AM, Ceriani RL. A Mr 46,000 human milk fat globule protein that is highly expressed in human breast tumors contains factor VIII-like domains. *Cancer research* 1991;51:4994-8.
215. Taylor MR, Couto JR, Scallan CD, Ceriani RL, Peterson JA. Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion. *DNA and cell biology* 1997;16:861-9.
216. Oba J, Moroi Y, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Furue M. Expression of milk fat globule epidermal growth factor-VIII may be an indicator of poor prognosis in malignant melanoma. *The British journal of dermatology* 2011;165:506-12.
217. Jinushi M, Nakazaki Y, Carrasco DR, et al. Milk fat globule EGF-8 promotes melanoma progression through coordinated Akt and twist signaling in the tumor microenvironment. *Cancer research* 2008;68:8889-98.
218. Tibaldi L, Leyman S, Nicolas A, et al. New blocking antibodies impede adhesion, migration and survival of ovarian cancer cells, highlighting MFGE8 as a potential therapeutic target of human ovarian carcinoma. *PloS one* 2013;8:e72708.

219. Soki FN, Koh AJ, Jones JD, et al. Polarization of prostate cancer-associated macrophages is induced by milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8)-mediated efferocytosis. *The Journal of biological chemistry* 2014;289:24560-72.
220. Wu Z, Boonmars T, Nagano I, et al. Milk fat globule epidermal growth factor 8 serves a novel biomarker of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014;35:1985-95.
221. D'Haese JG, Demir IE, Kehl T, et al. The impact of MFG-E8 in chronic pancreatitis: potential for future immunotherapy? *BMC gastroenterology* 2013;13:14.
222. Hu CY, Wu CS, Tsai HF, Chang SK, Tsai WI, Hsu PN. Genetic polymorphism in milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) is associated with systemic lupus erythematosus in human. *Lupus* 2009;18:676-81.
223. Akakura S, Singh S, Spataro M, et al. The opsonin MFG-E8 is a ligand for the alphavbeta5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Experimental cell research* 2004;292:403-16.
224. Kranich J, Krautler NJ, Heinen E, et al. Follicular dendritic cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:1293-302.
225. Baghdadi M, Chiba S, Yamashina T, Yoshiyama H, Jinushi M. MFG-E8 regulates the immunogenic potential of dendritic cells primed with necrotic cell-mediated inflammatory signals. *PloS one* 2012;7:e39607.
226. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science (New York, NY)* 2004;304:1147-50.
227. Peng Y, Elkon KB. Autoimmunity in MFG-E8-deficient mice is associated with altered trafficking and enhanced cross-presentation of apoptotic cell antigens. *The Journal of clinical investigation* 2011;121:2221-41.
228. Kruse K, Janko C, Urbonaviciute V, et al. Inefficient clearance of dying cells in patients with SLE: anti-dsDNA autoantibodies, MFG-E8, HMGB-1 and other players. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2010;15:1098-113.
229. Asano K, Miwa M, Miwa K, et al. Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice. *The Journal of experimental medicine* 2004;200:459-67.
230. Kusunoki R, Ishihara S, Aziz M, Oka A, Tada Y, Kinoshita Y. Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation. *Digestion* 2012;85:103-7.
231. Wu R, Dong W, Wang Z, Jacob A, Cui T, Wang P. Enhancing apoptotic cell clearance mitigates bacterial translocation and promotes tissue repair after gut ischemia-reperfusion injury. *International journal of molecular medicine* 2012;30:593-8.
232. Wu R, Chaung WW, Zhou M, et al. Milk fat globule EGF factor 8 attenuates sepsis-induced apoptosis and organ injury in alcohol-intoxicated rats. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2010;34:1625-33.
233. Fens MH, Mastrobattista E, de Graaff AM, et al. Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells. *Blood* 2008;111:4542-50.
234. Zhang F, Shah KG, Qi L, et al. Milk fat globule epidermal growth factor-factor 8 mitigates inflammation and tissue injury after hemorrhagic shock in experimental animals. *The journal of trauma and acute care surgery* 2012;72:861-9.

235. Atabai K, Fernandez R, Huang X, et al. Mfge8 is critical for mammary gland remodeling during involution. *Molecular biology of the cell* 2005;16:5528-37.
236. Nandrot EF, Anand M, Almeida D, Atabai K, Sheppard D, Finnemann SC. Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:12005-10.
237. Gao C, Xie R, Li W, et al. Endothelial cell phagocytosis of senescent neutrophils decreases procoagulant activity. *Thrombosis and haemostasis* 2013;109:1079-90.
238. Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 2005;437:754-8.
239. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, et al. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 2009;113:1332-9.
240. Atabai K, Jame S, Azhar N, et al. Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages. *The Journal of clinical investigation* 2009;119:3713-22.
241. Friggeri A, Yang Y, Banerjee S, Park YJ, Liu G, Abraham E. HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the alphavbeta3-integrin. *American journal of physiology Cell physiology* 2010;299:C1267-76.
242. Ensslin MA, Shur BD. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* 2003;114:405-17.
243. Schmitz C, Yu L, Bocca S, et al. Role for the endometrial epithelial protein MFG-E8 and its receptor integrin alphavbeta3 in human implantation: results of an in vitro trophoblast attachment study using established human cell lines. *Fertility and sterility* 2014;101:874-82.
244. Bocca SM, Anderson S, Amaker B, et al. Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8): a novel protein in the mammalian endometrium with putative roles in implantation and placentation. *Placenta* 2012;33:795-802.
245. Raymond AS, Shur BD. A novel role for SED1 (MFG-E8) in maintaining the integrity of the epididymal epithelium. *Journal of cell science* 2009;122:849-58.
246. Raymond AS, Elder B, Ensslin M, Shur BD. Loss of SED1/MFG-E8 results in altered luminal physiology in the epididymis. *Molecular reproduction and development* 2010;77:550-63.
247. Ensslin MA, Shur BD. The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:2715-20.
248. Abe T, Shin J, Hosur K, Udey MC, Chavakis T, Hajishengallis G. Regulation of osteoclast homeostasis and inflammatory bone loss by MFG-E8. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2014;193:1383-91.
249. Hajishengallis G. MFG-E8, a novel homeostatic regulator of osteoclastogenesis. *Inflammation and cell signaling* 2014;1:e285.
250. Newburg DS, Peterson JA, Ruiz-Palacios GM, et al. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet (London, England)* 1998;351:1160-4.
251. Kvistgaard AS, Pallesen LT, Arias CF, et al. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *Journal of dairy science* 2004;87:4088-96.

252. Liu F, Hu Q, Li B, et al. Recombinant milk fat globule-EGF factor-8 reduces oxidative stress via integrin beta3/nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2014;45:3691-7.
253. Cheyuo C, Aziz M, Yang WL, Jacob A, Zhou M, Wang P. Milk Fat Globule-EGF Factor VIII Attenuates CNS Injury by Promoting Neural Stem Cell Proliferation and Migration after Cerebral Ischemia. *PloS one* 2015;10:e0122833.
254. Uchiyama A, Yamada K, Perera B, et al. Protective Effect of MFG-E8 after Cutaneous Ischemia-Reperfusion Injury. *The Journal of investigative dermatology* 2014.
255. Aziz M, Matsuda A, Yang WL, Jacob A, Wang P. Milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 attenuates neutrophil infiltration in acute lung injury via modulation of CXCR2. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2012;189:393-402.
256. Aziz M, Jacob A, Matsuda A, et al. Pre-treatment of recombinant mouse MFG-E8 downregulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages via STAT3-mediated SOCS3 activation. *PloS one* 2011;6:e27685.
257. Deroide N, Li X, Lerouet D, et al. MFG-E8 inhibits inflammasome-induced IL-1beta production and limits postischemic cerebral injury. *The Journal of clinical investigation* 2013;123:1176-81.
258. Vaughan ED, Jr., Marion D, Poppas DP, Felsen D. Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York. *The Journal of urology* 2004;172:2563-9.
259. Seikaly MG, Ho PL, Emmett L, Fine RN, Tejani A. Chronic renal insufficiency in children: the 2001 Annual Report of the NAPRTCS. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 2003;18:796-804.
260. Chevalier RL. Counterbalance in functional adaptation to ureteral obstruction during development. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 1990;4:442-4.
261. Chevalier RL, Kim A, Thornhill BA, Wolstenholme JT. Recovery following relief of unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat. *Kidney international* 1999;55:793-807.
262. Chevalier RL, Thornhill BA, Chang AY. Unilateral ureteral obstruction in neonatal rats leads to renal insufficiency in adulthood. *Kidney international* 2000;58:1987-95.
263. Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Fitzpatrick JM, Watson RW. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction. *American journal of physiology Renal physiology* 2006;290:F4-13.
264. Forbes MS, Thornhill BA, Minor JJ, Gordon KA, Galarreta CI, Chevalier RL. Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis. *American journal of physiology Renal physiology* 2012;303:F120-9.
265. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 2002;110:341-50.
266. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2008;19:2282-7.
267. Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *The American journal of pathology* 2008;173:1617-27.

268. Puri TS, Shakaib MI, Chang A, et al. Chronic kidney disease induced in mice by reversible unilateral ureteral obstruction is dependent on genetic background. *American journal of physiology Renal physiology* 2010;298:F1024-32.
269. Si H, Banga RS, Kapitsinou P, et al. Human and murine kidneys show gender- and species-specific gene expression differences in response to injury. *PLoS one* 2009;4:e4802.
270. Quinlan MR, Cronin P, Daly PJ, et al. A gender comparison of postobstructive injury in the rat kidney. *Kidney & blood pressure research* 2010;33:266-73.
271. Steinhardt G, Salinas-Madrigal L, Farber R, Lynch R, Vogler G. Experimental ureteral obstruction in the fetal opossum. I. Renal functional assessment. *The Journal of urology* 1990;144:564-6; discussion 93-4.
272. Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 1994;8:175-80.
273. Miner JH, Sanes JR. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *The Journal of cell biology* 1996;135:1403-13.
274. Zeisberg M, Khurana M, Rao VH, et al. Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS medicine* 2006;3:e100.
275. Gross O, Girgert R, Beirowski B, et al. Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2010;29:346-56.
276. Gross O, Beirowski B, Koepke ML, et al. Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney international* 2003;63:438-46.
277. Cao Q, Wang Y, Zheng D, et al. IL-10/TGF-beta-modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010;21:933-42.
278. Kren S, Hostetter TH. The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney international* 1999;56:333-7.
279. Doi K, Okamoto K, Negishi K, et al. Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *The American journal of pathology* 2006;168:1413-24.
280. Schiller JS, Lucas JW, Ward BW, Peregoy JA. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2010. *Vital and health statistics Series 10, Data from the National Health Survey* 2012:1-207.
281. Udani S, Lazich I, Bakris GL. Epidemiology of hypertensive kidney disease. *Nature reviews Nephrology* 2011;7:11-21.
282. Maric-Bilkan C. Obesity and diabetic kidney disease. *The Medical clinics of North America* 2013;97:59-74.
283. Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB, Lopez-Hernandez FJ. Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacology & therapeutics* 2010;128:61-81.
284. Riegersperger M, Sunder-Plassmann G. How to prevent progression to end stage renal disease. *Journal of renal care* 2007;33:105-7.

285. Schmauss D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: recent developments. *Circulation* 2008;117:2131-41.
286. Behrendt D, Ganz P, Fang JC. Cardiac allograft vasculopathy. *Current opinion in cardiology* 2000;15:422-9.
287. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circulation research* 2006;99:801-15.
288. Weis M, von Scheidt W. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* 1997;96:2069-77.
289. Osto E, Tona F, De Bon E, Iliceto S, Cella G. Endothelial dysfunction in cardiac allograft vasculopathy: potential pharmacological interventions. *Current vascular pharmacology* 2010;8:169-88.
290. Valentine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation* 2003;76:891-9.
291. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2006;6:247-53.
292. Kushiyama T, Oda T, Yamada M, et al. Alteration in the phenotype of macrophages in the repair of renal interstitial fibrosis in mice. *Nephrology (Carlton, Vic)* 2011;16:522-35.
293. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, et al. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:8041-6.
294. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (New York, NY)* 2008;320:674-7.
295. Asgari E, Le Friec G, Yamamoto H, et al. C3a modulates IL-1beta secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood* 2013;122:3473-81.
296. Koehn BH, Apostolova P, Haverkamp JM, et al. GVHD-associated, inflammasome-mediated loss of function in adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 2015;126:1621-8.
297. Seto T, Kamijo S, Wada Y, et al. Upregulation of the apoptosis-related inflammasome in cardiac allograft rejection. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2010;29:352-9.
298. Shah KB, Mauro AG, Flattery M, Toldo S, Abbate A. Formation of the inflammasome during cardiac allograft rejection. *International journal of cardiology* 2015;201:328-30.
299. Abadja F, Sarraj B, Ansari MJ. Significance of T helper 17 immunity in transplantation. *Current opinion in organ transplantation* 2012;17:8-14.
300. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421:744-8.
301. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 2003;198:1951-7.
302. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2006;177:566-73.



303. Chung BH, Oh HJ, Piao SG, et al. Clinical significance of the ratio between FOXP3 positive regulatory T cell and interleukin-17 secreting cell in renal allograft biopsies with acute T-cell-mediated rejection. *Immunology* 2012;136:344-51.
304. Chung BH, Oh HJ, Piao SG, et al. Higher infiltration by Th17 cells compared with regulatory T cells is associated with severe acute T-cell-mediated graft rejection. *Experimental & molecular medicine* 2011;43:630-7.
305. Gorbacheva V, Fan R, Li X, Valujskikh A. Interleukin-17 promotes early allograft inflammation. *The American journal of pathology* 2010;177:1265-73.
306. van Besouw NM, Caliskan K, Peeters AM, et al. Interleukin-17-producing CD4(+) cells home to the graft early after human heart transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2015;34:933-40.
307. Lichtnekert J, Kulkarni OP, Mulay SR, et al. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PloS one* 2011;6:e26778.
308. Faust J, Menke J, Kriegsmann J, et al. Correlation of renal tubular epithelial cell-derived interleukin-18 up-regulation with disease activity in MRL-Fas<sup>lpr</sup> mice with autoimmune lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 2002;46:3083-95.
309. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nature medicine* 2001;7:1291-7.
310. Fong CH, Bebien M, Didierlaurent A, et al. An antiinflammatory role for IKKbeta through the inhibition of "classical" macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:1269-76.
311. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, et al. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:1261-8.
312. Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 2005;434:1138-43.
313. Martin BN, Wang C, Willette-Brown J, et al. IKKalpha negatively regulates ASC-dependent inflammasome activation. *Nature communications* 2014;5:4977.
314. Xiao Z, Jiang Q, Willette-Brown J, et al. The pivotal role of IKKalpha in the development of spontaneous lung squamous cell carcinomas. *Cancer cell* 2013;23:527-40.
315. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney international* 2009;75:1145-52.
316. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, et al. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology* 2010;176:85-97.
317. Sakai N, Wada T, Matsushima K, et al. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *Journal of hypertension* 2008;26:780-90.
318. Brissette MJ, Lepage S, Lamonde AS, et al. MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming. *PloS one* 2012;7:e36368.
319. White ES, Mantovani AR. Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. *The Journal of pathology* 2013;229:141-4.
320. Liu Z, Huang XR, Chen HY, Penninger JM, Lan HY. Loss of angiotensin-converting enzyme 2 enhances TGF-beta/Smad-mediated renal fibrosis and NF-kappaB-driven renal

inflammation in a mouse model of obstructive nephropathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2012;92:650-61.

321. Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair* 2015;8:7.

322. Kok HM, Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. Targeting CTGF, EGF and PDGF pathways to prevent progression of kidney disease. *Nature reviews Nephrology* 2014;10:700-11.

323. Ledbetter S, Kurtzberg L, Doyle S, Pratt BM. Renal fibrosis in mice treated with human recombinant transforming growth factor-beta2. *Kidney international* 2000;58:2367-76.

324. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, et al. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney international* 2000;58:2301-13.

325. Klahr S. New insights into the consequences and mechanisms of renal impairment in obstructive nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 1991;18:689-99.

326. Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney international* 1993;44:313-21.

327. Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, et al. Transforming growth factor-beta 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney international* 2000;58:1885-92.

328. Hwang M, Kim HJ, Noh HJ, et al. TGF-beta1 siRNA suppresses the tubulointerstitial fibrosis in the kidney of ureteral obstruction. *Experimental and molecular pathology* 2006;81:48-54.

329. Gagliardini E, Benigni A. Role of anti-TGF-beta antibodies in the treatment of renal injury. *Cytokine & growth factor reviews* 2006;17:89-96.

330. Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton, Vic)* 2005;10:48-56.

331. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *The Journal of clinical investigation* 2003;112:1486-94.

332. Arany PR, Flanders KC, DeGraff W, Cook J, Mitchell JB, Roberts AB. Absence of Smad3 confers radioprotection through modulation of ERK-MAPK in primary dermal fibroblasts. *Journal of dermatological science* 2007;48:35-42.

333. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature medicine* 2003;9:964-8.

334. Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, et al. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction. *Kidney international* 2004;66:597-604.

335. Lan HY. Smad7 as a therapeutic agent for chronic kidney diseases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008;13:4984-92.

336. Wang W, Huang XR, Li AG, et al. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005;16:1371-83.

337. Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A, et al. Down-regulation of Smad7 expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:8687-92.
338. Fukasawa H, Yamamoto T, Togawa A, et al. Ubiquitin-dependent degradation of SnoN and Ski is increased in renal fibrosis induced by obstructive injury. *Kidney international* 2006;69:1733-40.
339. Yang J, Zhang X, Li Y, Liu Y. Downregulation of Smad transcriptional corepressors SnoN and Ski in the fibrotic kidney: an amplification mechanism for TGF-beta1 signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2003;14:3167-77.
340. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, et al. Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:6686-91.
341. Higgins PJ. The TGF-beta1/upstream stimulatory factor-regulated PAI-1 gene: potential involvement and a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2006;2006:15792.
342. Freytag J, Wilkins-Port CE, Higgins CE, et al. PAI-1 Regulates the Invasive Phenotype in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Journal of oncology* 2009;2009:963209.
343. Freytag J, Wilkins-Port CE, Higgins CE, Higgins SP, Samarakoon R, Higgins PJ. PAI-1 mediates the TGF-beta1+EGF-induced "scatter" response in transformed human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2010;130:2179-90.
344. Oda T, Jung YO, Kim HS, et al. PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney international* 2001;60:587-96.
345. Eddy AA. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis. *Thrombosis and haemostasis* 2009;101:656-64.
346. Matsuo S, Lopez-Guisa JM, Cai X, et al. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: evidence from obstructive nephropathy in PAI-1-overexpressing mice. *Kidney international* 2005;67:2221-38.
347. Guo Y, Xiao L, Sun L, Liu F. Wnt/beta-catenin signaling: a promising new target for fibrosis diseases. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2012;61:337-46.
348. Cisternas P, Vio CP, Inestrosa NC. Role of Wnt signaling in tissue fibrosis, lessons from skeletal muscle and kidney. *Current molecular medicine* 2014;14:510-22.
349. Kawakami T, Ren S, Duffield JS. Wnt signalling in kidney diseases: dual roles in renal injury and repair. *The Journal of pathology* 2013;229:221-31.
350. Postlethwaite AE, Raghow R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, Kang AH. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *The Journal of cell biology* 1988;106:311-8.
351. Luo DD, Fielding C, Phillips A, Fraser D. Interleukin-1 beta regulates proximal tubular cell transforming growth factor beta-1 signalling. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24:2655-65.
352. Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, Endre ZA, Gobe G, Johnson DW. Interleukin-1beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney international* 2002;62:31-40.

353. Jones LK, O'Sullivan KM, Semple T, et al. IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24:3024-32.
354. Liang D, Liu HF, Yao CW, et al. Effects of interleukin 18 on injury and activation of human proximal tubular epithelial cells. *Nephrology (Carlton, Vic)* 2007;12:53-61.
355. Bani-Hani AH, Leslie JA, Asanuma H, et al. IL-18 neutralization ameliorates obstruction-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Kidney international* 2009;76:500-11.
356. Kitamoto K, Machida Y, Uchida J, et al. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy. *Journal of pharmacological sciences* 2009;111:285-92.
357. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:56-65.
358. Lee S, Huen S, Nishio H, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011;22:317-26.
359. Bielecki M, Kowal K, Lapinska A, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. Increased release of soluble CD163 by the peripheral blood mononuclear cells is associated with worse prognosis in patients with systemic sclerosis. *Advances in medical sciences* 2013;58:126-33.
360. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy* 2010;12:R128.
361. Osterholzer JJ, Olszewski MA, Murdock BJ, et al. Implicating exudate macrophages and Ly-6C(high) monocytes in CCR2-dependent lung fibrosis following gene-targeted alveolar injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2013;190:3447-57.
362. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109:E3186-95.
363. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *The American journal of pathology* 2008;172:288-98.
364. Okamura DM, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, et al. Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis. *American journal of physiology Renal physiology* 2011;300:F245-53.
365. Wang Y, Wang YP, Zheng G, et al. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney international* 2007;72:290-9.
366. Lu J, Cao Q, Zheng D, et al. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney international* 2013;84:745-55.
367. Cao Q, Wang C, Zheng D, et al. IL-25 induces M2 macrophages and reduces renal injury in proteinuric kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011;22:1229-39.

368. Ryu M, Kulkarni OP, Radomska E, Miosge N, Gross O, Anders HJ. Bacterial CpG-DNA accelerates Alport glomerulosclerosis by inducing an M1 macrophage phenotype and tumor necrosis factor-alpha-mediated podocyte loss. *Kidney international* 2011;79:189-98.
369. Vielhauer V, Berning E, Eis V, et al. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney international* 2004;66:2264-78.
370. Lopez-Guisa JM, Cai X, Collins SJ, et al. Mannose receptor 2 attenuates renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012;23:236-51.
371. Anders HJ, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney international* 2011;80:915-25.
372. Huen SC, Huynh L, Marlier A, Lee Y, Moeckel GW, Cantley LG. GM-CSF Promotes Macrophage Alternative Activation after Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2014.
373. Li H, Ambade A, Re F. Cutting edge: Necrosis activates the NLRP3 inflammasome. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009;183:1528-32.
374. Goncalves RG, Gabrich L, Rosario A, Jr., et al. The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney international* 2006;70:1599-606.
375. Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nature immunology* 2012;13:333-42.
376. Vesey DA, Cheung C, Cuttle L, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. Interleukin-1beta stimulates human renal fibroblast proliferation and matrix protein production by means of a transforming growth factor-beta-dependent mechanism. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 2002;140:342-50.
377. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009;183:787-91.
378. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011;469:221-5.
379. Tashiro K, Tamada S, Kuwabara N, et al. Attenuation of renal fibrosis by proteasome inhibition in rat obstructive nephropathy: possible role of nuclear factor kappaB. *International journal of molecular medicine* 2003;12:587-92.
380. Miyajima A, Kosaka T, Seta K, Asano T, Umezawa K, Hayakawa M. Novel nuclear factor kappa B activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction. *The Journal of urology* 2003;169:1559-63.
381. Chung AC, Huang XR, Zhou L, Heuchel R, Lai KN, Lan HY. Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24:1443-54.
382. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins SP, Higgins PJ. TGF-beta1 --> SMAD/p53/USF2 --> PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Cell and tissue research* 2012;347:117-28.
383. Correa-Costa M, Semedo P, Monteiro AP, et al. Induction of heme oxygenase-1 can halt and even reverse renal tubule-interstitial fibrosis. *PloS one* 2010;5:e14298.

384. Klahr S. The bone morphogenetic proteins (BMPs). Their role in renal fibrosis and renal function. *Journal of nephrology* 2003;16:179-85.
385. Morrissey J, Hruska K, Guo G, Wang S, Chen Q, Klahr S. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2002;13 Suppl 1:S14-21.
386. Cao Q, Wang Y, Zheng D, et al. Failed renoprotection by alternatively activated bone marrow macrophages is due to a proliferation-dependent phenotype switch in vivo. *Kidney international* 2014;85:794-806.
387. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006;211:609-18.
388. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:185-94.
389. Tsou CL, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:902-9.
390. Vanbervliet B, Homey B, Durand I, et al. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *European journal of immunology* 2002;32:231-42.
391. Agrawal A, Manchester M. Differential uptake of chemically modified cowpea mosaic virus nanoparticles in macrophage subpopulations present in inflammatory and tumor microenvironments. *Biomacromolecules* 2012;13:3320-6.
392. Al Faraj A, Shaik AS, Afzal S, Al Sayed B, Halwani R. MR imaging and targeting of a specific alveolar macrophage subpopulation in LPS-induced COPD animal model using antibody-conjugated magnetic nanoparticles. *International journal of nanomedicine* 2014;9:1491-503.
393. Movahedi K, Schoonooghe S, Laoui D, et al. Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective in vivo imaging of tumor-associated macrophages. *Cancer research* 2012;72:4165-77.
394. Cieslewicz M, Tang J, Yu JL, et al. Targeted delivery of proapoptotic peptides to tumor-associated macrophages improves survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:15919-24.
395. Wang M, Fu Z, Wu J, et al. MFG-E8 activates proliferation of vascular smooth muscle cells via integrin signaling. *Aging cell* 2012;11:500-8.
396. Yang C, Hayashida T, Forster N, et al. The integrin alpha(v)beta(3-5) ligand MFG-E8 is a p63/p73 target gene in triple-negative breast cancers but exhibits suppressive functions in ER(+) and erbB2(+) breast cancers. *Cancer research* 2011;71:937-45.
397. Kusunoki R, Ishihara S, Tada Y, et al. Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in colonic inflammation and carcinogenesis. *Journal of gastroenterology* 2015.
398. Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, et al. MFG-E8 expression for progression of oral squamous cell carcinoma and for self-clearance of apoptotic cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2014;94:1260-72.
399. Neutzner M, Lopez T, Feng X, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Udey MC. MFG-E8/lactadherin promotes tumor growth in an angiogenesis-dependent transgenic mouse model of multistage carcinogenesis. *Cancer research* 2007;67:6777-85.

400. Jinushi M, Sato M, Kanamoto A, et al. Milk fat globule epidermal growth factor-8 blockade triggers tumor destruction through coordinated cell-autonomous and immune-mediated mechanisms. *The Journal of experimental medicine* 2009;206:1317-26.
401. Blanco VM, Chu Z, Vallabhapurapu SD, et al. Phosphatidylserine-selective targeting and anticancer effects of SapC-DOPS nanovesicles on brain tumors. *Oncotarget* 2014;5:7105-18.
402. Fricker M, Neher JJ, Zhao JW, They C, Tolkovsky AM, Brown GC. MFG-E8 mediates primary phagocytosis of viable neurons during neuroinflammation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2012;32:2657-66.
403. Khalifeh-Soltani A, McKleroy W, Sakuma S, et al. Mfge8 promotes obesity by mediating the uptake of dietary fats and serum fatty acids. *Nature medicine* 2014;20:175-83.
404. Mitroulis I, Skendros P, Ritis K. Targeting IL-1beta in disease; the expanding role of NLRP3 inflammasome. *European journal of internal medicine* 2010;21:157-63.
405. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in immunology* 2013;25:469-84.
406. Jesus AA, Goldbach-Mansky R. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. *Annual review of medicine* 2014;65:223-44.
407. Sedimbi SK, Hagglof T, Karlsson MC. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2013;70:4795-808.
408. Ohta Y, Hamada Y, Katsuoka K. Expression of IL-18 in psoriasis. *Archives of dermatological research* 2001;293:334-42.
409. Compañen A, van der Wel L, van der Fits L, Laman J, Prens E. Elevated interleukin-18 protein expression in early active and progressive plaque-type psoriatic lesions. *European cytokine network* 2004;15:210-6.
410. Gangemi S, Merendino RA, Guarneri F, et al. Serum levels of interleukin-18 and s-ICAM-1 in patients affected by psoriasis: preliminary considerations. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2003;17:42-6.
411. Furlan R, Martino G, Galbiati F, et al. Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999;163:2403-9.
412. Shi FD, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren HG. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000;165:3099-104.
413. Sarkar A, Hall MW, Exline M, et al. Caspase-1 regulates Escherichia coli sepsis and splenic B cell apoptosis independently of interleukin-1beta and interleukin-18. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006;174:1003-10.
414. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010;185:4385-92.
415. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 2008;8:958-69.
416. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005;23:344-6.
417. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 2004;25:677-86.

418. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:524-9.
419. Ghosh AK, Quaggin SE, Vaughan DE. Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* 2013;238:461-81.
420. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature reviews Immunology* 2014;14:181-94.
421. Mirza R, Koh TJ. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine* 2011;56:256-64.
422. Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Blocking interleukin-1beta induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes* 2013;62:2579-87.
423. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *The Journal of investigative dermatology* 1998;111:850-7.
424. Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2013;190:1746-57.
425. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *The American journal of pathology* 2009;175:2454-62.
426. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010;184:3964-77.
427. Takamiya M, Fujita S, Saigusa K, Aoki Y. Simultaneous detection of eight cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay for wound age estimation. *International journal of legal medicine* 2008;122:143-8.
428. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* 2003;83:835-70.
429. DiPietro LA. Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Current opinion in rheumatology* 2013;25:87-91.
430. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology* 1995;146:56-66.
431. Summan M, Warren GL, Mercer RR, et al. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2006;290:R1488-95.
432. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American journal of pathology* 2007;170:818-29.
433. Willenborg S, Lucas T, van Loo G, et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood* 2012;120:613-25.
434. MacDonald KP, Palmer JS, Cronau S, et al. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* 2010;116:3955-63.
435. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Pittet MJ. Regulation of macrophage and dendritic cell responses by their lineage precursors. *Journal of innate immunity* 2012;4:411-23.



436. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010;115:e10-9.
437. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current opinion in hematology* 2010;17:53-9.
438. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews Immunology* 2011;11:723-37.
439. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2005;175:342-9.
440. Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010;42:495-505.
441. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:3037-47.
442. Lin SL, Castano AP, Nowlin BT, Luper ML, Jr., Duffield JS. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2009;183:6733-43.
443. Heymann F, Trautwein C, Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflammation & allergy drug targets* 2009;8:307-18.
444. Perdiguero E, Sousa-Victor P, Ruiz-Bonilla V, et al. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *The Journal of cell biology* 2011;195:307-22.
445. Zaslona Z, Przybranowski S, Wilke C, et al. Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2014;193:4245-53.
446. Korn D, Frasch SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Frontiers in immunology* 2011;2:57.
447. Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *Journal of athletic training* 2006;41:457-65.
448. Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE. Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 1999;65:35-42.
449. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation* 1998;101:890-8.
450. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *The Journal of clinical investigation* 2002;109:41-50.
451. Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB. Matrix control of transforming growth factor-beta function. *Journal of biochemistry* 2012;152:321-9.
452. Doyle JJ, Gerber EE, Dietz HC. Matrix-dependent perturbation of TGFbeta signaling and disease. *FEBS letters* 2012;586:2003-15.
453. Hernandez-Quintero M, Kuri-Harcuch W, Gonzalez Robles A, Castro-Munozledo F. Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell and tissue research* 2006;325:77-90.

454. Mateo RB, Reichner JS, Albina JE. Interleukin-6 activity in wounds. *The American journal of physiology* 1994;266:R1840-4.
455. Detmar M, Orfanos CE. Tumor necrosis factor-alpha inhibits cell proliferation and induces class II antigens and cell adhesion molecules in cultured normal human keratinocytes in vitro. *Archives of dermatological research* 1990;282:238-45.
456. Porter KE, Turner NA, O'Regan DJ, Ball SG. Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. *Cardiovascular research* 2004;64:507-15.
457. Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:36099-109.
458. Weidenbusch M, Anders HJ. Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis. *Journal of innate immunity* 2012;4:463-77.
459. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of leukocyte biology* 2013;93:875-81.
460. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2010;87:59-67.
461. Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, et al. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2005;174:6561; author reply -2.
462. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *The American journal of pathology* 2011;178:19-25.
463. Rodero MP, Legrand JM, Bou-Gharios G, Khosrotehrani K. Wound-associated macrophages control collagen 1alpha2 transcription during the early stages of skin wound healing. *Experimental dermatology* 2013;22:143-5.
464. Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cellular immunology* 2000;204:19-28.
465. Khalil N, Bereznay O, Sporn M, Greenberg AH. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *The Journal of experimental medicine* 1989;170:727-37.
466. Silvestre JS, Thery C, Hamard G, et al. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nature medicine* 2005;11:499-506.
467. Fallowfield JA, Mizuno M, Kendall TJ, et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2007;178:5288-95.
468. Weinheimer-Haus EM, Mirza RE, Koh TJ. Nod-like receptor protein-3 inflammasome plays an important role during early stages of wound healing. *PloS one* 2015;10:e0119106.
469. Lee DJ, Du F, Chen SW, et al. Regulation and Function of the Caspase-1 in an Inflammatory Microenvironment. *The Journal of investigative dermatology* 2015.
470. Bitto A, Altavilla D, Pizzino G, et al. Inhibition of inflammasome activation improves the impaired pattern of healing in genetically diabetic mice. *British journal of pharmacology* 2014;171:2300-7.

471. Goren I, Muller E, Schiefelbein D, et al. Systemic anti-TNFalpha treatment restores diabetes-impaired skin repair in ob/ob mice by inactivation of macrophages. *The Journal of investigative dermatology* 2007;127:2259-67.
472. Khanna S, Biswas S, Shang Y, et al. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS one* 2010;5:e9539.
473. Danon D, Kowatch MA, Roth GS. Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989;86:2018-20.
474. Danon D, Madjar J, Edinov E, et al. Treatment of human ulcers by application of macrophages prepared from a blood unit. *Experimental gerontology* 1997;32:633-41.
475. Zulloff-Shani A, Adunsky A, Even-Zahav A, et al. Hard to heal pressure ulcers (stage III-IV): efficacy of injected activated macrophage suspension (AMS) as compared with standard of care (SOC) treatment controlled trial. *Archives of gerontology and geriatrics* 2010;51:268-72.
476. Orenstein A, Kachel E, Zulloff-Shani A, et al. Treatment of deep sternal wound infections post-open heart surgery by application of activated macrophage suspension. *Wound repair and regeneration* : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 2005;13:237-42.

# Appendices

# Annexe 1 Regulation of Experimental Peritonitis : A complex orchestration

## Regulation of Experimental Peritonitis: A Complex Orchestration

L.-P. Laurin<sup>a,b</sup> M.-J. Brissette<sup>a</sup> S. Lepage<sup>a</sup> J.F. Cailhier<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Institut du Cancer de Montréal and

<sup>b</sup>Renal Division, CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

### Key Words

Experimental peritonitis · Macrophages · Lymphocytes · Mast cells · Leukocyte recruitment · Chemokines

### Abstract

Experimental peritonitis is a frequently used inflammatory model to evaluate leukocyte recruitment. By the intrinsic characteristics of the peritoneal cavity, the various resident cell populations have a role to play in the initiation, the modulation and the resolution of peritoneal inflammation. Through various manipulations of these cell populations, we gained important knowledge on their respective roles in peritoneal inflammation. In this brief review, we will focus on the cellular regulation of leukocyte recruitment in experimental peritonitis.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

### Introduction

The peritoneal cavity constitutes a protective barrier against damage and reduces friction between the intestines and surrounding tissues. The peritoneum is constituted of mesothelial cells (MeC), resident leukocytes and fibroblasts which are situated between the MeC lining and the capillaries. All of these cells are important as they are metabolically active and act as a barrier to invading pathogens by generating an innate and adaptive immu-

nological response upon determined leukocyte kinetics, as depicted in table 1 and figure 1. The peritoneal serosal cavity is lined by a monolayer of MeC, which constitute the most abundant cell type. The resident leukocytes are comprised mainly of macrophages (MΦ). In humans, the peritoneal resident leukocyte population is composed of 45–90% MΦ, 10–47% lymphocytes [45% T (mostly memory T cells) and 2% B lymphocytes], 8% natural killer (NK) cells, 2–6% dendritic cells (DC) and <5% polymorphonuclear leukocytes (PMN) [1]. Here, we will review their respective roles in different rodents models of experimental peritoneal inflammation (table 2).

**Table 1.** Leukocyte kinetics during general peritoneal inflammation

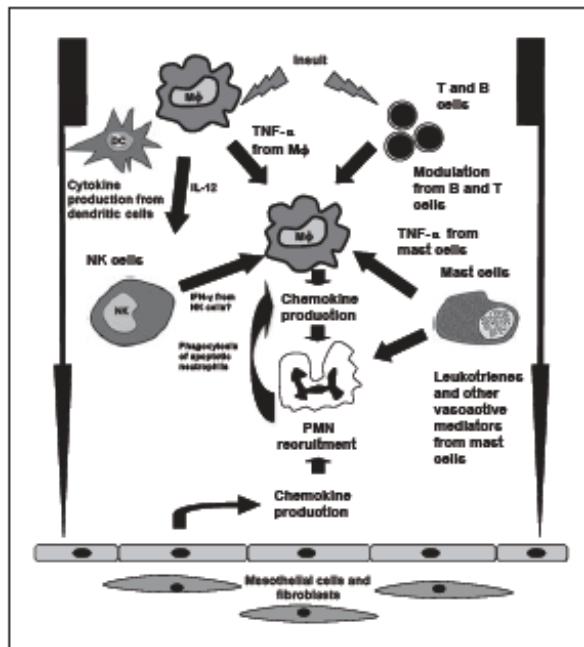
	Onset	Pro-gression	Reso-lution	Postreso-lution
PMN	↑↑	↑↑↑	↓	↓↓
MΦ	↑ (inflammatory)	↑↑	↑↑↑	↓↓
B1 cells	↓	↓↓	↑	↑↑
T cells	↑			↑↑
NK	↑↑			↑↑
MC	↑ (modulation)			
DC	↑	↑↑	↓	
MeC	N/A	N/A	N/A	N/A

The table reflects the views of the authors based on the available literature. N/A = Not applicable.

**Table 2.** Experimental peritonitis models

Stimuli	Peritonitis models	PMN influx (onset)	PMN influx (late)	Peritoneal chemokines	Peritoneal cytokines
Zymosan	Ajuebor et al. [18] Kolaczowska et al. [13]	↑ 4 h ↑ 6 h	↓ 24 h; basal level 48 h	MCP-1 ↑ 2 h and peak 4 h; ↓ 24 h MCP-1 and KC ↑ 6 h	IL-10 ↑ 4 h; basal level 24 h IL-10 and IFN-γ ↑ 6 h
LPS	Ajuebor et al. [18]	↑ 16 h	↓ 48 h	MCP-1 ↑ 1 h and peak 3 h; ↓ 24 h	N/A
Thioglycollate	Ajuebor et al. [18] Kipari et al. [14]  Cailhier et al. [21]	↑ 4 h ↑ 24 h  ↑ 8 h	↑ 48 h ↓ 72 h  ↓ 72 h	MCP-1 ↑ 4 h MIP-2 and KC ↑ 3 h MCP-1 ↑ 6 h MIP-2 and KC ↑ 1 h	N/A
Casein digest Bacto-Tryptone	Knudsen et al. [19]	↑ 24 h	N/A	MIP-2 ↑ 4 h; ↓ 6 h	IL-1β ↑ 2 h; ↓ 24 h
Bacteria ( <i>E. faecium</i> )	Leendertse et al. [20]	↑ 6 h	↓ 96 h	MCP-1 ↑ 6 h; ↓ 24 h	IL-6, IL-10 and TNF-α ↑ 6 h; ↓ 24 h

KC = Keratinocyte chemoattractant; MIP = macrophage inflammatory protein; N/A = not applicable.



**Fig. 1.** Regulation of acute peritoneal inflammation. Upon an inflammatory insult, TNF-α would be secreted by resident MΦ and MC, and IFN-γ would be secreted by NK cells by a MΦ-dependent IL-12 production. DC secrete various cytokines and chemokines contributing to the inflammatory and immune response. Resident B and T cells would affect this inflammatory response by an ill-defined mechanism and this would modulate chemokine production by MΦ, MeC and fibroblasts. This chemokine secretion and secretion of leukotrienes by MC would promote PMN recruitment.

### Implication in Human Peritonitis

A better understanding of the interactions between the key players involved in the inflammatory response in peritonitis may be clinically relevant, particularly in peritoneal dialysis patients. Several peritoneal dialysis solutions, especially lactate-buffered non-glucose containing fluid, could impair leukocytes recruitment, as suggested in lipopolysaccharide (LPS)-induced peritonitis in rats [2]. As stated below, immune responses against offending organisms can adopt different profiles, depending on which kind of bacteria is implicated [3]. Drainage solution can also discard resident and recruited leukocytes, thereby modulating the inflammatory response. However, the exact clinical consequences on the evolution of peritonitis are unknown.

### Polymorphonuclear Leukocytes

PMN are recruited to target tissues such as the peritoneal cavity by responding to a chemoattractant gradient generated by activated resident cells (e.g. MΦ) in response to a pathogenic agent (e.g. bacteria). PMN effector systems are activated following phagocytosis of a pathogen. The PMN oxidative response is characterized by the production of oxygen radicals, chemokines and the release of preformed proteins stored in granules (serine proteases, metalloproteinases, etc.). PMN apoptosis via proteolytic cascades (e.g. caspase-3 activation) and subsequent engulfment by MΦ is thought to be the major mechanism

**Table 3.** Peritonitis in lymphocyte-deficient mice (adapted from Kipari et al. [14])

	Baseline resident peritoneal cells	Circulating number of PMN	Peritoneal PMN infiltration	Circulating number of monocytes	Peritoneal monocytes/MΦ infiltration	Peritoneal chemokines (KC, MIP-2 and MCP-1)
RAG KO (absence of T and B cells)	↑ MΦ ↓ MC	no difference	↑ (8 and 24 h)	↓	early ↑ (8 h, 24 h) late ↓ (72 h)	↓ MCP-1 (24 h)
NUDE mice (absence of T cells)	no difference – MΦ ↓ MC ↓ B cells	no difference	↑ (8 and 24 h)	no difference	early ↑ (24 h)	↑ KC (8 h) ↑ MCP-1 (3 h)
μMT mice (absence of B cells)	no difference – MΦ no difference – MC	↓	↓ (24 h)	no difference	late ↓ (72 and 120 h)	no difference

KC = Keratinocyte chemoattractant; MIP = macrophage inflammatory protein; N/A = not applicable.

for clearing PMN during the resolution phase. MΦ can trigger PMN apoptosis by Fas–Fas ligand pathway that represents a negative feedback loop accelerating the resolution of inflammation whilst phagocytosis of senescent PMN inhibits the inflammatory mediators production by MΦ [4].

## Lymphocytes

### B Lymphocytes

Peritoneal B lymphocytes are divided into 4 different subpopulations according to their expression of CD5 (Ly-1) and MAC-1. B-1 cells express a B220<sup>low</sup>/CD5<sup>+</sup>/MAC-1<sup>low</sup> phenotype. The B-1 cells represent approximately 50% of the B cell population in the murine peritoneum (10–20% of total peritoneal cells are B-1 cells) and are the most relevant subtype implicated in peritoneal inflammation [5]. B-1 cells constitute another arm of the innate immune system. One of their specific functions is the synthesis of natural antibodies (IgM). Furthermore, they are key players in the modulation of the response to surperinfection in murine peritonitis [6] and in the recruitment of monocytes and MΦ without T cell help.

### T Lymphocytes

The majority of peritoneal T cells express the αβ T cell receptor (TcR) with around 17% expressing the γδ TcR. The CD4/CD8 ratio also differs from that evident in the blood where most of the T cells are CD8+. Although the majority of peritoneal CD8+ cells secrete a Th1 pattern of cytokines such interleukin (IL)-2 as well as the cytotoxic mediators interferon (IFN)-γ and tumor necrosis factor (TNF)-α, some peritoneal CD8+ cells secrete IL-4 and

IL-5 that are characteristic of Th2 cells [7]. These Th2-type cells are able to support B cell differentiation and secretion of IgG and IgA [7], whilst γδ T cells would play an important role in monocyte/MΦ differentiation [8].

### Resident Natural Killer T Cells and Natural Killer Cells

The NK T cell population is enriched in the human peritoneal cavity of healthy continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients; 20% of the peritoneal lymphocytes are NK T cells, whilst 4.2% are CD8+ NK cells [9]. Activated peritoneal NK cells produce a spectrum of cytokines such as TNF-α, IFN-γ, GM-CSF, lymphotoxin and IL-8 [10], whereas NK T cells can produce Th1-type cytokines (such as IFN-γ and TNF-α) as well as Th2-type cytokines (such as IL-4 and IL-13) [11]. The production of IFN-γ by NK T cells is induced by MΦ-dependent IL-12 production. NK T cells can mediate cytotoxicity through Fas–Fas ligand and perforin/granzyme pathways. It remains to be determined if NK T cells are regulators or effectors of immune-mediated damage. Although the role of NK T cells in peritonitis remains ill defined, it is likely that the modulation of the inflammatory response via IFN-γ secretion and the subsequent effects upon cytokine and chemokine production might be of some importance [12].

### Lymphocyte-Deficient Mice as a Model for Studying Lymphocyte Function in Experimental Peritonitis

Different mice models to study lymphocyte functions are available, as stated in table 3. A naturally occurring mutation in NUDE mice resulted in congenital absence of the thymus resulting in absence of T cell development. The μMT KO mice were generated by disruption of one

of the exons coding for the  $\mu$ -chain with the consequential arrest of B cell development at the stage of pre-B-cell maturation, resulting in an absence of mature B cells. RAG-1 KO lack mature T and B cells but other immune mediators are increased such as complement activity and NK cell activity.

There are scant data available regarding the function of lymphocytes during the initiation of acute peritoneal inflammation. Recent work by Kolaczowska et al. [13] demonstrated comparable changes between RAG-deficient mice and wild-type mice in vascular permeability and PMN infiltration in the model of zymosan peritonitis. In contrast, work by Rajakaria et al. [6] suggested that RAG-deficient mice exhibited an exaggerated peritoneal response to zymosan with increased PMN infiltration accompanied by increased TNF- $\alpha$  and reduced IL-10 levels. Recent data highlighted the role of lymphocytes in the modulation of PMN and monocyte/M $\Phi$  recruitment in Brewer's thioglycollate (BTG) peritonitis. T cells would act to limit leukocyte recruitment with an absence of T cells facilitating increased PMN and monocyte/M $\Phi$  recruitment. B cells would play a role in promoting M $\Phi$  recruitment in the later phase of inflammation as both RAG-1 KO mice and  $\mu$ MT mice exhibited reduced monocyte/macrophage (M $\Phi$ ) recruitment at late time points [14].

### Macrophages

M $\Phi$  are heterogeneous cells and can be found in tissues where they are known as resident M $\Phi$ . The local microenvironment will provide tissue-specific signals such as apocrine secretion products from neighboring resident cells and extracellular matrix. These local mediators play a prominent role in the development of the different phenotypes found in the various resident M $\Phi$  populations. Resident M $\Phi$  have an important role in the immune protection of their respective organ of residence and resident tissue M $\Phi$  are regarded as sentinels of the innate immune system. They are implicated in the clearance of pathogens and the repair of injured tissue.

It has been suggested that there are two distinct monocyte populations that give rise to either resident M $\Phi$  or inflammatory M $\Phi$  and that these monocytes may be distinguished by their surface markers. Intraperitoneal migration of resident M $\Phi$ -precursor monocytes is not prominent in the absence of inflammation. During inflammatory peritonitis; however, there is some recruitment of the long-lived CX<sub>3</sub>CR1<sup>Hi</sup>, Gr1<sup>-</sup> and CCR2<sup>-</sup> mono-

cytes [15] and this may be to replace the resident M $\Phi$  that emigrate to the parathymic lymph nodes during and following inflammation.

Resident peritoneal M $\Phi$  are an important source of cytokines and chemokines involved in the immune defense of the peritoneal cavity. It is believed that this 'cytokine network' facilitates communication between peritoneal M $\Phi$  and MeC that act in concert to protect the peritoneum [16]. Key players include the cytokines IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  and the chemoattractants IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, prostaglandins and leukotrienes. Furthermore, in recent years, new lipid mediators with anti-inflammatory properties have been discovered (e.g. resolvins and protectins), as opposed to the classic pro-inflammatory prostaglandins and leukotrienes. A new bioactive product named maresin-1 (MaR1), derived from docosahexaenoic, may also be involved in inflammation resolution. MaR1 would stop PMN infiltration and enhance nonphlogistic M $\Phi$  phagocytosis in the setting of mouse peritonitis [17].

In contrast, the role of resident peritoneal M $\Phi$  in the initiation of inflammation and orchestration of PMN recruitment is more controversial. It is of interest that previous work using clodronate to study the role of resident peritoneal M $\Phi$  in the initiation of experimental peritonitis has produced conflicting results [18, 19]. Ajuebor et al. [18] showed that M $\Phi$  ablation had no effect upon PMN recruitment in the BTG and zymosan model of peritonitis. In contrast, Knudsen et al. [19] demonstrated that M $\Phi$  blunted PMN influx in their casein model of peritonitis. More recently, Leendertse et al. [20] demonstrated that depletion of resident peritoneal M $\Phi$  delayed the peritoneal clearance of *Enterococcus faecium* with increased production of inflammatory cytokines and chemokines associated with systemic dissemination. A murine transgenic conditional M $\Phi$  ablation model also showed that absence of M $\Phi$  attenuated PMN infiltration with diminished C-X-C chemokine production at 1 h [21].

### Dendritic Cells

DC represent 1% of the resting resident peritoneal cells in rats [22]. They play a key role in the interactions with the adaptive arm of the immune response, i.e. T and B lymphocytes. Similarly to M $\Phi$ , resident DC exhibit different phenotypes and share numerous M $\Phi$  markers and functions that highlight the close relationship between M $\Phi$  and DC. A subset of DC, named regulatory DC, pro-



duced fewer pro-inflammatory cytokines and instead preferentially produced IL-10. This, not only suppressed bacterial LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines in M $\Phi$ , but also reduced their serum levels in mice [23].

The sensing function of DC, as for M $\Phi$ , is mediated through various innate immune receptors such as the Toll-like receptors. These receptors can react to different classes of infectious agents including bacteria and viruses. Upon receptor ligation, DC can up-regulate genes leading to expression of various cytokines and chemokines involved in the inflammatory and immune response such as IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-12 p40, MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , -1 $\gamma$ , MIP-2 $\alpha$ , MCP-5, macrophage migration inhibitory factor, inducible protein-10 and GRO-1 [24].

In humans, myeloid DC precursors (CD14<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) represent 2.2% of peritoneal cells at basal state in a recent study on peritoneal dialysis (PD) patients [3]. This number contrasts with older studies that have concluded that the population of DC represents 6% of total peritoneal cells. Peritoneal CD14<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> numbers increased significantly in PD-associated peritonitis patients, and seemed to occur with different pattern for Gram-positive and Gram-negative bacterial infection, reflecting a potential role in the peritoneal adaptive immune responses.

### Resident Mast Cells

There are two classes of mast cells (MC) in the mouse: connective tissue MC and mucosal MC. As is the case for resident M $\Phi$ , MC complete their maturation in the tissue of residence under the influence of the local microenvironment. MC exist only as 'resident' cells and can produce inflammatory mediators such as histamine, platelet-activating factor, prostaglandins, thromboxane, leukotriene, chymase, cytokines (GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-3, IL-4 and IL-6) and chemokines (MCP-1 and MIP-1 $\alpha$ ) [25]. The production of leukotrienes by MC is an important facet of the early PMN recruitment in a model of infectious peritonitis [26]. MC depletion had no effect upon BTG induced peritonitis, reduced PMN infiltration in LPS-induced peritonitis (though no chemokine differences were evident) and inhibited PMN influx and chemokine secretion in zymosan-induced peritonitis [18]. In summary, MC play a role in the initiation of inflammation, but many studies indicate that the main contribution of MC is in the modulation of the inflammatory response.

### Mesothelial and Stromal Cells

The MeC lining constitutes a protective barrier to physical and infectious injury and has complex role in the immunity of the serosal cavity. In vivo and in vitro studies have demonstrated that peritoneal MeC produce pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6, anti-inflammatory molecules such as IL-10 and the decoy molecule IL-1 receptor type II (IL-1RII) and prostaglandins. Stimulated MeC increased their expression of adhesion molecules and produced chemokines (IL-8, MCP-1 and regulated upon activation, normal T expressed and secreted; RANTES), which represent essential steps in order to mount an inflammatory response [27]. Fibroblasts are present in the interstitial stroma beneath the MeC layer and are also implicated in serosal inflammation.

MeC involvement in the initiation of inflammation is unquestionable whilst the underlying population of fibroblasts may also be involved. However, most studies involved the study of chemokine and cytokine production after the activation of MeC and this raised the possibility that other cells may well be involved in the initial production of these activating cytokines. A 'cytokine network' between the resident cells is therefore essential for the initiation of inflammation. Some studies have suggested that resident M $\Phi$ -derived pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  would be essential for the secretion of C-X-C and C-C chemokines from MeC and fibroblasts [27].

### Conclusions

Experimental peritonitis is a good model to understand the complex orchestration between key players involved in initiation and regulation of inflammation. M $\Phi$  seem to play a central role in the cytokine network with mesothelial and stromal cells. Other resident leukocytes act more as modulators of the inflammatory response, as depicted in figure 1.

### Acknowledgments

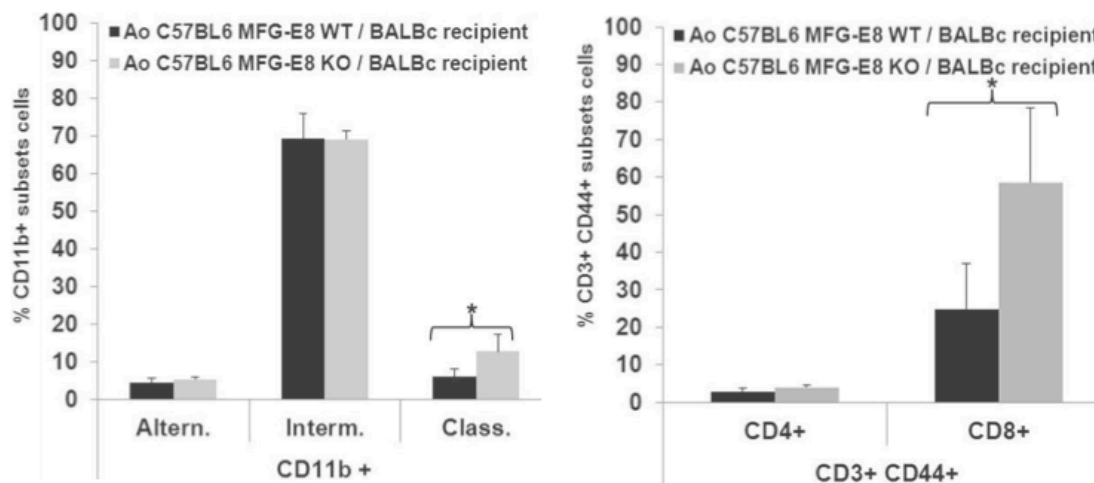
This work was supported by a Biomedical Research Grant from the Kidney Foundation of Canada, from le Fonds de la recherche en santé du Québec, la Fondation du CHUM and the Institut du Cancer de Montréal. J.F.C. is recipient of a Fonds de la recherche en santé du Québec clinician-scientist scholarship. We thank the J.L. Lévesque Foundation and the CHUM renal division for their support.

## References

- ▶ 1 Kubicka U, Olszewski WL, Tarnowski W, Bielecki K, Ziolkowska A, Wierzbicki Z: Normal human immune peritoneal cells: subpopulations and functional characteristics. *Scand J Immunol* 1996;44:157-163.
- ▶ 2 Mortier S, Falci D, Gericke M, Lamete N, De Vriese A: Effects of new peritoneal dialysis solutions on leukocyte recruitment in the rat peritoneal membrane. *Nephron Exp Nephrol* 2005;101:e139-e145.
- ▶ 3 McCully ML, Chau TA, Luke P, Blake PG, Madrenas J: Characterization of human peritoneal dendritic cell precursors and their involvement in peritonitis. *Clin Exp Immunol* 2005;139:513-525.
- ▶ 4 Wittko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L: Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000;80:617-653.
- ▶ 5 Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA: Progenitors for ly-1 b cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med* 1985; 161:1554-1568.
- ▶ 6 Rajakariar R, Lawrence T, Bystrom J, Hilliard M, Colville-Nash P, Bellington G, Fitzgerald D, Yaqoob MM, Gilroy DW: Novel biphasic role for lymphocytes revealed during resolving inflammation. *Blood* 2008;111: 4184-4192.
- ▶ 7 Birkhofer A, Rehbock J, Fricke H: T lymphocytes from the normal human peritoneum contain high frequencies of Th2-type CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 1996;26:957-960.
- ▶ 8 Skeen MJ, Freeman MM, Ziegler HK: Changes in peritoneal myeloid populations and their proinflammatory cytokine expression during infection with *Listeria* monocytogenes are altered in the absence of gamma/delta t cells. *J Leukoc Biol* 2004;76:104-115.
- ▶ 9 Lewis SL, Kutvirt SG, Cooper CL, Bonner PN, Holmes CJ: Characteristics of peripheral and peritoneal lymphocytes from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 1993;13(suppl 2):S273-S277.
- ▶ 10 Das S, Khar A: Regulation of NK cell function in vivo by the dose of tumour transplanted in the peritoneum. *Immunol Lett* 2002;83:133-142.
- ▶ 11 Smyth MJ, Godfrey DI: Nkt cells and tumor immunity - a double-edged sword. *Nat Immunol* 2000;1:459-460.
- ▶ 12 Godfrey DI, Kronenberg M: Gotng both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004;114:1379-1388.
- ▶ 13 Kolaczowska E, Barteczko M, Plytycz B, Arnold B: Role of lymphocytes in the course of murine zymosan-induced peritonitis. *Inflamm Res* 2008;57:272-278.
- ▶ 14 Kipari T, Watson S, Houlberg K, Lepage S, Hughes J, Cailhier JF: Lymphocytes modulate peritoneal leukocyte recruitment in peritonitis. *Inflamm Res* 2009;58:553-560.
- ▶ 15 Geissmann F, Jung S, Littman DR: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71-82.
- ▶ 16 Topley N, Mackenzie RK, Williams JD: Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis. *Immunobiology* 1996;195:563-573.
- ▶ 17 Serhan CN, Yang R, Martinod K, Kasuga K, Pillai PS, Porter TF, Oh SF, Spite M: Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* 2009;206:15-23.
- ▶ 18 Ajuebor MN, Das AM, Virag L, Flower RJ, Szabo C, Perretti M: Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous il-10. *J Immunol* 1999;162:1685-1691.
- ▶ 19 Knudsen E, Iversen PO, Van Rooijen N, Benestad HB: Macrophage-dependent regulation of neutrophil mobilization and chemotaxis during development of sterile peritonitis in the rat. *Eur J Haematol* 2002;69:284-296.
- ▶ 20 Leendertse M, Willems RJ, Giebelen IA, Roelofs JJ, van Rooijen N, Bonten MJ, van der Poll T: Peritoneal macrophages are important for the early containment of *Enterococcus faecium* peritonitis in mice. *Innate Immun* 2009;15:3-12.
- ▶ 21 Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, Savtll J, Hughes J, Lang RA: Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol* 2005;174:2336-2342.
- ▶ 22 van Vugt E, Arkema JM, Verdaasdonk MA, Beelen RH, Kamperdtjk EW: Morphological and functional characteristics of rat steady state peritoneal dendritic cells. *Immunobiology* 1991;184:14-24.
- ▶ 23 Fujita S, Setno K, Sato K, Sato Y, Eizumi K, Yamashita N, Taniuchi M: Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood* 2006;107:3656-3664.
- ▶ 24 Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P: Inducible il-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2001;2: 882-888.
- ▶ 25 Metcalfe DD, Baram D, Mekort YA: Mast cells. *Physiol Rev* 1997;77:1033-1079.
- ▶ 26 Malaviya R, Abraham SN: Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* 2000;67:841-846.
- ▶ 27 Broche F, Tellado JM: Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin Crit Care* 2001;7:105-116.

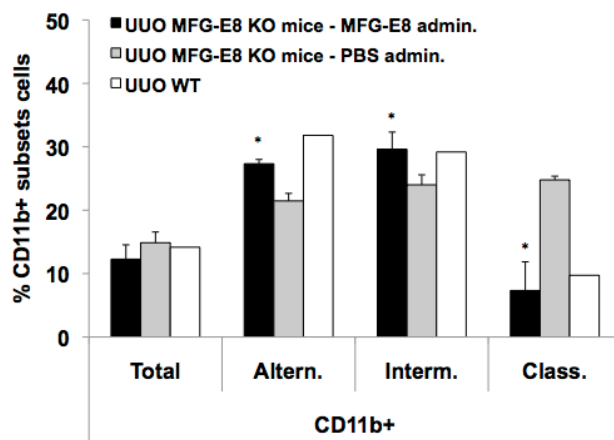
## Annexe 2 Effet systémique de MFG-E8

### A Effet systémique en vasculopathie chronique du transplant



La présence locale de MFG-E8 diminue le phénotype classique pro-inflammatoire des monocytes ainsi que l'activation des cellules T CD8+ en périphérie. 4 souris par groupe.  $*=p<0.05$

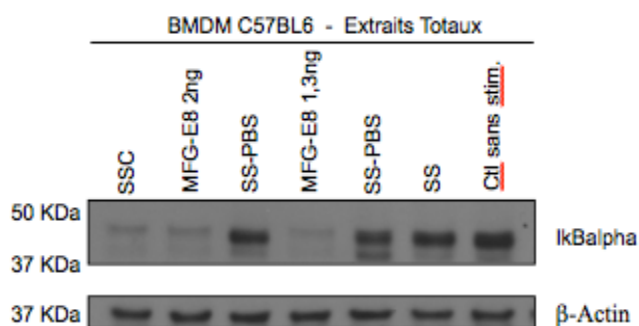
### B Effet systémique en maladie rénale obstructive



L'administration du recombinant MFG-E8 diminue le phénotype classique pro-inflammatoire des monocytes et augmente le phénotype alternatif et intermédiaire des monocytes en périphérie, reflet du phénotype obtenu dans la souris WT. 4 souris par groupe.  $*=p<0.05$

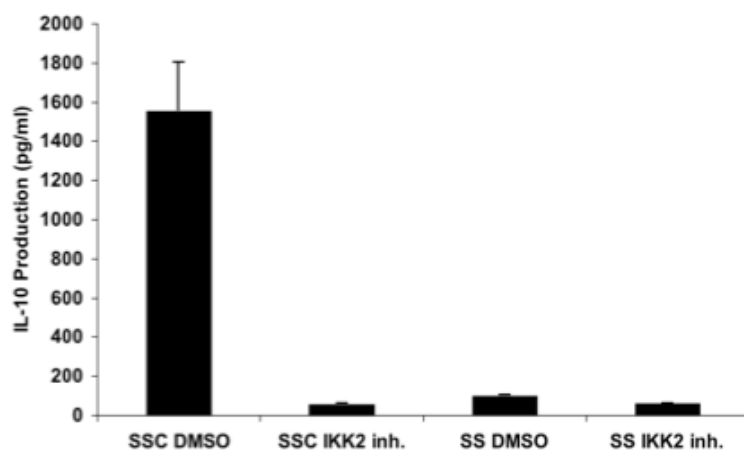
## Annexe 3 Implication de NFκB dans la programmation anti-inflammatoire du macrophage induite par SSC/MFG-E8

### A Dégradation de IκBα induite par le MFG-E8 dans le macrophage



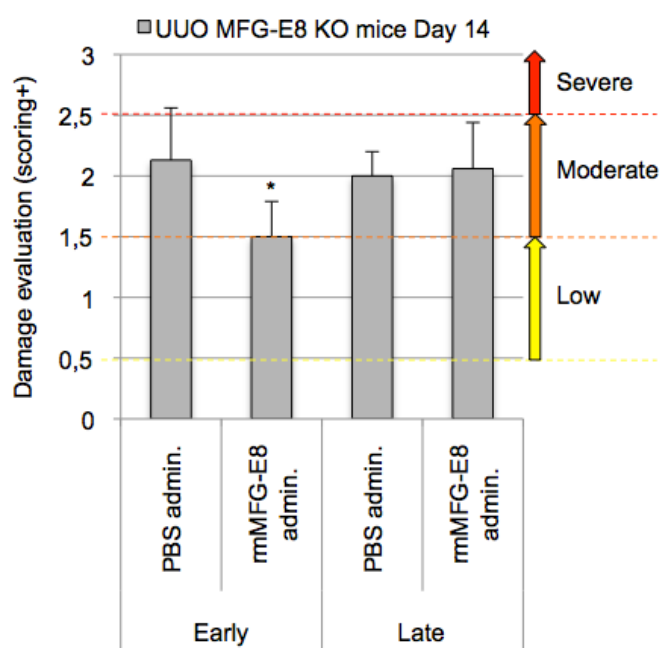
Suivant la stimulation de BMDMs avec le recombinant mMFG-E8, l'expression d'IκBα est diminuée, reflétant la diminution d'expression obtenue suivant la stimulation de BMDMs avec le milieu conditionné SSC.

### B Diminution de la production de cytokine anti-inflammatoire par le macrophage suite à l'inhibition de IKKβ



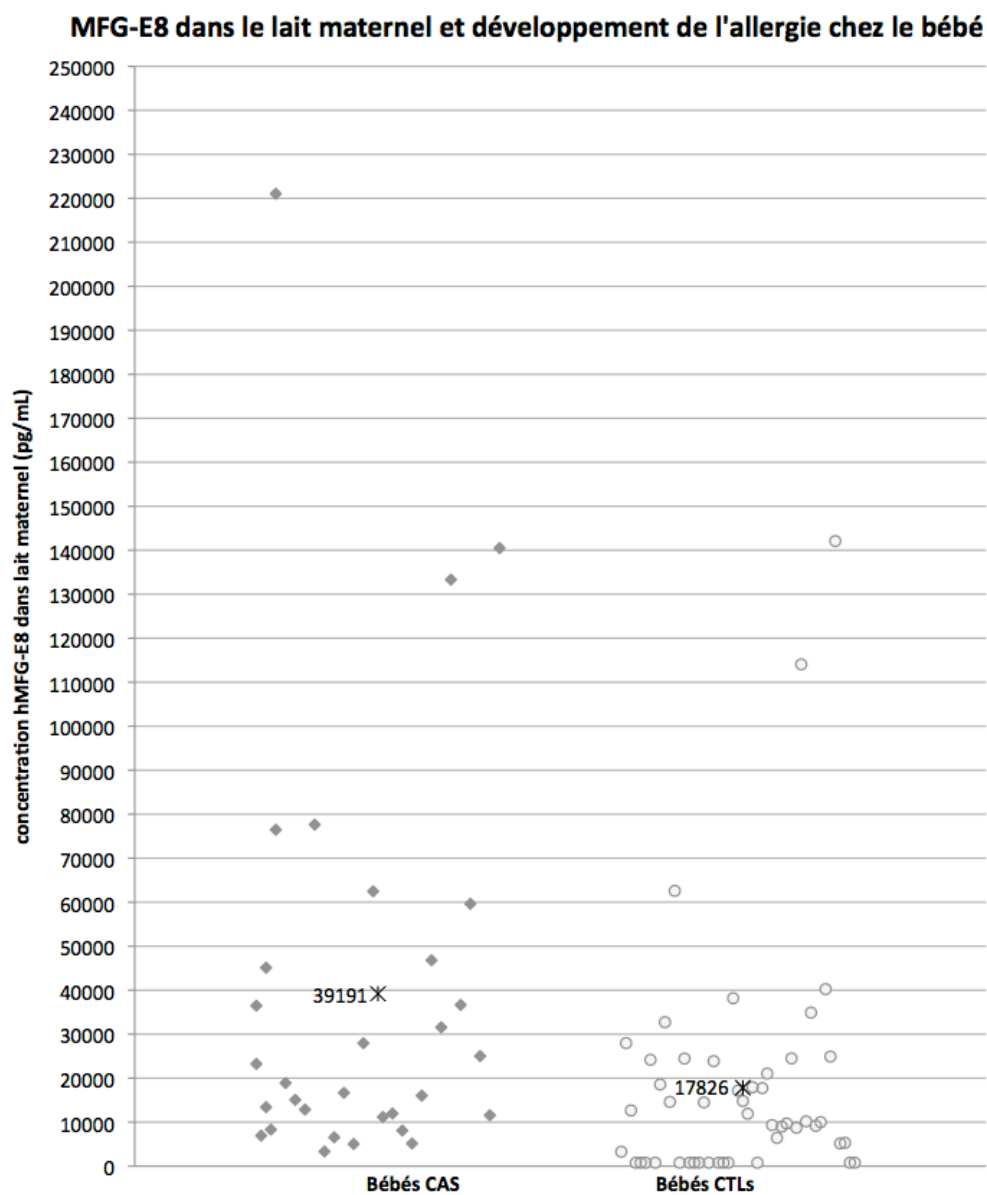
La production d'IL-10 est fortement inhibée suite au prétraitement (IKK2, inhiéteur de IKKβ) des BMDMs précédant l'exposition des BMDMs au SSC vs SS. Des résultats similaires ont aussi été obtenus quant à la production de TGFβ.

## Annexe 4 Fenêtre thérapeutique de l'administration du MFG-E8



Évaluation du dommage rénal après 14 jours d'UUO. Une diminution significative du dommage rénal est observée chez les souris administrées avec le recombinant mMFG-E8 vs PBS lorsque cette administration précède l'UUO (*Early*). La protection conférée par l'administration du recombinant MFG-E8 n'est pas observée lorsque l'administration est effectuée après l'induction de l'UUO (*Late*). 4 souris par groupe.  $*=p<0.05$

## Annexe 5 MFG-E8 dans la promotion des allergies



Une concentration élevée en MFG-E8 dans le lait maternel est associée au développement de l'allergie chez le bébé. Une moyenne de 39191 pg/mL est obtenue chez les bébés cas vs 17826 pg/mL chez les bébés ctls. Ctls: n = 50, Cas: n = 30.  $p < 0.01$

# *Curriculum Vitae*

## **Awards and honors**

Quebec National Assembly Award	2013
Canadian Society of Transplantation and American Society of Transplantation Distinguished Fellows Research Award	2011
Canadian Society of Nephrology Award (communication)	2014
Transplant Quebec Society Administration Committee's Special Award (communication)	2012
CHUM Ph.D. Award (communication)	2011
CHUM M.Sc. Award (communication)	2009
CRCHUM Scholarship	2011
Faculty of Graduate and Post-Doctoral Studies Doctorate Scholarship	2011
Faculty of Graduate and Post-Doctoral Studies Redaction Scholarship	2010
Faculty of Graduate and Post-Doctoral Studies Master Scholarship	2009
Canderel Scholarship	2009-2015

## **Selected submitted/published research articles, reviews and resumes**

MJ Brissette, P Laplante, S Qi, M Latour and JF Cailhier. Milk fat globule-epidermal growth factor-8 limits tissue damage through inflammasome modulation during renal injury. *Under revision Journal of Leukocyte Biology*.

MJ Brissette, S Lepage, AS Lamonde, I Sirois, J Groleau, LP Laurin and JF Cailhier. MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming. *PLoS One*. 2012;7(4):e36368.

LP Laurin, MJ Brissette, S Lepage, and JF Cailhier. Regulation of experimental peritonitis: a complex orchestration. *Nephron Exp Nephrol*. 2012;120(1):e41-6.

JF Cailhier, MJ Brissette, P Laplante. Milk fat globule-epidermal growth factor-8 limits tissue damage through inflammasome inhibition in renal obstruction. *American Society of Nephrology Kidney Week, November 2014*.

MJ Brissette, M Latour and JF Cailhier. MFG-E8 limits tissue damage through inflammasome modulation in renal injury. *Canadian Society of Nephrology Annual Meeting, April 2014*

MJ Brissette and JF Cailhier. MFG-E8 release by apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into pro-fibrotic cells. *Canadian Society of Transplant Annual Meeting, March 2013*.

MJ Brissette and JF Cailhier. Human and murine apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into antiinflammatory cells through MFG-E8 release. *Canadian Society of Transplant Annual Meeting, February 2012*.

MJ Brissette, S Lepage, L Cyr, S Qi and JF Cailhier. Milk fat globule-epidermal growth factor-8 modulates renal damage in a unilateral ureteral obstruction model. *World congress of Nephrology, April 2011*.

MJ Brissette, S Lepage, S Qi and JF Cailhier. Apoptotic endothelial cell microenvironment, through MFG-E8 release, reprograms macrophages into pro-fibrotic cells. *Canadian Society of Transplantation – American Society of Transplantation Distinguished Fellows Research Symposium, March 2011*.

MJ Brissette, S Lepage, and JF Cailhier. Apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into reparative cells. *American Society of Nephrology Annual Meeting, November 2010*.

MJ Brissette, S Lepage, and JF Cailhier. Apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into regulatory profibrotic cells. *Canadian Society of Nephrology Annual Meeting, May 2010*.

## **Selected communications**

MJ Brissette, M Latour and JF Cailhier. MFG-E8 limits tissue damage through inflammasome modulation in renal injury. *Canadian Society of Nephrology Annual Meeting, April 2014*

MJ Brissette et JF Cailhier. Rôle du MFG-E8 dans l'atténuation de l'insulte rénale dans un modèle d'obstruction rénale. *16e Congrès Annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CHUM, Décembre 2013.*

MJ Brissette et JF Cailhier. Apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into suppressive cells through MFG-E8 release. *XXIIe Journée Scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Novembre 2013.*

MJ Brissette and JF Cailhier. MFG-E8 release by apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into pro-fibrotic cells. *Canadian Society of Transplant Annual Meeting, March 2013.*

MJ Brissette et JF Cailhier. Rôle du MFG-E8 sur la réponse anti-inflammatoire dans les maladies rénales. *15e Congrès Annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CHUM, Décembre 2012.*

MJ Brissette, L Gafarova, et JF Cailhier. Rôle du MFG-E8 dans la vasculopathie chronique du transplant. *Colloque Annuel de la Société Québécoise de Transplantation, Octobre 2012.*

MJ Brissette and JF Cailhier. Human and murine apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into antiinflammatory cells through MFG-E8 release. *Canadian Society of Transplantation Annual Meeting, February 2012.*

MJ Brissette et JF Cailhier. Rôle du microenvironnement des cellules endothéliales apoptotiques et du MFG-E8 sur la reprogrammation anti-inflammatoire du macrophage dans la vasculopathie chronique du transplant. *14e Congrès Annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CHUM, Décembre 2011.*

MJ Brissette et JF Cailhier. Rôle du microenvironnement des cellules endothéliales apoptotiques et du MFG-E8 dans la reprogrammation immuno-régulatrice du macrophage. *XXIe Journée Scientifique de l'ICM, Novembre 2011.*

MJ Brissette, S Lepage, et JF Cailhier. Rôle du microenvironnement des cellules endothéliales apoptotiques sur la reprogrammation profibrotique du macrophage dans la vasculopathie chronique du transplant. *79e Congrès de l'Acfas, Mai 2011.*

MJ Brissette, S Qi and JF Cailhier. Milk fat globule-epidermal growth factor-8 modulates renal damage in an unilateral urétéral obstruction model. *World congress of Nephrology, April 2011.*

MJ Brissette, S Lepage, S Qi and JF Cailhier. Apoptotic endothelial cell microenvironment, through MFG-E8 release, reprograms macrophages into pro-fibrotic cells. *Canadian Society of Transplantation – American Society of Transplantation, Distinguished Fellows Research Symposium, March 2011.*

MJ Brissette, S Lepage, S Qi and JF Cailhier. Apoptotic endothelial cell microenvironment, through MFG-E8 release, reprograms macrophages into pro-fibrotic cells. *Canadian Society of Transplantation Annual Meeting, March 2011.*

MJ Brissette, S Lepage, et JF Cailhier. Rôle du microenvironnement des cellules endothéliales apoptotiques sur la reprogrammation profibrotique du macrophage dans la vasculopathie chronique du transplant. *13e Congrès Annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CHUM, Décembre 2010.*

MJ Brissette and JF Cailhier. Apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into reparative cells. *American Society of Nephrology Annual Meeting, November 2010.*

MJ Brissette, S Lepage, et JF Cailhier. Le microenvironnement des cellules endothéliales apoptotiques reprogramme les macrophages en cellules immuno-régulatrices. *XXe Journée Scientifique de l'Institut du Cancer de Montréal, Novembre 2010.*

MJ Brissette and JF Cailhier. Apoptotic endothelial cell microenvironment reprograms macrophages into regulatory pro-fibrotic cells. *Canadian Society of Nephrology Annual Meeting, May 2010.*

MJ Brissette, S Lepage, et JF Cailhier. Rôle du microenvironnement et du MFG-E8 sur la reprogrammation du macrophage dans les maladies rénales. *12e Congrès Annuel des étudiants, stagiaires et résidents du CHUM, Décembre 2009.*



