

RÔLE FONCTIONNEL DES CHIMIOKINES DANS UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE LÉSIONS DES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES RÉNALES

par

U. PANZER, O. M. STEINMETZ, F. THAISS et R. A. K. STAHL*

INTRODUCTION

L'activation des cellules endothéliales rénales joue un rôle pathophysiologique important dans les microangiopathies thrombotiques, les vascularites, le rejet de greffe allogénique, plusieurs types de glomérulonéphrites et les insuffisances rénales aiguës. Si les mécanismes moléculaires par lesquels la dysfonction endothéliale peut conduire à une maladie rénale progressive ne sont pas encore caractérisés en détail, ils pourraient inclure le développement d'un phénotype inflammatoire [1-2] et la participation de facteurs chimiotactiques des cellules inflammatoires et de molécules d'adhérence [3].

Au cours de l'inflammation, l'endothélium est le premier contact des leucocytes sanguins. Il peut donc jouer un rôle important dans le recrutement de leucocytes spécifiques, tels que les sous-populations de lymphocytes et les macrophages, au site de l'inflammation.

En général, les chimiokines et leurs récepteurs sont considérés comme les principaux régulateurs du trafic des leucocytes aux sites de l'inflammation. Les chimiokines sont des protéines sécrétées, qui sont exprimées par des leucocytes et des cellules résidentes tissulaires, telles que, par exemple, les cellules endothéliales. Leurs effets sont transmis, par les récepteurs des chimiokines, à sept domaines transmembranaires, et couplés aux protéines G, qui sont principalement exprimés sur des leucocytes [4]. Des études menées ces dix dernières années ont montré le rôle central des chimiokines et de leurs récepteurs dans la coordination précise de la migration des cellules inflammatoires dans les maladies rénales

* Medizinische Klinik, zentrum für Innere Medizin, Universität de Hambourg, Hambourg, Allemagne.

inflammatoires [5-8]. Il est intéressant de noter que, dans la plupart des cas, le recrutement des lymphocytes T est observé principalement dans l'interstitium tubulaire, alors que des monocytes sont décelés dans l'interstitium tubulaire et dans le glomérule [9]. Toutefois, l'observation fréquente d'autres sous-populations de leucocytes dans différents compartiments du tissu rénal, tels que le glomérule et l'interstitium tubulaire, demeure inexplicée. Nous avons donc analysé le profil d'expression des chimiokines dans un modèle de lésion microvasculaire aiguë chez le rat. Ce modèle est caractérisé par une lésion aiguë sévère des cellules endothéliales glomérulaires et tubulaires, suivie par une infiltration leucocytaire glomérulaire et tubulo-interstitielle massive et le développement d'une insuffisance rénale aiguë [10, 11].

UN MODÈLE DE LÉSION DES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES RÉNALES (LCEMR) CHEZ LE RAT

Des LCEMR ont été induites chez des rats Wistar mâles (pesant entre 200 et 220 g ; Charles River Wiga, Sulzfeld, Allemagne) d'après le protocole publié par Nangaku et Johnson [10]. Après une incision médiane, les rats étaient uninephrectomisés, un cathéter PE10 était inséré à travers l'artère fémorale gauche dans le pédicule rénal gauche et l'aorte était clampée au-dessus et en dessous de l'artère rénale gauche. Le rein gauche était rincé sélectivement avec du tampon PBS, puis perfusé avec des anticorps de lapin anti-cellules endothéliales. Après la procédure de perfusion, la circulation sanguine était restaurée en desserrant les clamps. L'ischémie totale ne dépassait jamais les cinq minutes. Après avoir desserré les clamps, la reperfusion du rein gauche était observée macroscopiquement et seuls les animaux chez lesquels la reperfusion était immédiate et complète étaient suivis.

Les anticorps anti-cellules endothéliales ont été induits chez des lapins par immunisation répétitive avec des cellules endothéliales glomérulaires de rat [12] solubilisées en Hunter Titer Max Gold. Comme le montre la coloration immunohistochimique des IgG de lapin (fig. 1a et b, voir Planche couleurs p. 255), l'anticorps polyclonal injecté en intraveineuse se fixe sur les cellules endothéliales glomérulaires et pérítubulaires. L'administration des anticorps a provoqué une insuffisance rénale aiguë concomitante avec le développement de lésions des cellules endothéliales glomérulaires. Des thromboses glomérulaires et des cellules endothéliales glomérulaires apoptotiques ont principalement été observées 24 heures après l'injection de l'anticorps (fig. 1c, voir Planche couleurs, p. 255). L'afflux des cellules inflammatoires dans le glomérule était déjà présent au temps précoce (24 heures) mais il était plus prononcé au jour 4 après l'induction de la LCEMR. Les cellules endothéliales des capillaires pérítubulaires étaient également sévèrement endommagées et le tout, associé à une infiltration massive de cellules mononucléées aux deux temps étudiés, conduisait à une lésion tubulaire prononcée (fig. 1d, voir Planche couleurs, p. 255). Des colorations ultérieures de C3 ont révélé une activation du complément glomérulaire (fig. 1e, voir Planche couleurs, p. 255) et tubulo-interstitielle (fig. 1f, voir Planche couleurs, p. 255).

RECRUTEMENT SPÉCIFIQUE DE LYMPHOCYTES T ET DE MONOCYTES DANS LES LÉSIONS MICROVASCULAIRES RÉNALES

Des colorations immunohistochimiques de néphrites animales ont montré le recrutement massif de lymphocytes T CD3 positifs et de monocytes ED-1 positifs dans l'interstitium rénal. De plus, une infiltration importante de monocytes était décelable dans le glomérule, alors que les lymphocytes T intraglomérulaires étaient rares. Une explication possible pour ce recrutement compartiment-spécifique de monocytes et de lymphocytes T pourrait être liée à une différence dans le profil d'expression des chimiokines des cellules endothéliales microvasculaires rénales endommagées. Nous avons donc choisi d'analyser les différences possibles dans les schémas d'expression, temporels et spatiaux, des chimiokines des cellules endothéliales.

L'induction de lésions des cellules endothéliales microvasculaires rénales s'accompagnait d'une augmentation de l'expression rénale d'ARNm codant pour des chimiokines qui attirent les lymphocytes T et les monocytes, avec une augmentation maximale à 24 heures. Parmi les ARNm analysés, l'IP-10/CXCL10 ($\times 119$), qui agit en premier par son récepteur CXCR3 sur les lymphocytes T activés [13, 14], était de loin la chimiokine la plus surexprimée (tableau I). La chimiokine d'attraction des monocytes MCP-1/CCL2 ($\times 65$) était également surexprimée de manière significative dans les LCEMR (tableau I), ce qui rappelle les résultats de nombreuses études déjà menées dans différents modèles animaux [15, 16]. Les expériences de *Western blot* ont confirmé que l'expression de l'ARNm de l'IP-10/CXCL10 augmentait parallèlement à la synthèse de la protéine IP-10/CXCL10 (*données non diffusées*).

LOCALISATION DE L'EXPRESSION DE LA CHIMIOKINE

Une hybridisation *in situ* a été effectuée, afin d'analyser la localisation de la chimiokine IP-10/CXCL10 la plus surexprimée (agissant sur le récepteur CXCR3 sur les lymphocytes T activés). L'induction de la LCEMR se traduisait par une

TABLEAU I. — EXPRESSION DES ARNm DES CHIMIOKINES RÉNALES. LE TABLEAU MONTRE L'EXPRESSION RELATIVE DE L'ARNm INTRARÉNAL DES CHIMIOKINES, ÉTUDIÉ EN TEMPS RÉEL RT-PCR, À 24 HEURES ET À 4 JOURS APRÈS L'INDUCTION DE LÉSIONS DES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES RÉNALES (\times FOIS PAR RAPPORT AU GROUPE CONTRÔLE UNINÉPHRECTOMISÉ).

	CONTRÔLE	LCEMR 24 HEURES	LCEMR 4 JOURS
IP-10/CXCL10	1	117	10
Mig/CXCL9	1	11	2
RANTES/CCL5	1	24	6
MCP-1/CCL2	1	10	8
MIP-1 α /CCL3	1	2	1

forte positivité de IP-10/CXCL10, avec un taux maximal à 24 heures, principalement localisée dans la zone de l'interstitium tubulaire. Comme le montre la figure 2, les transcrits d'IP-10/CXCL10 étaient principalement confinés dans les capillaires péri-tubulaires (fig. 2a, voir Planche couleurs, p. 256). De plus, l'expression d'IP-10/CXCL10 était décelable dans la zone périglomérulaire (fig. 2c, voir Planche couleurs, p. 256). Il est intéressant de noter qu'aucun signal IP-10/CXCL10 n'était décelable dans le glomérule, malgré la fixation d'anticorps et les lésions massives de l'endothélium glomérulaire. Les profils d'expression des ARN de chimiokines correspondaient aux leucocytes infiltrés. L'immunohistochimie a révélé de larges agrégats de lymphocytes T CD3 positifs, mais exclusivement dans les zones anatomiques où était observée l'expression de l'ARNm de l'IP-10/CXCL10, situées autour des capillaires tubulaires et dans la région périglomérulaire (fig. 2b et 2d, voir Planche couleurs, p. 256). Au contraire, aucune infiltration intraglomérulaire de lymphocytes T n'était observée. Les sondes n'ont montré que des signaux de bruit de fond. Aucune expression de la chimiokine n'a été décelée chez les animaux traités par des IgG de lapin non spécifiques après uninephrectomie (*données non diffusées*).

Ces découvertes montrent que les cellules endothéliales de différents compartiments rénaux répondent de manière spécifique à leur site à une lésion induite par des anticorps. Les différents profils d'expression des chimiokines fournissent une explication pour la spécificité des sous-populations de leucocytes infiltrés. Une observation similaire a déjà été faite dans les tissus hépatiques infectés par le virus de l'hépatite C. Dans ce cadre, l'IP-10/CXCL10 et le Mig/CXCL9 étaient sélectivement exprimés par l'endothélium sinusoidal, alors que les ligands CCR5, MIP-1 α /CCL3 et MIP-1 β /CCL4 étaient largement confinés à l'endothélium des vaisseaux des veines portes [17]. Il est donc possible que l'expression différentielle de différentes chimiokines par les cellules endothéliales de compartiments spécifiques soit un principe général important dans les maladies inflammatoires.

EFFETS DE LA NEUTRALISATION DE IP-10/CXCL10 SUR LE RECRUTEMENT DES LEUCOCYTES ET LA FONCTION RÉNALE

Afin de rechercher si l'IP-10/CXCL10 peut jouer un rôle fonctionnel dans le recrutement des lymphocytes T et des monocytes dans ce modèle de lésion des cellules endothéliales microvasculaires rénales, des animaux ont été traités avec un anticorps neutralisant anti-IP-10. Le traitement de rats ayant une LCEMR avec un anticorps anti-IP-10/CXCL10 s'est traduit par une diminution d'environ 40 p. 100 de l'infiltration tubulo-interstitielle des lymphocytes T, sans que l'infiltration tubulo-interstitielle des monocytes soit affectée (fig. 3a et b). L'effet de la neutralisation de IP-10/CXCL10 sur le recrutement des lymphocytes T tubulo-interstitiels était incomplet, suggérant que d'autres chimiokines ont une importance fonctionnelle. En fait, nous avons détecté une surexpression intrarénale, significative mais moins prononcée, de Mig/CXCL9, le deuxième ligand de CXCR3 identifié dans le rat, et une augmentation de l'expression du ligand de CCR5, RANTES/CCL5, dans tous les lysats de rein des animaux suivis après induction de LCEMR. Puisque le récepteur CCR5 est exprimé sur les lympho-

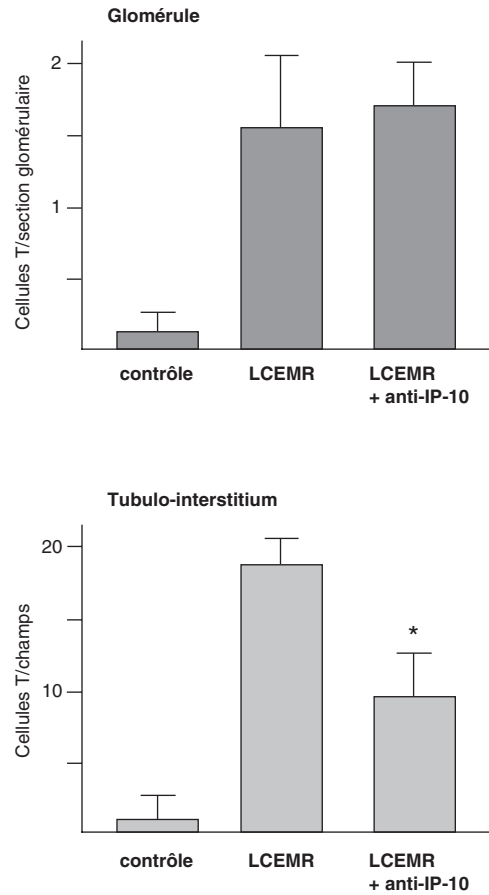


FIG. 3. — Les effets de la neutralisation des IP-10/CXCL10 sur le recrutement de leucocytes. L'infiltration des cellules T glomérulaires et tubulo-interstitielles a été évaluée par coloration immunohistochimique avec un anticorps CD3. Le nombre de cellules est exprimé en cellules CD3 positives par glomérule (panneau du haut) ou par champ de tissu tubulo-interstitiel (panneau du bas). Les résultats sont donnés sous forme de la moyenne de 50 sections glomérulaires ou de 30 champs de tissu tubulo-interstitiel + ou - SD.

cytes T, il est possible que ces chimiokines soient également impliquées dans le recrutement de ces cellules.

La réduction de l'infiltration des lymphocytes T tubulo-interstitiels était associée à une amélioration de la fonction rénale des animaux atteints d'une lésion microvasculaire et traités par l'anticorps neutralisant IP-10/CXCL10 (*données non diffusées*). Par contre, l'albuminurie n'était pas altérée de manière significative par le blocage de IP-10/CXCL10 (*données non diffusées*), ce qui remet fortement en question le rôle fonctionnel important du IP-10/CXCL10 dans l'apparition des lésions glomérulaires.

AUTRES MODÈLES DE LÉSIONS DES CELLULES ENDOTHÉLIALES MICROVASCULAIRES RÉNALES

Comme nous l'avons mentionné plus haut, nous manquons de modèles animaux pertinents et bien caractérisés de lésions des cellules endothéliales microvasculaires rénales. Outre le modèle décrit ci-dessus, Warner et al. ont démontré que l'injection à des souris d'une lectine spécifique de type B dérivée du champignon *Marasmius oreades* (MOA) se traduisait par la fixation de cette lectine sur les cellules endothéliales glomérulaires, grâce à des composants membranaires carbohydratés, conduisant à des lésions et à la mort des cellules associés à la formation de thrombi plaquettes/fibrine. Ils suggèrent que la lésion microangiopathique glomérulaire provoquée par le MOA pourrait permettre d'étudier la pathophysiologie des lésions des cellules endothéliales et leur lien avec la lésion microangiopathique glomérulaire [18]. Le groupe de Molitoris et Sutton a étudié le rôle des lésions des cellules endothéliales microvasculaires rénales dans la pathophysiologie des insuffisances rénales ischémiques aiguës. Dans ce but, ils ont examiné les marqueurs biochimiques des lésions des cellules endothéliales et les changements morphologiques de l'endothélium microvasculaire rénal, dans un modèle de rongeurs atteints d'insuffisance rénale aiguë ischémique [19]. Par l'ensemble de ces observations, ces auteurs montrent élégamment que des lésions des cellules endothéliales microvasculaires rénales surviennent dans leur modèle d'insuffisance rénale aiguë ischémique.

CONCLUSION

Ces découvertes décrites par notre groupe [20] fournissent une nouvelle explication de la diversité de l'endothélium rénal et de sa réponse à une lésion microvasculaire rénale. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse d'une hétérogénéité fonctionnelle des cellules endothéliales de différents sites vasculaires [21] et peuvent permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui peuvent être impliqués dans le recrutement spécifique des lymphocytes T et des monocytes dans les maladies microvasculaires rénales.

BIBLIOGRAPHIE

1. KANG DH, KANELIS J, HUGO C et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002, **13**, 806-816.
2. MOLITORIS BA, SUTTON TA. Endothelial injury and dysfunction : Role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int*, 2004, **66**, 496-499.
3. SEGAL MS, BAYLIS C, JOHNSON RJ. Endothelial health and diversity in the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2006, **17**, 323-324.
4. CHARO IF, RANSOHOFF RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*, 2006, **354**, 610-621.
5. KELLEY VR, ROVIN BH. Chemokines : therapeutic targets for autoimmune and inflammatory renal disease. *Springer Semin Immunopathol*, 2003, **24**, 411-421.

6. PANZER U, STEINMETZ OM, STAHL RA et al. Kidney diseases and chemokines. *Curr Drug Targets*, 2006, **7**, 65-80.
7. ANDERS HJ, VIELHAUER V, SCHLONDORFF D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*, 2003, **63**, 401-415.
8. HOLDSWORTH SR, KITCHING AR, TIPPING PG. Chemokines as therapeutic targets in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000, **9**, 505-511.
9. SEGERER S, CUI Y, HUDKINS KL et al. Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 2000, **11**, 2231-2242.
10. NANGAKU M, ALPERS CE, PIPPIN J et al. A new model of renal microvascular endothelial injury. *Kidney Int*, 1997, **52**, 182-194.
11. NANGAKU M, ALPERS CE, PIPPIN J et al. Renal microvascular injury induced by antibody to glomerular endothelial cells is mediated by C5b-9. *Kidney Int*, 1997, **52**, 1570-1578.
12. WOLF G, HAMANN A, HAN DC et al. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells : potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 1999, **56**, 860-872.
13. FARBER JM. Mig and IP-10 : CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 1997, **61**, 246-257.
14. QIN S, ROTTMAN JB, MYERS P et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*, 1998, **101**, 746-754.
15. WENZEL U, SCHNEIDER A, VALENTE AJ et al. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophages influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int*, 1997, **51**, 770-776.
16. TESCH GH, MAIFERT S, SCHWARTING A et al. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas (lpr) mice. *J Clin Invest*, 1999, **103**, 1813-1824.
17. SHIELDS PL, MORLAND CM, SALMON M et al. Chemokine and Chemokine Receptor Interactions Provide a Mechanism for Selective T Cell Recruitment to Specific Liver Compartments Within Hepatitis C-Infected Liver. *J Immunol*, 1999, **163**, 6236-6243.
18. WARNER RL, WINTER HC, SPEYER CL et al. Marasmius oreades lectin induces renal thrombotic microangiopathic lesions. *Exp Mol Pathol*, 2004, **77**, 77-84.
19. SUTTON TA, MANG HE, CAMPOS SB et al. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, **285**, F191-F198.
20. PANZER U, STEINMETZ OM, REINKING RR et al. Compartment-specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL10 in a model of renal endothelial microvascular injury. *J Am Soc Nephrol*, 2006, **17**, 454-464.
21. LIM YC, GARCIA-CARDENA G, ALLPORT JR et al. Heterogeneity of endothelial cells from different organ sides in T-cell subset recruitment. *Am J Pathol*, 2003, **162**, 1591-1601.

