THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale 649 :
« *Rosalind Franklin* » - Énergie – Environnement - Biosanté

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie
.....

Présentée par : Romain BOST

.....

****

Hypothèse d'un axe immuno-régulateur mettant en jeu l'interleukine-33 et l'amphiréguline dans l'inflammation stérile associée à l'ischémie-reperfusion hépatique

****

Directeurs de Thèse :
DR André HERBELIN – Pr Jean-Marc GOMBERT - Aurélie ROBIN

****

Soutenue le 11 mars 2025

devant la Commission d'Examen

****

JURY

DR André HERBELIN, Poitiers, Directeur de thèse
Aurélie ROBIN, Poitiers, Co-encadrante de thèse
Pr Jean-Pierre COUTY, Paris, Rapporteur
Dr François LEGOUX, Paris, Rapporteur
Pr Christine SILVAIN, Poitiers, Examinatrice
Dr Marion SALOU, Paris, Examinatrice

L'inflammation stérile induite par la séquence d'ischémie-reperfusion (IR), phénomène inhérent à la transplantation d'organe, est un processus conduisant à rétablir l'intégrité des tissus. L'objectif de cette thèse était de déterminer si, l'Interleukine-33 (IL-33), une alarmine libérée par les cellules endothéliales et épithéliales en souffrance, et l'amphiréguline (AREG), décrite comme participant à la résolution de l'inflammation, pouvaient constituer un axe immuno-régulateur impliquant les lymphocytes T (LT) innés (LTI) et régulateurs (Treg) dans le contexte de l'IR hépatique.

A cette fin, nous avons procédé à un immuno-*monitoring* sur une collection biologique de *sera* et cellules immunitaires périphériques de patients transplantés hépatiques (TH) prélevés à différents temps durant la séquence de TH, et nous avons, en parallèle, utilisé un modèle d'IR hépatique murin (IRm) comprenant des souris de type sauvage et transgéniques déficientes en IL-33 (IL-33KO) ou déficientes en iNKT (« invariant natural killer cells ») (Jα18KO) afin de suivre les phénomènes cellulaires et moléculaires intra-hépatiques liés à l'IR.

Mise en évidence d'un axe IL-33/LTI dans la genèse des lésions d'IR : Nos données ont révélé que lors d'une IRm, l'IL-33 joue un rôle clé dans le recrutement périphérique des iNKT, lesquels infiltrent le foie. De plus, dans ce modèle, l'activation des iNKT s'est avérée dépendre de l'IL-33, comme en a témoigné la perte d'activation chez les souris IL-33KO. Le fait que les lésions après IRm aient été retrouvées réduites chez les souris Jα18KO suggère la contribution des iNKT dans ce phénomène délétère. Cette fonction physio-pathologique a aussi été étudiée chez l'humain, où nous avons élargi notre étude des LTI aux MAIT (« mucosal-Associated Invariant T cells »). Les résultats ont révélé une augmentation de la proportion et du niveau d'activation des MAIT et iNKT post-TH, laquelle s'est révélée être corrélée avec les taux circulants d'IL-33 à la reperfusion du greffon. Une corrélation positive a également été établie entre le niveau d'activation des MAIT et des iNKT et le mauvais pronostic de reprise précoce des fonctions du greffon.

Hypothèse d'un axe réparateur IL-33/AREG/LT : Un pic d'AREG systémique a été observé en TH et en IRm dans les premières heures suivant la reperfusion hépatique. Cette libération était corrélée aux biomarqueurs de souffrance hépatique et aux lésions hépatiques en TH et IRm, tandis qu'elle était associée à un mauvais pronostic pour la reprise des fonctions du greffon en TH. Par immunofluorescence, nos données ont montré que les hépatocytes expriment l'AREG constitutivement à l'échelle nucléaire. Dans les premières heures suivant l'IRm, une perte d'AREG intra-hépatique a été observée, concomitante au pic de libération systémique, suggérant que les hépatocytes constituent la source majeure d'AREG systémique observée après TH ou IRm. Par ailleurs, l'immuno-monitoring a révélé une augmentation des Treg circulants (post TH) et intrahépatiques (post-IRm), corrélée à la libération d'IL-33 et non retrouvée chez les souris IL-33KO. L'activation précoce des Treg et celle persistante des iNKT et des MAIT en TH étaient corrélées avec la libération d'AREG.

En conclusion, ces résultats apportent une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans le syndrome d'IR hépatique, et propose un nouveau schéma hypothétique d'un axe immuno-régulateur IL-33/AREG/LT, avec l'implication de l'IL-33, d'abord dans une phase délétère, laquelle met en jeu les LTI, puis probablement de manière coordonnée avec l'AREG dans une phase tardive de régénération/réparation du tissu hépatique qui dépend des Treg et des LTI. A terme, la fonction délétère et/ou protectrice de l'AREG en IR hépatique, et plus généralement dans l'inflammation stérile, méritera d'être éprouvée par l'emploi de souris déficientes en AREG.

Mots-clés : Ischémie-reperfusion / Transplantation hépatique / Inflammation stérile / Immuno-régulation / Amphiréguline / Interleukine-33 / Lymphocytes T innés / Lymphocytes T régulateurs

Sterile inflammation induced by the ischaemia-reperfusion (IR) sequence, a phenomenon inherent to organ transplantation, is a process aimed at restoring tissue integrity. The aim of this thesis was to determine whether Interleukin-33 (IL-33), an alarmin released by suffering endothelial and epithelial cells, and amphiregulin (AREG), described as participating in the resolution of inflammation, could constitute an immunoregulatory axis involving innate T lymphocytes (LTI) and regulatory T lymphocytes (Treg) in the context of hepatic IR.

To this end, we carried out immunomonitoring on a biological collection of sera and peripheral immune cells from liver transplant patients (LT) taken at different times during the LT sequence, used a murine hepatic IR model (IRm) involving wild-type and transgenic mice deficient in IL-33 (IL-33KO) or iNKT (invariant natural killer cells) (Jα18KO) in order to look at IR-related cellular and molecular intrahepatic phenomena.

Evidence of an innate IL-33/LT axis in the development of IR lesions: Our data showed that during IRm, IL-33 plays a key role in the peripheral recruitment of iNKT that infiltrate the liver. Furthermore, iNKT activation in this model was shown to be IL-33 dependent, as evidenced by the loss of activation in IL-33KO mice. The fact that lesions after IRm were found to be reduced in Jα18KO mice suggests the contribution of iNKT to this deleterious phenomenon. This physiopathological function was also studied in humans, where we extended our study of LTI to MAIT (mucosal-associated invariant T cells). The results showed an increase in the proportion and level of activation of MAIT and iNKT after LT, which was shown to correlate with circulating IL-33 levels at graft reperfusion. A positive correlation was also found between the level of MAIT and iNKT activation and the poor prognosis for early graft function recovery.

Hypothesis of an IL-33/AREG/LT repair axis: A peak of systemic AREG was observed in LT and IRm in the first hours after hepatic reperfusion. This release correlated with biomarkers of liver injury and damage in both TH and IRm and was associated with a poor prognosis for recovery of graft function in TH. Using immunofluorescence, our data showed that hepatocytes express AREG at the nuclear level under basal conditions. In the first hours after IRm, a loss of intrahepatic AREG was observed, coinciding with the peak of systemic release, which may therefore be the main source of systemic AREG observed after LT or IRm. In addition, immunomonitoring showed an increase in circulating and intrahepatic Treg after LT, which correlated with IL-33 release. This phenomenon was absent in IL-33KO mice after IRm. Early Treg activation in humans was associated with AREG levels at the end of TH. The study also showed persistent activation of iNKT and MAIT, which correlated with AREG release during TH.

In conclusion, these results provide a better understanding of the phenomena involved in the hepatic IR syndrome and suggest a new hypothetical IL-33/AREG/LT immunoregulatory axis involving IL-33, initially in a deleterious phase involving LTI, and then probably in a coordinated manner with AREG in a late phase of liver tissue regeneration/repair dependent on Treg and LTI. Finally, the deleterious and/or protective function of AREG in hepatic IR, and more generally in sterile inflammation, will have to be tested using AREG-deficient mice.

Key words: Ischemia-reperfusion / Liver transplantation / Sterile inflammation / Immunoregulation / Amphireguline / Interleukine-33 / Innate T lymphocytes / Regulatory T lymphocytes

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier les membres de mon jury de thèse. Merci au Prof. Jean-Pierre COUTY et au Dr. François LEGOUX d'avoir accepté le rôle de rapporteurs pour mon travail de thèse, ainsi qu'au Prof. Christine SILVAIN et au Dr. Marion SALOU d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à mes directeurs de thèse, le DR. André HERBELIN et le Prof. Jean-Marc GOMBERT, ainsi que ma co-encadrante de thèse Aurélie ROBIN, qui à la suite de mon stage dans leur groupe de recherche, m'ont fait confiance pour réaliser ce travail de thèse. Votre expertise et votre implication au cours de ces années m'ont permis de progresser et de sortir cette expérience grandit. Je tiens également à vous remercier de votre soutien humain, en particulier lors de l'année 2024, qui comme vous le savez, ne m'a pas épargné.

Je remercie également la région Nouvelle-Aquitaine et l'INSERM pour l'allocation doctorale qui m'a permis de réaliser ces trois années de thèse. J'adresse mes remerciements à Prof. Frédéric BECK, directeur de l'Ecole Doctorale Biosanté et Madame Sophie BERGERONNEAU, secrétaire de l'Ecole Doctorale pour leur accompagnement, et tout particulièrement lors cette année 2024.

Je remercie également le Prof. Mathias A. ALVILA de l'université de Pampelume et le Prof. Zaiss DIETMAR de l'université de Regensburg ainsi qu'à leurs étudiants respectifs qui ont acceptés de nous envoyer des échantillons biologiques importants pour ce projet de thèse. De même, je tiens à remercier le Prof. Jean-Michel GOUJON du service d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Poitiers, qui nous a gracieusement donné accès à des échantillons biologiques pour cette thèse.

La réalisation de cette thèse aurait été différente sans la présence précieuse de nombreuses personnes.

A Aurélie. Bien que je t'aie déjà remercié un peu plus haut en tant que co-encadrente de ma thèse mais je tiens ici à remercier la collègue de la Team souris. Si aujourd'hui, j'ai à mon sens réussi cette thèse, c'est sans aucun doute en ayant pu compter sur l'aide précieuse d'une co-encadrante exceptionnelle. Je tiens à te remercier énormément pour toute l'aide que tu m'as apporté lors de cette thèse, autant sur le plan scientifique, que sur le plan l'humain. L'« AREG » n'aura pas été qu'une protéine mais aussi de jolies expériences de travail, et surtout un voyage grec au moment où « *the fire is finish* », dans un hôtel seize étoiles avec la découverte d'un magnifique Parthénon au pied de la colline et de l'expérimentation animale en pleine rue. Pour tout cela, je tiens à te dire merci.

A Sarah. Tu ne peux pas imaginer ma gratitude pour ces quatre dernières années. Radicalement différents et pourtant une entente qui dépasse l'entendement… Merci d'avoir été là, d'avoir écouté, d'avoir compris, d'avoir également été ma partenaire de ménage et j'en passe… mais surtout d'avoir toujours été toi ! (PS : je te promets que les posters continueront d'être édités où que tu sois, quoi que tu fasses !)

A Hélène. Impossible également de dire un merci à l'égal de ce que je te dois. Je te remercie pour avoir partagé mon bureau au début de ma thèse lors de ton M2, pour ton écoute et tes encouragements au moment où j'en avais besoin. Merci pour la musique, merci pour tout.

Je ne saurais que trop remercier Amandine, Amélie, Emma, Anaïs. Amandine, notre psy attitrée du labo (bureau PS J240 pour les consultations), ton soutien et ta bonne humeur ont été précieux. Amélie, merci pour ta bonne humeur, ton aide précieuse pour les manips, et surtout nos discussions canasson, grâce à toi, j'ai évité bien des faux pas équestres auprès de Camille ! Emma et Anaïs, vous êtes arrivées bien trop tard dans la joyeuse troupe d'IRATI… ou peut-être suis-je celui qui suis partit trop tôt ? En tout cas merci à vous toutes pour ces moments passés ensemble, pour les discussions, les fous rires et cette ambiance qui a rendu cette année en votre compagnie bien plus agréable.

Alice, merci de m'avoir accueilli en 2020 (en particulier dans un contexte sanitaire compliqué) pour effectuer mes 2 stages très enrichissants et qui ont, par ailleurs, débouchés sur une thèse. Sans ta confiance à la base, il n'y aurait pas eu cette thèse. C'est drôle je me souviens de notre entretien pour le stage comme si c'était hier alors que ça fait bientôt 5 ans.

Sébastien, Nina, Marine merci pour votre gentillesse, aide et soutien. Un grand merci pour les bons moments que nous avons partagé au labo et aux congrès.

Je souhaite aussi remercier Laurine ROGER, qui a effectué son stage sous ma supervision et, qui m'a beaucoup aidé en mettant au point avec moi, deux protocoles lors de ce travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi.

Je souhaite à exprimer ma profonde gratitude à l'ensemble des membres de la U1313, tous ceux qui, même non cités nommément, m'ont apporté leur bonne humeur et leur amitié, ainsi que leur aide tout au long de ma thèse.

Si aujourd'hui j'en suis là, c'est grandement grâce à mes proches.

A Camille. Cette thèse, je l'ai travaillée, écrite mais nous l'avons vécue ensemble. Chaque jour, tu as été là partageant avec moi les bons moments, mes petites victoires mais aussi ceux de doute. Tu as été mon équilibre, ma force silencieuse et mon soutien indéfectible même quand tu le sais cette aventure semblait inatteignable ou interminable. Tu as accepté de t'adapter pour que je puisse mener cette thèse et aujourd'hui je te le redis, je tiendrai ma promesse. Merci pour ta patience, ton amour, ta présence inestimable, merci pour tout. Cette thèse c'est grâce à toi.

A mes parents. Depuis mon enfance jusqu'à aujourd'hui, vous avez été là, présents à chaque étapes, défis, échecs et réussites. Vous nous avez guidés avec bienveillance, encouragés dans nos choix, et surtout vous nous avez donnés la liberté de construire la vie que nous souhaitions. Si j'ai pu mener ce parcours à bien, c'est en partie grâce à vous, votre soutien, votre patience, et votre amour. Vous avez cru en moi, et pour cela, Maman, Papa, MERCI. Cette thèse est autant la vôtre que la mienne, je vous la dédie.

Cath, Toutoune. Même si nous n'avons pas eu l'occasion de beaucoup se voir ces trois dernières années, je sais que vous avez été là. Merci pour votre présence, votre énergie, d'être vous tout simplement. (PS : Oui même dans une thèse je continuerais à vous appeler comme ça !) Cath, il est 2h11, j'écris cette ultime phrase de mon mémoire pour te dire merci.

Mes derniers remerciements s'adressent à mes amis, Dylan, Alizée, Dany, Benjamin, pour leurs encouragements et leurs soutiens sans faille.

« Après l'orage, l'arc en ciel… »

Merci Sayû

Table des matières

TABLE DES MATIERES 1

ABREVIATIONS 3

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 5

AVANT-PROPOS 7

INTRODUCTION GENERALE 9

PARTIE I – LES ENJEUX IMMUNOLOGIQUES EN TRANSPLANTATION D'ORGANE ASSOCIES A L'INFLAMMATION STERILE 9

I- La transplantation hépatique 10

a. Etat des lieux de la transplantation hépatique 10

b. Principales indications à une TH 11

c. Les nouveaux enjeux de la TH 11

II- Le foie, un organe complexe hautement immunologique 13

a. Structure et fonctions du foie 13

b. Les cellules composant le foie 16

III- L'Ischémie-reperfusion : un processus d'inflammation stérile inhérent à la transplantation d'organe 21

a. L'inflammation stérile 21

b. Définir inflammation stérile associée à l'IR en TH 26

PARTIE II – LA PLACE PRIVILEGIEE DE L'ALARMINE INTERLEUKINE-33 ET DE L'IMMUNITE NATURELLE DANS L'INDUCTION DE L'INFLAMMATION STERILE ASSOCIEE A L'IR 33

I- L'interleukine-33 : une cytokine/alarmine au cœur de l'inflammation stérile 34

a. Présentation générale de l'IL-33 34

b. Biologie moléculaire de l'IL-33 35

c. Expression tissulaire et régulation biologique 38

d. Cibles cellulaires et fonctions associées de l'IL-33 39

II- L'immunité naturelle, une immunité abondante dans le foie 40

a. L'immunité naturelle 41

b. Les LTI : caractéristiques et fonctions 44

III- Le lien privilégié de l'IL-33 avec les LTI dans la genèse des lésions d'IR d'organe 51

a. L'IL-33 dans la physiopathologie des lésions d'IR d'organe 51

b. Place des LTI dans les lésions d'IR d'organe : hypothèse d'un axe IL-33/LTI en transplantation hépatique 53

PARTIE III – L'INFLAMMATION STERILE, UN PROCESSUS POUR RETABLIR L'INTEGRITE D'UN TISSU 57

I- Principes de la régénération hépatique : un modèle unique de réparation tissulaire 58

a. Mécanismes fondamentaux de la régénération hépatique 58

b. Les EGF, la principale voie mitogène dans la régénération hépatique 61

II- L'AREG : un facteur de croissance épidermique impliqué dans la réparation des tissus ... 63
a. Présentation générale de l'AREG ... 63
b. Biologie moléculaire de l'AREG ... 63
c. Expression cellulaire de l'AREG et fonction biologique ... 70
III- Hypothèse d'un axe immunitaire réparateur IL-33/AREG/Treg associé à l'IR hépatique .. 75
a. Les Treg : archétype des cellules T immuno-régulatrices et leur lien privilégié avec l'IL-33 et l'AREG ... 76
b. L'IL-33, l'AREG et les Treg dans un axe commun en IR d'organe ? ... 82
IV- Les LTI : des cellules douées de dualité fonctionnelle et partageant des fonctions immuno-régulatrices avec les Treg ... 85
a. Les iNKT, des chefs d'orchestre de la réparation ? ... 85
b. Les MAIT, une population directement impliquée dans la réparation tissulaire ... 87

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE ... 91

RESULTATS ... 93

I- Préambule ... 94
a. Limites de l'étude chez l'humain ... 94
b. Modèle murin d'IR hépatique ... 95
MANUSCRIT N°1 ... 98
EARLY ACTIVATION AND RECRUITMENT OF INVARIANT NATURAL KILLER T CELLS DURING LIVER ISCHEMIA-REPERFUSION: THE MAJOR ROLE OF THE ALARMIN INTERLEUKIN-33 ... 98
MANUSCRIT N°2 ... 129
SEVERITY OF HEPATIC IR INJURY IS ASSOCIATED WITH EARLY SYSTEMIC RELEASE OF NUCLEAR AMPHIREGULIN BY SUFFERING HEPATOCYTES AND PREDICTS DYSFUNCTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION ... 129

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ... 165

I- L'axe alarmine IL-33/LTI dans l'inflammation stérile associée à l'IR hépatique ... 166
a. Recrutement en périphérie des iNKT par l'IL-33 dans le modèle murin d'IR et en TH : contribution aux lésions tissulaires ? ... 166
b. Implication d'autres LTI dans la phase précoce inflammatoire d'IR hépatique ? ... 170
c. Conclusion à propos de l'axe alarmine IL-33/LTI dans l'inflammation stérile associée à l'IR hépatique ... 171
II- Hypothèse d'un axe IL-33/AREG/LT dans la réparation hépatique ... 172
a. Contribution de l'AREG et de l'IL-33 à l'activation/recrutement et à l'expansion des Treg. ... 172
b. AREG : signification physiopathologique dans la réparation tissulaire suite à l'IR associée à la TH 175
c. Un axe AREG/LTI dans la réparation des lésions d'IR ? ... 182
d. Eprouver l'hypothèse d'un axe IL-33/AREG/LT/AREG protecteur ... 187

CONCLUSION GENERALE ... 193

BIBLIOGRAPHIE ... 195

Abréviations

5-OE-RU	5-amino-ribityl uracil
aa	Acide aminé
ABM	Agence de biomédecine
ADAM-17	*A disintegrin and metalloprotease 17*
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALAT	Alamine aminotransferase
AMPc	Adénosine-monophosphate cyclique
APC	*Antigen presenting cells*
AREG	Amphiréguline
AREG-CTF	Fragment d'amphiréguline transmembranaire-cytoplasmique
AREGKO	Souris déficiente en AREG
ARN	Acides ribonucléiques
ARNm	ARN messager
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
CD	Cluster de différenciation
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DAMPs	*Damage-associated molecular patterns*
DC	*Dendritic cells*
EGF	*Epidermal growth factor*
EGFR	*Epidermal growth factor receptor*
Foxp3	*Forkhead box P3*
HGF	*Hepatocyte growth factor*
HIF	*Hypoxia-inducible factor*
HMGB1	*High mobility group box 1*
HSC	*Hepatic stellate cells*
IFN-γ	Interféron gamma
IL-	Interleukine
IL-1RaCP	*Interleukin 1 receptor accessory protein*
IL-33KO	Souris déficiente en IL-33
ILC	*Innate lymphoid cells*
iNKT	*Invariant natural killer T cell*
IR	Ischémie-reperfusion
Jα18KO	Souris déficiente en cellules iNKT

KC	*Kupfer cells*
kDa	Kilodalton
LB	Lymphocyte B
LSEC	*Liver sinusoidal endothelial cells*
LT	Lymphocyte T
LTI	Lymphocyte T inné
MAIT	*Mucosal-associated invariant T cell*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases*
MEAF	*Model for early allograft function*
MELD	*Model for end-stage liver disease*
MR1	*MHC-related protein 1*
MyD88	*Myeloid differentiation primary response 88*
NET	*Neutrophil extracellular traps*
NF-κB	*Nuclear factor kappa B*
NK	*Natural killer cells*
NKG2	*Natural killer group 2*
NLS	*Nuclear localisation signal*
O_2	Oxygène
PLZF	*Promyelocytic leukemia zinc finger*
PNN	Polynucléaires neutrophiles
pro-AREG	Forme complète amphiréguline
PRR	*Pattern recognition receptors*
ROS	*Reactive oxygen species*
scRNAseq	Séquençage unicellulaire de l'ARN
ST2	*Suppressor of tumorigenicity 2*
ST2KO	Souris déficiente en ST2
T-bet	*T-box expressed in T cells*
TCR	*T cells receptors*
TGF	*Transforming growth factor*
TH	Transplantation hépatique
Th	*T helper*
TLR	*Toll like receptor*
TNF-α	*Tumor necrosis factors alpha*
Treg	Lymphocyte T régulateur
T-γδ	Lymphocytes T gamma delta
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
WT	*Wild-type*
α-GalCer	α-galactosylceramide

Liste des Figures et Tableaux

Figure 1 : Évolution du nombre de greffes hépatiques en France depuis 1990. ..... *10*
Figure 2 : Evolution de la demande en greffe hépatique et du nombre de greffes en France entre 2018 et 2023. ..... *12*
Figure 3 : Anatomie hépatique chez l'humain. *14*
Figure 4 : Anatomie du lobule hépatique. *15*
Figure 5 : Répartition des différentes populations immunitaires intra-hépatiques chez l'humain sain et modélisation de la circulation des cellules immunitaires au niveau des sinusoïdes. *16*
Figure 6 : Exemples de populations immunitaires impliquées dans la détection des DAMPs et dans l'initiation des réponses inflammatoires stériles. *22*
Figure 7 : Cascade inflammatoire de l'IR hépatique et ses conséquences. *27*
Figure 8 : Structure génétique et protéique de l'IL-33, ainsi que sa configuration tridimensionnelle en interaction avec ses récepteurs. *35*
Figure 9 : Signalisation et régulation négative de l'IL-33. ..... *37*
Figure 10 : L'IL-33 agit comme une "alarme" immunitaire, coordonnant à la fois la défense et la réparation tissulaire. *40*
Figure 11 : Dynamique temporelle et intensité des réponses immunitaires après stimulation en fonction de leur nature : immunité innée, immunité naturelle et immunité adaptative. *42*
Figure 12 : Marqueurs caractérisant les cellules immunitaires innées et LTI utilisés pour mettre en place le gradient d'« innateness ». *44*
Figure 13 : Principaux sous-types fonctionnels des cellules iNKT en fonction de leur profil transcriptionnel et des cytokines qu'elles produisent. *47*
Figure 14 : Mécanismes d'activation et les sous-types fonctionnels des cellules MAIT *50*
Figure 15 : Principales voies de signalisation activées par le récepteur EGFR. *61*
Figure 16 : Structure génique et protéique de l'AREG, ainsi que sa configuration tridimensionnelle *64*
Figure 17 : Représentation des différentes voies de clivage de la pro-AREG conduisant aux différents isoformes d'AREG. *67*
Figure 18 : Représentation des voies de signalisation de l'AREG. *69*
Figure 19 : Représentation schématique des mécanismes de modulation de l'inflammation et de régénération tissulaire impliquant les Treg. *79*

Figure 20 : L'IL-33, une alarmine/cytokine impliquée dans l'inflammation stérile induite par les LTI et l'hypothèse d'un axe immuno-régulateur mettant en jeu l'IL-33, l'AREG et les LT *92*
Figure 21 : Anatomie hépatique simplifiée chez la souris en point de vue ventrale. *96*
Figure 22 : Composition cellulaire du tissu hépatique humain adulte sain comparé au tissu hépatique d'une souris (C57BL/6) adulte saine. *97*
Figure 23 : Schéma récapitulatif des principaux résultats du Manuscrit n°1. ..... *100*
Figure 24 : Schéma récapitulatif des principaux résultats du Manuscrit n°2. ..... *130*
Figure 25 : Contribution de l'AREG et de l'IL-33 à l'activation/recrutement et à l'expansion des Treg.. ..... *174*
Figure 26 : Les HEPG2 réagissent aux conditions de stress induit par une hypoxie en augmentant leur libération d'AREG. *176*
Figure 27 : Expression rapide et transitoire des transcrits d'Areg dans le modèle murin d'IR hépatique. *178*
Figure 28 : Données préliminaires en faveur d'un lien entre l'IL-33 et l'AREG. *180*
Figure 29 : Gradient innateness AREG et EGFR (ERBB2). *181*
Figure 30 : Données préliminaires en faveur de l'existence d'un axe réparateur IL-33/AREG/LTI. *183*
Figure 31 : Analyse comparative entre la libération d'AREG après IR hépatique chez les souris WT et IL-33KO. *185*
Figure 32 : Intégration des données expérimentales dans une chronologie des événements survenant lors d'une transplantation hépatique. *194*

Tableau 1 : Principaux DAMPs d'origine hépatique impliqués dans l'inflammation stérile, leurs récepteurs et leurs fonctions. 23

Avant-propos

Aujourd'hui, le système immunitaire est principalement perçu par le grand public comme une arme défensive, un rempart protégeant l'organisme contre les agents pathogènes. Cette vision, bien que juste dans son fondement, reste cependant très incomplète. Le système immunitaire ne se limite pas à ce rôle de protection et intervient dans toutes les grandes fonctions physiologiques de l'organisme, jouant un rôle central dans le maintien de l'homéostasie. Il réagit aussi aux différents *stimuli* tels que le stress, aux agressions externes ou internes, et se mobilise à travers de multiples mécanismes afin de restaurer l'intégrité des tissus endommagés. Ce sont ces capacités à répondre aux déséquilibres, à en limiter les conséquences et à rétablir un état d'équilibre, qui témoignent de la puissance et de la polyvalence du système immunitaire.

Parmi ces nombreuses attributions, le système immunitaire a un rôle clé dans les processus de réparation tissulaire. Il ne s'agit pas uniquement de réparer des blessures mineures comme une coupure, mais aussi de répondre à des lésions bien plus importantes, comme celles causées par une perte partielle de la fonction d'un organe ou, dans un cadre clinique, lors d'une transplantation d'organe. Dans ce contexte, les tissus du greffon subissent un stress majeur, notamment lié aux phénomènes d'ischémie-reperfusion (IR), qui altèrent leurs intégrités et compromettent leurs viabilités et fonctions. Comprendre les mécanismes immuno-inflammatoires et immuno-réparateurs qui se déclenchent lors de ces événements est donc indispensable pour améliorer la prise en charge des patients transplantés. En effet, la science ne se limite pas à une quête de connaissances : elle vise également à transformer ces connaissances en outils cliniques, afin d'optimiser la qualité des greffons, d'élargir leur disponibilité, notamment à travers l'utilisation de greffons marginaux tels que les foies stéatosiques, et de mieux accompagner les patients.

Mon intérêt pour le système immunitaire vient de ma formation en licence, où j'ai été charmé par son spectre d'action, sa flexibilité et sa capacité à orchestrer des réponses adaptées dans des contextes variés. Cette attirance pour ce domaine a été renforcée par des expériences personnelles et professionnelles, me sensibilisant à ses implications cliniques. J'ai donc eu la chance de prendre part à ce travail de thèse, qui combine une approche translationnelle, mêlant études observationnelles chez des patients transplantés hépatiques, et recherches appliquées sur des modèles murins.

Durant ces trois années de travaux, mon principal objectif a été d'approfondir notre compréhension des phénomènes d'IR en transplantation hépatique. Mon travail s'est structuré autour de deux axes : d'une part, identifier les mécanismes cellulaires impliquant l'alarmine interleukine (IL)-33 (IL-33) dans l'inflammation stérile, en s'appuyant en particulier sur les lymphocytes T (LT) innés (LTI) ; d'autre part, explorer un possible mécanisme réparateur initié par l'IL-33, en partant du postulat que l'amphiréguline (AREG) est une cytokine clé dans la résolution de l'inflammation, pourrait jouer un rôle précoce central dans la mobilisation et l'amplification des fonctions réparatrices des LT.

À travers ce mémoire, je partage les avancées de ces trois années de recherche, apportant une meilleure connaissance des mécanismes d'inflammation et de réparation dans un contexte d'IR hépatique et plus largement d'inflammation stérile. J'espère que ce travail contribuera, à terme, à élargir les perspectives thérapeutiques pour les patients en transplantation d'organes.

INTRODUCTION GENERALE

Partie I – Les enjeux immunologiques en transplantation d'organe associés à l'inflammation stérile

I- La transplantation hépatique

a. Etat des lieux de la transplantation hépatique

La transplantation d'organes solides demeure l'approche thérapeutique privilégiée en cas de défaillance terminale des organes. La première greffe du foie a eu lieu en 1963 et a comptabilisé depuis un total de 33 816 greffes, dont 588 provenant de donneurs vivants d'après le rapport de 2023 de l'Agence de biomédecine (ABM), faisant de cette dernière, la greffe d'organe la plus pratiquée en France (avec 1 342 patients transplantés en 2023) derrière le rein. (Voir Figure 1) [1]. Les progrès réalisés au niveau des techniques de prélèvement et des traitements immunosuppresseurs ont fait de la transplantation hépatique (TH) une option curative de premier ordre pour diverses affections hépatiques en phase terminale.

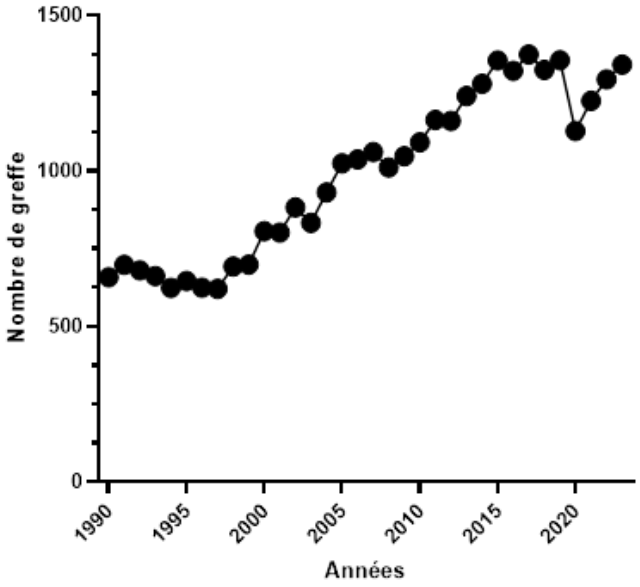


Figure 1 : Évolution du nombre de greffes hépatiques en France depuis 1990. D'après les données de l'ABM (2023) [1]

b. Principales indications à une TH

En 2023, le carcinome hépatocellulaire (CHC) était la principale cause de TH chez les adultes, représentant 26,9 % des nouveaux cas avec une augmentation de 68 % des cas observés entre 2008 et 2018. La cirrhose alcoolique terminale, qui représente 23,8 % des personnes inscrites sur les listes de TH, est fréquemment un antécédent du CHC, principalement en raison d'une consommation excessive d'alcool. L'hépatite fulminante, caractérisée par une nécrose hépatique rapide, a également connue une augmentation significative, représentant 5,3 % des cas observés. Les maladies hépatiques stéatosiques associées à un dysfonctionnement métabolique ainsi que l'hépatite alcoolique aiguë ont augmenté de 11 % et 22 %, respectivement, ce qui représente 3,6 % et 2,9 % des nouveaux inscrits. De plus, les re-transplantations, bien qu'elles ne soient pas liées à la maladie, représentaient 5,1 % des indications de TH. L'indication de la TH repose principalement sur le score MELD [2] pour « *model for end-stage liver disease* », une échelle de 6 à 40 dérivées des valeurs de bilirubine sérique totale, de créatinine sérique et du « *international normalized ratio* »(ou INR). Ce système de notation évalue la gravité de la maladie, prédit le pronostic de survie à trois mois et détermine l'urgence de l'indication à la TH.

c. Les nouveaux enjeux de la TH

L'âge croissant de la population, la baisse de la mortalité chez les jeunes, les changements alimentaires et l'augmentation des maladies chroniques du foie ont fortement participé à l'augmentation à la fois des indications et de la demande de transplantation. Malgré le fait que l'ensemble de la population française soit considéré comme de potentiels donneurs, une opposition importante au don d'organes existe, avec une baisse d'environ 34 % des dons chez les donneurs décédés.

Cela a entraîné une disparité importante entre les greffons disponibles et les patients en attente de transplantation. Le rapport ABM datant de 2022 indique environ 2,4 patients par greffon en France, avec un taux de mortalité des patients ou de détérioration de 273,6 à 286,2 pour 1 000 patients par an (Voir Figure 2) [1]. Par conséquent, la transplantation est devenue une option thérapeutique de plus en plus difficile à mettre en place, représentant à ce jour un défi de santé publique majeur.

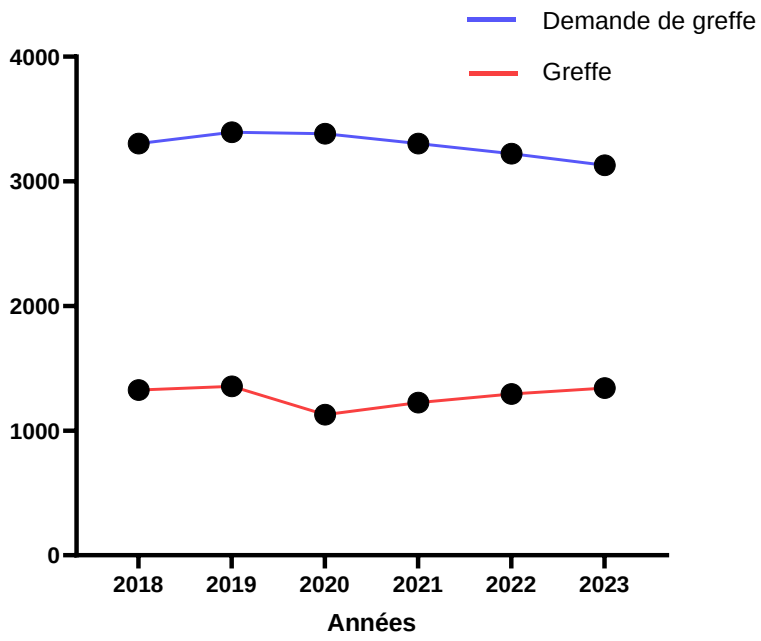


Figure 2 : Evolution de la demande en greffe hépatique et du nombre de greffes en France entre 2018 et 2023. D'après les données de l'ABM (2023) [1]

C'est pourquoi, aujourd'hui, en parallèle d'une sensibilisation de l'opinion publique, l'un des axes de recherche prioritaire en transplantation d'organe est focalisé sur une meilleure compréhension des facteurs qui vont influer la survie, la fonction et la régénération des tissus du greffon. L'IR est un phénomène inhérent à la TH dû à l'arrêt de l'apport sanguin dans le greffon lors de son prélèvement et de son transport, suivi de la reperfusion du greffon sur le receveur. Ce phénomène va induire des lésions affectant toutes les populations cellulaires hépatiques, en particulier les hépatocytes, le parenchyme fonctionnel du foie, entraînant une altération fonctionnelle, mais aussi les cellules endothéliales, entraînant des thromboses microvasculaires.

Ensemble, ces lésions contribuent à réduire la survie des greffons, et il est donc essentiel d'étudier les mécanismes moléculaires, cellulaires, et immuno-inflammatoires qui sont impliqués dans l'initiation des lésions d'IR hépatique, ainsi que dans l'initiation de la réparation conduisant à un retour à des conditions homéostatiques [3].

Une meilleure compréhension des phénomènes de transplantation permettra d'améliorer l'utilisation de greffons répondant à des critères étendus, auparavant considérés comme présentant un risque élevé. Par ailleurs, un laboratoire innovant de réparation de greffons a récemment été mis en place à Toronto en 2022 [4]. Ce laboratoire a pour objectif de réhabiliter les greffons pulmonaires endommagés et de les préconditionner en vue d'une transplantation. Bien qu'elle soit axée sur les greffes pulmonaires, cette initiative représente une nouvelle orientation pour la recherche sur la régénération des greffons, ce qui suggère une éligibilité plus importante des greffons à l'avenir. Il est donc impératif que les recherches futures abordent les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la réparation des organes dans des contextes inflammatoires et hémostatiques.

II- Le foie, un organe complexe hautement immunologique

a. Structure et fonctions du foie

Le foie constitue l'organe interne le plus volumineux de l'anatomie humaine, avec une masse allant de 1 à 2 kg et représentant environ 2 à 3 % du poids corporel total, jouant une fonction essentielle dans les processus métaboliques, les mécanismes de détoxification et la régulation des réponses immunitaires.

Il reçoit 80 % de son apport sanguin de la veine porte hépatique, riche en nutriments et en antigènes microbiens dérivés du tractus gastro-intestinal, et 20 % du sang oxygéné fourni par l'artère hépatique. L'anatomie du foie est illustrée ci-dessous en Figure 3 [5,6].

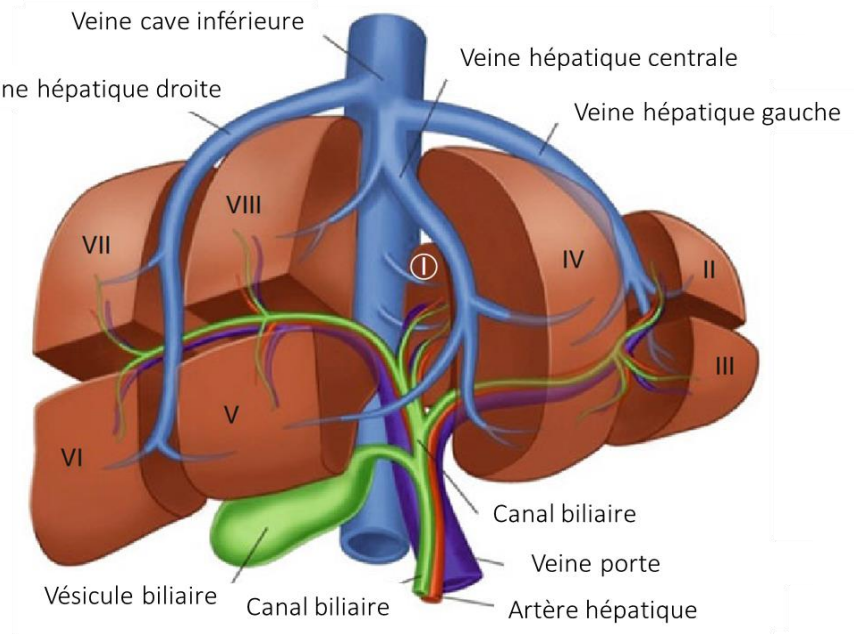


Figure 3 : Anatomie hépatique chez l'humain. Le lobe caudé correspond au segment I situé derrière le segment IV. Le lobe hépatique est subdivisé en trois segments II, III, IV par la veine porte gauche. Le lobe droit est subdivisé par la veine porte droite en segments V, VI en bas et en segments VII, VIII en haut. Issue et adaptée de Ehab Youssef et al., 2015 [5]

Cette double vascularisation alimente un réseau de sinusoïdes, dans lequel d'importants échanges moléculaires et cellulaires ont lieu entre les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses. L'architecture opérationnelle du foie repose sur les lobules hépatiques, des structures hexagonales dont chacun des angles dispose d'une triade portale, composé de la veine porte, l'artère hépatique et du canal biliaire, comme illustré dans la Figure 4 [6–8]. Le sang arrive par la veine porte et l'artère hépatique, traverse le lobule pour y être traité et retourne dans la circulation par la veine centro-lobulaire. Ces lobules sont principalement composés d'hépatocytes, entourés de sinusoïdes, qui sont tapissés de cellules endothéliales sinusoïdales ou « *liver sinusoidal endothelial cells* » (LSEC).

Ces derniers, facilités par une circulation sanguine lente et une diminution des niveaux de pression, permettent le transit direct des molécules entre le sang et les hépatocytes grâce aux délimitations qu'elles érigent, tout en agissant en barrière immunologique de par leur capacité de présentation antigénique et ainsi la favorisation de l'interaction des molécules du sang avec le système immunitaire.

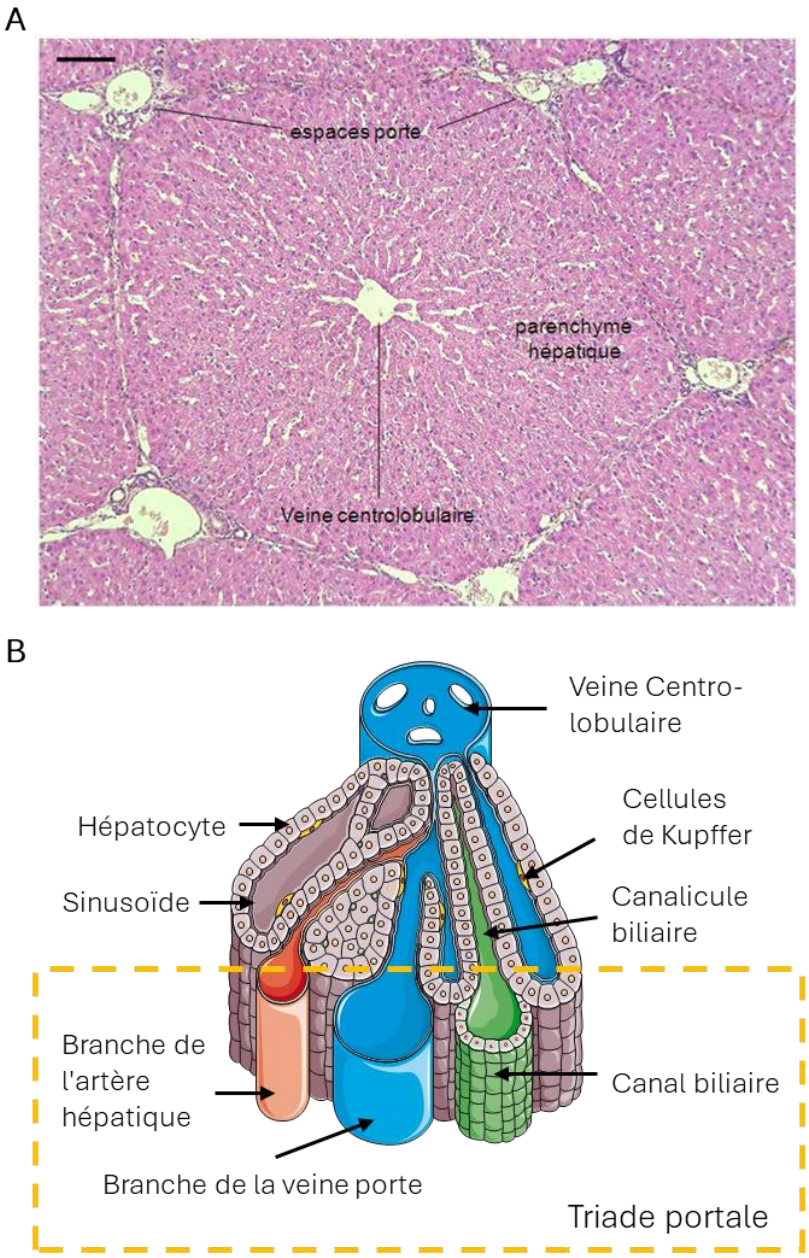


Figure 4 : Anatomie du lobule hépatique. A : Coupe histologique d'un lobule hépatique où figurent la veine centrolobulaire (au centre du lobule) et les espaces portes (aux cinq angles du lobule hexagonal). Issu de NAMUR, 2009 [7] ; B : Représentation de la structure d'un lobule hépatique en 3D avec les principales cellules le composant. Issue et adaptée de Bessaguet et al., 202 [6] Servier Mediacal Art [9].

b. Les cellules composant le foie

La majeure partie du foie est constituée de cellules qui n'appartiennent pas au système immunitaire. Le foie est principalement composé de cellules parenchymateuses, les hépatocytes, représentant plus de deux tiers des populations cellulaires hépatiques. Le tiers restant comprend les cellules non parenchymateuses non immunitaires, qui comprennent les LSEC, les cellules stellaires hépatiques ou « hepatic stellate cells» (HSC), les cholangiocytes, ainsi que les cellules immunitaires résidentes et infiltrées. Cette hétérogénéité cellulaire et leur interaction renforcent la capacité du foie à maintenir son équilibre entre tolérance immunitaire et défense, tout en contribuant à l'homéostasie et à la réparation tissulaire (Voir Figure 5) [10–13].

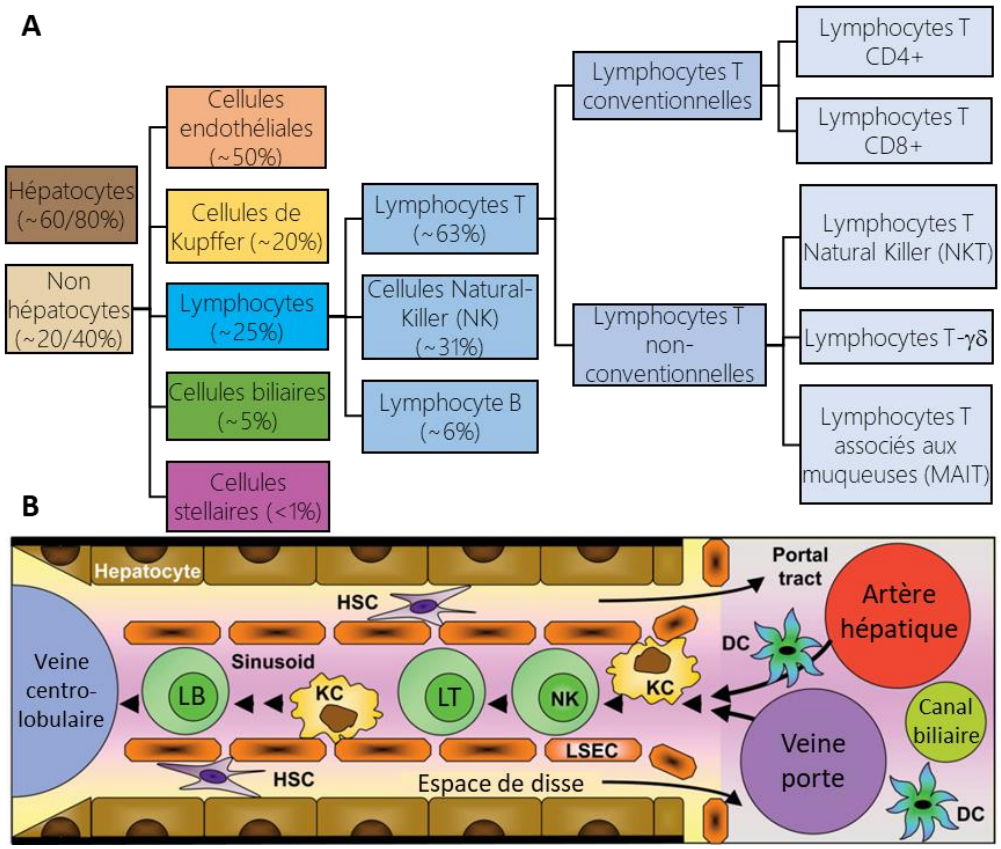


Figure 5 : Répartition des différentes populations immunitaires intra-hépatiques chez l'humain sain et modélisation de la circulation des cellules immunitaires au niveau des sinusoïdes. A : Pourcentage relatif à la population parente. B : LB : cellule B, LT : cellule T, NK : cellule Natural Killer, KC : cellule de Kupffer, DC : cellule dendritique. Issue et adaptée de Racanelli et al.,2006. [11]

i. Les cellules « non immunitaires » aux propriétés immunitaires

Les hépatocytes représentent entre 60 et 80 % des cellules hépatiques et remplissent des fonctions métaboliques essentielles, telles que la synthèse des protéines plasmatiques, le stockage du glycogène et la biotransformation des toxines [13,14].

Les hépatocytes jouent non seulement un rôle crucial dans diverses fonctions métaboliques de l'organisme mais participent également activement à la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires en réaction à divers *stimuli* inflammatoires chroniques (infections / produits microbiens ou maladies métaboliques) ou aigus.

En effet, les hépatocytes sont capables de sécréter dans leur micro-environnement un ensemble de médiateurs, comme les vésicules extracellulaires contenant chimiokines (comme CXCL10), composant lipidiques, acides nucléiques, ou bien encore microARN qui vont permettre une communication intercellulaire et promouvoir une réponse inflammatoire. Des cytokines telles que le « *tumor necrosis factors alpha* » (TNF-α), l'IL-11, l'IL-32 ainsi que des chimiokines telles que le CXCL1 ou le « *monocyte chemoattractant protein 1* » (ou MCP-1) qui attirent respectivement les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les monocytes sur le site inflammatoire [14] sont également produites par les hépatocytes amplifiant alors la réponse inflammatoire. Bien qu'impliqués dans la phase inflammatoire, ils peuvent également produire des cytokines comme l'IL-6 durant une réponse inflammatoire aiguë lors d'une hépatectomie partielle, qui se révèle essentielle dans la régénération tissulaire [15].

Lors d'un stress cellulaire important induisant une souffrance, voire une mort des hépatocytes, ces cellules libèrent également des molécules d'alertes nommées DAMPs pour « *Damage-Associated Molecular Patterns* », modulant une réponse inflammatoire [14,16,17]. Cette partie sera abordée par la suite dans le troisième point de cette Partie I de l'Introduction Générale.

Enfin, les hépatocytes ont le rôle de cellules présentatrices de l'antigène ou « antigen presenting cells » (APC) au système immunitaire par le biais des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classes I et II ainsi que par le cluster de différentiation (CD)1d, et le « MHC-related protein 1 », deux CMH non-classiques restreints de classe I que nous nommerons ci-après CD1d et MR1 respectivement [14,18,19].

Ainsi, bien que les hépatocytes soient principalement des cellules métaboliques, leur rôle immunologique en fait des acteurs essentiels dans la régulation de l'inflammation hépatique et le maintien de l'homéostasie hépatique [14]. Cependant, une activation excessive ou prolongée peut entraîner des effets pathologiques, tels que la fibrose hépatique, l'hépatite chronique ou bien encore le syndrome d'inflammation systémique.

Les LSEC, qui forment 50 % des cellules non parenchymateuses, sont caractérisées par les fenestrations importantes qu'elles délimitent afin de faciliter le mouvement des cellules immunitaires à travers les sinusoïdes notamment lorsque le flux sanguin est diminué, jouant ainsi un rôle clé dans la régulation [13,20]. Il est important de souligner que, bien qu'elles soient classées comme « non immunes », les LSEC ont la capacité d'agir en tant que APC et sont également responsables de la sécrétion d'IL-10 et de « *transforming growth factor beta* » (TGF-β), qui sont des molécules immuno-régulatrices cruciales [10,13]. Comme les hépatocytes, les LSEC en souffrance libèrent également des DAMPs, modulant une réponse inflammatoire [16,17].

Les HSC (ou cellules d'Ito) représentant moins de 1% sont situées dans l'espace de Disse, et sont des réservoirs principaux de vitamine A. En conditions normales, ces cellules soutiennent la structure vasculaire en même temps que le métabolisme lipidique. Lors d'une inflammation, elles se transforment en myofibroblastes, contribuant à la fibrose en produisant de la matrice extracellulaire [21] et peuvent également jouer un rôle d'APC [11,22,23].

Enfin, les cellules biliaires ou cholangiocytes, tapissent les canaux biliaires intrahépatiques et participent à la sécrétion et à la modification de la bile. Les cholangiocytes expriment des récepteurs pour des agents pathogènes, ce qui leur permet de contribuer à l'immuno-surveillance [13,24].

ii. Le système immunitaire intrahépatique

Le foie héberge un système immunitaire diversifié, capable d'exercer des activités anti-inflammatoires et immuno-tolérantes, atténuant ainsi la survenue de réactions immunitaires indésirables [10–12,24,25].

De plus, il permet d'orchestrer des réponses rapides et vigoureuses lorsque le besoin s'en fait sentir. Ses caractéristiques immunologiques uniques ont donné lieu au début des années 2000 à l'émergence du concept d'« hépatoimmunologie » proposé par R Mackay [10].

Le foie abrite une population de macrophages résidents appelés cellules de Kupffer ou « kupfer cells » (KC) représentent environ 20 % des cellules non parenchymateuses [11,25,26]. Celles-ci sont équipées de récepteurs scavenger, de « *Toll like receptor* » (TLR), de récepteurs Fc (« Fc receptors » FcR) et de récepteurs du complément, ce qui leur permet de présenter efficacement des antigènes par le biais du CMH de classes I et II ainsi que des molécules CD1d et MR1 [27,28]. De plus, les KC jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire en libérant un large éventail de cytokines telles que l'IL-10, le TNF-α, l'IL-12 et l'IL-18, contribuant ainsi au maintien de l'immuno-tolérance dans le foie.

Les cellules dendritiques ou « dendritic cells » (DC), situées principalement dans les sinusoïdes et la triade portale, fonctionnent comme des APCs. Cette distribution suggère un positionnement stratégique pour la surveillance immunitaire et la réponse au sein du foie.

Les cytokines telles que l'IL-10 et le TGF-β, produites par les KC, les LSEC et les HSC peuvent rendre les DC hépatiques tolérogènes. Cet équilibre est crucial pour le maintien de la tolérance hépatique ou de l'immunité [24,25].

Les cellules « *natural killer* » (NK), représentent environ 30% des lymphocytes hépatiques et jouent un rôle essentiel dans l'élimination des cellules infectées par des virus ou transformées en cellules malignes. Elles sont également impliquées dans la régulation des réponses inflammatoires immunitaires grâce à la libération de cytokines comme l'interféron gamma (IFN-γ) [11,25].

Les cellules lymphoïdes innées ou « innate lymphoid cells » (ILC) constituent une population hétérogène de cellules immunitaires qui jouent un rôle crucial dans l'immunité innée, l'homéostasie des tissus et la réponse inflammatoire. Dans le foie, les ILC sont particulièrement importantes en raison de leurs rôle immunologique unique, exposé à des antigènes alimentaires et microbiens provenant du système porte [25,29].

Le foie est principalement composé de cellules lymphocytaires associées à l'immunité dite « naturelle » [25,30]. Ces cellules, connues pour leur abondance exceptionnelle dans le foie, comprennent, les lymphocytes « *invariant natural killer T* » (iNKT), les LT gamma delta (T-γδ) et les lymphocytes « *mucosal-associated invariant T* » (MAIT), qui jouent tous un rôle crucial dans le maintien et la régulation de l'homéostasie hépatique. Ces populations de cellules ayant un intérêt significatif dans ce projet de thèse, celles-ci seront décrites plus en détail dans la Partie II de l'Introduction Générale.

Bien que minoritaire en condition basale, on note la présence de cellules immunitaires adaptatives, en particulier les LT régulateurs (Treg), qui contribuent de manière significative aux mécanismes de tolérance immunitaire [14,25]. Les Treg jouent un rôle essentiel dans l'initiation et le maintien de la tolérance immunitaire, principalement par leurs activités immuno-suppressives. Les Treg interagissent avec les KC et les hépatocytes pour promouvoir la tolérance aux antigènes d'origine alimentaire et microbienne et leur absence ou dysfonctionnement peut conduire à des pathologies auto-immunes ou inflammatoires du foie.

Cette population de cellules ayant un intérêt significatif dans ce projet de thèse, celles-ci seront décrites plus en détail dans la Partie III de l'Introduction Générale.

III- L'Ischémie-reperfusion : un processus d'inflammation stérile inhérent à la transplantation d'organe

a. L'inflammation stérile

i. Définition de l'inflammation stérile

L'inflammation stérile est un phénomène inflammatoire survenant sans la présence d'agents infectieux tels que des bactéries et des virus. Bien que cette réponse immunitaire présente des analogies avec une défense contre du non soi, on parle ici d'une inflammation déclenchée sous l'impulsion de *stimuli* chimiques, physiques ou métaboliques [31–33]. Elle peut être caractérisée comme une réponse immunitaire coordonnée qui est activée par des signaux endogènes. Ces signaux endogènes, plus connus sous le nom de « *damage-associated molecular patterns* » ou DAMPs, ont été initialement identifiés par Polly Matzinger [34], une immunologiste de renom et ceux inspirés par les travaux avant elle, de Janeway en 1989 [35,36].

Polly Matzinger a proposé que, outre les molécules externes connues sous le nom de « *pathogen-associated molecular patterns* » (PAMPs), le système immunitaire puisse également être activé par des molécules internes libérées par l'organisme en réponse au stress en tant que mécanisme d'alerte pour maintenir ou restaurer l'intégrité des tissus.

La libération de DAMPs par des cellules endommagées ou nécrotiques entraîne l'activation de cellules immunitaires et non-immunitaires (Voir Figure 6) [17,34,37], ce qui entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires qui stimulent le processus d'inflammation stérile [31–33].

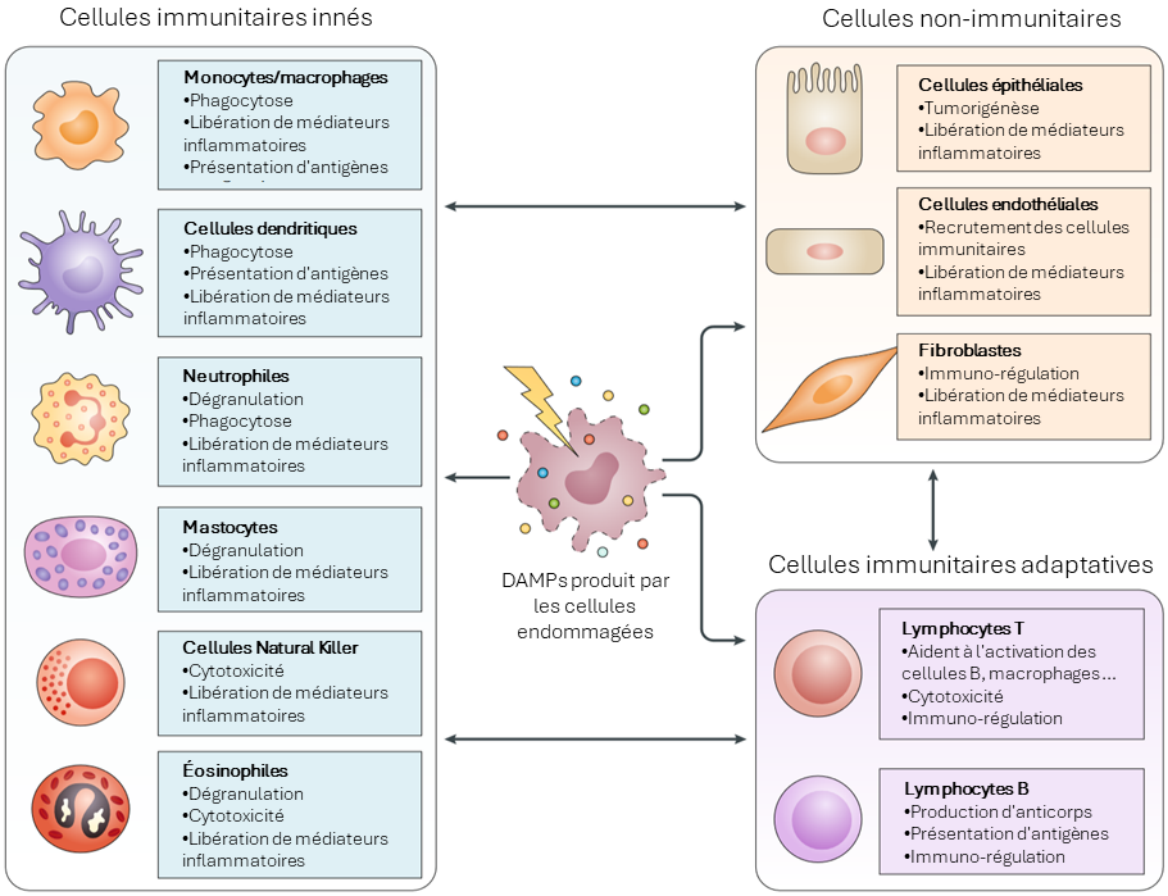


Figure 6 : Exemples de populations immunitaires impliquées dans la détection des DAMPs et dans l'initiation des réponses inflammatoires stériles. *Issue et adaptée de Gong et al. 2020[17]*

Les DAMPs sont des métabolites et des structures protéiques constitutives des cellules de l'organisme. Lors d'un stress cellulaire induisant une mort, les DAMPs vont être relargués dans l'environnement de façon passive comme signal de la perte de l'intégrité cellulaire adressé au système immunitaire possédant des « *pattern recognition receptors* » (PRRs) [17,34,37]. Une liste des principaux DAMPs et de leurs PRRs associés est présentée ci-dessous dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Principaux DAMPs d'origine hépatique impliqués dans l'inflammation stérile, leurs récepteurs et leurs fonctions. *D'après Ignat et al., 2020 [38] , Gong et al., 2020 [17] et McDonald et al.,2016 [33].*

DAMPs	PRRs	Fonctions
ATP, UTP	P2RX7, P2Y2, NLRP3	Métabolites de purine / Activation de l'inflammasome NLRP3 / Infiltration de PNN
Défensines	TLR4, CCR6	Signalisation inflammatoire
Acides gras	TLR4	Signalisation inflammatoire
HSPs (HSPA1A, HSPB1)	TLR2, TLR4, CD14, CD91	Chaperons intracellulaires / Adjuvants
HMGB1	TLR4, RAGE, CD24/SIGLEC10	Facteur nucléaire multifonctionnel / Effets profibrogéniques / Fonction anti-inflammatoire
P100	RAGE	Signalisation inflammatoire et fonction anti-inflammatoire
mtDNA	NLRP3, TLR9	Activation de l'inflammasome NLRP3
nDNA	NLRP3, TLR9	Activation de l'inflammasome NLRP3 / activation des CSH
Peptides N-formyl	FPR1, TLR9	Polypeptides mitochondriaux
S1P	S1PR	Stimulus anti-apoptotique
Acide urique	NLRP3	Catabolite de la purine / Métabolite pro-inflammatoire
Peroxiredoxin-1	TLR2, TLR4, NLRP3	Signalisation NF-κB et inflammasome NLRP3
Histones	TLR2, TLR4	Activation de l'inflammasome NLRP3

Parmi ces DAMPs, certaines protéines se distinguent par leurs capacités à activer le système immunitaire, mais aussi à orchestrer les processus de réparation et de régénération tissulaire. Ces protéines spécifiques, désignées sous le terme d'alarmines, vont au-delà du rôle traditionnel des DAMPs en agissant comme des médiatrices centrales de la régénération.

ii. Les Alarmines

En 2006, Joost J. Oppenheim, lors d'un colloque consacré aux signaux de danger et à la protéine « *high mobility group box 1* » (HMGB1), va étoffer la définition des DAMPs de Polly Matzinger [39,40]. Guidé par la théorie du danger, Joost J. Oppenheim va introduire un nouveau concept, celui porté par les « alarmines ». Le concept d'alarmine veut catégoriser des DAMPs protéiques, constitutivement exprimés par les cellules, qui, en plus d'avoir des propriétés de relargage suite à stress cellulaire, agissent en tant que « premiers intervenants » dans l'induction d'une réponse immunitaire suite à un stress cellulaire. Ces dernières seraient alors dotées de la capacité unique d'induire une résolution de l'inflammation et une régénération tissulaire. De plus, les mécanismes d'action et les rôles des alarmines peuvent varier et avoir un impact à la fois sur les cellules immunitaires et non immunitaires similaires aux cytokines, se distinguant par leur processus de sécrétion unique.

Pour décrire ce nouveau concept, Joost J. Oppenheim va utiliser comme modèle la protéine HMGB1. HMGB1 est une protéine exprimée constitutivement dans divers types cellulaires, immunitaires et non immunitaires [40–42]. Au niveau intracellulaire, HMGB1 fonctionne comme un facteur nucléaire vital pour l'organisation de la chromatine et la régulation de la transcription des gènes, essentielle à l'intégrité cellulaire. Ce caractère critique de l'HMGB1 a été mis en évidence chez des souris déficientes en HMGB1 qui sont non viables [41].

HMGB1 peut être libéré dans l'environnement extracellulaire en réponse à divers *stimuli* via des mécanismes passifs ou actifs [41]. La libération passive se produit pendant la nécrose cellulaire, résultant de la perte de l'intégrité membranaire. À l'inverse, au cours de l'apoptose, des modifications de conformation de la chromatine va séquestrer HMGB1 dans le noyau, inhibant ainsi sa libération.

La libération active est déclenchée par des signaux de stress, comme des conditions hypoxiques, entraînant une sécrétion par les cellules innées telles que les monocytes/macrophages et les DC après une translocation cytoplasmique sans passer par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [41,43].

Lors de sa libération dans le milieu extracellulaire, HMGB1 joue un rôle d'alarme en influençant l'inflammation et l'immunité. Il interagit avec des récepteurs spécifiques, notamment les TLR et le « *receptor for advanced glycation endproducts* » (ou RAGE), favorisant ainsi la libération de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires sur les sites en souffrance [16] .

De plus, le HMGB1 fait partie intégrante des processus de régénération tissulaire. Il facilite l'activation des cellules souches, aidant ainsi à la réparation des tissus endommagés [44]. De plus, il joue un rôle dans l'angiogenèse et régule l'activité des fibroblastes, favorisant ainsi la réparation des tissus tout en freinant la fibrose. Dans les scénarios d'IR, le HMGB1 contribue activement à la reconstitution des tissus en attirant les cellules immunitaires et en stimulant la synthèse de la matrice extracellulaire.

En tant que membre clé de la famille des alarmines, HMGB1 illustre parfaitement le rôle de ces molécules dans l'homéostasie tissulaire, l'induction des inflammations et la régénération des tissus. D'autres alarmines, telles que les protéines S100, HSP, partagent ces capacités. En particulier, l'IL-33, sécrétée au cours de l'IR hépatique, et rénale [45–49] émerge comme un sujet prometteur dans l'étude des phénomènes d'IR hépatique et que nous aborderons dans la Partie II de l'Introduction Générale.

b. Définir inflammation stérile associée à l'IR en TH

i. Définition de l'IR

L'IR est un phénomène pathologique complexe qui n'est pas exclusivement associé au processus de transplantation d'organe. Il se manifeste dans divers contextes et scénarios cliniques aigus tels que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, ou chronique comme divers troubles vasculaires périphériques et même des affections telles que l'apnée du sommeil, qui peut avoir un impact significatif sur l'apport en oxygène, et en nutriments essentiels, pour les organes touchés. Une séquence d'IR correspond à la durée pendant laquelle un organe subit une privation en apport sanguin, qui survient avant la restauration ultérieure du flux sanguin. Dans le contexte spécifique de la transplantation d'organe, cette phase indissociable commence au cours de la procédure chirurgicale de prélèvement d'organe et se poursuit jusqu'au moment où l'organe est reperfusé dans le corps du receveur.

ii. Principaux mécanismes mis en jeu et conséquence de l'IR en TH

L'IR en TH est un processus complexe qui engendre une cascade d'événements biologiques et immunologiques induisant une réponse inflammatoire stérile disproportionnée conduisant aux lésions d'IR ayant des conséquences significatives pour la fonction et la survie du greffon et du receveur [50–52]. Les principaux événements de l'IR hépatique et ses conséquences sont illustrés dans la Figure 7.

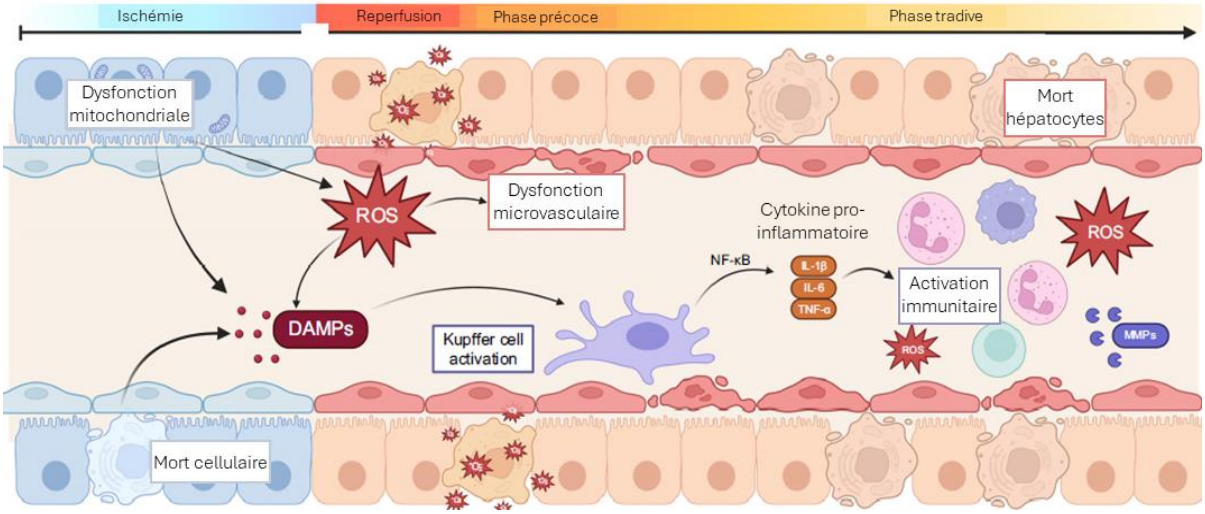


Figure 7 : Cascade inflammatoire de l'IR hépatique et ses conséquences. Phase d'ischémie : dysfonction mitochondriale entraînant un stress oxydatif et une mort cellulaire. Les cellules en souffrance libèrent des DAMPs dans le milieu extracellulaire. **Phase de reperfusion** : production massive de ROS, amplifiant les lésions. Activation immunitaire par les DAMPs qui libèrent des cytokines pro-inflammatoires. **Lésions IR précoces** : Recrutement et activation des cellules immunitaires via les cytokines pro-inflammatoires contribuant à l'inflammation et amplifiant les lésions tissulaires. **Lésions IR tardives** : La persistance du stress et l'amplification de l'inflammation entraînent des dommages irréversibles une altération de la fonction de l'organe. Issue et adaptée de Maspero et al., 2023 [50]

1. Premiers éléments non-immunitaires mis en jeux lors de l'IR

L'ischémie provoque une forme spécifique de stress cellulaire en raison de la perturbation du flux sanguin vers un organe, entraînant des anomalies métaboliques dues à la privation d'oxygène (O_2) [50–52]. Les principaux organites cellulaires affectés par cette interruption de l'apport en O_2 et en nutriments sont les mitochondries [53]. Cette réduction de la disponibilité d'O_2 oblige les mitochondries à passer du métabolisme aérobie au métabolisme anaérobie, ce qui aboutit à une déplétion en adénosine triphosphate (ATP), à une production excessive de lactate, à des perturbations de l'homéostasie ionique, à une dérégulation enzymatique et à l'apparition d'une acidose métabolique. De plus, ce phénomène contribuera à une baisse du pH (pour potentiel hydrogène) de la région ischémique et à l'accumulation de « *reactive oxygen species* » (ROS) [54,55].

Bien que cruciale pour le maintien de la viabilité de l'organe, la reperfusion peut exacerber ce processus en intensifiant les lésions tissulaires. En effet, celle-ci entraîne une génération élevée de ROS et d'espèces azotées, induisant ainsi un stress oxydatif [54,55]. Ce dernier joue un rôle essentiel dans les dommages cellulaires, car il provoque la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines et des dommages de l'acide désoxyribonucléique (ADN), activant ainsi les voies de destruction cellulaire telles que l'apoptose et la nécrose [50–52]. De plus, le stress oxydatif aggrave le dysfonctionnement mitochondrial en endommageant l'ADN et les protéines de ces organites, perturbant ainsi la synthèse d'ATP, l'homéostasie du calcium, essentielle à la survie cellulaire.

Par ailleurs, l'altération de la fonction mitochondriale joue un rôle important dans l'activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale « *mitochondrial permeability transition pore* » (ou MPTP), un phénomène essentiel qui aboutit à la perte du potentiel de membrane mitochondriale et à la libération ultérieure de facteurs pro-apoptotiques dans l'environnement cytosolique, provoquant ainsi la mort cellulaire programmée ou la nécrose [50–52].

2. Impact du système immunitaire sur les phénomènes d'IR

La réponse inflammatoire mettant en jeu la réponse immunitaire innée, est une composante non négligeable des lésions d'IR, impliquant la libération de DAMPs/alarmines, conduisant à la production d'une tempête cytokinique et de chimiokines par un ensemble de cellules immunitaires et non-immunitaires [49,56]. Ce phénomène induit un recrutement des cellules immunitaires résidentes ou circulantes suite à la reperfusion du greffon, contribuant à l'inflammation stérile délétère. Comme évoqué précédemment, l'environnement riche en cellules immunitaires innées du foie, rend cet organe particulièrement sensible à l'IR.

Les premiers acteurs cellulaires immunitaires qui vont interagir avec les DAMPs/alarmines sont les cellules résidentes du foie, en particulier les KC par les TLR-4 [50,56], dont l'augmentation de son expression en IR est associée à l'activité pro-inflammatoire des macrophages. Cette activation des KC va permettre une expression du « *nuclear factor-kappa B* » (NF-κB) importante, induisant une production plus importante de cytokines pro inflammatoires et de chimiokines amplifiant le recrutement de PNN dans la circulation [57].

Les PNN sont également recrutés par les DAMPs et par des agents chimiotactiques tels que le C3a et le C5a, appartenant au système du complément [58]. Une fois recrutés, les PNN jouent un rôle essentiel dans les lésions, par la production de ROS et de cytokines inflammatoires telles que l'IFN-γ, le TNF-α, l'IL-1β, et des protéases, amplifiant l'inflammation et endommageant ainsi davantage les hépatocytes et les LSEC [59,60].

Par ailleurs, le système du complément, en plus de jouer un rôle chimiotactique, est également activé et favorise les lésions du greffon après une TH via le dépôt du complexe d'attaque membranaire C5-9 [58].

La réponse immunitaire naturelle, via les LTI, indépendante de l'engagement du récepteur des cellules T ou « T cells receptors » (TCR) joue également un rôle clé. Les cellules iNKT, activées par la voie IL-23-IRF1 (« *interferon regulatory factor-1* »), sécrètent de l'IFN-γ, qui se révèle crucial dans la médiation des lésions induites par l'IR [61]. L'implication des LTI dans la mise en place des lésions d'IR sera discutée de manière détaillée plus tard dans la Partie II de l'Introduction Générale.

3. Conséquences de l'IR sur le devenir du greffon

L'IR, entraîne une cascade inflammatoire qui, de façon disproportionnée peut avoir des conséquences délétères importantes pour le greffon.

Le recrutement massif de PNN et de plaquettes conduit à l'obstruction des sinusoïdes et à une stagnation sanguine locale. Cette congestion aggrave l'hypoxie hépatique et exacerbe les dommages tissulaires. De plus, les PNN activés libèrent des enzymes protéolytiques (élastase, collagénase) et des ROS, contribuant toujours davantage aux lésions tissulaires, se manifestant par une cholestase (élévation de la bilirubine), une cytolyse hépatique (augmentation des transaminases), et une diminution de la synthèse des facteurs de coagulation. [51]

De plus, si la réponse inflammatoire n'est pas résolue, elle peut persister et devenir chronique. Les cytokines pro-inflammatoires en maintenant l'activation des cellules immunitaires, favorisent un environnement propice aux lésions tissulaires chronique [62]. Il a été montré que des lésions endothéliales persistantes, entrainant une inflammation chronique suite à la TH activent les HSC, qui passent d'un phénotype quiescent en myofibroblastes prolifératifs. Les HSC vont produire une matrice extracellulaire excessive, notamment du collagène, conduisant au développement de fibrose hépatique. Cette fibrose peut évoluer vers une récurrence de la cirrhose, altérant gravement la fonction du greffon.

Par ailleurs, l'exposition prolongée aux antigènes et la production continue de DAMPs/alarmines stimulent les réponses immunitaires adaptatives, favorisant l'activation des LT et Lymphocytes B (LB) alloréactifs. Cela peut entraîner destruction progressive des tissus hépatiques [63,64].

En conséquence de ces événements, un dysfonctionnement du greffon hépatique peut survenir, voire à une récurrence des pathologies hépatiques ayant amenées à l'indication de la TH, et dans le pire des cas un rejet du greffon.

Take-Home Message partie I : Les enjeux immunologiques et l'inflammation stérile en transplantation hépatique

- La transplantation hépatique : un défi thérapeutique et logistique

La TH est essentielle pour traiter les maladies terminales du foie, mais la pénurie de greffons et l'augmentation des indications posent des défis majeurs. Les recherches actuelles visent à optimiser, la survie, la fonction, la réparation, permettant à long terme l'utilisation des greffons à critères étendus.

- Le foie : un organe immunologique unique

Le foie combine fonctions métaboliques et immunitaires pour maintenir son homéostasie. Ses cellules non-immunitaires (hépatocytes, LSECs) participent à l'immunité par la production de cytokines et leur capacité de présentation antigénique. Ces échanges avec les cellules immunitaires résidentes et infiltrantes maintiennent un équilibre entre tolérance et défense.

- L'ischémie-reperfusion (IR) : un mécanisme clé d'inflammation stérile

L'IR, inhérente à la TH, provoque une cascade de lésions métaboliques (stress oxydatif, dysfonction mitochondriale) et immunitaires (libération de DAMPs, activation rapide de l'immunité innée et, à long terme, l'immunité adaptative). Ces processus compromettent la fonction et la survie du greffon, avec des conséquences allant de la dysfonction aiguë à chronique.

Cette Partie I de l'Introduction Générale met en lumière les défis immunologiques liés à la TH et les mécanismes inflammatoires associés à l'IR. Ces éléments soulignent la nécessité de mieux comprendre les processus cellulaires et moléculaires sous-jacents à l'inflammation stérile pour améliorer la survie des greffons. Dans la Partie II de l'Introduction Générale, l'alarmine IL-33 et les LTI de l'immunité naturelle seront présentés, avec un accent particulier sur leur potentielle implication dans la genèse des lésions d'IR.

Partie II – La place privilégiée de l'alarmine interleukine-33 et de l'immunité naturelle dans l'induction de l'inflammation stérile associée à l'IR

I- L'interleukine-33 : une cytokine/alarmine au cœur de l'inflammation stérile

Mes travaux de recherche dans le contexte de la TH se sont portés initialement sur l'IL-33, une cytokine/alarmine à la dichotomie fonctionnelle, membre de la super famille de l'IL-1. Ici, nous discuterons de l'IL-33 et de son lien privilégié avec les LTI dans la genèse des lésions d'IR.

a. Présentation générale de l'IL-33

L'IL-33 a été initialement identifiée chez le chien en 1999 avant d'être décrite au début des années 2000 chez l'humain et la souris [65]. Classée dans la superfamille des IL-1 grâce aux travaux de Smithgall *et al.*, l'IL-33 possède un récepteur appelé « *suppressor of tumorigenicity 2* » (ST2), formant un hétérodimère avec l' « *interleukin 1 receptor accessory protein* » (IL-1RaCP) partagé avec ses homologues [66]. Cette interaction est cruciale pour l'initiation des réponses immunitaires de type « *T helper* » (Th) 2, conférant à l'IL-33 le statut de 11e membre de la famille des IL-1, sous la désignation IL-1F11. L'IL-33 se distingue toutefois par sa double fonctionnalité : elle agit à la fois comme cytokine et comme alarmine [67].

En effet, à l'instar d'HMGB1, l'IL-33 est retrouvée constitutivement dans les noyaux de diverses cellules tissulaires, notamment les cellules endothéliales et possède la capacité d'être libérée en réponse à des stress cellulaires ou des lésions tissulaires, alertant le système immunitaire [49,67,68].

b. Biologie moléculaire de l'IL-33

i. Structure génique et protéique de l'IL-33

Le gène, codant pour la protéine IL-33 humaine, est situé sur le chromosome 9p24.1 et comporte 8 exons. Ce gène code pour une protéine de 270 acides aminés (aa), avec un poids moléculaire d'environ 30 kilodaltons (kDa). La protéine IL-33 possède deux domaines principaux conservés : le domaine C-terminal, ou domaine cytokinique « IL-1-like », qui confère une activité cytokinique à l'IL-33, et le domaine N-terminal nucléaire, caractérisé par un motif hélice-boucle-hélice, facilitant sa localisation dans le noyau et son interaction avec la chromatine. Cette configuration unique confère à l'IL-33 des propriétés de régulation transcriptionnelle en plus de ses fonctions immunitaires. Ces deux domaines sont séparés par un domaine capteur de protéase qui régule la maturation et l'activité de l'IL-33 [69]. (Voir Figure 8)

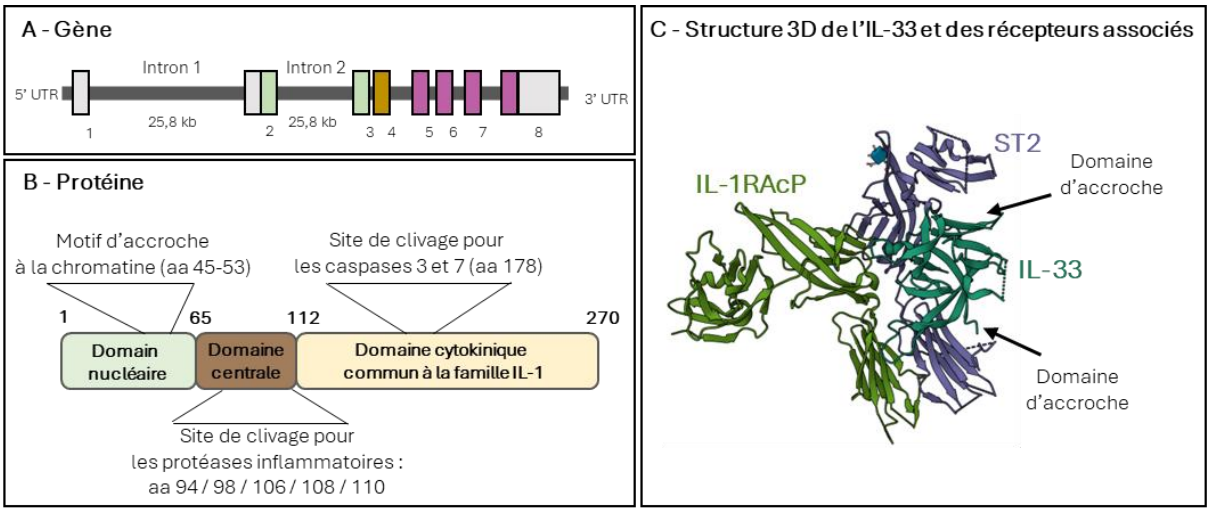


Figure 8 : Structure génétique et protéique de l'IL-33, ainsi que sa configuration tridimensionnelle en interaction avec ses récepteurs. A : Gène et ses 8 exons codant pour la protéine IL-33. B : Protéine IL-33 de 270 aa. Issus et adapté de Cayrol et al., 2022 [69]C : Structure tridimensionnelle de l'IL-33 et de ses récepteurs ST2 et IL-1RaCP. Adapté de Liu et al., 2013 [70].

ii. Régulation biologique de l'IL-33

L'activité biologique de l'IL-33 est finement régulée. La forme complète initiale est déjà biologiquement active et est libérée par les cellules endommagées [47,49,68,69]. Lors de l'inflammation, des protéases libérées par les PNN, telles que l'élastase et la protéinase 3, ou les mastocytes, clivent l'IL-33 pour produire des formes plus courtes et plus actives (entre 18-21 kDa). Ces formes clivées, retrouvées lors de lésions pulmonaires aiguës et d'inflammations induites par des allergènes, conservent leur domaine IL-1-like, crucial pour induire des réponses inflammatoires dépendantes de ST2 [71].

Plusieurs mécanismes cellulaires limitent les actions biologiques de l'IL-33. Sa localisation nucléaire, essentielle dans son rôle d'alarmine, peut être considérée comme une forme de régulation négative de par sa rétention en condition physiologique. Contrairement à HMGB1, cette activité est également contrôlée par des mécanismes d'inactivation, tels que le clivage par les caspases 1, 3 et 7 lors de l'apoptose, ou encore l'oxydation de la protéine, qui limite sa capacité d'interaction avec ST2. Par ailleurs, une version soluble de son récepteur discuté ci-après permet également une régulation négative [72,73] .

iii. Le récepteur de l'IL-33 : ST2

ST2 est codé par le gène IL1RL1 et se décline sous deux formes principales par épissage alternatif : une version transmembranaire et une version soluble (sST2) [67]. La liaison de l'IL-33 au ST2 transmembranaire active le domaine intracellulaire Toll-IL-1R (ou TIR) de l'IL-1RaCP, formant un complexe tridimensionnel qui active des voies de signalisation dépendantes de « *myeloid differentiation primary response 88* » (MyD88), notamment NF-κB et les « *mitogen-activated protein kinases* » (MAPK) à l'origine d'une réponse immunitaire chez les cellules ST2+ [74].

Cependant, la forme soluble sST2 agit comme un leurre en neutralisant l'IL-33 pour limiter son activité et peut être produit par les mastocytes activés (Voir Figure 9) [72,73].

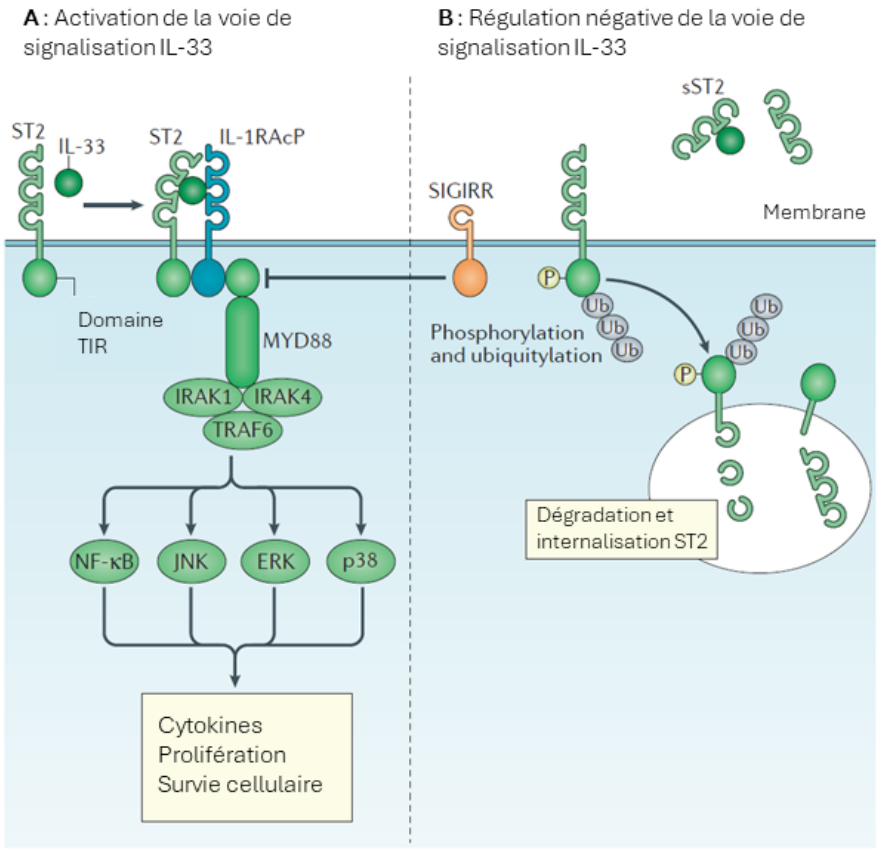


Figure 9 : Signalisation et régulation négative de l'IL-33. A : L'IL-33, en se liant à son récepteur ST2, forme un hétérodimère avec le corécepteur IL-1RAcP, activant la voie de signalisation MYD88, IRAK1/4 et TRAF6, et conduit à terme à la prolifération, la survie cellulaire, et la sécrétion de cytokines. B : La régulation négative de l'IL-33 implique le récepteur soluble sST2 en tant que leurre neutralisant l'IL-33 ou par le récepteur SIGIRR, qui inhibe la cascade de signalisation via la phosphorylation et l'ubiquitination des composants de ST2, favorisant l'internalisation et la dégradation de ST2. Issue et adaptée de Liew et al., 2016 [73]

c. Expression tissulaire et régulation biologique

i. Expression constitutive

L'IL-33 est exprimée de manière constitutive dans de nombreux tissus humains, en particulier ceux exposés à l'environnement externe, tels que la peau et les muqueuses. Elle est également présente dans le compartiment nucléaire des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les fibroblastes dermiques, ainsi que les tissus lymphoïdes secondaires. Il est à noter qu'à ce jour, la présence d'IL-33 constitutive au sein des cellules immunitaires n'a pas été démontrée [68,69] .

En ce qui concerne le foie, des recherches antérieures menées dans notre laboratoire, et des résultats publiés par Marvie *et al.* en 2010, ont démontré que l'IL-33 est exprimée de manière constitutive dans le compartiment nucléaire des LSEC. Toutefois, une telle expression constitutive n'est pas retrouvée dans les cellules épithéliales telles que les hépatocytes. [75]

ii. Expression induite

En plus de remplir sa fonction d'alarmine, il convient de noter que l'IL-33 possède également un potentiel d'action en tant que cytokine dans certaines conditions d'induction, pouvant modifier de manière significative son rôle dans le cadre de la réponse immunitaire. Il existe encore peu de publications traitant spécifiquement de l'expression induite de l'IL-33 au sein de populations dites non-immunitaires.

Néanmoins, on observe une augmentation notable des niveaux d'expression de l'IL-33 dans les HSC [75], ainsi que dans les hépatocytes [76,77], en particulier à la suite de stress induits dans des modèles d'hépatite auto-immune, soulignant ainsi la complexité de sa dynamique fonctionnelle selon les contextes pathologiques [47].

Comme mentionné précédemment, il semble que les cellules constituant le système immunitaire n'expriment pas l'IL-33 de manière constitutive, ce qui indique un schéma d'expression plus régulé et conditionnel. À l'inverse, il a été démontré, chez la souris et l'humain, que certains composants du système immunitaire inné, notamment les DC [78] , les mastocytes [79] et les monocytes/macrophages[80,81], sont capables de sécréter l'IL-33, et ceci dans un contexte strictement pro-inflammatoire [82,83]. Cette sécrétion se caractérise par le fait qu'elle ne dépasse pas les niveaux qui seraient généralement induits par son rôle d'alarmine, reflétant ainsi un mécanisme étroitement contrôlé qui correspond au besoin de l'organisme de répondre à l'inflammation tout en maintenant l'homéostasie [84].

d. Cibles cellulaires et fonctions associées de l'IL-33

Comme illustré dans la Figure 10, un large éventail de cellules immunitaires expriment le récepteur ST2, faisant de ces populations des cibles clés de l'IL-33 [74]. Parmi ces cellules immunitaires, on retrouve les NK, les LTI tel que les iNKT [85] ou les MAIT [86] et les PNN [87] mais aussi les, les Treg [88], lymphocytes Th2, les ILC2 [89], les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles et les macrophages de type M2[74]. L'IL-33 contribue ainsi à des réponses immunitaires variées, notamment en amplifiant les réponses Th2, en favorisant l'inflammation, et en modulant l'homéostasie tissulaire. Certaines cellules non immunitaires telles que les cellules épithéliales ou endothéliales peuvent exprimer le ST2.

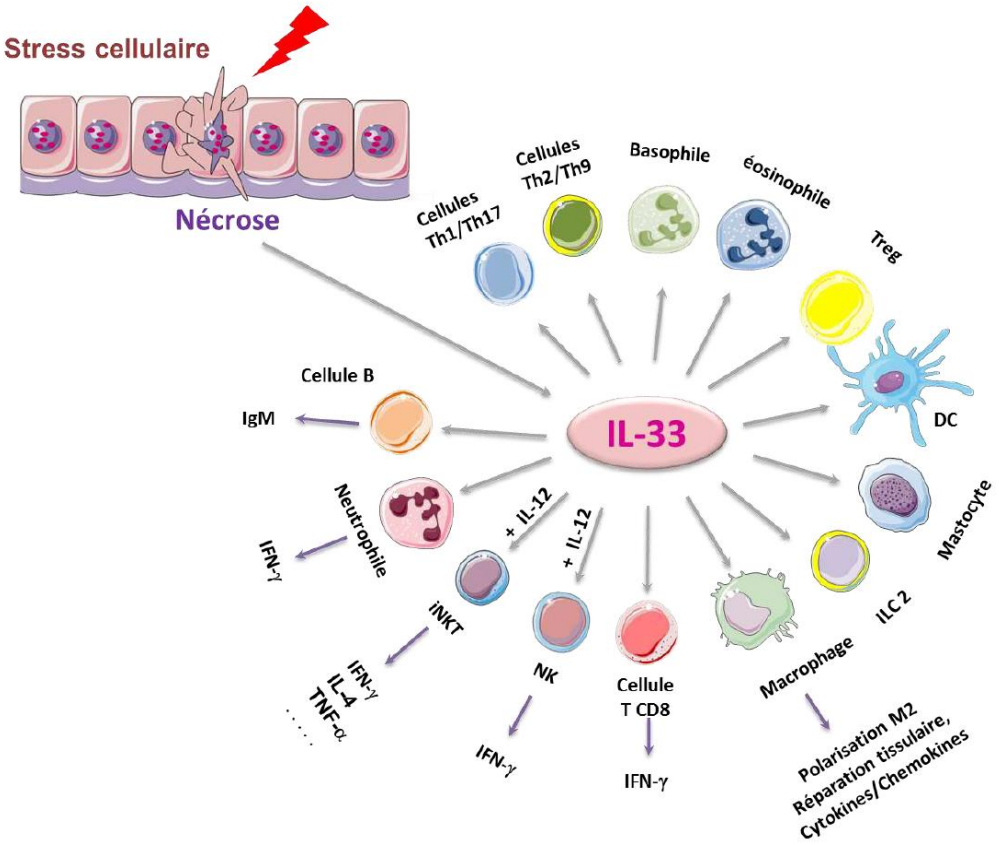


Figure 10 : L'IL-33 agit comme une "alarme" immunitaire, coordonnant à la fois la défense et la réparation tissulaire. Issus et adaptée de Xu et al., 2017 [74]

II- L'immunité naturelle, une immunité abondante dans le foie

Il a été démontré que l'IL-33 potentialise la production d'IFN-γ par les iNKT, en agissant comme cofacteur de l'IL-12 ou bien encore en synergie avec l'engagement du récepteur TCR [85,90]. De même, l'IL-33 amplifie la production d'IFN-γ et de TNF-α chez les MAIT [86]. Comme indiqué précédemment, le foie est le siège d'un système immunitaire caractérisé par la présence enrichie de LTI, qui font partie intégrante de l'immunité associée à la réponse immunitaire dite « naturelle ».

Par la suite, l'immunité innée sera définie, avec un intérêt spécifique sur deux populations de LTI: les cellules MAIT et iNKT, toutes deux connues pour répondre de manière directe à l'IL-33.

a. L'immunité naturelle

Pendant des décennies, le système immunitaire a été conceptualisé de manière dichotomique, ceci en opposant une immunité « innée », rapide mais non spécifique, à une immunité « adaptative », plus lente mais hautement spécifique [91].

Cependant, la découverte de nouveaux sous-ensembles de LT exprimant des TCR invariants ou semi-invariants a remis en question ce modèle [92]. Bien que ces populations cellulaires possèdent des caractéristiques d'immunité adaptative, elles démontrent également une capacité à fonctionner indépendamment de la reconnaissance d'un agent pathogène, à l'image des cellules innées.

Cette observation a conduit à l'émergence d'un concept intermédiaire, celui de l'immunité « naturelle », qui regroupe des cellules immunitaires non conventionnelles ou LTI telles que les T-γδ, les iNKT et les MAIT. Située à l'interface entre les immunités innée et adaptative, cette immunité naturelle s'installe rapidement, en quelques heures, et concerne environ 10 à 20 % des LT humains [93,94]. Ainsi, ces cellules jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense de l'hôte, ainsi que dans la régulation de divers processus immunitaires comme la réparation.

L'identification de ces populations cellulaires a marqué une avancée majeure dans la compréhension du système immunitaire, définissant son organisation en un spectre continu plutôt qu'un modèle binaire illustré en Figure 11.

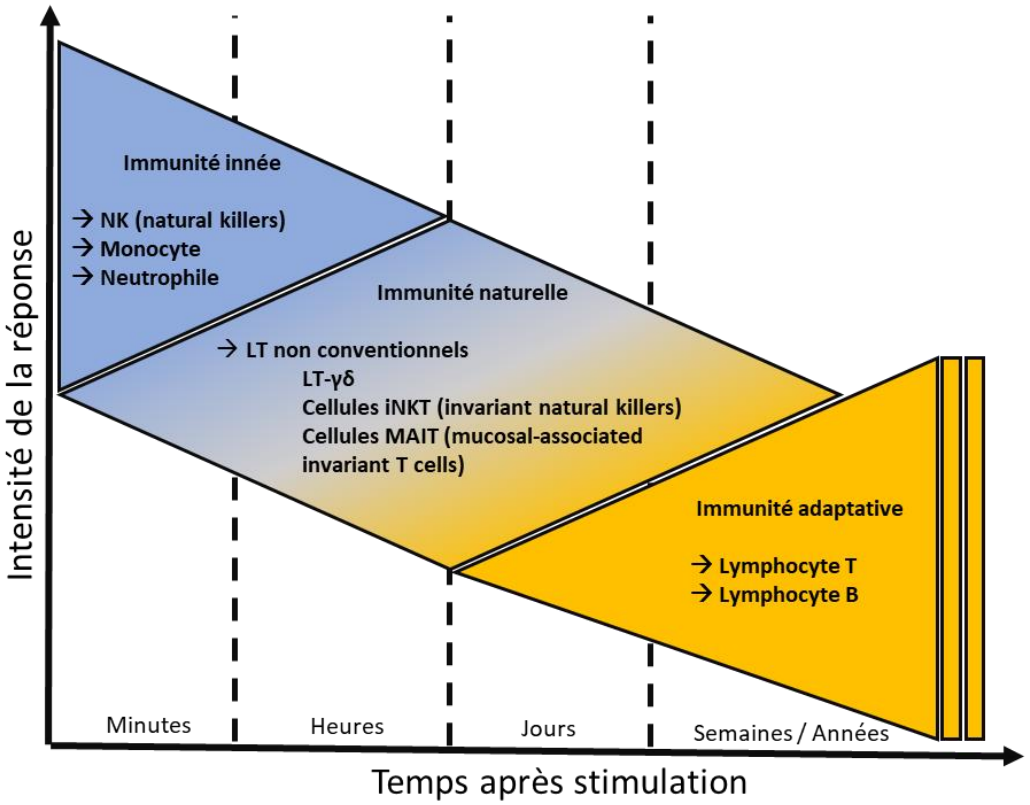


Figure 11 : Dynamique temporelle et intensité des réponses immunitaires après stimulation en fonction de leur nature : immunité innée, immunité naturelle et immunité adaptative. Immunité innée : Réponse rapide mais non spécifique en quelques minutes/heures après la stimulation mettant en jeu les cellules NK, les monocytes et les neutrophiles. Immunité naturelle : Réponse semi-spécifique dans les heures/jours suivant la stimulation composée de cellules à l'interface entre l'immunité innée et adaptative : les LTI, (T-γδ, iNKT et MAIT). Immunité adaptative : Réponse se développant à plus long terme (jours/années) et caractérisé par une réponse hautement spécifique et mémorielle. Les principaux effecteurs sont les LT et LB. Issue et adaptée de Jean-Marc Gombert.

En 2019, Gutierrez-Arcelus *et al*. ont proposé une conceptualisation innovante du système immunitaire sous forme d'un gradient d'« *innateness* », illustrant un *continuum* entre les caractéristiques innées et adaptatives [94]. Cette proposition s'appuie sur des analyses de séquençage unicellulaire de l'acide ribonucléique (ARN) (scRNAseq) réalisées en situation homéostatiques, qui ont permis de mettre en évidence une signature phénotypique et fonctionnelle commune aux cellules lymphoïdes innées et aux LTI. Ces travaux ont révélé les propriétés spécifiques qui confèrent aux LTI leur nature innée, offrant ainsi une vision élargie des fonctions immunitaires.

Ce modèle de gradient qui repose sur six caractéristiques clés est représenté dans la Figure 12 [94,95].

Premièrement, une forte expression de facteurs de transcription spécifiques tels que les facteurs « *promyelocytic leukemia zinc finger* » (PLZF), éomésodermine (EOMES) et « *T-box expressed in T cells* » (T-bet) est observée chez les LTI, ces facteurs étant associés à des traits innés. Deuxièmement, les LTI présentent une diminution de l'expression de Nur77, un marqueur d'engagement du TCR, et conservent leur capacité à survivre même après l'élimination du TCR. Troisièmement, les LTI expriment des marqueurs typiques des cellules immunitaires innées, notamment les récepteurs « *killer-cell immunoglobulin-like* » (KIR) et « *natural killer group 2* » (NKG2) et peuvent être activées indépendamment du TCR, notamment après stimulation innée via des cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-18, un mécanisme comparable à *l' « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* » (ou ADCC). Quatrièmement, elles possèdent un niveau élevé de transcrits préformés codant pour des cytokines telles que l'IFN-γ, qui sont rapidement libérées lors de stimulations innées. Cinquièmement, leur sensibilité accrue à l'IL-15, via une forte expression de CD122 (la chaîne réceptrice de l'IL-15), contribue à leur prolifération homéostatique. Enfin, sixièmement, leur profil métabolique distinct, caractérisé par une biomasse mitochondriale réduite et une absorption moindre de glucose à l'état d'équilibre, reflète leur aptitude à répondre rapidement avec des ressources énergétiques limitées.

Grâce à ces travaux, Gutierrez-Arcelus *et al.*, ont établi une représentation du gradient d'« innateness » s'étendant des LT CD4, qui représentent l'archétype de l'immunité adaptative, aux cellules NK, archétypes de l'immunité innée [94]. Entre ces deux extrêmes, se trouvent les cellules de l'immunité naturelle, telles que les MAIT, les iNKT et les T-γδ. Ces dernières, en raison de leurs caractéristiques mixtes, occupent une position centrale dans ce *continuum* fonctionnel et seront explorées plus en détails dans la section suivante.

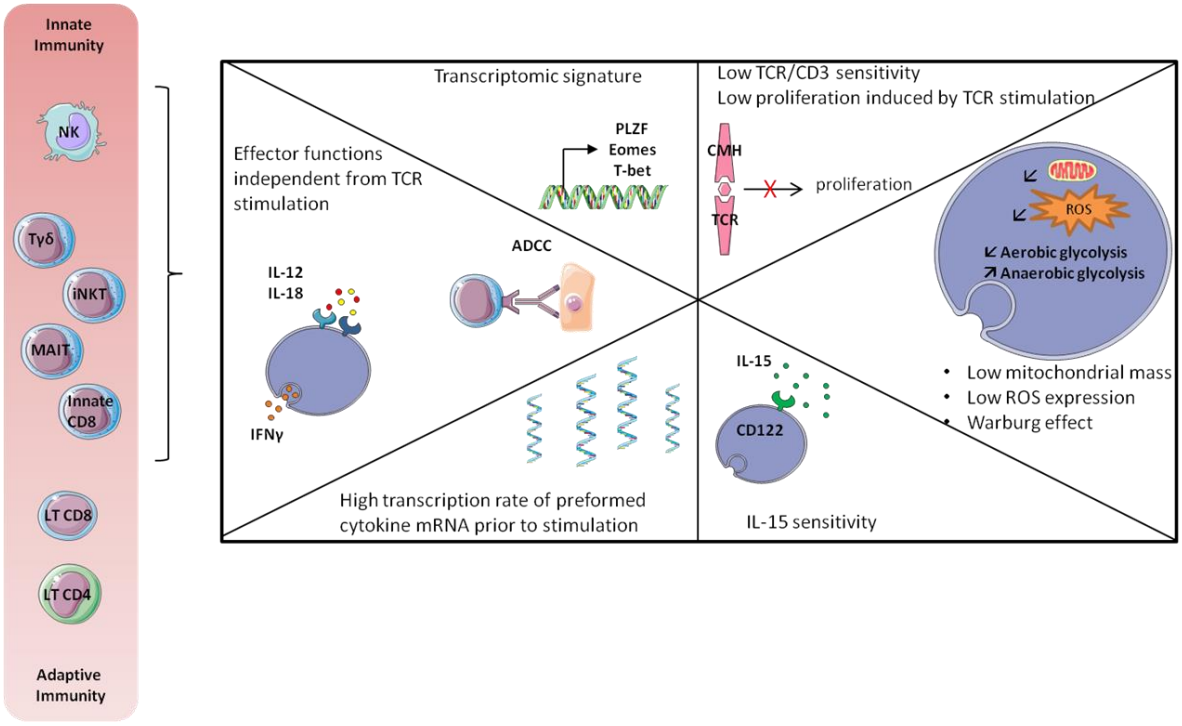


Figure 12 : Marqueurs caractérisant les cellules immunitaires innées et LTI utilisés pour mettre en place le gradient d'« innateness ». *La signature indiquant le caractère « inné » repose sur : 1) un profil transcriptomique caractérisé par l'expression de facteurs de transcription (PLZF, Eomes ou T-bet) ; 2) une faible sensibilité au TCR/CD3 ; 3) une masse mitochondriale plus importante associée à une diminution de la production de ROS ; 4) une sensibilité accrue à l'IL-15, comme en témoigne l'expression significative de CD122. Un taux élevé de l'ARNm « préformé » de cytokines (IFN-γ) en conditions basales ; une signature fonctionnelle « innée » efficace comprenant notamment la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et la production d' IFN-γ après stimulation par l'IL-12 et l'IL-18. Issue de Daniel et al., 2021. [95]*

b. Les LTI : caractéristiques et fonctions

i. Les iNKT : archétypes des LTI

Les « natural killer T cells » ou NKT représentent un sous-ensemble unique des LTI. Les NKT se divisent en deux sous-populations principales : les iNKT de type I, ou NKT invariants, qui expriment un récepteur TCR invariant (Vα24-Jα18 chez l'humain), et les NKT de type II, caractérisées par un TCR plus varié [96–98].

Les iNKT se distinguent par leur reconnaissance des antigènes via la molécule CD1d, une molécule non polymorphe du CMH non classique, plutôt que par les molécules CMH classiques à l'instar des cellules immunitaires dites « classiques » [97]. En plus d'intervenir dans leur processus de développement au stade double positif CD4+/CD8+ au niveau thymique (CD1d exprimé par les thymocytes corticaux) [99], le CD1d leur présente des antigènes glycolipidiques, mettant en évidence leur rôle distinctif dans la présentation antigénique par les molécules CMH traditionnelles.

Ces cellules iNKT se retrouvent dans de nombreux organes, notamment la rate, les poumons, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques, mais elles sont particulièrement enrichies dans le foie où leur fréquence dépasse 1 %, au contraire du sang périphérique humain où leur fréquence peut varier entre 0,001 % à 1 %[96]. Cette localisation préférentielle reflète leur rôle immunologique dans le foie.

De plus, les iNKT partagent certaines caractéristiques avec les cellules NK, notamment l'expression de marqueurs tels que CD161, CD56 et NKG2D, ce qui leur a valu leur appellation [96,98] et exprime fortement PLZF [94,100]. Ces cellules sont hautement conservées chez différentes espèces, y compris la souris, l'humain et d'autres mammifères, soulignant leur importance évolutive.

Les iNKT sont capables de produire rapidement des cytokines et d'influencer l'immunité innée et adaptative. Ces cellules possèdent une double modalité d'activation. Elles peuvent être activées par leur récepteur TCR, à la suite de la reconnaissance de glycolipides présentés par CD1d sur des APC telles que les macrophages, ou les hépatocytes [18,26]. Elles peuvent également être activées indépendamment du TCR par des cytokines telles que l'IL-12, l'IL-18 ou l'IL-33 [85,98,101].

En réponse à ces stimulations, les iNKT produisent une large variété de cytokines, incluant des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α et IFN-γ, des cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et TGF-β, ainsi que des cytokines modulatrices comme IL-4, IL-13 et IL-17 [98]. Leur expression de molécules cytotoxiques telles que la perforine et la granzyme leur confère, par ailleurs, une capacité cytotoxique essentielle.

Les iNKT sont composées de plusieurs sous-populations ayant des fonctions et des caractéristiques spécifiques comme illustrées dans la Figure 13.

Les iNKT1, également appelées iNKT « Th1-*like* », produisent principalement l'IFN-γ en réponse à l'IL-12 ou par l'engagement de leur TCR et jouent un rôle clé dans les réponses inflammatoires. Leur développement dépend du facteur de transcription T-bet [102–104].

Les iNKT2, ou iNKT « Th2-*like* », sécrètent des cytokines Th2 telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 et sont impliquées dans les réponses allergiques et inflammatoires [102–104].

Les iNKT17, ou iNKT « Th17-*like* » caractérisées par la production de cytokines Th17 comme IL-17 et IL-22, participent à la réponse aux infections et à la régulation de l'inflammation [102–104].

Une autre sous-population, les iNKTFH ou iNKT « *Follicular helper* », présente dans les centres germinatifs, exprimant le Bcl-6 et soutient les LB en produisant de l'IL-21 et en favorisant les réponses humorales [102,105].

Enfin, des iNKT régulatrices, telles que les iNKT FoxP3 et les iNKT10, modulent les réponses immunitaires. Les iNKT FoxP3 expriment PLZF, en plus des marqueurs de régulation comme le Foxp3, CTLA-4 et PD-1, et montrent des propriétés immuno-suppressives, bien qu'elles soient très rares chez l'humain [106,107]. Les iNKT10 produisent principalement de l'IL-10, se distinguant par un manque d'expression du PLZF et Foxp3 et jouant un rôle dans la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire [104] .

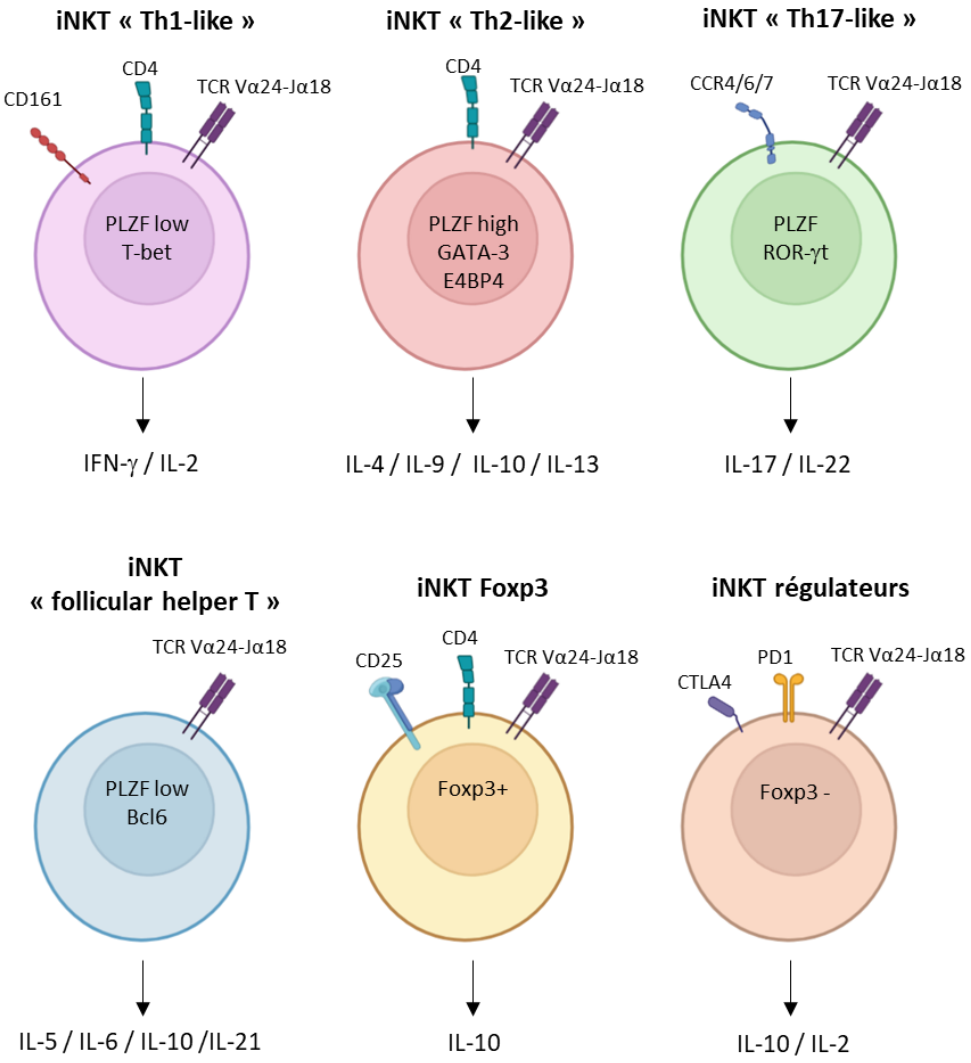


Figure 13 : Principaux sous-types fonctionnels des cellules iNKT en fonction de leur profil transcriptionnel et des cytokines qu'elles produisent. Adaptée de Chang et al., 2011 [105] ; Lee et al., 2013 [103]; Kim et al., 2015 [104]; Lynch et al., 2015 [106]; Cui et al., 2019 [102]. BioRender *[108]*

Les rôles immunologiques des iNKT sont vastes et variés. Ces cellules influencent l'immunité innée en activant les macrophages et les cellules NK, et l'immunité adaptative en interagissant avec les LB, les LT classiques et les DC. Elles participent à l'immuno-surveillance antitumorale [96], à la défense contre les infections bactériennes et virales, ainsi qu'à la modulation des réponses auto-immunes. De plus, elles contribuent au maintien de l'homéostasie tissulaire et à la régénération des tissus [109,110], que nous aborderons dans la Partie III de l'Introduction générale, soulignant leur rôle multifonctionnel dans le système immunitaire.

ii. Les MAIT

Depuis l'identification des iNKT, des recherches approfondies, notamment celles menées par l'équipe dirigée par Olivier Lantz, ont permis de décrire en 2003 une autre catégorie de LT semi-invariants : les cellules exprimant le récepteur Vα7.2-Jα33/12/20, souvent associé aux chaînes Vβ2 ou Vβ13 [111]. Cette découverte a conduit à l'identification des MAIT, ainsi nommées en raison de leur forte présence dans la *lamina propria* intestinale, où elles jouent un rôle majeur dans la surveillance immunitaire et la réponse aux infections [112]. Les MAIT sont abondantes dans le sang périphérique par rapport aux iNKT, représentant 1 à 10 % des LT, et sont encore plus fréquentes dans le foie, où elles constituent plus de 15 % des lymphocytes [112].

Comme les iNKT, les MAIT possèdent la capacité unique de reconnaître des molécules non conventionnelles du CMH. Les MAIT se lient à la molécule MR1, une protéine non polymorphe qui présente des métabolites non peptidiques, notamment deux dérivés de la vitamine B2 tels que le 5-OE-RU et le 5-OP-RU (issus du 5-amino-ribityl uracil, 5-A-RU). Cette interaction leur permet de détecter de manière précoce des cellules hôtes infectées par des bactéries ou des levures [113] . D'une façons similaire aux iNKT, les MAIT sont sélectionnées de manière restreinte à la molécule MR1 pour leur développement [114]. MR1, nécessite la liaison de ligands non eucaryotes pour se replier correctement et être présentée à la surface cellulaire. Ces ligands, principalement issus de la flore microbienne, soulignent la dépendance des MAIT à l'environnement microbiotique pour leur sélection et leur maturation [113].

Les MAIT expriment également des récepteurs associés aux cellules NK, tels que CD16, CD161, NKG2 et CD94, et présentent un phénotype de mémoire effectrice. La majorité des MAIT humaines sont de type CD8+ (70 à 90 % des MAIT), tandis qu'une minorité est doublement négative ou exprime le CD4+. Leur répertoire inclut également des récepteurs de cytokines (IL-7R, IL-18R, IL-23R, IL-12R et ST2), indiquant leur sensibilité aux signaux cytokiniques et aux alarmines.

Les MAIT s'activent par deux mécanismes principaux. La première repose sur la reconnaissance, via leur récepteur TCR, de métabolites microbiens dérivés de la voie de synthèse de la vitamine B2, présentés par MR1 sur des APC telles que les macrophages et les hépatocytes [19,27] . Le second mécanisme est indépendant du TCR et implique des signaux cytokiniques, notamment l'IL-12, l'IL-18, l'IL-15, les interférons de type I et l'IL-33 [86] . Cette double modalité d'activation leur permet de répondre rapidement dans des contextes infectieux, y compris viraux.

Les MAIT peuvent être classées en deux grandes sous-populations fonctionnelles (voir Figure 14) : les MAIT de type Th1 et celles de type Th17, selon leur profil transcriptionnel et leur production de cytokines.

Les MAIT Th1 expriment le facteur de transcription T-bet et sont principalement impliquées dans la défense antimicrobienne et la cytotoxicité et l'immuno-surveillance anti-cancéreuse. Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ et le TNF-α, ainsi que des molécules cytotoxiques comme la perforine et la granzyme, leur permettant de cibler directement les cellules infectées ou tumorales. Leur rapidité de réponse et leur localisation dans les tissus barrières, tels que l'intestin, les poumons et le foie, en font des acteurs essentiels de la surveillance immunitaire.

Les MAIT Th17, quant à elles, se distinguent par l'expression du « *retinoid-related orphan receptor* » (RORγt), un facteur de transcription clé dans leur différenciation. Ces cellules produisent des cytokines comme l'IL-17 et le « *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* » (GM-CSF), jouant un rôle crucial dans la réparation tissulaire et les réponses inflammatoires. Leur recrutement sur les sites de lésions est médié par l'axe CXCL16-CXCR6, et elles présentent une signature transcriptionnelle spécifique associée à la réparation tissulaire [115,116]. Contrairement aux MAIT Th1, leur fonction de réparation est indépendante de MR1. Ces propriétés font des MAIT Th17, des candidates prometteuses pour des approches thérapeutiques visant à améliorer la cicatrisation et la régénération tissulaire [113,115–117].

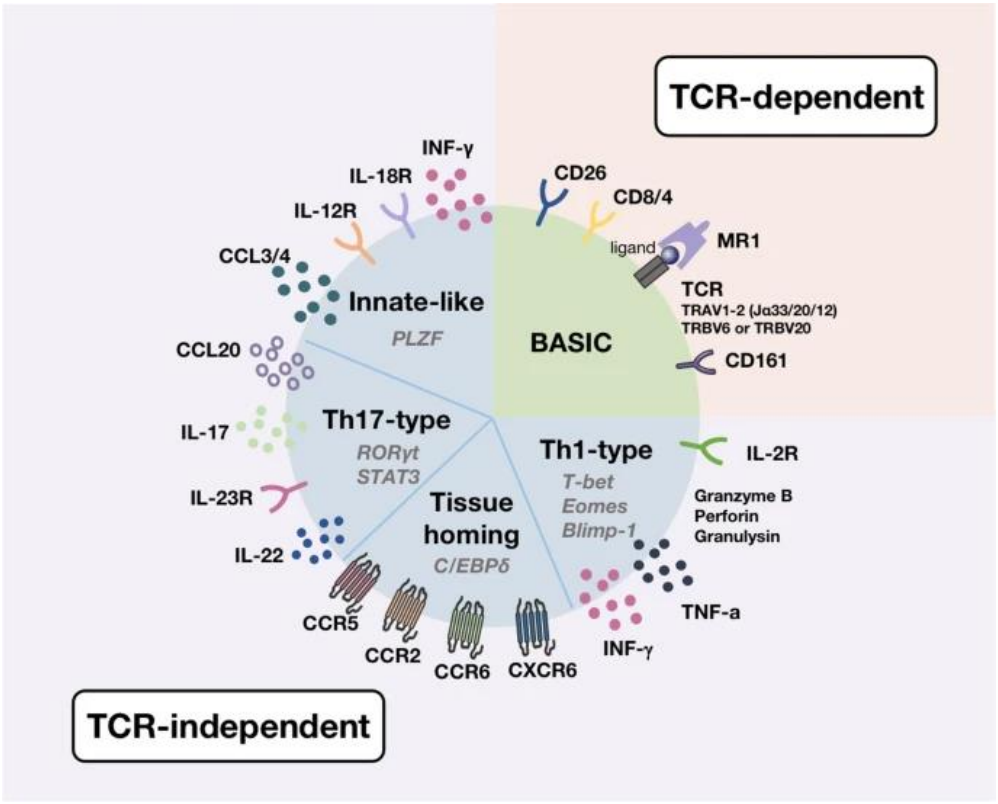


Figure 14 : Mécanismes d'activation et les sous-types fonctionnels des cellules MAIT. Les MAIT peuvent être activées par leur TCR, via la reconnaissance de métabolites présentés par MR1, ou indépendants de celui-ci, via des cytokines telles que l'IL-12, l'IL-18 ou l'IL-33. Les MAIT de type Th1 expriment T-bet et produisent des cytokines pro-inflammatoires. Les MAIT de type Th17, régulées par RORγt, produisent l'IL-17 et l'IL-22. Issue et adaptée de Lin et al., 2024 [116]

En résumé, les MAIT sont des cellules multifonctionnelles qui combinent une détection rapide des pathogènes et des capacités régulatrices et réparatrices. Elles jouent un rôle clé dans la défense immunitaire et la modulation des réponses inflammatoires, contribuant ainsi à la protection contre les infections et au maintien de l'homéostasie tissulaire. Comme les iNKT, les fonctions réparatrices des MAIT seront abordées dans la Partie III de l'Introduction Générale.

III- Le lien privilégié de l'IL-33 avec les LTI dans la genèse des lésions d'IR d'organe

a. L'IL-33 dans la physiopathologie des lésions d'IR d'organe

Des études ont documenté une libération significative d'IL-33 à la suite d'événements d'IR affectant des organes tels que le cerveau, le cœur, les reins ou le foie [48]. Néanmoins, à ce jour, selon le modèle et le protocole considéré, on attribue à l'IL-33 des effets pro-inflammatoire ou protecteurs de l'organe subissant les lésions d'IR. Cette dualité fonctionnelle de l'IL-33 est réconciliable si l'on prend en compte le concept des alarmines proposé par Joost J. Oppenheim, définies comme des cytokines déclenchant l'inflammation mais contribuant finalement à sa résolution. Dans cette Partie II de l'Introduction Générale, sera abordée la question du potentiel pro-inflammatoire de l'IL-33 en relation avec les lésions d'IR. Le potentiel protecteur de cette alarmine, quant à lui, sera traité plus après dans la Partie III de l'Introduction Générale.

Notre groupe de recherche a contribué de manière substantielle à l'élucidation de l'IL-33 en tant qu'alarmine dans le contexte de la transplantation d'organe. En 2014, Thierry *et al.* ont établi les premières preuves mettant en évidence l'importance de l'IL-33 en tant que signal d'alarme chez des patients transplantés rénaux [118]. Les concentrations d'IL-33 mesurées dans l'urine des patients présentaient une corrélation avec la durée de l'IR et étaient liées à l'activation de la réponse immunitaire innée périphérique. Les résultats rapportés par notre équipe concordent avec une étude menée en 2016 par Zhang *et al.*, qui a démontré que les taux d'IL-33 présents dans le sang des patients présentant une dysfonction rénale après une greffe étaient nettement plus élevés par rapport à ceux des greffons sans dysfonction, indiquant un rôle potentiellement délétère de l'IL-33 [119].

Les travaux de notre équipe menés par Ferhat *et al.*, ont démontré dans un modèle murin de lésions d'IR rénale utilisant des souris déficientes en IL-33 (IL-33KO), que cette alarmine jouait un rôle clé dans l'initiation des lésions tissulaires. A l'instar des taux observés dans l'urine en 2014, l'IL-33 a été identifiée sous sa forme circulante dans le sang après une heure de reperfusion [45]. De plus, les souris IL-33KO présentaient un nombre réduit de lésions histologiques induites par l'IR, sans évoluer vers une fibrose interstitielle, et présentaient une préservation de la fonction rénale par rapport aux souris sauvages (WT pour « *wild-type* »). Ces résultats soulignent davantage le rôle pro-inflammatoire de l'IL-33 dans les phénomènes d'IR. Par ailleurs, l'IL-33 a été impliquée dans le recrutement des PNN.

Les recherches menées par Barbier *et al.*, qui ont précédé ma thèse, visaient à déterminer si l'IL-33 était libérée et agissait comme une alarmine à la suite d'une IR hépatique [46]. Il a été établi que l'IL-33 est sécrétée par les cellules endothéliales immédiatement après la reperfusion du greffon après la TH. Les taux sériques d'IL-33 mesurés au début de la reperfusion présentaient une corrélation positive avec le syndrome post-reperfusion peropératoire, l'insuffisance rénale pendant la phase post-greffe et les dysfonctions précoces du greffon. De plus, l'utilisation de modèles murins déficients en IL-33 a permis d'illustrer que l'absence d'IL-33 s'accompagne d'une réduction des lésions d'IR ainsi que d'une diminution du recrutement des PNN.

En s'appuyant sur un modèle de résection hépatique chez des sujets humains ainsi que sur des modèles murins d'IR hépatique, Yazdani *et al.* ont démontré que l'IL-33 libérée par les cellules endothéliales jouait un rôle déterminant dans l'initiation d'une inflammation stérile et des lésions d'IR par le recrutement de PNN et la formation de « *neutrophil extracellular traps* » (NET). La présence de ces NET était nettement diminuée chez les souris déficientes en ST2 (ST2KO). Par ailleurs, l'administration d'IL-33 suivant l'IR aggravait significativement les processus inflammatoires dans les tissus affectés par la formation plus importante de NET [87].

Ensemble, ces résultats indiquent que l'IL-33 est un médiateur essentiel des premiers stades de la réponse inflammatoire induite par une séquence d'IR hépatique.

b. Place des LTI dans les lésions d'IR d'organe : hypothèse d'un axe IL-33/LTI en transplantation hépatique

L'intérêt particulier pour les LTI dans le contexte de l'inflammation stérile associée à la TH repose sur des travaux publiés en 2009 montrant que ces cellules peuvent être recrutées ou activées par leur récepteur TCR via des ligands glycolipidiques endogènes mais également par des signaux cytokiniques [120]. Les iNKT et, dans une moindre mesure, les MAIT sont enrichis dans les tissus hépatiques, ce qui les place en première ligne dans les phénomènes d'IR.

Bien que le rôle des MAIT soit encore peu exploré, certaines études mettent en lumière leur profil pro-inflammatoire. Dans des modèles de lésion cérébrale ischémique, il a été montré que les MAIT infiltrent rapidement les tissus neuraux après un événement ischémique, contribuant aux processus neuro-inflammatoires [121]. La réduction du volume d'infarctus du cœur dans des modèles murins déficients en MAIT confirme leur rôle pro-inflammatoire. De manière similaire, lors d'une IR rénale, les MAIT sont associées à l'aggravation des lésions rénales [122]. Cependant, dans ces situations, l'infiltration des MAIT ne semble pas être corrélée à la présence d'IL-33.

En revanche, les iNKT, population archétype des LTI, sont bien reconnus pour leur rôle dans les lésions d'IR dans divers organes comme le rein, le cerveau, les poumons [45,48,123,124], y compris dans le foie [48,125–127].

Leur activation en réponse à un événement d'IR conduit à leur sécrétion d'IFN-γ, de TNF-α et d'IL-17A, des cytokines qui favorisent l'infiltration des PNN et la formation de lésions tissulaires.

Ces effets sont atténués dans des modèles murins dépourvus de iNKT (Jα18KO), ce qui démontre que l'activation des iNKT constitue un mécanisme central dans la genèse des lésions d'IR rénale [45] .

Bien que les études établissant un lien direct entre l'IL-33 et les iNKT soient limitées, des recherches menées par Bourgeois *et al*. en 2009 ont révélé une interaction entre ces deux acteurs clés [85]. L'administration d'IL-33 dans des modèles murins a entraîné la prolifération et l'activation des iNKT, ainsi qu'une régulation positive de leur récepteur ST2. Les travaux de Thierry *et al*. ont par ailleurs montré que les iNKT sont activés dès les premières heures suivant une transplantation rénale, cette activation coïncidant avec une libération d'IL-33 [118]. De manière similaire, Ferhat *et al*. ont confirmé chez la souris que l'IL-33, en tant qu'alarmine, joue un rôle déterminant dans le recrutement des iNKT [45]. Une fois activées, ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IFN-γ et l'IL-17A, une production qui met aussi en jeu l'IL-12. Cette activation des iNKT exacerbe l'afflux des PNN, lesquels contribuent à l'aggravation des lésions d'IR rénale.

Dans la continuité de ces travaux, Barbier *et al*. ont également mis en évidence dans l'IR hépatique et la TH une sécrétion précoce d'IL-33, laquelle joue un rôle clé dans la mobilisation initiale des PNN et dans l'induction des lésions inflammatoires [46]. Dans le foie bien que les iNKT ont été associés aux lésions hépatiques suite à l'IR [125–127], à ce jour aucun lien n'a été fait avec l'IL-33. Ces observations nous amènent à formuler l'hypothèse que l'IL-33 pourrait agir comme un médiateur pro-inflammatoire essentiel en facilitant le recrutement et l'activation des iNKT et des MAIT, lesquels, via leur production de cytokines, peuvent contribuer à l'infiltration par des monocytes et des PMN du tissu subissant une séquence d'IR.

Take Home Message Partie II : L'IL-33 et l'immunité naturelle dans l'inflammation stérile associée à l'IR

- L'IL-33, une cytokine clé dans l'inflammation stérile

L'IL-33, membre de la famille de l'IL-1, agit comme une alarmine, libérée par les cellules en réponse aux lésions tissulaires.
En se liant à son récepteur ST2, elle active des réponses immunitaires pro-inflammatoires.
Dans le foie, elle est constitutivement exprimée par les LSEC ; son expression induite lors d'un stress cellulaire a été proposée pour les cellules hématopoïétiques innées et les hépatocytes.

- L'immunité naturelle : une réponse rapide à l'intersection de l'inné et de l'adaptatif

Les LTI tels que les iNKT et les MAIT combinent une activation rapide et des fonctions immunitaires spécifiques, jouant un rôle clé dans l'initiation des réponses inflammatoires aigues. Ces cellules, enrichies dans le foie, sont connues pour répondre aux signaux de danger tels que l'IL-33, initiant et/ou amplifiant les réponses inflammatoires.

- L'axe IL-33/LTI dans les lésions d'ischémie-reperfusion (IR)

Dans des modèles d'IR rénale, l'IL-33 est libérée de façon précoce, et favorise le recrutement des PMN et l'activation des iNKT, contribuant à l'aggravation des lésions tissulaires.
Bien que les MAIT soient moins étudiés, leur rôle pro-inflammatoire et implication dans l'IR cérébrale suggère une implication potentielle dans l'IR hépatique.
A ce jour, l'axe IL-33/LTI dans l'IR hépatique n'a pas été étudié.

L'axe IL-33/LTI a été identifié en tant que contributeur potentiel aux dommages hépatiques induits par une séquence d'IR. Cependant, l'IL-33, en tant qu'alarmine, possède également des propriétés modulatrices qui pourraient orienter les réponses immunitaires vers des mécanismes réparateurs. Ces propriétés soulèvent l'hypothèse d'un rôle complémentaire de l'IL-33 dans la mise en jeu d'un axe réparateur impliquant différents sous-types de LT, notamment les Treg et potentiellement les LTI, ceci en prenant appui sur leur dualité fonctionnelle bien documentée. Cet axe pourrait agir en synergie avec l'AREG, un facteur de croissance essentiel, à la fois comme médiateur direct de réparation et comme effecteur/médiateur de l'activité réparatrice portée par les cellules immunitaires. Dans la Partie III de l'Introduction Générale, nous explorerons cette hypothèse d'un rôle réparateur de l'IL-33, en mettant en lumière les interactions potentielles entre l'IL-33, les LT et l'AREG dans le contexte des lésions hépatiques d'IR.

Partie III – L'inflammation stérile, un processus pour rétablir l'intégrité d'un tissu

I- Principes de la régénération hépatique : un modèle unique de réparation tissulaire

a. Mécanismes fondamentaux de la régénération hépatique

Le foie se distingue des autres organes par ses capacités régénératrices. En effet, en comparaison à d'autres organes solides, le foie se régénère en préservant un rapport foie/poids corporel stable, un phénomène appelé « hépatostat » [128]. Ce phénomène contraste nettement avec d'autres organes (tels que les poumons et les reins) qui ne retrouvent pas leurs dimensions d'origine en cas d'ablation d'une de leur partie. Ce phénomène de régénération est essentiel à la préservation de l'homéostasie physiologique mais est intrinsèquement défectueux car il agit comme un mécanisme compensatoire [129,130]. Plus précisément, le foie se régénère en rétablissant uniquement la masse de l'organe, plutôt que sa morphologie d'origine, ce qui peut ultérieurement affecter sa capacité fonctionnelle [131].

La régénération du foie peut être déclenchée par divers facteurs, notamment le maintien homéostatique des tissus hépatiques, ainsi que par des *stimuli* pathologiques tels que des lésions aiguës résultant d'une hépatectomie partielle, des événements d'IR et des agressions chimiques dues à une consommation excessive de médicaments ou d'alcool [130]. Chacun de ces *stimuli* active un réseau complexe de cascades de signalisations extracellulaires et intracellulaires visant à rétablir à la fois le volume et la fonctionnalité du foie.

Dans un foie sain, les hépatocytes sont principalement quiescents, moins de 1 à 2 % d'entre eux étant simultanément engagés dans le cycle cellulaire en condition physiologique et ont une longévité moyenne de trois cents jours [132].

Cela explique pourquoi la recherche sur la régénération du foie s'appuie essentiellement sur l'étude de la restauration tissulaire après un stress, en particulier à la suite d'une hépatectomie partielle.

Le foie présente principalement deux voies de régénération distinctes : l'une dite « classique » reposant sur de l'auto-prolifération des hépatocytes et, l'autre dite « alternative » qui engage les cellules progénitrices du foie en cas de lésions importantes.

i. La régénération hépatique par les hépatocytes

La voie « classique » de prolifération des hépatocytes dans le foie, observée dans toutes les espèces de vertébrés, implique principalement la réplication d'hépatocytes sains préexistants [130,133]. Ce phénomène remarquable d'hyperplasie peut être attribué à la nature polyploïde des hépatocytes, qui peuvent exister sous forme de cellules bi-nucléées ou tri-nucléées, facilitant ainsi une division cellulaire efficace tout en préservant l'unicité du phénotype [134].

Ces caractéristiques permettent au foie, fréquemment soumis à diverses formes de stress, d'assurer : 1) le maintien de son intégrité structurale et de ses capacités fonctionnelles à la suite de processus de régénération, les hépatocytes matures se divisant en hépatocytes supplémentaires, préservant ainsi les fonctions métaboliques et détoxifiantes essentielles du foie ; 2) une réponse régénératrice rapide et efficace à la suite d'une agression mécanique ou chimique, plus rapide que celle résultant de la différenciation des cellules souches ; 3) une stabilité cellulaire, qui minimise l'émergence de types cellulaires aberrants susceptibles de compromettre la fonction hépatique ou d'entraîner la formation de cellules malignes.

Cette capacité régénératrice peut être observée lorsque le foie d'un donneur de petite corpulence est transplanté chez un receveur de plus grande taille, mais elle est particulièrement prononcée lors de la régénération hépatique après une hépatectomie partielle. Suite à une telle intervention, le foie compense la réduction de masse en stimulant la prolifération des hépatocytes.

ii. La régénération hépatique par les cellules progénitrices du foie

Un mécanisme « secondaire » de régénération hépatique existe et implique des cellules progénitrices du foie, appelées également « cellules ovales » en raison de leurs caractéristiques morphologiques [13,130,133,135]. Ces cellules, situées à l'intérieur des canaux de Hering, présentent une bipotence et possèdent des caractéristiques similaires à celles des cellules souches, étant ainsi en capacité de se différencier en hépatocytes et en cholangiocytes.

Leur implication est essentielle dans le processus de régénération du foie, en particulier lorsque les voies de régénération « classiques » sont inefficaces. Plus précisément, ce mécanisme, appelé réaction ductulaire, est généralement lié à la réponse hépatique provoquée par des lésions importantes ou une inflammation persistante, des conditions qui empêchent l'existence d'une population suffisante d'hépatocytes sains nécessaires à l'activation de la voie « classique » de prolifération des hépatocytes, ou dans des scénarios où cette dernière est perturbée [130].

Ces cellules progénitrices vont s’activer pour faciliter la restauration de la masse et de la capacité fonctionnelle du tissu hépatique. Bien que cette voie soit classée comme « secondaire », son rôle reste essentiel tant dans les contextes aigus que chroniques, puisque son inhibition entraîne un déficit significatif des mécanismes de réparation hépatique et de la fonctionnalité globale du foie.

b. Les EGF, la principale voie mitogène dans la régénération hépatique

Les facteurs mitogènes sont des acteurs majeurs de la régénération hépatique et appartiennent à la famille des « *epidermal growth factor* » (EGF)[136]. Qu'ils interviennent par des voies classiques ou secondaires, ces facteurs jouent un rôle central dans les mécanismes de régénération du tissu hépatique. Leur action repose principalement sur l'activation de la cascade de signalisation associée au récepteur des EGF (EGFR) [137], un récepteur tyrosine kinase transmembranaire. Lorsqu'il est activé par ses ligands, ce récepteur déclenche des voies de signalisation essentielles pour la prolifération, la différenciation et la survie des hépatocytes, processus indispensables à la régénération du foie après des lésions hépatiques aiguës ou chroniques (voir Figure 15).

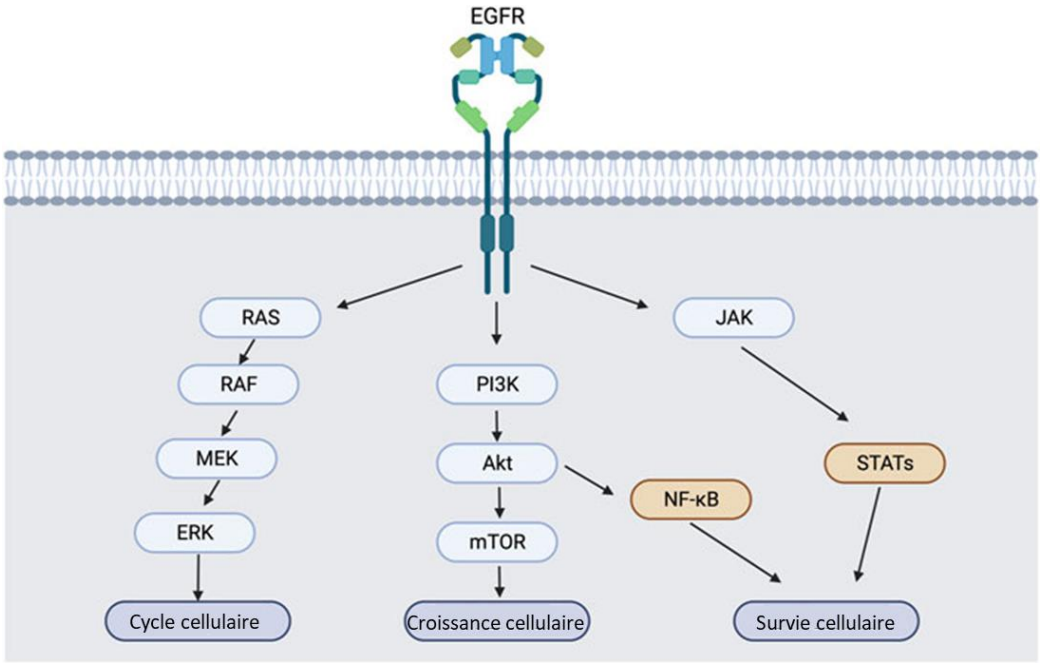


Figure 15 : Principales voies de signalisation activées par le récepteur EGFR. La signalisation EGFR est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, de la croissance cellulaire et de la survie des hépatocytes, essentielles pour la régénération hépatique. Issue de Sung et al., 2022. [138]

Parmi les principaux ligands de l'EGFR, l' « *hepatocyte growth factor* » (HGF), le « *vascular endothelial growth factor* » (VEGF), l' « *epidermal growth factor* » (EGF) et le TGF-α jouent un rôle important dans la régénération hépatique, chacun agissant sur des types cellulaires communs ou distincts [139]. Le HGF est une cytokine multifonctionnelle qui, en se liant à son récepteur, active plusieurs cascades de signalisations telles que JAK/STAT3, PI3K/AKT/NF-B et Ras/Raf, qui sont cruciales pour la prolifération, la croissance et la survie des cellules lors de la régénération du foie [140].

L'EGF et le TGF-α, deux autres ligands de l'EGFR, sont des mitogènes directs pour les hépatocytes, favorisant la synthèse de l'ADN et la progression du cycle cellulaire [141]. Le VEGF, bien qu'il ne soit pas directement lié à la prolifération des hépatocytes, est impliqué dans la signalisation paracrine qui affecte les cellules endothéliales, lesquelles à leur tour produisent le HGF, favorisant ainsi la régénération du foie [141].

Ensemble, ces facteurs de croissance et leurs voies associées favorisent tous la prolifération des tissus hépatiques, et contribuent au maintien des fonctions hépatiques.

Les mécanismes de régénération hépatique reposent sur une coordination complexe entre signaux moléculaires et réponses cellulaires, dans laquelle les EGF jouent un rôle central. Ces facteurs, par leur capacité à stimuler la prolifération, la différenciation et la survie des cellules, s'avèrent essentiels à la réparation tissulaire. Parmi eux, l'AREG se distingue comme un acteur essentiel de la régénération hépatique [130,142], non seulement pour ses propriétés réparatrices, mais aussi pour son rôle immuno-régulateur sur les cellules immunitaires. Dans cette perspective, nous décrirons par la suite l'implication de l'AREG ainsi que son lien avec le système immunitaire.

II- L'AREG : un facteur de croissance épidermique impliqué dans la réparation des tissus

a. Présentation générale de l'AREG

L'amphiréguline (AR ou AREG) a été décrite pour la première fois par Shoyab *et al*. en 1988, où ils ont décrit son rôle clé dans la régulation de la prolifération cellulaire, notamment dans le microenvironnement des lignées cellulaires de carcinome mammaire MCF-7 [143]. Elle fût donc classée comme une cytokine de type II en tant qu'élément appartenant à la vaste famille des facteurs de croissance épidermiques (EGF). L'AREG se distingue de la plupart des autres EGF puisqu'elle peut, non seulement, induire un signal mitogénique, mais aussi induire une différenciation cellulaire. Cette activité inattendue d'un "EGF" est à la base du nom "Amphi"-*regulin*, car ce facteur induit la prolifération dans certaines lignées cellulaires, tout en induisant l'arrêt de la croissance et la différenciation dans d'autres comme décrit chez les kératinocytes par Shoyab *et al.* en 1988 [143].

b. Biologie moléculaire de l'AREG

i. Structure génique et protéique de l'AREG

L'humain possède deux allèles distincts du gène *AREG*, appelés *AREG* et *AREGB* [144]. Aujourd'hui, bien que leurs contributions distinctes restent inconnues, ces 2 régions couvrent collectivement une longueur approximative de 10 kb (kilobases) et sont positionnées à une distance de 160 kb l'une de l'autre, sur la bande chromosomique 4q13.3.

Il est à noter que ces allèles du gène *AREG* sont situés à proximité d'autres éléments EGF, comme le gène de la bétacéluline, connu sous son abréviation BTC, l'épiréguline, appelé EREG, et le gène épigène, désigné EPGN [145].

Le gène *AREG* est transcrit en un ARN messager (ARNm) de 1,4 kb, composé de six exons qui codent ensemble pour une protéine transmembranaire, appelée pro-AREG de 252 aa. L'architecture de la protéine pro-AREG, illustrée dans la Figure 16, se distingue par l'existence de plusieurs domaines [143,145,146].

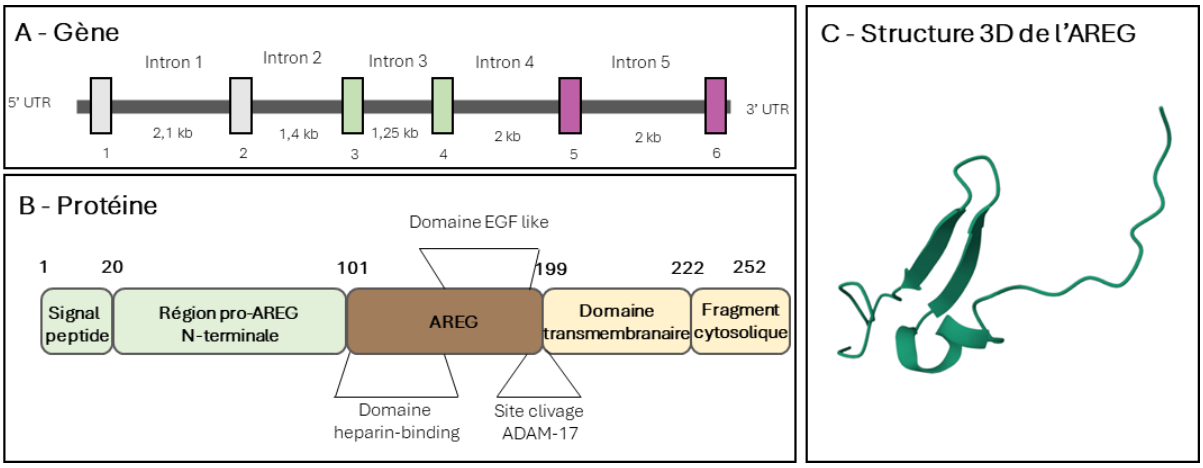


Figure 16 : Structure génique et protéique de l'AREG, ainsi que sa configuration tridimensionnelle. A : Gène de six exons codant pour la pro-AREG ; B : Structure de la protéine pro-AREG incluant un signal peptide, une région pro-AREG N-terminale, la région AREG, un domaine transmembranaire et un fragment cytosolique. Adaptée de : Berasain et al.,2014 [145] C : Structure tridimensionnelle de l'AREG humaine. Issus de "Protein Data Bank" [147]

À son extrémité N-terminale, un peptide signal hydrophobe assure son transport et son insertion dans la membrane cellulaire. Ce peptide signal est suivi par une pro-région hydrophile N-terminale, qui contient un site de glycosylation à son début, crucial pour la maturation et la stabilité de la protéine.

La région centrale de la protéine inclut la région AREG mature, qui comporte un domaine de liaison à l'héparine, doté d'un signal de localisation nucléaire ou « *nuclear localisation signal* » (NLS), et un domaine de type EGF.

Ce domaine est caractérisé par six résidus de cystéine, typiques de la famille des EGF, essentiels pour ses interactions fonctionnelles.

Suivi de la région AREG, un domaine hydrophobe de la protéine, correspond à la région transmembranaire, ancrant l'AREG dans la membrane cellulaire se terminant par l'extrémité C-terminale comprenant un domaine cytoplasmique jouant un rôle clé dans la régulation intracellulaire. Ce domaine contient un second NLS.

Ensemble, ces caractéristiques confèrent à l'AREG une diversité fonctionnelle lui permettant d'intervenir dans des processus cellulaires variés.

ii. Régulation biologique de l'AREG

L'activité biologique de l'AREG peut être régulée à différents niveaux [145]. L'expression du gène *AREG* est régulée au niveau transcriptionnel par divers activateurs et répresseurs. Les principaux activateurs transcriptionnels comprennent le « *Wilms' tumor suppressor gene1 »* (WT1) [148], l'« *hypoxia-inducible facto* (HIF) *2 »* [149,150], la p53 [151,152], la bêta-caténine [153], l'adénosine-monophosphate cyclique (AMPc), la *« response element-binding protein »* (CREB) *et l'« activator protein 1 »* (AP1) [154,155].

Les voies de signalisation de l'acide rétinoïque et du « *Wingless integration site* » (Wnt) jouent également un rôle dans l'activation de l'expression de l'AREG, en particulier dans le CHC. Le « *breast cancer 1 »* (BRAC1) a été identifié, dans les lignées humaines de cellules cancéreuse du col de l'utérus (Hela), comme un répresseur transcriptionnel de l'AREG, son blocage entraînant une régulation positive de celui-ci, indiquant bien son rôle dans la régulation transcriptionnelle directe [156]. La voie de l'AMPc influence de manière significative l'expression de l'AREG [145]. Dans les LT, la voie PKA de type I, activée par l'AMPc, augmente les transcrits du gène AREG en fonction du temps et de la concentration. Cette voie implique également l'activation d'un élément sensible à l'AMPc dans la région promotrice de l'AREG.

Des facteurs tels que le tabagisme [157] et les polluants environnementaux peuvent stimuler l'expression de l'AREG par des voies impliquant l'AHR et l'AMPc. Les cytokines comme l'IL-1α et le TNF-α favorisent également l'expression autocrine de l'AREG, améliorant ainsi la prolifération dans certaines cellules épithéliales. Bien que HIF soit souvent associée à la voie classique de régulation transcriptionnelle de l'*AREG* en condition hypoxique, l'expression de l'AREG au niveau de l'épithélium intestinal a aussi été décrite comme indépendante de celle-ci mais médié par CREB [155].

Il est intéressant de noter que l'AREG peut stimuler sa propre expression grâce à une boucle de rétroaction autocrine impliquant une liaison à l'EGFR. Ce mécanisme a été observé dans les cellules épithéliales intestinales et les cellules cancéreuses du sein, suggérant un aspect autorégulateur de l'expression de l'AREG [158]. Des études sur le cancer colorectal, ont montré que l'expression de l'AREG est inversement corrélée à la méthylation intragénique de l'ADN, mettant en évidence que les éléments épigénétiques présents dans le corps du gène *AREG*, mais pas dans la région promotrice, influencent sa régulation.

iii. Clivage de la pro-AREG par la métalloprotéase ADAM-17

Identifiée en 1988, ADAM-17 pour « *a disintegrin and metalloprotease 17* », également appelée « *tumor necrosis factor-α-converting enzyme* » (TACE), est une métalloprotéase qui est impliquée dans le traitement protéolytique des précurseurs des cytokines, des facteurs de croissance et des récepteurs associés à la membrane [159,160]. Un site de clivage spécifique à la lysine 187 de la pro-AREG permet la libération de formes solubles de l'AREG. Cependant, l'activité protéolytique d'ADAM-17 sur la pro-AREG peut conduire à la génération de multiples variants d'AREG solubles.

Les recherches de Brown *et al.* en 1998 ont montré qu'il existe 5 variants possibles de l'AREG solubles issues du clivage de la pro-AREG (Voir Figure 17) [161].

ADAM-17 facilite le clivage protéolytique de la protéine précurseur pro-AREG intégrée dans la membrane, permettant ainsi la libération d'un variant mature et soluble qui englobe le motif EGF, avec un poids moléculaire approximatif de 43 kDa. Ce clivage préférentiel représente la forme prédominante de l'AREG soluble N-glycosylée [161].

Cependant, il existe quatre isoformes alternatives potentielles de l'AREG qui résultent du traitement séquentiel et/ou alternatif de la pro-AREG par ADAM-17. En l'absence de clivage préférentiel, un clivage secondaire au niveau des sites proximaux peut produire des isoformes pro-AREG de 26 kDa et 28 kDa à la surface cellulaire. Ces doublets peuvent eux-mêmes subir un clivage au niveau d'un site distal, ce qui produit un doublet d'AREG matures et solubles de 19 kDa et 21 kDa. La cinétique de clivage de ce doublet est comparativement plus lente, prolongeant ainsi sa rétention à la surface cellulaire, et un traitement ultérieur sur le site proximal peut conduire à la formation d'une isoforme pro-AREG de 16 kDa. Cette pro-AREG de 16 kDa, déficiente dans une partie substantielle du domaine de liaison à l'héparine, peut être clivée au niveau d'un site distal pour libérer un AREG soluble de 9 kDa dans le milieu extracellulaire [161].

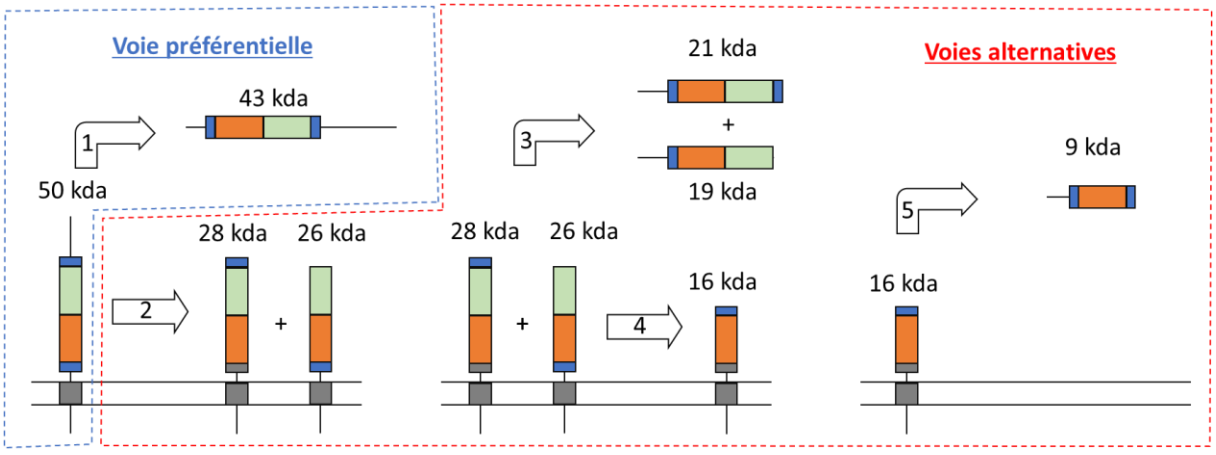


Figure 17 : Représentation des différentes voies de clivage de la pro-AREG conduisant aux différents isoformes d'AREG. *Adaptée de Brown et al., 1998 [161]*

Dans l'ensemble, la voie préférentielle à un clivage correspondant à la forme soluble de 43 kDa reste prédominante et est cruciale pour la capacité de l'AREG à déclencher une signalisation autocrine ou paracrine via le récepteur du facteur EGFR, activant ainsi les voies intracellulaires qui régissent la survie, la prolifération et la motilité des cellules.

iv. Le récepteur de l'AREG : EGFR et signalisation cellulaire

Identifié dans les travaux du biochimiste, prix Nobel, Stanley Cohen, l'EGFR, désigné HER1, ERBB2 ou ErbB1, est classé parmi la famille des « *human epidermal receptor* » (ou HER) ou, plus fréquemment appelé la famille EGFR [137]. Ce récepteur est une protéine transmembranaire de 170 kDa, présentant une activité tyrosine kinase. Bien qu'associé à l'AREG, l'EGFR interagit avec plusieurs autres ligands, notamment l'EGF, l'EPG et le TGF-α [162].

À la suite du clivage protéolytique induit par ADAM-17, l'AREG est libérée sous forme soluble, facilitant ainsi ses fonctions autocrine ou paracrine [163–165].Cette libération est essentielle pour une action étendue au niveau des tissus. De plus, l'AREG a la capacité de déclencher une signalisation juxtacrine lorsqu'elle reste attachée à la membrane plasmique dans sa conformation pro-AREG, ce qui permet une interaction directe avec l'EGFR sur les cellules adjacentes [165]. (Voir Figure 18).

L'AREG stimule principalement l'EGFR, tout en facilitant la formation d'homodimères (« *closed conformation* ») ou d'hétérodimères (« *extended conformation* ») avec d'autres membres de la famille des EGFR, notamment ErbB2, ErbB3 et ErbB4. [166]. Cet événement de dimérisation est essentiel pour l'initiation de cascades de signalisations intracellulaires comprenant RAS/MAPK, PI3K/AKT, mTOR, STAT et PLCγ, comme discuté plus haut [145]. Ces voies de signalisation jouent un rôle déterminant dans la régulation de nombreux processus cellulaires, dont notamment la prolifération, la survie, le caractère invasif, la motilité et l'angiogenèse [145]. (Voir Figure 18).

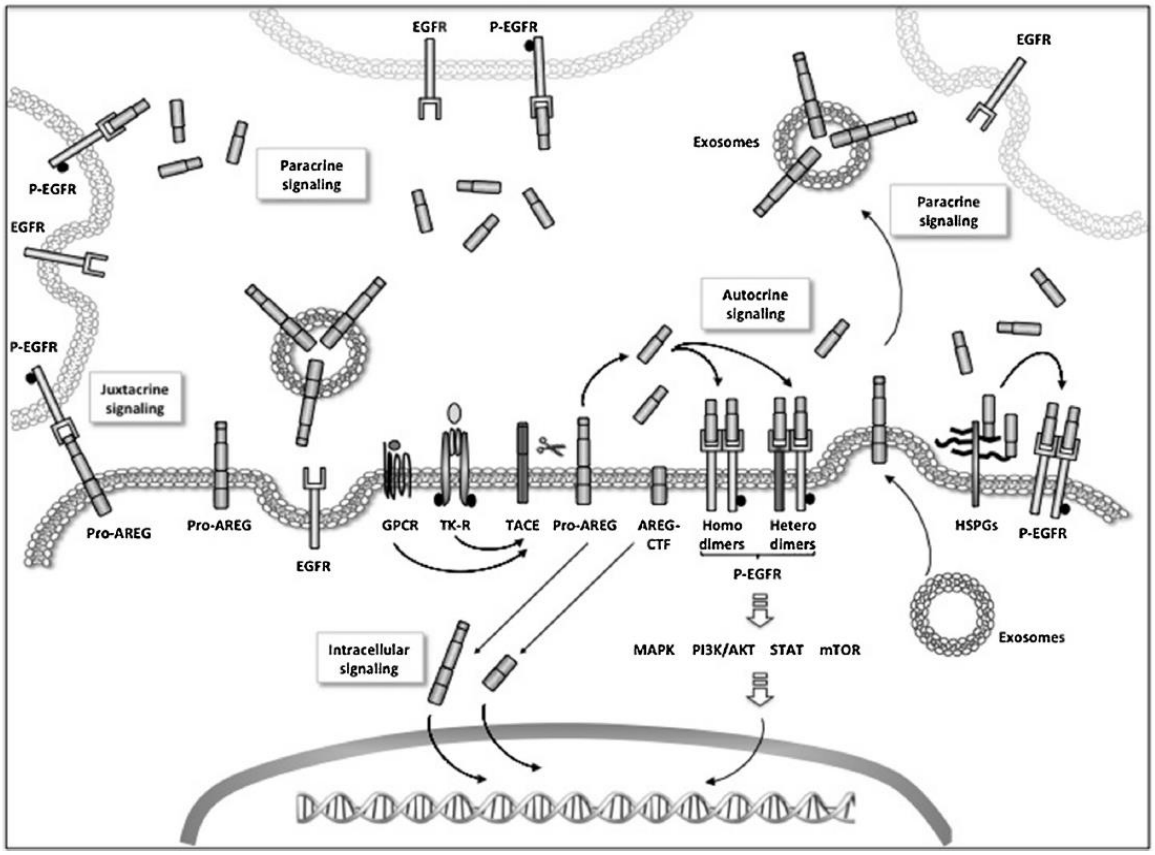


Figure 18 : Représentation des voies de signalisation de l'AREG. La pro-AREG, clivée par ADAM-17 (TACE dans la figure) libère une forme soluble qui va agir sur le milieu environnant de façon autocrine ou paracrine via l'EGFR. La pro-AREG membranaire peut également déclencher des signaux juxtacrines ou être libérée sous forme d'exosomes. Une translocation de la pro-AREG ou de l'AREG-CTF est possible. Issue de Berasain, 2014 [145]

L'AREG ici aussi se différencie des autres EGF. En effet, Jones *et al.*, et Macdonald-Obermann *et al.*, ont montré que l'AREG se lie à l'EGFR avec une affinité inhabituellement faible et présente une capacité de liaison différentielle pour l'EGFR par rapport à d'autres EGF [167,168]. Bien que présentant une forte homologie de séquence protéique avec les autres EGF, un acide aminé diffère dans son domaine de liaison au récepteur et forme une interaction instable avec ce dernier [169]. Par ailleurs, sa lésion avec l'EGFR n'induit pas une internalisation de celui-ci amenant normalement à sa dégradation comme l'a reporté Stern *et al.*, ce qui entraîne une signalisation soutenue en aval sans rétroaction négative de la cascade de signalisation MAP-kinase [170]. Ces différences pourraient expliquer pourquoi l'AREG induit des résultats biologiques distincts des EGF.

c. Expression cellulaire de l'AREG et fonction biologique

L'AREG présente une dualité fonctionnelle importante en fonction du contexte (condition physiologique/pathologique), des cellules qui la porte, et des cibles cellulaires. Dans un même contexte, mais portée par deux types cellulaires effecteurs différents, l'AREG peut avoir des rôles opposés. Par la suite, nous parlerons de l'AREG en condition physiologique et pathologique.

i. Expression tissulaire et fonction biologique en condition physiologique

L'AREG est exprimée de manière constitutive dans un large éventail de tissus sains, notamment le placenta, les ovaires, les testicules, le cœur, le pancréas, la rate, la moelle osseuse, le sang, les reins, les poumons, le côlon et le sein [171]. Cette expression omniprésente suggère son rôle essentiel dans le maintien de fonctions physiologiques normales dans de multiples systèmes physiologiques.

Pourtant, malgré son expression constitutive dans un large panel de tissu, les souris déficientes en AREG (AREGKO) sont viables et fertiles ce qui suggère que les fonctions de l'AREG ne sont pas vitales pour l'organisme, ou du moins, ces fonctions biologiques au sein des tissus peuvent être compensées, possiblement par d'autres EGF [172]. Cependant, il est à noter que ces souris présentent des phénotypes dommageables concernant le développement de leurs glandes mammaires et, plus particulièrement, dans la formation de leurs canaux lactifères suggérant ainsi le rôle de l'AREG dans la morphogenèse et la maturation des glandes mammaires au cours de la « puberté » [164,173].

Sa localisation cellulaire peut différer en fonction des tissus. Bien que souvent membranaire ou cytoplasmique, la littérature décrit certaines cellules épithéliales, telles que les cellules épithéliales du colon [163] et des ovaires [174], comme possédant une expression constitutive nucléaire d'AREG. La présence de NLS sur la protéine AREG, telle que la rapportée par Shoyab *et al.*, en 1989, pourrait expliquer cette particularité, bien que sa fonction nucléaire à ce jour reste mal décrite [175].

Cependant, bien que ne s'agissant pas d'une expression nucléaire constitutive de l'AREG, il a été montré que l'internalisation de la pro-AREG peut avoir un rôle dans la croissance cellulaire des kératinocytes [176]. En effet, l'arrêt de la croissance cellulaire induite par la neutralisation de l'AREG, et reflété par un arrêt de la mitose, ne peut pas être contrecarré par l'ajout d'AREG recombinante dans le milieu. Ces résultats montrent que l'AREG soluble (ici recombinante) ne peut pas être internalisée dans le noyau des cellules. Cependant, la transfection de plasmides exprimant une pro-AREG ou le fragment d'AREG transmembranaire-cytoplasmique (AREG-CTF) résultant du clivage par ADAM-17 conduit à leur localisation nucléaire et à la restauration de la prolifération cellulaire. Ces résultats, en plus d'indiquer que l'AREG nucléaire peut agir sur le cycle cellulaire, montrent également que ce phénomène dépend d'une internalisation de la pro-AREG.

Il convient de noter, que l'expression transcriptionnelle de l'*AREG* dans le foie est très faible, voire presque indétectable en condition physiologique [142,177].

Peu d'études ont exploré la source d'AREG dans le foie en conditions physiologiques. Néanmoins, les modèles murins AREGKO présentent des lésions chroniques du foie, soulignant le rôle indispensable de l'AREG dans le maintien de l'homéostasie tissulaire hépatique [145].

ii. Expression induite au sein des cellules non immunitaires et fonction

En fonction du caractère aigu ou chronique du stress induit sur un environnement, la littérature décrit des effets opposés de l'AREG.

Dans les pathologies chroniques, l'AREG est généralement décrite comme ayant un rôle délétère [178]. Lors de pathologies métaboliques, L'AREG est associée à une fibrose importante. L'étude de McKee en 2015 a montré que l'AREG est positivement régulée lors de la stéatose hépatique non alcoolique [21]. Cette AREG, en activant les HSC, induit une prolifération et une activation de ces cellules, contribuant à la fibrose hépatique et au dysfonctionnement de l'organe.

L'AREG permet également une prolifération, une survie et un échappement à l'apoptose des cellules malignes. En condition physiologique, l'AREG est initialement pro-apoptotique par la voie p53, cependant les cellules transformées produisent des taux importants d'AREG faisant pencher la balance des effets de celle-ci permettant le développement du cancer. Lorsque l'AREG est surexprimée, elle ne passe alors plus par la voie p53 mais va induire par l'EGFR une voie de survie, rendant par conséquent ces cellules malignes résistantes à l'apoptose [152,179].

L'AREG, dans le contexte d'une inflammation stérile aiguë, reste peu étudiée. Cependant, certaines publications rapportent une augmentation rapide de son expression, notamment dans des modèles d'infarctus du myocarde ou d'IR cérébrale [150,180,181].

Plus spécifiquement dans le foie, l'équipe du Prof. Matias A. Avilas a largement contribué à montrer ce phénomène [142,177] . Bien que l'Areg soit indétectable en condition physiologique, Berasain *et al.*, en 2005, a montré que lors d'une lésion hépatique, en particulier dans le contexte de l'apoptose médiée par Fas son expression est fortement induite [177]. La régulation positive de l'Areg se produit rapidement entre deux et cinq heures après l'administration d'un anticorps anti-Fas agoniste.

Cette induction précède l'expression d'autres ligands de l'EGFR tels que l'EPR, ce qui suggère un rôle unique et plus précoce de l'AREG dans la réponse du foie à une lésion. Une deuxième étude a montré que l'ARNm de l'*Areg* chez le rat et la souris devient détectable dès les premières minutes après l'hépatectomie partielle [142]. Cette induction rapide de l'expression du gène *Areg* a directement été attribuée à un début de la régénération hépatique. La même étude met également en évidence que l'induction de l'*AREG* est indépendante du facteur de transcription WT1, dont l'expression n'est pas induite après une résection hépatique. En revanche, d'autres médiateurs tels que l'IL-1β et la prostaglandine E2 (PGE2) sont impliqués dans la promotion de l'expression du gène *Areg* lors de la régénération du foie après hépatectomie partielle.

Dans l'ensemble de ces études, en situation inflammatoire aigüe, une déficience en AREG se traduit par une exacerbation des lésions tissulaires et d'une détérioration des fonctions des organes impliqués. Ces résultats montrent un rôle différent des situations chroniques avec ici, une AREG protectrice/réparatrice.

iii. Les cellules immunitaires productrices d'AREG

Bien qu'initialement identifiée comme une cytokine produite par les cellules épithéliales, l'AREG est également produite par divers sous-ensembles de cellules immunitaires. Ces cellules immunitaires, en sécrétant de l'AREG en réponse à divers *stimuli*, contribuent ainsi de manière significative à la régénération tissulaire, l'immuno-modulation et la réponse inflammatoire.

1. Les cellules immunitaires innées productrices d'AREG

Des études *in vitro* ont montré que les éosinophiles régulent à la hausse l'expression de l'ARNm *AREG* et sécrètent ensuite la protéine AREG lors d'une stimulation par le GM-CSF et l'IL-5 [178]. Il a été également montré que les basophiles possèdent la capacité de synthétiser l'AREG en réponse à l'IL-3, dérivée des LT suite à une stimulation de leur TCR. Dans les modèles expérimentaux murins, l'AREG produite par les basophiles est essentielle afin d'atténuer les réactions d'hypersensibilité médiées par les LT. Les mastocytes sont capables de produire de l'AREG de manière constitutive chez les personnes asthmatiques, ainsi que pendant le processus de réticulation des IgE, contribuant ainsi à la physiopathologie de l'asthme [182]. L'AREG sécrétée par les mastocytes et basophiles joue un rôle bifonctionnel en améliorant les capacités des Treg afin d'atténuer les réponses inflammatoires tout en supprimant l'activité des cellules Th1 [183,184]. Enfin, les ILC2 peuvent adopter un phénotype de réparation tissulaire caractérisé par la sécrétion d'AREG, qui joue un rôle central dans la modulation des réponses immunitaires et la facilitation de la réparation tissulaire [29,185] bien qu'en fonction du contexte, celle-ci puisse s'avérer délétère dans l'hépatite aiguë [89].

2. Cellules immunitaires adaptatives productrices d'AREG

Les cellules Th2 sont connues pour produire de l'AREG, facilitant la réponse aux infections parasitaires, en particulier lors d'infections par des helminthes, en favorisant la prolifération des cellules épithéliales intestinales [178]. Les LT CD8 cytotoxiques sont capables de sécréter l'AREG, ayant un rôle dans les pathologies tumorales, en jouant un rôle important dans la tumorigenèse, et permettant la croissance, l'échappement et la motilité des cellules tumorales [178]. Cette capacité des LT CD8 à produire de l'AREG est également attribuée à une régénération tissulaire [186] .

En résumé, cette liste non exhaustive montre que le système immunitaire à la fois de type inné et adaptatif, en produisant l'AREG, contribue directement à la régulation immunitaire, la réparation des tissus et la pathogenèse des maladies.

En tant que facteur de croissance clé, l'AREG joue un rôle central dans les processus de réparation tissulaire, notamment en réponse aux lésions hépatiques. Cependant, sa production et son activité sont étroitement liées aux cellules immunitaires régulatrices, en particulier les Treg. Ces derniers, activés par des signaux tels que l'IL-33, apparaissent comme des médiateurs essentiels dans la modulation de l'inflammation et la promotion de la régénération. Dans la partie suivante, nous décrirons les propriétés immuno-régulatrices des Treg, ainsi que leur lien fonctionnel avec l'IL-33 et l'AREG, avant de discuter l'hypothèse émergente d'un axe IL-33/AREG/Treg en tant que mécanisme réparateur dans les lésions d'IR hépatique.

III- Hypothèse d'un axe immunitaire réparateur IL-33/AREG/Treg associé à l'IR hépatique

Lors de l'inflammation stérile induite après un stress cellulaire, la régénération tissulaire constitue un mécanisme biologique initié par la libération de DAMPs résultant de la perte de l'intégrité des tissus. Dans ce cadre, les alarmines représentent un élément majeur dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice [39,42,73]. Bien que l'IL-33 joue un rôle important dans la cascade inflammatoire, comme expliqué dans la Partie II de l'Introduction Générale, elle est également reconnue pour ses propriétés de résolution et de régénération qui sont largement documentées dans la littérature. L'IL-33 est souvent reconnue comme un facteur critique dans divers cas de résolution de l'inflammation, principalement en raison de ses interactions avec des populations cellulaires spécifiques, en particulier les Treg, qui sont essentielles à la réparation et à la régénération efficace des tissus exprimant ST2.

Par ailleurs, l'AREG a été identifiée ces dernières années comme une puissante médiatrice de l'activité immuno-régulatrice des Treg. En interagissant avec les Treg, l'IL-33 améliore leur production de cytokines immuno-régulatrices, en partie à travers l'AREG [187].

a. Les Treg : archétype des cellules T immuno-régulatrices et leur lien privilégié avec l'IL-33 et l'AREG

i. Définition et sélection des Treg

Décrits pour la première fois en 1995 chez la souris et en 2001 chez l'humain, les Treg sont un sous-ensemble spécialisé de LT CD4(+) essentiel au maintien de l'homéostasie immunitaire et de l'auto-tolérance [188]. Ils contrôlent également l'inflammation en inhibant la prolifération et la production de cytokines d'autres populations immunitaires. Aujourd'hui, les Treg sont définis par : 1) l'expression du facteur de transcription « *forkhead box P3* » (Foxp3), qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la maturation et des capacités inhibitrices de ces cellules ; 2) une co-expression avec le CD25 ; par ailleurs, certaines études s'appuient sur le « *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* » (CTLA-4), qui fait également partie intégrante de leurs mécanismes immuno-suppresseurs [188].

Chez l'humain, les Treg représentent 5 à 10 % du *pool* total de CD4+, ou 1 à 2 % des lymphocytes du sang périphérique [189]. La population de Treg se divise en deux catégories principales : les Treg naturels et les Treg inductibles. Les Treg naturels proviennent de LT CD4 qui subissent un processus de différenciation intra-thymique (acquisition de Foxp3) après la reconnaissance de leur autoantigène via le TCR ; ils se caractérisent par l'expression de taux élevés d'HELIOS et de neuropiline-1.

En revanche, les Treg inductibles sont issus de LT CD4 naïfs qui subissent leur différenciation en dehors du thymus lorsqu'ils rencontrent un antigène, généralement liés à une costimulation sous-optimale par divers médiateurs, notamment le TGF-β1, l'IL-2 et l'acide rétinoïque [190]. Il est à noter que les hépatocytes ont la capacité de faciliter la conversion des LT CD4 en Treg à la suite de l'activation du TCR, médiée par la voie de signalisation Notch, favorisant ainsi la tolérance immunologique au niveau hépatique [191].

Par ailleurs, Delacher *et al.*, ont montré que le « *basic leucine zipper ATF-like transcription factor* » (BATF) est essentiel dans la différenciation des précurseurs des Treg tissulaires exprimant ST2 au sein des organes lymphoïdes et de leur présence ultérieure dans les tissus non lymphoïdes tels que la peau, les poumons ou le foie [192].

ii. L'IL-33 : une alarmine/cytokine dans le recrutement des Treg

Dans différents contextes d'inflammation stérile, l'IL-33 s'est avérée essentielle dans la réparation des tissus à la suite d'un stress. En effet, bien que démontré par administration pharmacologique de la cytokine, il a été montré que l'IL-33 peut induire une angiogenèse [193], la prolifération des cellules épithéliales [66], ainsi qu'une protection des cellules épithéliales lors d'une hypoxie [194]. En plus, de pouvoir directement cibler des cellules non-immunitaires, de nombreuses études indiquent que la voie de signalisation IL-33/ST2 joue un rôle central dans le recrutement et l'efficacité opérationnelle des Treg dans le contexte de la réparation tissulaire dans des environnements non lymphoïdes [195,196] .

De façon générale, la signalisation de l'IL-33/ST2 induit une boucle de rétroaction positive sur les Treg. L'IL-33 agit sur les Treg en augmentant le niveau d'expression des facteurs de transcription Foxp3, GATA3 et STAT5, augmentant ainsi leurs capacités immuno-régulatrices, aboutissant *in fine* à une augmentation du niveau d'expression du récepteur ST2 à la surface des Treg [197].

Les Treg périphériques expriment faiblement le ST2 à leur surface alors que les Treg infiltrés ou résidants dans les tissus présentent une expression plus prononcée de ST2. Par ailleurs, les Treg ST2+ présentent un potentiel de prolifération plus important [197]. Au niveau hépatique, les Treg présentent une expression constitutivement élevée de ST2. L'impact de la signalisation IL-33/ST2 sur les Treg hépatiques a été démontré suite à la mise en évidence d'une accumulation de Treg appauvrie dans le foie des souris ST2KO pendant le pic d'infection par le cytomégalovirus. Par ailleurs, les modèles murins déficients en ST2 sont caractérisés par une nécrose hépatocellulaire, une infiltration de cellules mononucléées et une extravasation d'érythrocytes [198].

De manière surprenante, une étude menée par Arpaia *et al*., en 2015, a montré, à travers un modèle d'infection virale, qu'en plus de l'importance critique de Treg dans la réparation tissulaire post-infection, que cette fonction réparatrice des Treg dépend de l'IL-18 et de l'IL-33 mais est indépendante de la signalisation du TCR. La déficience des voies de signalisation IL-18 et IL-33, a abrogé la production de médiateur de réparation mais pas de l'immuno-suppression. Ces résultats indiquent une voie unique pour les fonctions de réparation tissulaire par ces cellules [187].

Collectivement, ces données indiquent que les signaux apportés par l'interaction l'IL-33/ST2 contrôlent l'expansion et les fonctions réparatrices des Treg protégeant les tissus.

iii. L'AREG au cœur des mécanismes d'engagement des Treg dans la restauration tissulaire

Les Treg constituent un sous-ensemble immuno-régulateur qui joue un rôle vital dans la préservation de l'homéostasie tissulaire. Leur engagement dans la réparation tissulaire est médié par deux voies de régulation : l'immuno-suppression de l'inflammation et la réparation tissulaire [199].

L'AREG est d'une importance cruciale pour ces voies de régulation. L'axe Treg/AREG a été mis en évidence par Burzyn *et al.*, en 2013 en utilisant un modèle murin pour étudier les lésions des muscles squelettiques [200]. Les Treg qui étaient mobilisés sur les sites des lésions étaient capables de générer des quantités très élevées d'AREG. De plus, l'administration d'AREG recombinant facilitait la régénération musculaire tandis que le processus de guérison était altéré dans les cas où les Treg étaient absents causant la présence d'un infiltrat pro-inflammatoire plus intense.

Ces deux voies, qui ont en commun d'être en partie médiées par l'AREG, sont illustrées ci-dessous (voir Figure 19) [199,201,202] et seront discutées dans les deux parties suivantes.

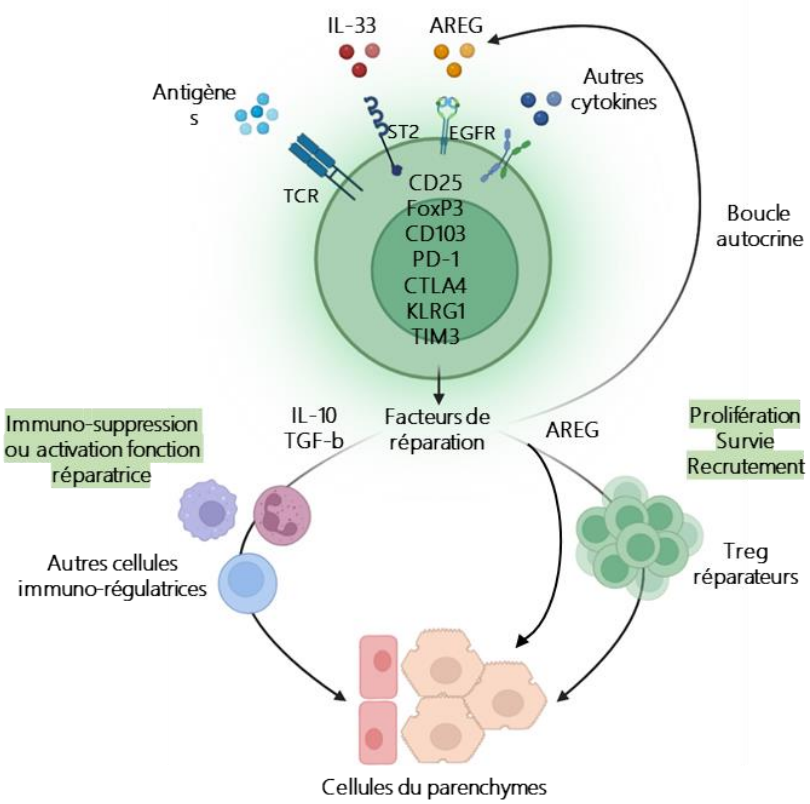


Figure 19 : Représentation schématique des mécanismes de modulation de l'inflammation et de régénération tissulaire impliquant les Treg. *Les Treg activés produisent des cytokines, comme l'IL-10 et le TGF-β, qui agissent sur les cellules en leur attribuant des fonctions immuno-régulatrices, pour promouvoir une immuno-suppression. Les Treg activés produisent également de l'AREG en agissant directement sur le parenchyme ou en boucle autocrine et paracrine, contribuant à la prolifération, la survie et le recrutement des Treg. Ces deux voies collaborent afin de restaurer l'homéostasie tissulaire et réparer les lésions des tissus. Issue et adaptée de Zhang et al., 2017 [199], Zaiss et al., 2015[201] et Zaiss et al.,2019 [202].* BioRender *[108]*

1. Immuno-suppression de l'inflammation médiée par les Treg

Les Treg modulent les fonctions pro-inflammatoires de divers types de cellules immunitaires, tels que les LT effecteurs, les DC, les macrophages et les LB, via de multiples mécanismes, notamment la suppression directe des réponses pro-inflammatoires. Pour y parvenir, les Treg sécrètent une gamme de cytokines immuno-modulatrices, telles que l'IL-10, le TGF-β, l'IL-35 mais également l'AREG [190].

L'AREG est cruciale pour le fonctionnement optimal des Treg. Des recherches menées par le professeur Dietmar M.W. Zaiss et son équipe en 2013 ont démontré qu'après activation, les cellules Treg migrent vers le site inflammatoire, où elles rencontrent l'AREG, qui accroit leurs fonctions suppressives, potentiellement par la libération d'exosomes immuno-suppresseurs [184]. En l'absence d'AREG, les cellules Treg perdent en partie leur capacité à atténuer l'inflammation locale. Cette étude de Zaiss et al., en 2013 se place dans un contexte d'inflammation chronique où l'AREG est produite par les mastocytes [184].

De même, il est important de noter que les Treg infiltrés dans les tissus sont également capables de produire de l'AREG fonctionnant via une boucle autocrine pour améliorer leurs capacités immuno-régulatrices [183,184,200].

Bien qu'en condition physiologique, l'expression de l'EGFR ne soit généralement pas détectée dans les Treg, on note une induction marquée de l'expression de l'EGFR dans les Treg tissulaires suite à un stress cellulaire [203]. Cela suggère que l'expression de l'EGFR est induite de préférence dans les Treg au sein d'environnements inflammés.

Cette voie EGFR augmente la capacité suppressive des Treg permettant d'inhiber de manière significative la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ, le TNF-α, la perforine et le granzyme B, et également la prolifération des LT CD8.

Cet effet immuno-suppresseur n'étant pas retrouvé dans les Treg dépourvus d'EGFR, on peut en déduire que l'expression de l'EGFR est indispensable au maintien de l'homéostasie immunitaire pendant la réparation tissulaire [184,204].

Dans un modèle d'inflammation stérile aiguë plus pertinent dans notre étude, les basophiles étaient identifiés en tant que principaux producteurs d'AREG lors d'une réaction d'hypersensibilité de la peau [183]. Bien que les sources identifiées d'AREG à l'origine des capacité immuno-suppressive des Treg dans ces études soient immunitaires, cela implique également qu'une source non immune d'AREG, en réponse au stress cellulaire, pourrait influencer les capacités immuno-suppressives des Treg, bien que cela reste encore à documenter.

Dans la section qui suit, nous discuterons des fonctions réparatrices de l'AREG synthétisée par les Treg.

2. Restauration tissulaire médiée par les Treg

On associe les Treg à un processus « non immunologique » du fait de leur action de réparation sur des cellules non immunitaires. Ainsi, les Treg activés contribuent par la production d'AREG à la réparation des cellules épithéliales, endothéliales ou encore des cellules des parenchymes exprimant l'EGFR [202].

Cette capacité des Treg à produire l'AREG dans le cadre de la réparation tissulaire a été observée dans la régénération de l'épithélium pulmonaire [187],du muscle squelettique [205] et dans les tissus rénaux [206] .

b. L'IL-33, l'AREG et les Treg dans un axe commun en IR d'organe ?

L'existence d'un axe IL-33/Treg/AREG dans laquelle l'IL-33 induit à travers les Treg une production d'AREG est maintenant bien défini dans les modèles d'inflammation. Plusieurs articles, abordant le sujet de l'IL-33 en tant qu'agent protecteur dans les lésions induites par l'IR, discutent d'un mécanisme de protection facilité par une source exogène d'IL-33 pendant le pré-conditionnement ou durant la phase de reperfusion de l'organe.

Dans un autre modèle murin d'inflammation stérile aigüe, celui de l'hépatite auto-immune induite par la concanavaline, Wachtendorf *et al.*, ont récemment documenté le rôle immuno-régulateur de l'axe IL-33/Treg/AREG [89]. Cette étude souligne le double rôle de l'AREG, à la fois dans la promotion de l'inflammation et de sa résolution, en fonction des cellules qui vont la produire en réponse à l'IL-33. En effet, cette étude a mis en évidence l'implication de l'IL-33 endogène laquelle, en activant les ILC2, aggrave les lésions hépatiques. Cependant, un prétraitement avec de l'IL-33 exogène a permis de réduire la gravité de la maladie en induisant l'expression de l'AREG des Treg ST2+ dont l'activation était cruciale pour atténuer la maladie. Ainsi, l'absence de signalisation endogène d'IL-33 chez les souris ST2KO a entraîné une aggravation de la maladie, associée à une activation réduite des Treg. À l'inverse, le transfert adoptif de Treg ST2+ activés par l'IL-33 a supprimé les réponses inflammatoires. De plus, l'étude a révélé que les souris AREGKO présentaient des lésions hépatiques plus graves, liées à une production accrue de cytokines par les ILC2 et à une réduction des Treg ST2+.

Bien que ne s'agissant pas du foie, un seul travail dans un modèle d'IR rénale a mis en lumière le rôle protecteur d'un axe IL-33/Treg/AREG sans stimulation pharmacologique d'IL-33. Cette étude très récente de Vikram *et al.*, a montré le rôle essentiel des Treg via le ST2 et l'AREG dans la protection et la réparation du tissu rénal à la suite d'une IR unilatérale rénale [206].

Le séquençage de l'ARN des Treg spléniques et rénaux indiquait que les Treg ST2+ sont enrichis en gènes liés à la prolifération et à la fonction des Treg, notamment en gènes codant des facteurs réparateurs tels que l'AREG. La suppression de ST2 ou de l'AREG, spécifiquement dans les Treg, exacerbait les lésions rénales et la fibrose induites par l'IR rénale. Cela suggère que le l'IL-33 et l'AREG jouent tous les deux, un rôle essentiel dans l'atténuation des lésions rénales.

Cependant, il convient de noter, qu'à ce jour, la place d'un axe IL-33/AREG/Treg ou l'IL-33 et l'AREG (hors boucle autocrine/paracine) agissent de paires pour recruter les Treg n'a pas été étudiée. Pourtant, les études citées ci-dessus, en traitant l'axe IL-33/Treg/AREG ont mis en lumière de possibles premiers éléments d'un axe IL-33/AREG/Treg.

Vikram *et al.*, a montré que, lors d'expériences de co-culture d'organoïdes rénaux/Treg, les Treg de type sauvage, étaient capables de préserver la viabilité des organoïdes rénaux dans des conditions hypoxiques mais pas les Treg déficients en ST2 [206]. Cet effet protecteur était restauré par une supplémentation en AREG, soulignant son importance sur les Treg, indépendamment de l'IL-33 dans le processus de réparation. L'AREG remplace, ici, la signalisation IL-33 vers les fonctions réparatrices que leur étude et celle de Arpaia *et al.*, a montré comme essentielle. Ces dernières données suggèrent donc l'existence d'un axe IL-33/AREG/Treg, avec une source d'AREG en dehors de celles portées par les Treg, pour la résolution des lésions causées par l'IR, bien que cela reste à démontrer [206].

De façon un peu contradictoire mais toujours dans cette idée d'axe IL-33/AREG/Treg, Wachtendorf *et al.*, a démontré *in vitro*, que l'AREG exogène augmente l'activation des Treg ST2+, mettant sa contribution dans la résolution de l'inflammation [89]. Cependant, dans cette étude, de façon intéressante cellules Treg issus des souris ST2KO ne répondait pas à cette AREG exogène, comme si une signalisation IL-33 manquait.

S'agissant de l'IR appliquée au foie, l'existence, bien que les Treg aient été décrits comme contributeurs essentiels à la résolution des lésions d'IR [207–210], de tels axes impliquant l'AREG ou l'IL-33 n'a jamais été documentés. Sakai *et al.*, en 2012 ont montré dans un modèle murin d'IR hépatique, que l'administration d'IL-33 recombinante pendant la phase de reperfusion avait une influence protectrice sur les hépatocytes en atténuant l'étendue des lésions, ceci en régulant les voies du facteur nucléaire NF-κB, des protéines MAPK, de la cycline D1 et de Bcl-2, entraînant ainsi une diminution des cytokines pro-inflammatoires et de l'infiltrat des cellules immunitaires innées. Soulignons néanmoins que la source de l'IL-33 dans ce travail était d'origine exogène [194]. De même, il a été démontré que la signalisation IL-33/ST2 à travers les Treg joue un rôle dans l'inhibition de l'activation de la caspase 3 et atténue les lésions dans un modèle d'hépatite aiguë induit par la concanavaline A [211].

Malgré les fonctions protectrices mentionnées, le rôle de l'IL-33 et des Treg dans le contexte de la transplantation d'organe est complexe et n'est pas nécessairement associé à des *stimuli* endogènes. À ce jour, aucun article n'aborde l'implication de l'AREG dans un axe IL-33/Treg lors de l'IR hépatique. Il apparaît donc essentiel d'approfondir la compréhension des rôles de l'IL-33 d'origine endogène, de l'AREG et des Treg dans ce contexte.

Si l'axe IL-33/AREG/Treg représente un mécanisme émergent clé dans la réparation des tissus lésés, d'autres cellules immuno-régulatrices pourraient également contribuer à ces processus. Parmi elles, les LTI s'imposent comme des acteurs de plus en plus reconnus pour leurs capacités immuno-régulatrices ainsi qu'à promouvoir la réparation tissulaire. En effet, les LTI sont également sensibles aux signaux d'alarmes liés à un stress tissulaire comme celui apporté par l'IL-33, et partagent des fonctions immuno-régulatrices avec les Treg.

Dans la partie suivante, nous explorerons le rôle potentiel des LTI dans la réparation et leurs implications dans des mécanismes similaires à celui des Treg, par la mise en jeu séparée ou conjointe de l'IL-33 et de l'AREG.

IV- Les LTI : des cellules douées de dualité fonctionnelle et partageant des fonctions immuno-régulatrices avec les Treg

Ces dernières années, de nombreux travaux ont révélé que les LTI partageaient des fonctions immuno-régulatrices avec les Treg, jouant ainsi un rôle important dans la modulation des réponses inflammatoires et la préservation de l'homéostasie tissulaire. Cette dualité fonctionnelle des LTI, jointe à leurs sensibilités accrues à l'IL-33, font de ces cellules, des candidates pertinentes dans la résolution des lésions d'IR.

a. Les iNKT, des chefs d'orchestre de la réparation ?

En dehors du rôle délétère pro-inflammatoire des iNKT dans l'IR en général et du foie en particulier, il existe des fonctions protectrices des iNKT révélées généralement en condition de stimulation non pas endogène mais pharmacologique avec leur ligand α-galactosylcéramide (α-GalCer). Dans ces études, les iNKT jouent un rôle indirect mais essentiel dans les processus de sauvegarde et de restauration tissulaire après une lésion hépatique en facilitant le passage d'un état d'inflammation à un état de résolution.

L'étude menée par Cao *et al*. en 2009 a montré que la préactivation des iNKT par leur ligand α-GalCer atténuait significativement les lésions d'IR dans des modèles murins [212]. L'administration d'α-GalCer entraînait une augmentation des concentrations sériques d'IL-13 dont la neutralisation inhibait l'effet protecteur, soulignant ainsi son importance critique. De plus, le prétraitement avec l'α-GalCer augmentait les niveaux d'expression du récepteur de l'adénosine A2A (A2AR) dans le tissu hépatique dont la neutralisation entraînait également une réduction de l'effet protecteur, révélant donc l'existence d'un mécanisme dépendant à la fois de l'IL-13 et de l'A2AR.

Par ailleurs, deux études plus récentes de Goto *et al.*, ont montré que l'activation des iNKT par l'α-GalCer facilitait la réparation du foie après une lésion d'IR. De façon étonnante, l'activation des iNKT facilitait l'accélération de la polarisation des macrophages pro-inflammatoires et réparateurs [213,214]. En effet, les iNKT traités par l'α-GalCer induit la production de cytokines pro-inflammatoires IFN-γ favorisant un phénotype macrophages pro-inflammatoires et en parallèle, de cytokines anti-inflammatoires IL-4 favorisant un phénotype réparateur. L'étude a également révélé que l'inhibition de l'IL-4 retardait la réparation du foie, alors que l'inhibition de l'IFN-γ la favorise, mettant en évidence les rôles distincts de ces cytokines dans la polarisation des macrophages et la réparation du foie. Par ailleurs, il a été découvert que le nombre de iNKT diminuait initialement après une lésion d'IR, mais augmentait de manière significative dans les jours suivant la reperfusion chez les souris traitées par l'α-Galcer, dépassant les taux des souris témoins. Ce repeuplement était associé à une amélioration de la réparation du foie, comme l'indiquent la réduction de la nécrose hépatique et l'augmentation de l'expression de l'antigène nucléaire des cellules proliférantes (PCNA), un marqueur de la prolifération des hépatocytes. De plus, le traitement par α-GalCer facilitait la commutation phénotypique des macrophages, contribuant ainsi à la guérison du foie [213,214].

En condition physiopathologique, un seul travail dans un modèle de stress hépatique par brûlure a mis en lumière le rôle protecteur des iNKT en absence de stimulation pharmacologique. Cette étude particulièrement intéressante est celle menée par Liew *et al.*, en 2017, où ils ont mis en avant la dynamique spatio-temporelle des iNKT et leurs implications après une brûlure hépatique [110]. Les auteurs ont montré que les iNKT n'infiltrent pas directement le site de la lésion du fait des sinusoïdes effondrés, lesquels forment une barrière physique empêchant leur entrée précoce. Cependant, des iNKT vont finalement parvenir à infiltrer le site lésé dans les jours suivant la lésion. Ces iNKT étaient activés et produisaient de l'IL-4, permettant une conversion des monocytes vers un phénotype de réparation.

Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que les iNKT peuvent être des régulateurs essentiels de la réparation et de la résolution de l'inflammation en cas de lésion hépatique stérile. Par ailleurs, l'implication de l'IL-33 ou de l'AREG dans l'induction d'une protection médiée par les iNKT n'a pas été décrite à ce jour. La compréhension de leur rôle « réparateur naturel » et de leurs mécanismes sous-jacents doit donc être approfondie.

b. Les MAIT, une population directement impliquée dans la réparation tissulaire

Proposé pour la première fois en 2017 par Salou *et al.*, il est maintenant bien défini que les MAIT exercent, comme les Treg, des fonctions réparatrices [215,117,216–219]. Les MAIT ont été décrites comme ayant un rôle significatif dans la défense et la réparation de l'épithélium. Les MAIT, par la sécrétion de diverses cytokines, notamment l'IL-17, l'IL-22, mais aussi l'AREG, aident à maintenir l'intégrité de la barrière formée par les muqueuses et facilitent le processus de cicatrisation des plaies.

L'activation des MAIT, dépendantes du TCR, conduit à l'expression d'un programme de réparation tissulaire. A travers des étude *in vitro* et *in vivo*, Leng *et al.*, ont montré qu'une stimulation des MAIT dépendante du TCR induisait la production de molécules telles que le TNF, la furine et le CCL3, toutes reconnues pour leurs implications au sein des processus de réparation des tissus [219]. Dans les modèles humains et murins de l'étude de Hinks *et al.*, les MAIT activées humaines et murines exprimaient une forte signature de réparation tissulaire. Cela inclut la régulation positive des gènes associés à la réparation et au remodelage des tissus, tels que la MMP25, la furine, le PDGFB et le TGF-β1, ainsi que des gènes liés à l'angiogenèse tels que le CSF2, le VEGF et le PDGFB. De plus, l'étude a montré que les MAIT, grâce à leurs interactions avec les agents pathogènes synthétisant la riboflavine et les organismes commensaux, peuvent accélérer la cicatrisation des plaies.

Les travaux récents de A du Halgouet *et al.*, ont révélé que si la stimulation du TCR est nécessaire pour l'acquisition du programme de réparation tissulaire, elle n'est cependant pas requise pour l'exécution proprement dite de la fonction de réparation [115]. En effet, la fonction pro-réparation des MAIT s'est révélée indépendante de la signalisation TCR soutenue. Par ailleurs, la sécrétion d'AREG pouvait être induite après une stimulation dépendante de MR1 mais, également par l'IL-18, ce qui indique un réseau complexe d'interactions cytokiniques dans la réparation, médié par les MAIT. Cela souligne que leurs capacités de réparation tissulaire peuvent être activées sans stimulation continue spécifique de l'antigène et suggère en outre une séparation entre la phase d'acquisition et la phase d'application fonctionnelle des MAIT.

Il est à noter que leur capacité de réparation leur est conférée lors de leur développement grâce à l'exposition au microbiote. En effet, les travaux de G. Constantinides *et al.*, montrent que le développement et la présence à long terme de MAIT dans les tissus sont influencés par l'exposition précoce aux microbiotes spécifiques synthétisant la riboflavine. Cette empreinte microbienne précoce s'est avérée cruciale pour établir une population MAIT robuste capable de favoriser la réparation des tissus tout au long de la vie [217].

Par ailleurs, Talvard-Balland *et al.*, ont récemment documenté que les MAIT exercent des fonctions immuno-suppressives, ceci en inhibant la prolifération et l'activation des cellules T alloréactives, notamment dans le contexte de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) [220]. Ce mécanisme repose principalement sur une interaction directe entre le récepteur T (TCR) des MAIT et la molécule MR1, dont l'expression est induite à la surface des cellules T activées. Cette interaction entraîne une diminution de la signalisation TCR des cellules alloréactives, réduisant leur prolifération ainsi que leur expression de marqueurs d'activation (CD25, HLA-DR, PD-1, LAG-3). De plus, les MAIT modulent l'environnement immunitaire en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN-γ et le TNF-α, tout en augmentant celle d'IL-10, une cytokine aux propriétés anti-inflammatoires.

Ces caractéristiques des MAIT dans la GVHD pourraient s'appliquer en transplantation d'organe par une régulation négative des réponses immunitaires allogéniques post-transplantation.

L'ensemble de ces observations indique que les MAIT ne jouent pas uniquement un rôle dans les mécanismes de défense immunitaire, mais contribuent également de manière significative au maintien de l'homéostasie tissulaire et aux processus de résolution de l'inflammation.

En ce qui concerne le foie, les fonctions réparatrices des MAIT sont à ce jour seulement étudiées dans un cadre inflammatoire chronique, et associées à une fibrose tissulaire due à une réparation inappropriée [221,222]. Aujourd'hui, la littérature existante concernant le foie demeure pauvre, ne traitant pas la TH et méritant une étude plus approfondie dans un cadre d'inflammation stérile, car les MAIT constituent plus de 15 % de la population cellulaire immunitaire hépatique chez l'humain. Par ailleurs, comme pour les iNKT, l'implication de l'IL-33 ou de l'AREG dans l'induction d'une protection médiée par les iNKT n'a pas été décrite à ce jour.

Take Home Message Partie III : L'inflammation stérile et la régénération hépatique

- Principes de la régénération hépatique : un modèle unique de réparation tissulaire

Le foie se distingue par sa capacité unique à régénérer sa masse fonctionnelle après une lésion, afin de maintenir son homéostasie.
Deux voies principales contribuent à cette régénération : la prolifération des hépatocytes préexistants (voie classique) / l'activation des cellules progénitrices du foie (voie secondaire) en cas de dommage majeur.

- L'AREG : un facteur de croissance épidermique impliqué dans la réparation des tissus

L'AREG est un facteur de croissance épidermique clé, produite par des cellules épithéliales et immunitaires en réponse au stress cellulaire.
En situation de stress aigu, l'AREG favorise la prolifération, la survie des hépatocytes et la restauration tissulaire en plus de jouer un rôle essentiel dans les phases précoces de la réparation, tout particulièrement dans l'inflammation stérile hépatique.

- Hypothèse d'un axe immunitaire réparateur IL-33/AREG/Treg associé à l'IR hépatique

L'IL-33 agit comme un signal d'alarme dans les lésions tissulaires, activant les Treg qui produisent l'AREG.
Cet axe contribue à : la modulation de l'inflammation/la promotion de la réparation tissulaire en améliorant les fonctions immuno-régulatrices des Treg.
Bien que documenté dans d'autres modèles (IR rénale, hépatite), cet axe n'est pas décrit dans l'IR hépatique.

- Les LTI : des cellules douées de dualité fonctionnelle et partageant des fonctions immuno-régulatrices avec les Treg

Les LTI, notamment les iNKT et les MAIT, partagent des fonctions immuno-régulatrices avec les Treg. Les iNKT orchestrent la transition entre inflammation et réparation en produisant des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Les MAIT, influencés par le microbiote, participent à la réparation par le biais de cytokines comme l'AREG.
Leur rôle spécifique dans l'IR hépatique reste à approfondir.

En résumé, les interactions entre l'IL-33, les LT (notamment les Treg et les LTI) et l'AREG émergent comme des mécanismes clés susceptibles d'orchestrer des réponses réparatrices au cours des lésions d'IR hépatiques. Ces données soulignent l'importance d'explorer ces voies dans un contexte dynamique, afin de mieux comprendre comment l'IL-33 ou l'AREG pourrait basculer d'un rôle délétère à un rôle régénérateur, et d'identifier des cibles potentielles pour moduler ces processus.

Objectifs du travail de thèse

L'objectif de mon travail de thèse a été double :

- Suite à la démonstration du laboratoire de l'implication de l'alarmine IL-33 dans l'inflammation stérile induite par l'IR et associée à la TH [46], le premier objectif de mon travail de thèse a été d'identifier les mécanismes cellulaires sous-jacents à l'action de l'IL-33, en particulier ceux mettant en jeu les LTI.

- Le second objectif de mon travail de thèse a été d'éprouver l'existence d'un axe réparateur mettant en jeu l'IL-33 dans notre modèle animal d'IR hépatique ainsi qu'en TH chez l'humain, ceci en étant guidé par le concept de Joost J. Oppenheim, lequel décrit les alarmines comme coordonnant la phase initiale d'inflammation avec une phase ultérieure de résolution/réparation. J'ai postulé que l'AREG, une cytokine récemment décrite comme participant à la résolution de l'inflammation, pourrait impulser conjointement avec l'IL-33 dans un axe réparateur ou y contribuer via la mise en jeu des Treg et des LTI, principaux acteurs de l'immuno-régulation/réparation.

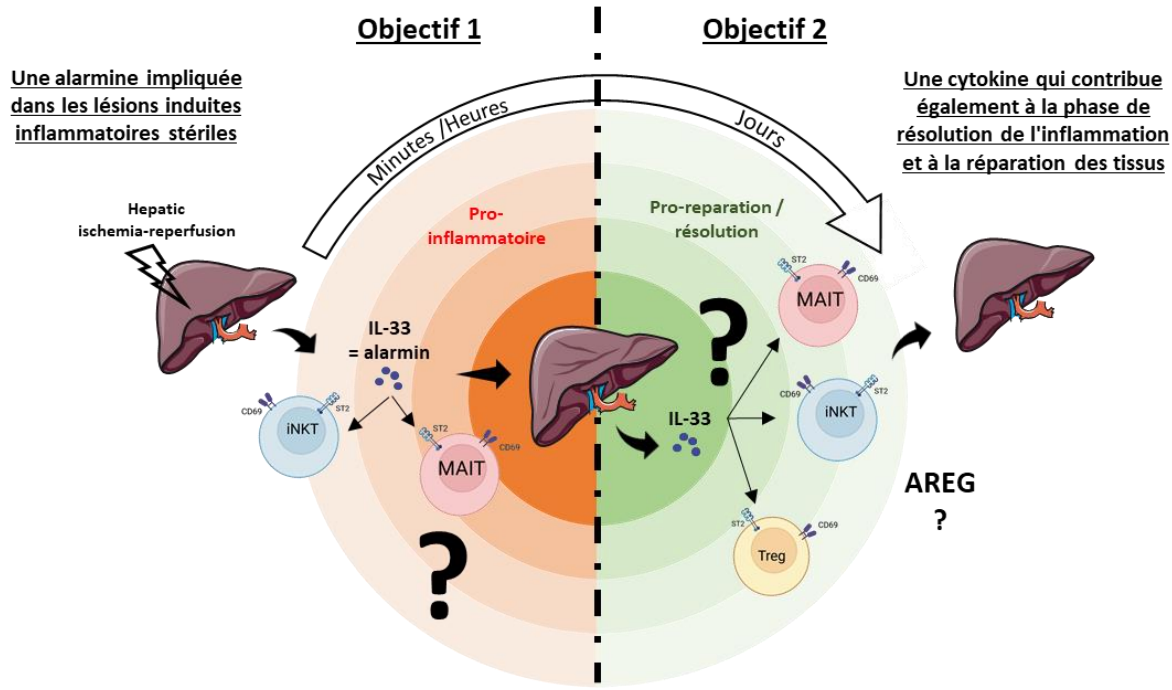


Figure 20 : L'IL-33, une alarmine/cytokine impliquée dans l'inflammation stérile induite par les LTI et l'hypothèse d'un axe immuno-régulateur mettant en jeu l'IL-33, l'AREG et les LT. BioRender et Servier Medical Art *[9,108]*

Résultats

I- Préambule

La force, en même temps que le caractère ambitieux de cette thèse, repose sur son approche translationnelle, combinant des études en transplantation clinique du foie et en modélisation animale d'IR hépatique. Cette modélisation animale à partir de souris sauvages et transgéniques s'avère indispensable pour répondre à des questions biologiques précises concernant les mécanismes immunitaires sous-jacents délétères ou protecteurs, impliqués dans l'IR, ce qui est difficilement réalisable chez l'humain en raison de contraintes éthiques et techniques.

a. Limites de l'étude chez l'humain

La cohorte ALTHE utilisée lors de cette thèse permet d'accéder aux cellules et au sérum du sang périphérique, fournissant des informations précieuses sur l'évolution du système immunitaire et le relargage de facteurs solubles, tels que les cytokines, pendant et après la TH. Cependant, ce type d'étude observationnelle ne permet pas d'explorer directement les mécanismes immuno-régulateurs intra-hépatiques durant l'inflammation stérile induite par l'IR, ni même de dissocier les effets liés aux facteurs chirurgicaux de ceux induits spécifiquement par la séquence d'IR.

b. Modèle murin d'IR hépatique

i. Apport du modèle murin

Les souris représentent un outil indispensable pour étudier *in vivo* les mécanismes immuno-pathologiques de l'inflammation stérile en raison de leur grande homologie génétique et physiologique avec l'humain. Des études comparatives de séquençage montrent que seuls trois cent gènes sont spécifiques aux *Muridae* [223,224], ce qui atteste de la conservation évolutive des processus biologiques entre ces deux espèces.

Le modèle murin d'IR hépatique, utilisé pour cette thèse en tant que modèle d'inflammation stérile, permet d'exclure les composantes allogéniques et de distinguer l'inflammation directement induite par l'IR à celle induite par la chirurgie, notamment l'attrition tissulaire. Bien qu'une auto-transplantation chez la souris constituerait un modèle idéal, elle reste, techniquement, difficile à réaliser. Le modèle actuel permet donc, d'approfondir les connaissances sur les réponses immunitaires tant systémiques que locales de manière robuste et reproductible dans un contexte contrôlé.

ii. Spécificités anatomiques et immunologiques du foie murin

Anatomiquement, le foie murin est constitué de cinq lobes distincts à la différence des quatres lobes présents chez l'humain : le lobe latéral gauche, le lobe intermédiaire, le lobe latéral droit, le lobe caudé et le lobe carré. Cependant, l'architecture des lobules reste similaire, permettant une comparaison pertinente (Voir Figure 21).

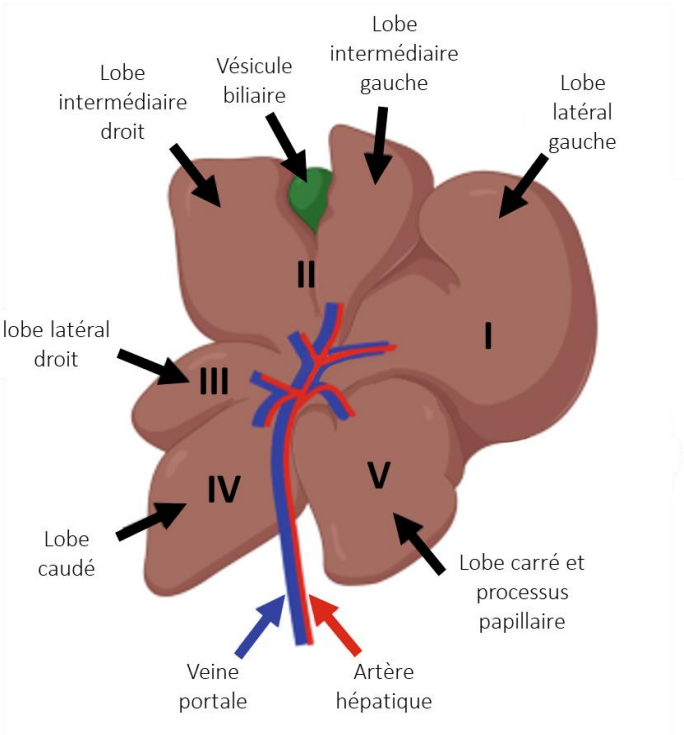


Figure 21 : Anatomie hépatique simplifiée chez la souris en point de vue ventrale. I : lobe latéral gauche ; II : lobe intermédiaire ; III : le lobe latéral droit ; IV : lobe caudé ; V : lobe carré et processus papillaire. Adapté de Abe et al., 2008 [225]. BioRender [108].

La souris possède en plus l'avantage de partager avec le sujet humain des biomarqueurs de souffrance hépatique tels que les alanines aminotransférases (ALAT), les aspartates aminotransférases (ASAT) et la bilirubine, ainsi que des signatures histologiques lors des phases d'inflammation (infiltration par des macrophages et des polynucléaires) et de sa résolution (fibrose).

Sur le plan immunitaire, la composition des LTI diffère entre les deux espèces (Voir Figure 22). Chez la souris, les iNKT sont abondants tandis que les MAIT sont faiblement représentés (respectivement 10-30 % et < 0,5 % des lymphocytes intra-hépatiques) ; à l'inverse, chez l'humain, les MAIT et les iNKT représentent, respectivement, environ 15 % et 1 % des lymphocytes intra-hépatiques. Cette disparité des MAIT entre les deux espèces est attribuée à l'absence d'infections microbiennes dans les conditions de laboratoire des souris. De même, les T-γδ sont plus fréquents dans le foie humain que murin (respectivement 8 %-15% et 3-5% des lymphocytes intra-hépatiques). [30]

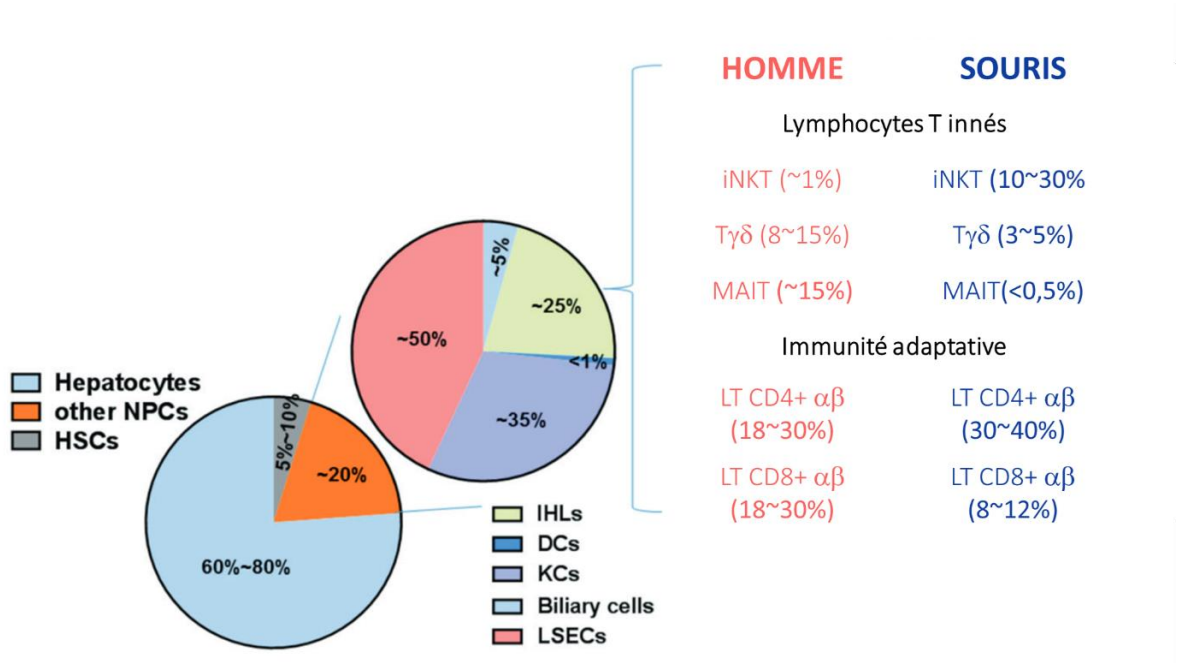


Figure 22 : Composition cellulaire du tissu hépatique humain adulte sain comparé au tissu hépatique d'une souris (C57BL/6) adulte saine. *Issu et adapté de Chen et al., 2021 [30]. NPC : Non parenchymal cells ; HSC : Hepatic stellate cells ; IHL : Lymphocyte intrahépatique ; DC : dendritic cells ; KC : cellules de Kupffer ; LSEC : liver sinusoidal endothelial cells.*

Malgré ces différences, l'utilisation du modèle murin d'IR hépatique constitue une approche pertinente pour décortiquer les mécanismes immunitaires associés à l'inflammation stérile. Ce modèle offre un cadre expérimental permettant, non seulement, de mieux comprendre la dynamique des réponses immunitaires intra-hépatiques, en complément des données cliniques obtenues chez l'humain, mais aussi, à terme, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques tant à l'échelle cellulaire que moléculaire.

MANUSCRIT N°1

Early activation and recruitment of invariant natural killer T cells during liver ischemia-reperfusion: the major role of the alarmin interleukin-33

Aurélie Robin [1‡], Claire Mackowiak [2‡], Romain Bost [2], Fanny Dujardin [3] , Alice Barbarin [1] , Antoine Thierry [4] , Thierry Hauet [5] , Luc Pellerin [5] , Jean-Marc Gombert [6] , Ephrem Salamé [7] , André Herbelin[2*] and Louise Barbier [7*]

1 : Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Institut National de la Sante´ Et de la Recherche Médicale, Ischémie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation, Université de Poitiers, Poitiers, France ; 2 : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischémie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Université de Poitiers, Poitiers, France ; 3 : Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Trousseau, Pathologie, Tours, France ; 4 Université de Poitiers, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischémie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Néphrologie, Poitiers, France ; 5 : Université de Poitiers, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischémie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Biochemistry, Poitiers, France ; 6 : Université de Poitiers, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischémie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Immunologie, Poitiers, France ; 7 : Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Trousseau, Digestive Surgery and Liver Transplantation, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischémie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Tours, France L'axe alarmine IL-33/LTI dans l'inflammation stérile associée à l'IR

‡ Ces auteurs ont contribué de manière égale à ce travail et en sont les premiers auteurs.

Ce premier manuscrit s'inscrit dans le premier objectif de cette thèse, qui est d'élucider les mécanismes cellulaires sous-jacents médiés par l'IL-33 qui peuvent expliquer sa corrélation significative avec la sévérité des lésions d'IR et les dysfonctions du greffon après la TH [226].

Pour atteindre cet objectif, une étude translationnelle a été menée auprès d'une bio-collection de patients ayant subi une TH (ALTHE), dans le but de réaliser une étude observationnelle du système immunitaire périphérique avant et pendant les premières heures du processus de transplantation. De plus, un modèle murin d'IR hépatique a été utilisé pour améliorer la compréhension des mécanismes immunitaires localisés qui sont déclenchés à la suite d'événements d'IR hépatique.

- Recrutement en périphérie des iNKT par l'IL-33 dans le modèle murin d'IR contribuant aux lésions.

Dans le modèle murin d'IR hépatique, nos résultats montrent que l'IL-33 joue un rôle central dans le recrutement périphérique des iNKT de la rate après l'IR, qui s'infiltrent ensuite dans les tissus hépatiques, ce phénomène n'ayant pas été observé chez les souris IL-33KO. De plus, nos résultats démontrent que l'activation des iNKT dépend de la présence d'IL-33, comme en témoigne l'absence d'activation constatée chez les souris IL-33KO. À leur tour, les iNKT améliorent le recrutement des PNN, comme le confirme la réduction marquée de cet événement chez les souris Jα18KO. En fin de compte, les iNKT jouent un rôle contributif dans le développement des lésions suite à l'IR, qui sont diminuées chez les souris Jα18KO.

- La TH est associée à une activation précoce des LTI liée à la libération de l'alarmine IL-33, lesquelles corrèlent positivement avec le dysfonctionnement précoce du greffon

Nous avons ensuite validé la pertinence physiopathologique de ces résultats chez l'humain grâce à une analyse observationnelle PBMC. Ici, nous avons élargi nos recherches pour y inclure les MAIT, qui, comme les iNKT, possèdent une dichotomie fonctionnelle et une réactivité accrue à l'IL-33. Les résultats ont indiqué une augmentation notable de la proportion et des niveaux d'activation des MAIT et des iNKT post-TH. En outre, une corrélation positive significative a été identifiée entre les concentrations circulantes d'IL-33 et l'augmentation observée de la fréquence et des niveaux d'activation des MAIT et des iNKT.

Par conséquent, l'alarmine IL-33, par son interaction avec les iNKT et les MAIT, favorise leur recrutement et/ou leur activation dans les tissus, modulant ainsi la réponse immunitaire lié à l'IR du foie dans des modèles murins et dans des scénarios de transplantation, où elle améliore leurs fonctions effectrices pro-inflammatoires, contribuant finalement à des lésions tissulaires et à un dysfonctionnement du greffon après la TH.

En conclusion, cette étude met en évidence un axe IL-33/LTI en tant que nouveaux composants cellulaires essentiels et mécanismes sous-jacents à l'inflammation stérile aiguë chez l'humain. Des études supplémentaires sont nécessaires pour valider l'implication spécifique des sous-ensembles de cellules MAIT et iNKT et pour évaluer avec précision leurs contributions fonctionnelles dans la trajectoire clinique de l'inflammation stérile associée à la LT.

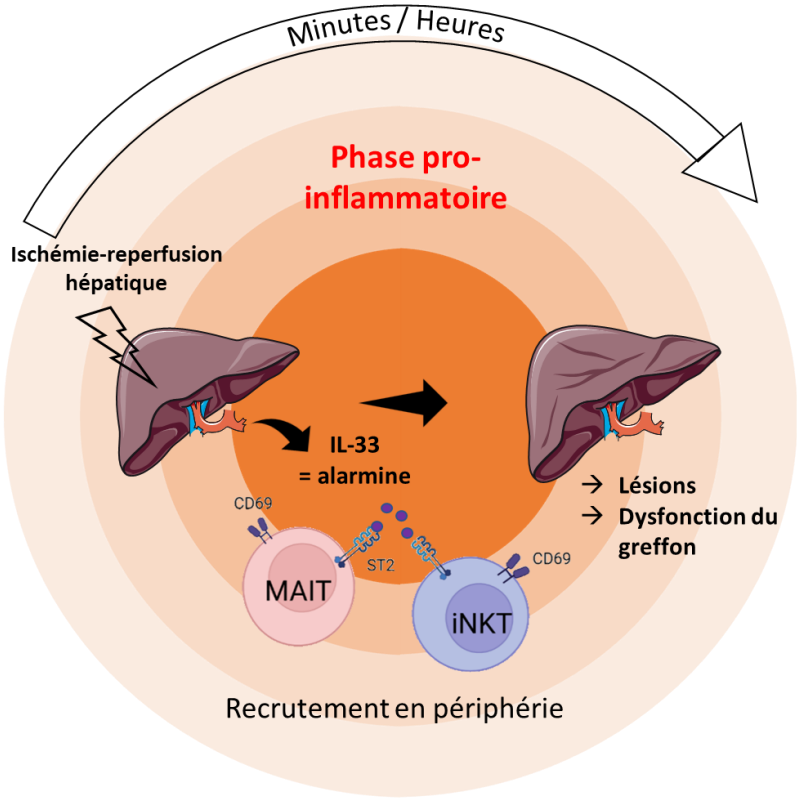


Figure 23 : Schéma récapitulatif des principaux résultats du Manuscrit n°1. *[226]* BioRender et Servier Medical Art *[9,108]*

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 09 May 2023
DOI 10.3389/fimmu.2023.1099529

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Liyen Loh,
University of Colorado, United States

REVIEWED BY
Dominic Paquin Proulx,
United States Military HIV Research Program, United States
Kazuya Iwabuchi,
Kitasato University School of Medicine, Japan
Karina Inacio Carvalho,
Case Western Reserve University, United States

*CORRESPONDENCE
André Herbelin
andre.herbelin@inserm.fr
Louise Barbier
louisebarbier@hotmail.fr

†PRESENT ADDRESS
Louise Barbier,
New Zealand Liver Transplant unit, Auckland City Hospital, Auckland, New Zealand

‡These authors have contributed equally to this work and share first authorship

§These authors have contributed equally to this work and share last authorship

RECEIVED 15 November 2022
ACCEPTED 12 April 2023
PUBLISHED 09 May 2023

CITATION
Robin A, Mackowiak C, Bost R, Dujardin F, Barbarin A, Thierry A, Hauet T, Pellerin L, Gombert J-M, Salamé E, Herbelin A and Barbier L (2023) Early activation and recruitment of invariant natural killer T cells during liver ischemia-reperfusion: the major role of the alarmin interleukin-33. *Front. Immunol.* 14:1099529. doi: 10.3389/fimmu.2023.1099529

Early activation and recruitment of invariant natural killer T cells during liver ischemia-reperfusion: the major role of the alarmin interleukin-33

Aurélie Robin[1‡], Claire Mackowiak[2‡], Romain Bost[2], Fanny Dujardin[3], Alice Barbarin[1], Antoine Thierry[4], Thierry Hauet[5], Luc Pellerin[5], Jean-Marc Gombert[6], Ephrem Salamé[7§], André Herbelin[2*§] and Louise Barbier[7*†§]

[1]Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Ischemie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation, Université de Poitiers, Poitiers, France, [2]Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischemie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Université de Poitiers, Poitiers, France, [3]Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Trousseau, Pathology, Tours, France, [4]Université de Poitiers, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischemie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Nephrology, Poitiers, France, [5]Université de Poitiers, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischemie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Biochemistry, Poitiers, France, [6]Université de Poitiers, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischemie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Immunology, Poitiers, France, [7]Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Trousseau, Digestive Surgery and Liver Transplantation, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Ischemie Reperfusion Métabolisme et Inflammation Stérile en Transplantation (IRMETIST), Tours, France

Over the past thirty years, the complexity of the αβ-T cell compartment has been enriched by the identification of innate-like T cells (ITCs), which are composed mainly of invariant natural killer T (iNKT) cells and mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. Based on animal studies using ischemia-reperfusion (IR) models, a key role has been attributed to iNKT cells in close connection with the alarmin/cytokine interleukin (IL)-33, as early sensors of cell-stress in the initiation of acute sterile inflammation. Here we have investigated whether the new concept of a biological axis of circulating iNKT cells and IL-33 applies to humans, and may be extended to other ITC subsets, namely MAIT and γδ-T cells, in the acute sterile inflammation sequence occurring during liver transplant (LT). From a prospective biological collection of recipients, we reported that LT was accompanied by an early and preferential activation of iNKT cells, as attested by almost 40% of cells having acquired the expression of CD69 at the end of LT (i.e. 1-3 hours after portal reperfusion), as opposed to only 3-4% of conventional T cells. Early activation of iNKT cells was positively correlated with the systemic release of the alarmin IL-33 at graft reperfusion. Moreover, in a mouse model of hepatic IR, iNKT cells were activated in the periphery (spleen), and recruited in the liver in WT mice, as early as the first hour after reperfusion, whereas this phenomenon was virtually missing in IL-33-deficient mice. Although to a lesser degree than iNKT cells, MAIT and γδ-T cells also seemed targeted during LT, as attested by 30% and

10% of them acquiring CD69 expression, respectively. Like iNKT cells, and in clear contrast to γδ-T cells, activation of MAIT cells during LT was closely associated with both release of IL-33 immediately after graft reperfusion and severity of liver dysfunction occurring during the first three post-operative days. All in all, this study identifies iNKT and MAIT cells in connection with IL-33 as new key cellular factors and mechanisms of acute sterile inflammation in humans. Further investigations are required to confirm the implication of MAIT and iNKT cell subsets, and to precisely assess their functions, in the clinical course of sterile inflammation accompanying LT.

KEYWORDS

innate like T cell, iNKT cell, interleukin-33, sterile Inflammation, alarmin, liver transplantation, ischemia - reperfusion

Introduction

Besides classic adaptive CD4+ and CD8+ T cells, the T cell compartment comprises several lineages of cells endowed with both innate and adaptive properties that are referred to as unconventional or innate-like invariant T cells (ITCs) (for reviews (1–3):). This class of T cells includes three main lineages, i.e., invariant natural killer T (iNKT) cells, mucosa-associated invariant T (MAIT) cells, and γδ-T cells. These cells recognize non-peptide antigens, are not restricted to classical major histocompatibility complex (MHC) and have emerged as key players in tissue homeostasis and protection from infection. As immune system components, ITCs are also expected to rapidly and efficiently respond to cell-stress and represent obvious candidates to participate in endogenous pathways of inflammation. For instance, non-classical MHC cluster differentiation (CD)1d-restricted presentation of self-antigens to iNKT cells is induced by endogenous stress and may be activated by proinflammatory cytokines (4, 5). Given their versatile functions, in addition to contributing to tissue inflammation and damage, ITCs can participate in the process of the resolution of inflammation, including tissue repair and regeneration (6, 7).

Based on numerous mouse models, iNKT cells are recognized as the archetypal ITCs, which are capable of being early sensors and managers in the development and resolution of acute sterile inflammation (for review: (8)), a condition that occurs in the absence of infection and underlies medical afflictions such as mechanical trauma, chemical and environmental insults, and organ ischemia-reperfusion (IR) injury (IRI) (for reviews: (9–11)). Indeed, activation of iNKT cells has been documented as a general mechanism for the initiation of IRI in solid organs (kidney, liver, lung, brain and heart) ((12–18); for review: (8)). Moreover, exploration of the modes of activation and recruitment of iNKT cells in sterile inflammation induced by IRI in mice suggests the involvement of T cell receptor (TCR)/non-classical MHC CD1d molecule interactions in iNKT cell activation, even though further investigations are needed to characterize the effective endogenous lipids presented by CD1d (13, 15, 17, 19–21). Another specific feature of ITCs is their ability to be activated by cytokine-driven signals independently of TCR-engagement and CD1d molecule recognition. In particular, the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-12 and IL-18 can activate iNKT cells to produce IFN-γ, a response that is amplified upon TCR-engagement (22). Accordingly, in a model of sterile liver injury, the authors documented a biphasic mechanism of iNKT cell activation through self-antigen presentation and IL-12/IL-18-driven signals (7).

More recently, the alarmin/cytokine IL-33 has emerged as a new general mechanism driving activation and recruitment of iNKT cells in the early phase of sterile inflammation (for review:(8)). IL-33 belongs to the IL-1 superfamily ((23); for review: (24)), is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells and is immediately released after tissue damage ((12, 25–31); for reviews: (32, 33)). IL-33 has aroused interest due to its singular action as an alarmin during infectious, allergic responses and acute tissue injury (8, 24, 29, 34, 35), and as a cytokine, contributing to the resolutive/repair phase of sterile inflammation (30, 31, 36, 37). We recently provided evidence that IL-33 and iNKT cells interact directly to promote kidney inflammation in an experimental model of renal IRI (12). Indeed, iNKT cells, like innate cells (natural killer cells, neutrophils), constitutively express the IL-33 receptor-specific ST2 chain (38, 39). As a result, recruitment of iNKT cells is rapidly driven by endogenous released IL-33, which induces their IFN-γ/IL-17A production in response to IR (12).

Even though the contribution of iNKT cells to induction of sterile inflammation in experimental models is well-established, the

Abbreviations: ALT, alanine amino transferase; CD, cluster differentiation; D0, before transplantation; EoT, end of transplantation; FCM, flow cytometry; HS, healthy subjects; IFN, interferon; IL, interleukin; iNKT, invariant natural killer T; IR, ischemia reperfusion; IRI, ischemia-reperfusion injury; ITCs, innate-like T cells; LT, liver transplant or liver transplantation; MAIT, mucosa-associated invariant T; MEAF, model for early allograft function; MFI, median fluorescence intensity; MHC, major histocompatibility complex; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; SEM, standard error of the mean; TCR, T cell receptor; WT, wild-type.

place of this ITC subset in acute conditions resulting from sterile inflammation in humans remains poorly documented. Considering our recent demonstration that endogenous IL-33 acts as an alarmin in liver IR and is associated with injury after human liver transplantation (LT) (40), we decided to investigate whether the new concept of a biological axis of iNKT cells and IL-33, involved in alerting the immune cells during sterile inflammation, applies to human LT.

To this end, we analyzed the influence of the LT on the activation status of blood iNKT cells and its possible association with early IL-33 release. To conclusively demonstrate that IL-33 is the causal effect, we compared iNKT cell activation in wild-type (WT) and IL-33-deficient mice in a model of hepatic IRI. We extended our analysis in LT patients to the other main ITC compartments, namely MAIT and γδ-T cells, relative to the adaptive conventional T cell compartments.

Material and methods

LT patients and healthy subjects

Twenty-one patients from a prospective biological collection of adult LT recipients from the Transplant Unit of the University Hospital of Tours between July 1, 2017, and June 2, 2019, were included. These patients represent a sub-group of patients described in a previous report (40) where intra-operative and post-operative management was described. Recipients, donor characteristics, and outcomes of LT are detailed in Supplementary Table 1.

Early allograft dysfunction was assessed by the model of early allograft function (MEAF) score defined by Pareja et al. in 2015 (41) (mathematical model based on bilirubinemia levels, International Normalized Ratio and ALT during the first three post-operative days, giving a continuous score ranging from 0 to 10).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from eleven healthy subjects (HS) (mean age 47 ± 15 years) without liver disease obtained from the French Blood Institute (Etablissement Français du Sang, Lyon, France) were used as controls. This study was approved by a regional ethics committee (comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale Tours-Région Centre-Ouest 1 under registration number DC-2016-2651) and by the French regulatory agency (Agence de la Biomédecine, the national authority for organ procurement and transplantation in France, under registration number PFS16-005). Written informed consents were obtained for each patient and healthy donor according to the Declaration of Helsinki. All data were collected anonymously in a prospectively maintained database declared to the French Data Protection Authority. No potentially identifiable human images or data are presented in this study.

PBMC and serum collections from LT patients

PBMC were isolated by Ficoll density gradient from peripheral blood of HS (n=11) and patients prior to LT (D0: usually 2-6 hours prior to transplantation; n=17), and at the end of the procedure during skin closure (EoT; n=16).

Serum was isolated from peripheral blood of healthy subjects (n=11) and LT patients at D0 (n=21), at graft reperfusion (GR: just after unclamping of the caval and portal anastomoses, usually around 3-4 hours after the beginning of the procedure; n=21), and at EoT (n=21). PBMC and serum were stored frozen in liquid nitrogen and at -80°C, respectively, at the Centre de Ressources Biologiques Santé of Tours (BB-0033-00013).

Enzyme-linked immunosorbent assay

Serum IL-33, IL-12 and IL-18 (R&D systems) were determined using ELISA kits according to the manufacturer's instructions.

Mice

WT C57BL/6 mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Jα18KO C57BL/6 mice (lacking iNKT cells), hereafter referred to as iNKT cell-deficient mice, were provided by Taniguchi and colleagues (42). Mice with a Lac-z gene-trap (Gt) reporter (IL-33$^{Gt/Gt}$) onto a C57BL/6 background, hereafter referred to as IL-33-deficient mice, were generated as described by Pichery et al. (43). Ten-to-twelve-week-old male mice weighing between 22 and 30 g were used in all experiments.

Experimental model of warm IRI

All animal experimental procedures and housing were carried out in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/EU) and complied with the three Rs principle (Replace, Reduce, Refine). The animal study was reviewed and approved by a regional Ethics Committee (COMETHEA Poitou-Charentes, authorization n°2016110211568800).

The entire procedure of warm IR was adapted from the technique described by Abe et al. (44). Briefly, thirty minutes before general anesthesia, mice received analgesia with subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg). Mice were then anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Mice then received continuous anesthesia with gaseous administration of isoflurane (2% then 1.5% for maintenance). After disinfection of the abdomen, laparotomy with right subcostal and upper midline incision was performed. Median and left lateral lobes were lift up to expose their hepatic pedicle just above the branching to the right lateral lobe and an atraumatic clamp was placed. This technique allows partial ischemia of 70% of the liver (median and left lateral lobes), while right lateral and caudate, quadrate lobes are still perfused. Saline serum was carefully added to the abdominal cavity for hydration. Clamp was applied for 70 minutes under gaseous isoflurane anesthesia. The clamp was then removed, and the abdominal wall and skin were totally closed before isoflurane cessation. Animals were culled at various time points after reperfusion by cervical dislocation.

In sham-operated animals, the surgical procedure was identical, but without clamping of the hepatic pedicle.

Mouse plasma collection for ALT activity assay

Blood samples were obtained by retro-orbital bleed under gaseous isoflurane (5%) and collected in tubes containing heparin. After centrifugation (10 minutes, 2000g), plasma samples were stored at -20°C prior to ALT measurement with a Cobas C701 automatic analyzer (Roche Diagnostic).

Histology of mouse livers

The portal vein was cut immediately after euthanasia and the inferior vena cava was injected with phosphate-buffered saline to perfuse the liver. Liver samples were preserved in formalin before paraffin embedding. Samples were cut at 3.5µm and subjected to hematoxylin phloxine saffron staining. To quantify tissue lesions of IRI, we used a reading grid from the literature that we adapted, as previously detailed (43). The total number of points was referred to as the liver injury score.

Mouse cell isolation

Dissociation of liver and spleen was carried out at 37°C during 30 minutes and at room temperature during 56 seconds, respectively, using a gentleMACS™ dissociator (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions. Note that dissociation of liver was performed with the Liver Dissociation kit (Miltenyi Biotec) in gentleMACS™ C tubes (Miltenyi Biotec). Spleen and liver samples were then homogenized through a 70-µm cell-strainer and washed. Parenchymal cells were removed by centrifugation and red blood cells were lysed in ammonium chloride buffer before resuspension in DMEM cell culture media and RPMI 1640 for liver and spleen samples, respectively. Cell counting was performed in trypan blue. Cell numbers were determined with a hematocytometer, re-suspended at 1.10^6/mL in phosphate-buffered saline, and expressed per mg tissue.

Flow cytometry analysis

Briefly, cells were stained by viability dye, and then incubated with the appropriate antibody/reagent mix prior to fixation, as previously reported (12, 45). A detailed list of antibodies and reagents used for staining is provided in Supplementary Table 2. Fluorescence minus one control or unstained cells served as negative staining control samples. Samples were acquired on a spectral cytometer AURORA using SpectroFlo® software for unmixing (Cytek) and on a BD FACS Verse™ cytometer using the BD FACsSuite software (BD Biosciences) for human and mouse samples, respectively. Data were analyzed using FlowJo v10 (BD Biosciences). Because of the very low relative proportion of iNKT cells among human PBMC (that can be less than 0.01% of total CD3 (+) cells), a minimum of 50,000 CD3(+) cells were analyzed for all human samples. For qualitative evaluation (CD69 and CD4 expression), iNKT cells could be counted (mean ± SEM and range/sample) in all HS (387 ± 148 [30-4221]), and in 8 (out of 17) (127 ± 51 [13-399]) and 9 (out of 16) (40 ± 17 [10-2982]) patients before and at the end of LT, respectively.

Gating strategies are detailed in Supplementary Figure 1 and Supplementary Figure 11 for human and mouse samples, respectively. Heatmap analysis presented in Supplementary Figure 4 was performed by OMIQ® software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Excel® for Mac Os (Microsoft® Corporation) and Graph Pad Prism software v7 (GraphPad, La Jolla, Inc.). Quantitative data are presented as percentages and absolute numbers. Qualitative data are presented as mean (± standard error of the mean (SEM)). Non-parametric tests were used because of the small number of samples per group. Experimental and control groups were compared with the unpaired (independent) two-tailed Mann-Whitney U test. Spearman tests were performed for correlation analysis. Results were considered to be statistically significant when $p<0.05$.

Results

Overall decrease in the relative proportion of circulating ITC subsets in patients awaiting LT

First, we analyzed the relative proportion of conventional lymphocytes and ITCs (for gating strategy, see Supplementary Figure 1) in patients awaiting LT (D0) and in healthy subjects (HS) (for representative plots, see Figure 1A). The frequency of total T lymphocytes (defined as CD3(+) cells) among PBMC did not differ between LT patients and HS (Figure 1B, left panel). In LT patients, we observed decreased frequency of the conventional CD8 T cell subset, as compared to HS (Figure 1B, right panel), which was accompanied by an increase of its CD4 counterpart (Figure 1B, middle panel). All in all, a dramatic decrease in frequency of all ITC components was evidenced among total T lymphocytes in LT patients as compared to HS (Figures 1C-E). Indeed, substantially lower frequency (mean ± SEM) of iNKT cells (0.02 ± 0.006 *vs.* 0.17 ± 0.02% in HS; $p<0.01$) (Figure 1C), MAIT cells (0.51 ± 0.11 *vs.* 2.89 ± 0.49% in HS; $p<0.0001$) (Figure 1D), and γδ-T cells (2.70 ± 0.61 *vs.* 4.47 ± 0.82% in HS; $p<0.05$) (Figure 1E) was observed.

LT did not affect the relative proportion of ITC subsets, except for MAIT cells

Next, we investigated the impact of LT on frequencies of circulating conventional T lymphocytes and ITCs (Figure 1, for

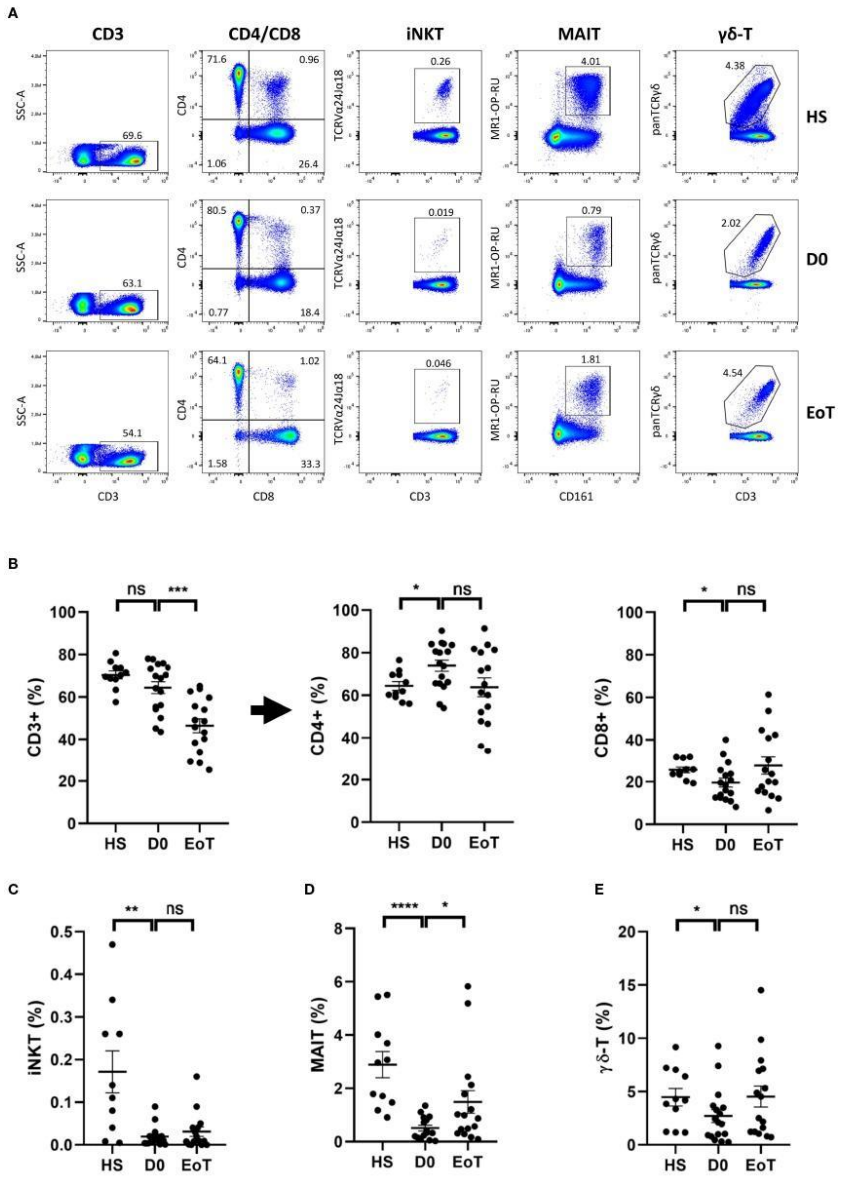


FIGURE 1
Effect of LT on relative proportion of blood conventional and ITC subsets. Flow cytometry analysis (representative plots are depicted in **(A)**) showing frequencies of total CD3(+) cells (among total mononuclear live cells), conventional CD4 T cells, referred as CD4+ cells, and conventional CD8 T cells, referred as CD8+ cells (among total CD3(+) cells) **(B)**, iNKT cells **(C)**, MAIT cells **(D)** and γδ-T cells **(E)** (among total CD3(+) cells) in peripheral blood of healthy subjects (HS; n=11), patients awaiting LT (D0; n=17) and after LT (EoT; n=16). Of note the decrease frequency of total T lymphocytes (CD3(+)) among PBMC between the beginning and the end of LT (64.4 ± 1.9% (n=17) *vs.* 46.4 ± 3.3% (n=16), respectively) is fully explained by an increase of its CD3(-) counterpart (53.6 ± 3.3% (n=16) at EoT *vs.* 35.6 ± 2.8% (n=17) at D0). For detailed gating strategy, see Supplementary Figure 1. Data are expressed as means ± SEM. Unpaired (independent) two-tailed Mann-Whitney U test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, ns, not significant. Each symbol represents one HS or a LT patient.

representative plots, see Figure 1A). As shown in Figure 1B, frequency of total T lymphocytes (CD3(+)) significantly decreased between the beginning (D0) and the end (EoT) of LT, a phenomenon explained by an increase of non-T lymphocytes (CD3(-)) among PBMC (for details, see the legend of Figure 1). Apart from CD4 T cells, for which a decreasing trend was observed, all T cell subsets showed an increased trend in terms of rate frequency, ranging from 1.4-fold-increase for conventional CD8 T-cells (Figure 1B), 1.6-fold-increase for iNKT cells (Figure 1C)), 1.6-fold-increase for γδ-T cells (Figure 1E) to a significant 2.9-fold-increase ($p<0.05$) for MAIT cells (Figure 1D).

LT was associated with early and preferential activation of ITC subsets, especially iNKT cells

LT was accompanied by cell activation of all T cell subsets (Figure 2; for representative histograms and plots, see Figure 2A and Supplementary Figure 2, respectively), as attested by the rate of increase in cells expressing the early activation marker CD69, which ranged from a 2.9-fold-increase for iNKT cells (Figure 2C), a 2.3-fold-increase for MAIT cells (Figure 2D) and conventional T cells (Figure 2B) to a 2.0-fold-increase for γδ-T cells (Figure 2E). Moreover, by comparing the percentage of cells expressing CD69 between the end and the beginning of LT, we deduced that almost 40% of iNKT cells had become activated (57.3 ± 9.2% at EoT *vs.* 19.7 ± 3.2% at D0), instead of only 3-4% of conventional T cells (CD3 T cells: 6.2 ± 1.4% at EoT *vs.* 2.3 ± 0.5 at D0; CD4 T cells: 4.2 ± 1.2% at EoT *vs.* 1.6 ± 3.6 at D0; CD8 T cells: 6.7 ± 1.4 at EoT *vs.* 2.9 ± 0.6% at D0). To an intermediate place, 30% of MAIT cells (52.3 ± 7.0 at EoT *vs.* 22.5 ± 3.6 at D0) and 10% of γδ-T cells (21.0 ± 2.6% at EoT *vs.* 10.3 ± 1.95% at D0) had also become activated during LT. Of note, iNKT cell activation during LT involved both CD4(+) (37.3 ± 11.3% at EoT *vs.* 9.55 ± 3.9% at D0) and CD4(-) (78.6 ± 8.6% at EoT *vs.* 37.0 ± 9.9% at D0) contingents (Supplementary Figure 3A). The same conclusion was reached when comparing the CD8(+) (55.4 ± 7.0% at EoT *vs.* 23.5 ± 3.8% at D0) and CD8(-) (47.4 ± 4.8% at EoT *vs.* 22.9 ± 4.8% at D0) contingents of the MAIT subset (Supplementary Figure 3B).

Activation of iNKT and MAIT cells at the end of LT was closely associated with release of the alarmin IL-33 immediately after graft reperfusion

At this stage, an important question was to identify the underlying mechanism involved in activation of ITC populations during LT. Although TCR-engagement could not be excluded, the fact that no modulation of the TCR signal transduction molecule CD3 expression level was found on iNKT, MAIT and γδ-T cells between the beginning and the end of LT even when comparing CD69(+) to CD69(-) fractions for each of the three ITC populations studied, does not support the hypothesis of activation-induced TCR internalization (Supplementary Figure 4; for representative plots, see Supplementary Figure 5).

Regarding innate activation by cytokines, as mentioned above, a major candidate is IL-33, which, on the one hand, targets innate components of the immune system, including ITCs such as iNKT cells (38, 39) and MAIT cells (46) and, on the other hand, has been documented to be released as an alarmin both in a mouse model of warm hepatic IRI and in the setting of human LT (40), a conclusion that we confirmed in the present study (Figure 3A).

Supporting the proposal that ITCs were activated early during LT in response to IL-33 release, we found a positive correlation between serum levels of IL-33 after graft reperfusion and expression of the early activation marker CD69 on blood iNKT cells ($r=0.74$; $p<0.03$; n=9) and MAIT cells ($r=0.73$; $p<0.002$; n=16) at the end of LT (Figure 3B; left and middle panel, respectively). In clear contrast, during LT, serum levels of IL-12 and IL-18, also known to activate ITCs, were neither increased (Supplementary Figure 6A), nor correlated with CD69 expression on any of the three ITC populations studied (Supplementary Figure 6B).

Note that no correlation was found with IL-33 when considering CD69(+) γδ-T cells (Figure 3B; right panel) and CD69(+) conventional T cells (Supplementary Figure 7). Moreover, and compatible with the hypothesis that IL-33 would be a common underlying factor contributing to iNKT and MAIT cell activation, we observed a positive correlation between the relative proportions of CD69(+) iNKT and CD69(+) MAIT cells at the end of LT. In contrast, CD69 (+) γδ-T cells, which did not correlate with serum of IL-33, did not correlate with CD69(+) iNKT cells either (Supplementary Figure 8).

Activation of iNKT and MAIT cells at the end of LT correlated with early graft dysfunction

Finally, we interrogated whether activation of ITCs induced by LT could be predictive of the level of early graft dysfunction, measured by the MEAF score (Figure 3C). Although no correlation was found for γδ-T cells ($r=0.35$; $p=0.18$; n=16), we observed that CD69 expression on MAIT cells ($r=0.55$; $p<0.05$; n=16) was positively correlated with the MEAF score. For iNKT cells, a non-significant trend ($p=0.11$) for a positive correlation was evidenced ($r=0.57$).

The proof of concept of a deleterious IL-33/ITC axis applied to liver IR injury

In order to provide direct and definitive evidence of the causal link between IL-33 and activation of ITCs during liver IR, we decided to determine the impact of IL-33 on activation/recruitment of iNKT cells in a mouse model of warm hepatic ischemia. We chose to focus on iNKT cells, based on their presence in mouse at high frequencies both in periphery (spleen) and in liver (47), as well as their contribution to severity of liver IR, as attested by decreased ALT levels, and fewer neutrophil recruitment and histological lesions in iNKT cell-deficient (Jα18KO) mice, compared to WT mice (Supplementary Figures 9, 10).

To test the hypothesis of an IL-33/iNKT cell axis, we then evaluated IL-33-deficient ($IL\text{-}33^{Gt/Gt}$) mice (43) in our liver IR model. Number and activation level (mean fluorescence intensity

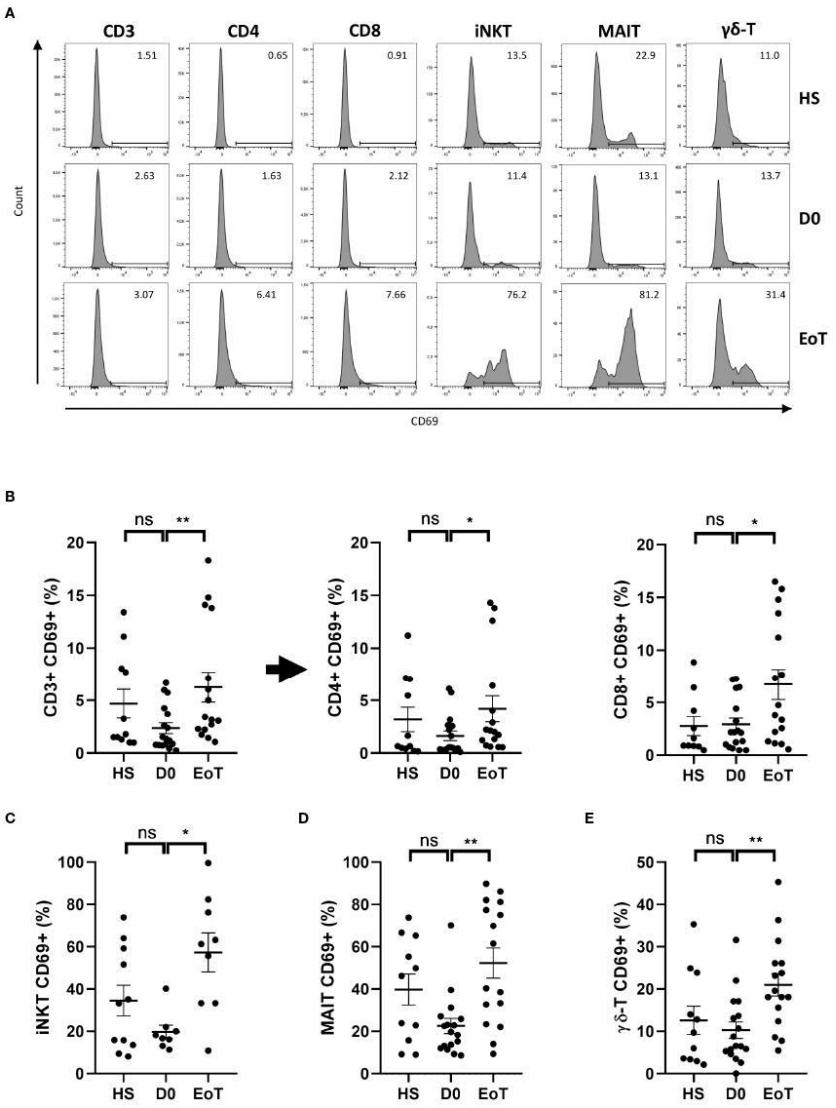


FIGURE 2
Effect of LT on relative proportion of blood CD69(+) cells among conventional and ITC subsets. Flow cytometry analysis (representative histograms are depicted in **(A)**) showing frequencies of CD69(+) cells among total CD3(+) cells, conventional CD4 T cells, referred as CD4+ cells, conventional CD8 T cells, referred as CD8+ cells **(B)**, iNKT cells **(C)**, MAIT cells **(D)**, and γδ-LT cells **(E)** in peripheral blood of healthy subjects (HS; n=11) patients before (D0; n=8-17) and at the end of LT (EoT; n=9-16). Of note, iNKT cells could not be detected in 9 (out of 17) and 7 (out of 16) patients before and at the end of LT, respectively. For detailed gating strategy, see Supplementary Figure 1. Representative plots are shown in Supplementary Figure 2. Data are expressed as means ± SEM. Unpaired (independent) two-tailed Mann-Whitney U test. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ns, not significant. Each symbol represents one HS or LT patient.

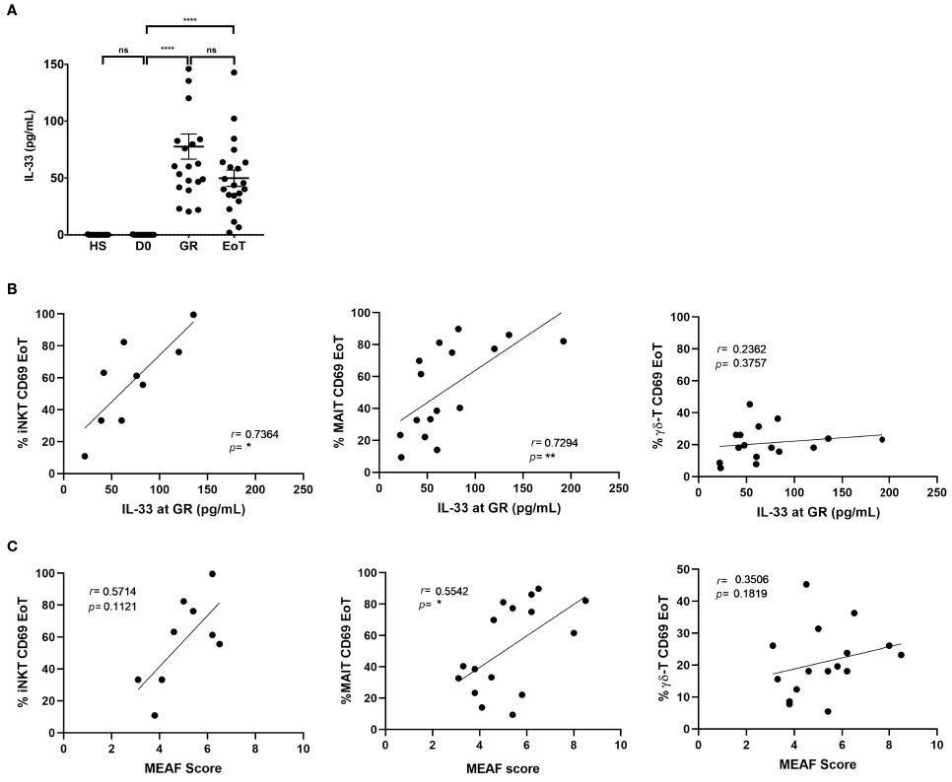


FIGURE 3
Analysis of the association between IL-33 release, ITC activation and liver injury in LT patients. **(A)** Serum levels of IL-33 (pg/mL) in healthy subjects (HS: n=11) and in patients prior to LT (D0: n=21), at graft reperfusion (GR: n=21), and at the end of LT (EoT: n=21). Horizontal bars represent means. Unpaired (independent) two-tailed Mann-Whitney U test. ****$p<0.0001$, ns, not significant. **(B, C)** Spearman's rank correlation of CD69 expression (%) on blood ITC subsets (iNKT, MAIT, γδ-T cells) at the end of LT and serum levels of IL-33 at graft reperfusion (n=9-16) **(B)** or MEAF score (n=9-16) **(C)**. Of note, iNKT cells could not be detected in 7 out of 16 patients at the end of LT. Analysis was performed by Spearman test. Each symbol represents one LT patient.

(MFI) surface expression level of the early activation marker CD69) of iNKT cells were determined in the spleen and liver in WT and IL-33-deficient mice after 1 hour of reperfusion. Flow cytometry gating strategy to identify iNKT cells in mice is shown in Supplementary Figure 11. As depicted in Figure 4, the number of iNKT cells decreased in the spleen and increased in the liver of WT mice (Figure 4A and Supplementary Figure 12), while being activated (Figure 4B and Supplementary Figure 13). On the contrary, IL33-deficient mice showed neither recruitment (Figure 4A) nor activation of iNKT cells (Figure 4B) in the liver, demonstrating that recruitment and activation of iNKT cells after liver IR depends on IL-33.

Discussion

This work provides initial evidence in humans of general and preferential activation of the circulating iNKT cell compartment in the acute sterile inflammation sequence occurring during LT.

Two lines of evidence support the hypothesis that early iNKT cell activation shown at the end of LT could be driven by the alarmin IL-33, which is released in circulation and reaches a peak immediately after graft reperfusion (40): **i)** activation of iNKT cells at the end of LT was closely associated with release of IL-33 immediately after graft reperfusion; **ii)** in a mouse model of liver IRI, early activation of iNKT cells depended on endogenous IL-33, as attested by its virtual loss when WT mice were replaced by IL-33-deficient mice.

In humans, although iNKT cells are rapidly activated in response to IL-33 alone (48), co-signals provided by the pro-inflammatory cytokines IL-12 and IL-18 or by TCR-engagement could also contribute to the amplitude of iNKT cell activation observed in patients at the end of LT. However, during LT, there was no correlation between serum levels of the two proinflammatory cytokines and activation of iNKT cells, suggesting that, unlike IL-33, IL-12 and IL-18 were not sufficient

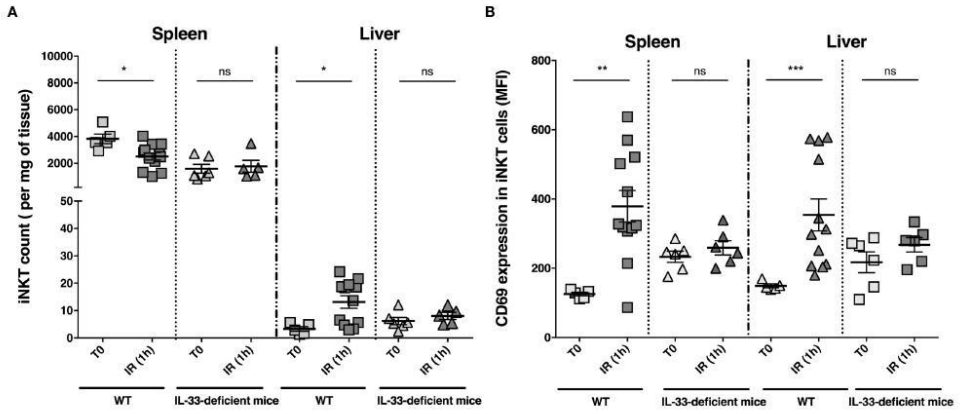


FIGURE 4
iNKT cell numbers and CD69 MFI on iNKT cells in spleen and liver before clamping and 1 hour after declamping of liver lobes: comparison between WT and IL-33-deficient mice. iNKT cell numbers (per milligram of tissue) **(A)** and CD69 expression (mean of fluorescence intensity (MFI)) on iNKT cells **(B)** were determined by flow cytometry in spleen and liver of WT and IL-33-deficient mice before liver clamping (T0) and after 1 hour after declamping of liver lobes (IR (1 h). Data are expressed as mean ± SEM. Of note, IL-33-dependent cell recruitment in the liver, although preferentially involving iNKT cells, tended to affect the entire CD3 T cell compartment (CD3(+) cell count/mg of tissue (mean ± SEM): 40 ± 17 at T0 (n=5) and 92 ± 17 (n=12) after 1 hour of reperfusion in WT mice; p=0.06 *vs.* 63 ± 23 (n=6) at T0 and 43 ± 4.6 (n=6) after 1 hour of reperfusion in IL-33-deficient mice; p=0.82). Unpaired (independent) two-tailed Mann-Whitney U test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns, not significant. n=5-12 mice per group. Each symbol represents one mouse.

by themselves to significantly induce iNKT cell activation, even though we cannot exclude the involvement of IL-12 as an effective coagent of IL-33, due to its high baseline pre-LT levels. Furthermore, no TCR internalization on iNKT cells could be detected, which does not suggest involvement of a TCR ligand.

By providing the *princeps* observation that iNKT cells could be activated in response to IL-33 released as an alarmin during LT, our study extends to humans the new concept of a biological axis of iNKT cells and IL-33, involved in alerting and controlling the immune cells during sterile inflammation. However, our study is based on a single condition of sterile inflammation, namely LT, implying a population of patients with iNKT cell biology altered at baseline (see Figure 1, and (49, 50)) and having received immunosuppression. In this clinical setting, we should therefore highlight the limitation of our phenotypic analysis, due to the very low events of iNKT cells, which are virtually absent in one third of patients.

Another limitation of our study is the origin of iNKT cells that are detected among recipient PBMC, namely transplant-derived versus host origin. Although microchimerism of hematopoietic cells has not been documented during transplantation procedure in LT recipients, we cannot exclude early recirculation of liver resident iNKT cells from the donor liver during this time-sequence. However, the fact that we did not observe an increase in the frequency of iNKT within PBMC in recipient patients between the beginning and the end of LT, suggests that this phenomenon, if it occurs, is still marginal.

An important objective now would be to determine whether the IL-33/iNKT cell biological axis contributes to the severity of IRI associated with LT. In fact, in our mouse model of liver IR, IL-33 and iNKT cells were separately deleterious as evidenced by attenuation of IRI in IL-33-deficient mice (40) and iNKT cell-deficient mice (see Supplementary Figure 9 and Supplementary Figure 10), respectively. In a remarkably similar fashion, when considering the setting of human LT, we previously reported that IL-33 release at reperfusion was positively correlated with cardinal features of early liver injury-associated disorders after LT (40). The possibility that activation of iNKT cells is also closely associated with IR manifestations during LT, which is suggested in the present study by a trend toward positive correlation between the proportion of activated iNKT cells and the MEAF score, remains to be demonstrated in a larger cohort of patients.

Although the precise functions and associated mechanisms of iNKT cells necessitate further investigation, their possible action *via* IFN-γ or/and IL-17A secretion, as reported in mouse IRI models of kidney IRI (12, 13, 17), merits special attention.

Unlike the mouse, resident iNKT cells in human liver are not abundant (% among T lymphocytes: 0.1 to 1.0 *vs.* 5 to 40 in mouse) (51–53). Since our analysis is restricted to peripheral blood, it is difficult to determine whether activation of circulating iNKT cells mirrors their migration into the liver. However, this hypothesis is in line with our data in mice showing that iNKT cell activation in the periphery (spleen) driven by liver IR is accompanied by their recruitment to the liver. In all cases, we assume that both host-derived and graft-resided iNKT cells are targeted by IL-33, thereby causing graft dysfunction in the early phase of LT.

Another important aim of our study was to determine whether during LT, IL-33 also drives activation of the other two main circulating ITC components, namely MAIT and γδ-T cells. As expected, the two non-conventional T cell components shared with iNKT cells a preferential activation during LT, in accordance

with their well-recognized hyperreactivity to endogenous cellular stress elements. Of note, as with iNKT cells, MAIT and γδ-T cells displayed a profound number defect in patients awaiting LT, in accordance with previous reports (49, 54), thereby suggesting a general and coordinated "innateness" alteration. Despite this, as was the case for iNKT cells, activation of MAIT cells during LT was closely associated with both early release of IL-33 and severity of liver dysfunction after graft reperfusion. Future studies using mice lacking MAIT cells (MR1-deficient mice) and IL-33-deficient mice overexpressing MAIT cells (IL-33$^{gt/gt}$ x Vα19*i* TCR transgenic mice) will allow to directly test the existence of a deleterious IL-33/MAIT cell axis during liver IRI.

In clear contrast to activation of MAIT cells, activation of γδ-T cells during LT did not correlate with early release of IL-33. This difference may be explained by the fact that, unlike iNKT and MAIT cells (12, 38, 39, 46), γδ-T cells do not seem directly targeted by IL-33 (55). Of course, future studies dedicated to γδ-T cells during LT will need to take into account the significant qualitative differences between the two major γδ-T contingents present in the blood (i.e., δ1 and δ2).

Interestingly, this response pattern within the ITC compartment is similar to that reported in the acute response to COVID-19 infection (56), in which activation of all three ITC subsets also occurs. In this infection condition, activation of iNKT and MAIT cells, but not γδ-T cells, was correlated with both IL-18 secretion and disease severity. Since IL-18 is known to fully activate iNKT and MAIT cell functions in synergy with IL-33 (12, 38, 39, 46), it remains to be investigated whether IL-33 might be a common and key component in infection and sterile inflammation conditions, driving MAIT and iNKT cells to initiate the clinical course and to determine disease severity. In this context, special attention should also be given to the capacity attributed to iNKT and MAIT cells (57–60), as well as IL-33 (37), to lead to repair response. Longitudinal analysis after LT will help to determine whether MAIT and iNKT cell activation persists over time and may be associated with protective mechanisms in relation with IL-33.

More generally, additional analyses comparing other sterile inflammation conditions and infection of other origins will help to better evaluate the "sterile inflammation" specificity of our findings.

In summary, we have shown that LT drives general and preferential activation of the three main ITC components, namely iNKT, MAIT, and γδ-T cells. In addition, we have identified iNKT and MAIT cells in connection with IL-33 as new key cellular factors and mechanisms of sterile inflammation in clinical settings. Of importance, our study also raises the possibility that the levels of activation (as assessed by CD69 expression) on MAIT and iNKT cells may be predictive of the clinical course of sterile inflammation conditions. Further investigations will be required to precisely assess their functions during sterile inflammation and its resolution after LT.

Taken as a whole, these findings should encourage further studies on MAIT and iNKT cells in sterile inflammation conditions so as to assess their potential as biomarkers and/or targets for immune intervention strategies.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale Tours-Région Centre-Ouest 1 under registration number DC-2016-2651. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was reviewed and approved by COMETHEA Poitou Charentes, authorization no. 2016110211568800.

Author contributions

AR and CM developed methodology, performed investigation, and wrote the original draft. RB performed investigations and reviewed the manuscript. AB performed formal analysis and reviewed the manuscript. FD helped in creating the liver injury score and in analyzing liver tissue. AT, TH, and LP were involved in conceptualization and project administration and reviewed the manuscript. J-MG was involved in conceptualization, performed supervision and reviewed the manuscript. ES and AH were involved in conceptualization and project administration, performed supervision, and reviewed the manuscript. LB developed methodology, performed investigations, was involved in conceptualization and project administration, performed supervision, and wrote the original draft. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The study was supported by grants from "Agence de la Biomédecine" (Appel d'offres Recherche 2019), "Fondation de la Recherche Médicale" (Subvention Transplantation et Thérapie Cellulaire 2020; PME 202006011489), University Hospital Federation "SUPORT" SUrvival oPtimization in ORgan Transplantation, by INSERM, University Hospital of Poitiers, University Hospital of Tours, and University of Poitiers, and by program FEDER/CPER HABISAN of Nouvelle Aquitaine for their participation in equipment funding.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Jeffrey Arsham, a professional American medical translator, who reviewed the manuscript. The authors also thank the staff of PREBIOS animal facility and the ImageUP platform of flow cytometry (University of Poitiers); Dr Jean-Philippe Girard for providing IL-33$^{Gt/Gt}$ mice;

Dr Rémy Sindayigaya from the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (University Hospital of Tours) for the clinical data; Dr Héloïse Ducousso from the Department of Urology (University Hospital of Poitiers) for mouse experiments; Sandrine Joffrion from the Biochemistry Laboratory (University Hospital of Poitiers) for ALT measurements; and the National Institute of Health Tetramer Core Facility for providing the CD1d and MR1 tetramers.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1099529/full#supplementary-material

References

1. Bendelac A, Rivera MN, Park S-H, Roark JH. MOUSE CD1-SPECIFIC NK1 T CELLS: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* (1997) 15:535–62. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.535

2. Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol* (2015) 16:1114–23. doi: 10.1038/ni.3298

3. Wencker M, Turchinovich G, Di Marco Barros R, Deban L, Jandke A, Cope A, et al. Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness. *Nat Immunol* (2014) 15:80–7. doi: 10.1038/ni.2773

4. Paget C, Mallevaey T, Speak AO, Torres D, Fontaine J, Sheehan KCF, et al. Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity* (2007) 27:597–609. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.017

5. Brigl M, Tatituri RVV, Watts GFM, Bhowruth V, Leadbetter EA, Barton N, et al. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *J Exp Med* (2011) 208:1163–77. doi: 10.1084/jem.20102555

6. Hossain M, Kubes P. Innate immune cells orchestrate the repair of sterile injury in the liver and beyond. *Eur J Immunol* (2019) 49:831–41. doi: 10.1002/eji.201847485

7. Liew PX, Lee W-Y, Kubes P. iNKT cells orchestrate a switch from inflammation to resolution of sterile liver injury. *Immunity* (2017) 47:752–765.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.016

8. Ferhat MH, Robin A, Barbier L, Thierry A, Gombert J-M, Barbarin A, et al. The impact of invariant NKT cells in sterile inflammation: the possible contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33. *Front Immunol* (2018) 9:2308. doi: 10.3389/fimmu.2018.02308

9. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* (2010) 28:321–42. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101311

10. van Golen RF, Reiniers MJ, Olthof PB, van Gulik TM, Heger M. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics: hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol* (2013) 28:394–400. doi: 10.1111/jgh.12072

11. McDonald B, Kubes P. Innate immune cell trafficking and function during sterile inflammation of the liver. *Gastroenterology* (2016) 151:1087–95. doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.048

12. Ferhat M, Robin A, Giraud S, Sena S, Goujon J-M, Touchard G, et al. Endogenous IL-33 contributes to kidney ischemia-reperfusion injury as an alarmin. *J Am Soc Nephrol* (2018) 29:1272–88. doi: 10.1681/ASN.2017060650

13. Li L, Huang L, Sung SJ, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-γ production and renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* (2007) 178:5899–911. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5899

14. Zimmerman M, Martin A, Yee J, Schiller J, Hong J. Natural killer T cells in liver ischemia–reperfusion injury. *J Clin Med* (2017) 6:41. doi: 10.3390/jcm6040041

15. Lappas CM, Day Y-J, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J Exp Med* (2006) 203:2639–48. doi: 10.1084/jem.20061097

16. Wang Z-K, Xue L, Wang T, Wang X-J, Su Z-Q. Infiltration of invariant natural killer T cells occur and accelerate brain infarction in permanent ischemic stroke in mice. *Neurosci Lett* (2016) 633:62–8. doi: 10.1016/j.neulet.2016.09.010

17. Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-γ–mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* (2010) 120:331–42. doi: 10.1172/JCI38702

18. Shimamura K, Kawamura H, Nagura T, Kato T, Naito T, Kameyama H, et al. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. *Cell Immunol* (2005) 234:31–8. doi: 10.1016/j.cellimm.2005.04.022

19. Richards JA, Wigmore SJ, Anderton SM, Howie SEM. NKT cells are important mediators of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transpl Immunol* (2017) 45:15–21. doi: 10.1016/j.trim.2017.08.002

20. Kuboki S, Sakai N, Tschöp J, Edwards MJ, Lentsch AB, Caldwell CC. Distinct contributions of CD4 $^+$ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* (2009) 296:G1054–9. doi: 10.1152/ajpgi.90464.2008

21. Savransky V, Molls RR, Burne-Taney M, Chien C-C, Racusen L, Rabb H. Role of the T-cell receptor in kidney ischemia–reperfusion injury. *Kidney Int* (2006) 69:233–8. doi: 10.1038/sj.ki.5000038

22. Leite-de-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, Machavoine F, Koezuka Y, Schneider E, et al. A distinct IL-18-Induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol* (1999) 163:5871–6. doi: 10.4049/jimmunol.163.11.5871

23. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* (2005) 23:479–90. doi: 10.1016/j.immuni.2005.09.015

24. Liew FY, Girard J-P, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:676–89. doi: 10.1038/nri.2016.95

25. Moussion C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-Like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'Alarmin'? *PloS One* (2008) 3:e3331. doi: 10.1371/journal.pone.0003331

26. Yazdani HO, Chen H-W, Tohme S, Tai S, van der Windt DJ, Loughran P, et al. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. *J Hepatol* (2018) 68:130–9. doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.010

27. Li D, Guabiraba R, Besnard A-G, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 134:1422–1432.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.011

28. Luo Q, Fan Y, Lin L, Wei J, Li Z, Li Y, et al. Interleukin-33 protects ischemic brain injury by regulating specific microglial activities. *Neuroscience* (2018) 385:75–89. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.05.047

29. Akcay A, Nguyen Q, He Z, Turkmen K, Won Lee D, Hernando AA, et al. IL-33 exacerbates acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* (2011) 22:2057–67. doi: 10.1681/ASN.2010091011

30. Michaudel C, Mackowiak C, Maillet I, Fauconnier L, Akdis CA, Sokolowska M, et al. Ozone exposure induces respiratory barrier biphasic injury and inflammation controlled by IL-33. *J Allergy Clin Immunol* (2018) 142:942–58. doi: 10.1016/j.jaci.2017.11.044

31. Gadani SP, Walsh JT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron* (2015) 85:703–9. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.013

32. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Küchler AM. Interleukin-33 – cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol* (2009) 30:227–33. doi: 10.1016/j.it.2009.03.003

33. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): a nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev* (2018) 281:154–68. doi: 10.1111/imr.12619

34. McSorley HJ, Smyth DJ. IL-33: a central cytokine in helminth infections. *Semin Immunol* (2021) 53:101532. doi: 10.1016/j.smim.2021.101532

35. Guo H, Bossila EA, Ma X, Zhao C, Zhao Y. Dual immune regulatory roles of interleukin-33 in pathological conditions. *Cells* (2022) 11:3237. doi: 10.3390/cells11203237

36. Riedel J-H, Becker M, Kopp K, Düster M, Brix SR, Meyer-Schwesinger C, et al. IL-33–mediated expansion of type 2 innate lymphoid cells protects from progressive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* (2017) 28:2068–80. doi: 10.1681/ASN.2016080877

37. Dwyer GK, D'Cruz LM, Turnquist HR. Emerging functions of IL-33 in homeostasis and immunity. *Annu Rev Immunol* (2022) 40:15–43. doi: 10.1146/annurev-immunol-101320-124243

38. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-γ production. *Eur J Immunol* (2009) 39:1046–55. doi: 10.1002/eji.200838575

39. Smithgall MD, Comeau MR, Park Yoon B-R, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* (2008) 20:1019–30. doi: 10.1093/intimm/dxn060

40. Barbier L, Robin A, Sindayigaya R, Ducousso H, Dujardin F, Thierry A, et al. Endogenous interleukin-33 acts as an alarmin in liver ischemia-reperfusion and is associated with injury after human liver transplantation. *Front Immunol* (2021) 12:744927. doi: 10.3389/fimmu.2021.744927

41. Pareja E, Cortes M, Hervás D, Mir J, Valdivieso A, Castell JV, et al. A score model for the continuous grading of early allograft dysfunction severity: GRADING EARLY ALLOGRAFT DYSFUNCTION. *Liver Transpl* (2015) 21:38–46. doi: 10.1002/lt.23990

42. Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, et al. Requirement for V $_{\alpha}$ 14 NKT cells in IL-12-Mediated rejection of tumors. *Science* (1997) 278:1623–6. doi: 10.1126/science.278.5343.1623

43. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33–LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol* (2012) 188:3488–95. doi: 10.4049/jimmunol.1101977

44. Abe Y, Hines I, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, et al. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free Radic Biol Med* (2009) 46:1–7. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.029

45. Daniel L, Tassery M, Lateur C, Thierry A, Herbelin A, Gombert J-M, et al. Allotransplantation is associated with exacerbation of CD8 T-cell senescence: the particular place of the innate CD8 T-cell component. *Front Immunol* (2021) 12:674016. doi: 10.3389/fimmu.2021.674016

46. Azzout M, Dietrich C, Machavoine F, Gastineau P, Bottier A, Lezmi G, et al. IL-33 enhances IFNγ and TNFα production by human MAIT cells: a new pro-Th1 effect of IL-33. *Int J Mol Sci* (2021) 22:10602. doi: 10.3390/ijms221910602

47. Chen Y, Tian Z. Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer. *Cell Mol Immunol* (2021) 18:57–72. doi: 10.1038/s41423-020-00561-z

48. Thierry A, Giraud S, Robin A, Barra A, Bridoux F, Ameteau V, et al. The alarmin concept applied to human renal transplantation: evidence for a differential implication of HMGB1 and IL-33. *PloS One* (2014) 9:e88742. doi: 10.1371/journal.pone.0088742

49. Huang W, He W, Shi X, He X, Dou L, Gao Y. The role of CD1d and MR1 restricted T cells in the liver. *Front Immunol* (2018) 9:2424. doi: 10.3389/fimmu.2018.02424

50. Bandyopadhyay K, Marrero I, Kumar V. NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. *Cell Mol Immunol* (2016) 13:337–46. doi: 10.1038/cmi.2015.115

51. Paquin-Proulx D, Greenspun BC, Pasquet L, Strunz B, Aleman S, Falconer K, et al. IL13Rα2 expression identifies tissue-resident IL-22-producing PLZF $^{+}$ innate T cells in the human liver: Dominic paquin-proulx et al. *Eur J Immunol* (2018) 48:1329–35. doi: 10.1002/eji.201747334

52. Cheng X, Tan X, Wang W, Zhang Z, Zhu R, Wu M, et al. Long-Chain Acylcarnitines Induce Senescence of Invariant Natural Killer T Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* (2022) 83, 582–94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-22-2273

53. Ishihara S, Nieda M, Kitayama J, Osada T, Yabe T, Kikuchi A, et al. α-glycosylceramides enhance the antitumor cytotoxicity of hepatic lymphocytes obtained from cancer patients by activating CD3−CD56+ NK cells in vitro. *J Immunol* (2000) 165:1659–64. doi: 10.4049/jimmunol.165.3.1659

54. Zhang Y, Kong D, Wang H. Mucosal-associated invariant T cell in liver diseases. *Int J Biol Sci* (2020) 16:460–70. doi: 10.7150/ijbs.39016

55. Duault C, Franchini DM, Familliades J, Cayrol C, Roga S, Girard J-P, et al. TCRVγ9 γδ T cell response to IL-33: a CD4 T cell–dependent mechanism. *J Immunol* (2016) 196:493–502. doi: 10.4049/jimmunol.1500260

56. Jouan Y, Guillon A, Gonzalez L, Perez Y, Boisseau C, Ehrmann S, et al. Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J Exp Med* (2020) 217:e20200872. doi: 10.1084/jem.20200872

57. Trottein F, Paget C. Natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in lung infections. *Front Immunol* (2018) 9:1750. doi: 10.3389/fimmu.2018.01750

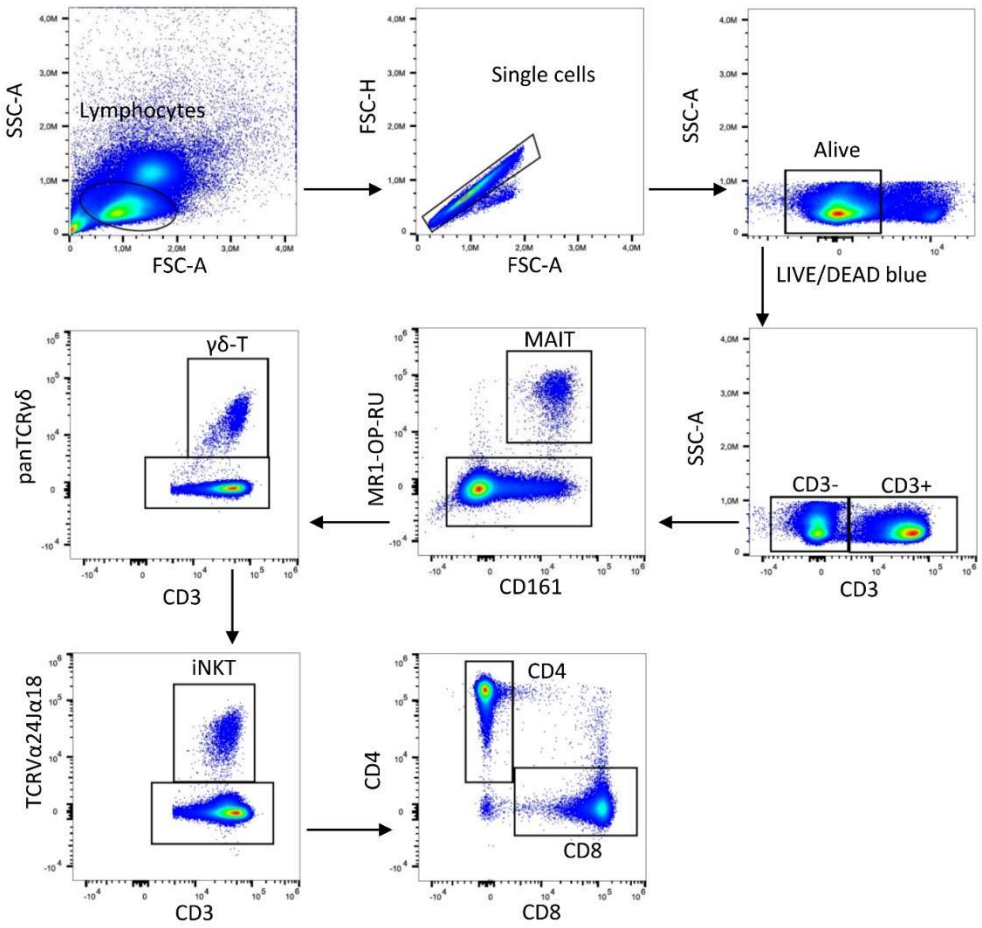
58. Hinks TSC, Marchi E, Jabeen M, Olshansky M, Kurioka A, Pediongco TJ, et al. Activation and in vivo evolution of the MAIT cell transcriptome in mice and humans reveals tissue repair functionality. *Cell Rep* (2019) 28:3249–3262.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.039

59. Lamichhane R, Schneider M, de la Harpe SM, Harrop TWR, Hannaway RF, Dearden PK, et al. TCR- or cytokine-activated CD8+ mucosal-associated invariant T cells are rapid polyfunctional effectors that can coordinate immune responses. *Cell Rep* (2019) 28:3061–3076.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.054

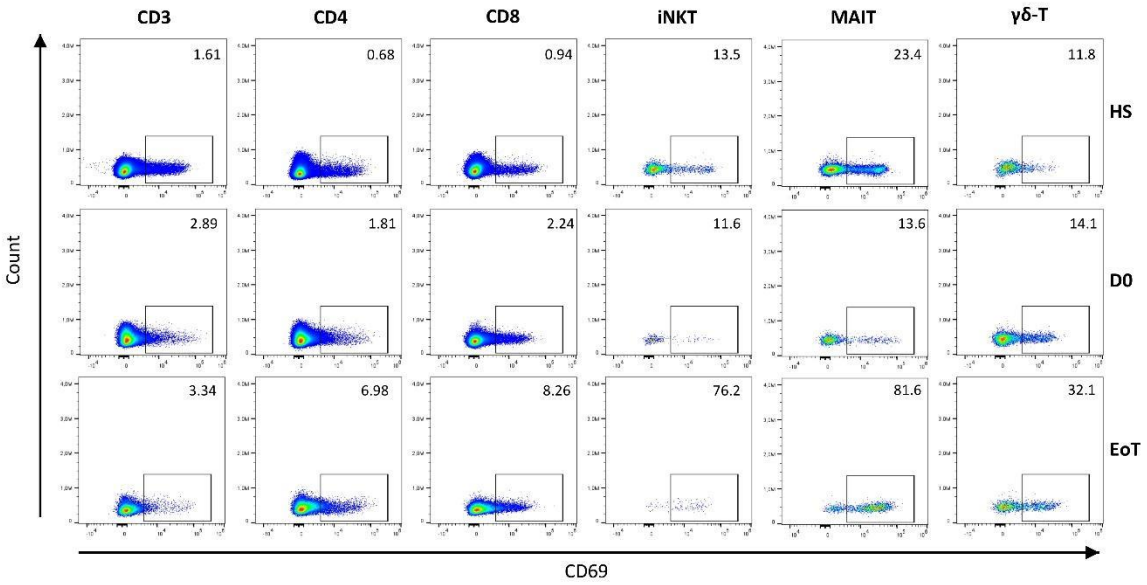
60. Leng T, Akther HD, Hackstein C-P, Powell K, King T, Friedrich M, et al. TCR and inflammatory signals tune human MAIT cells to exert specific tissue repair and effector functions. *Cell Rep* (2019) 28:3077–3091.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.050

COPYRIGHT

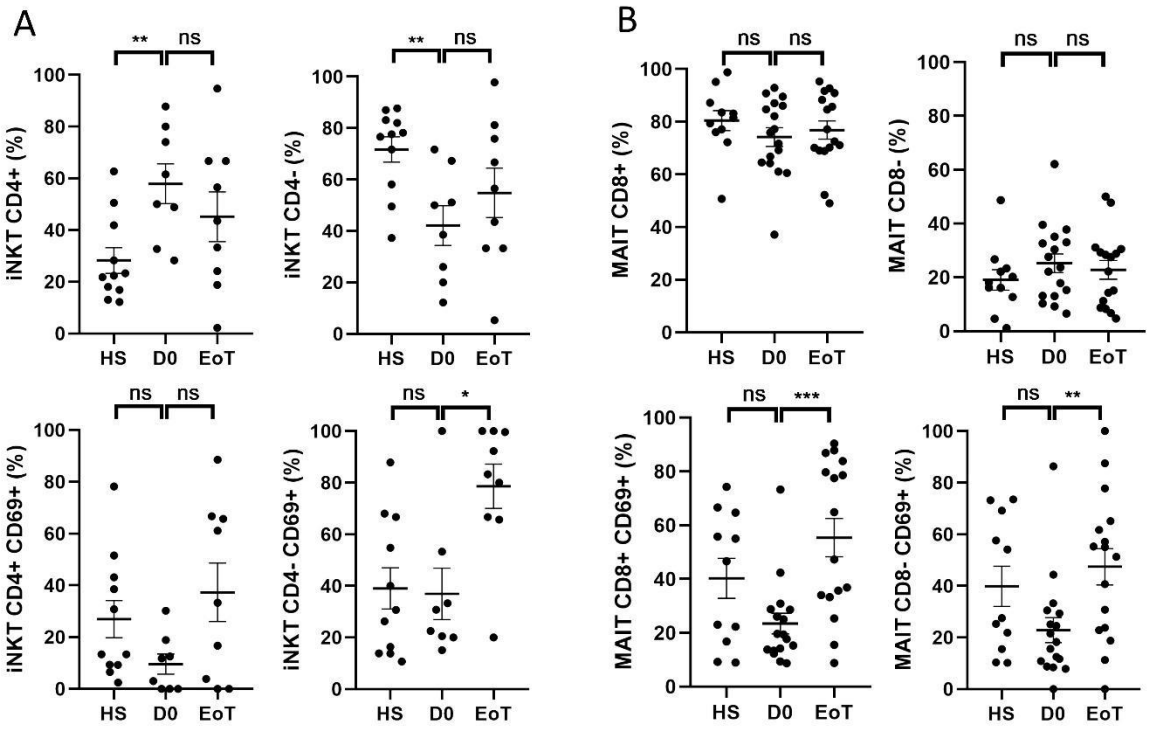
© 2023 Robin, Mackowiak, Bost, Dujardin, Barbarin, Thierry, Hauet, Pellerin, Gombert, Salamé, Herbelin and Barbier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



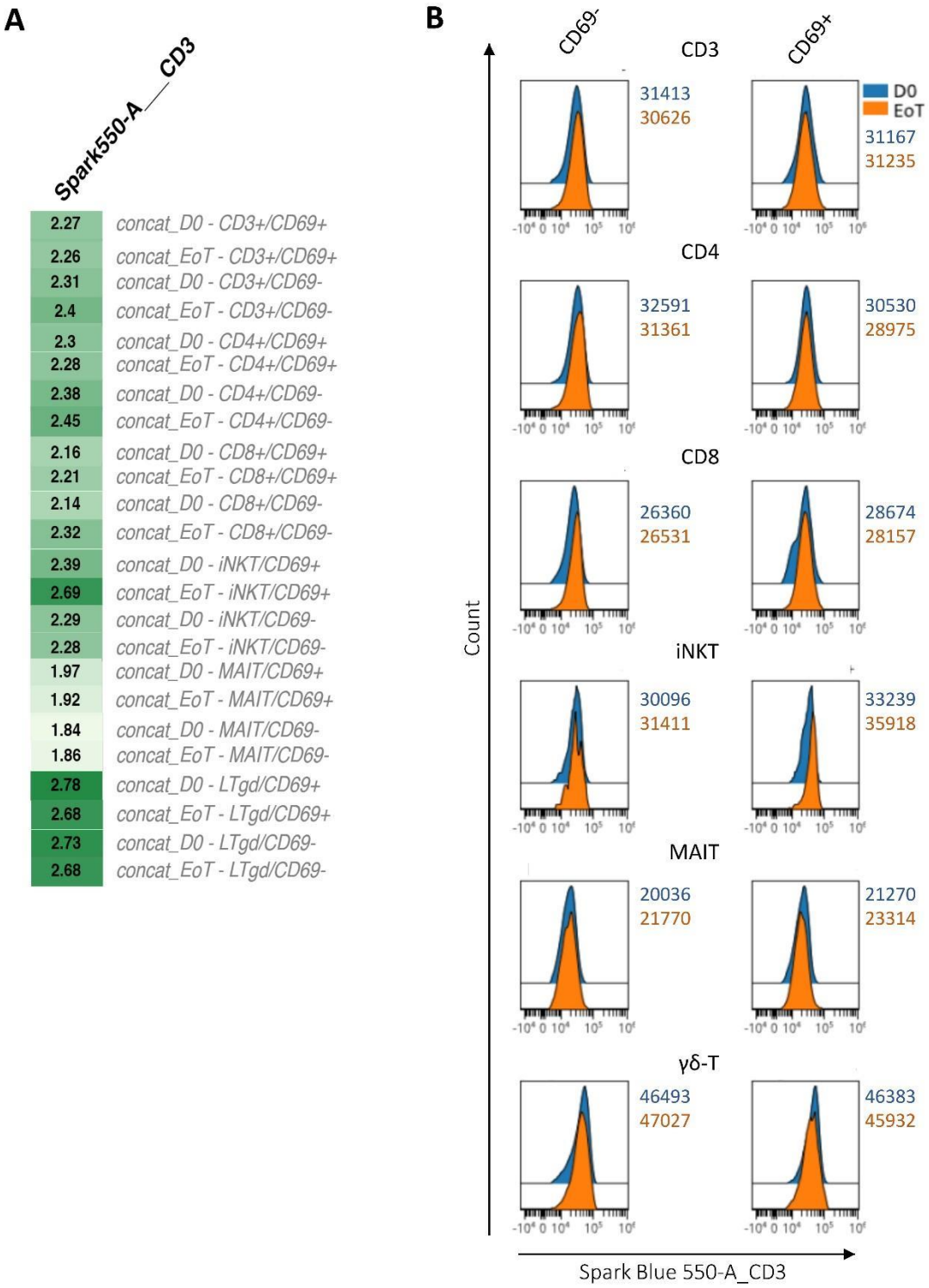
Supplementary Figure 1: Flow cytometry gating strategy used for the analysis of blood conventional and ITC subsets in LT patients and HS. MAIT cells (CD3(+), CD161(+), MR1(+)), γδ-T cells (CD3(+), MR1(-), panTCRγδ(+)), iNKT cells (CD3(+), MR1(-), panTCR-γδ(-), TCRVα24Jα18(+)), **conventional** CD4 T cells (CD3(+), MR1(-), panTCR-γδ(-), TCRVα24Jα18(-), CD4(+)) cells, referred to as CD4(+) cells, conventional CD8 T cells (CD3(+), MR1(-), panTCR-γδ(-), TCRVα24jα18(-), CD8(+)), referred to as CD8(+) cells, in peripheral blood. Lymphocytes were gated based on SSC-A *vs.* FSC-A, and singlets were selected from FSC-A and FSC-H dot plot.



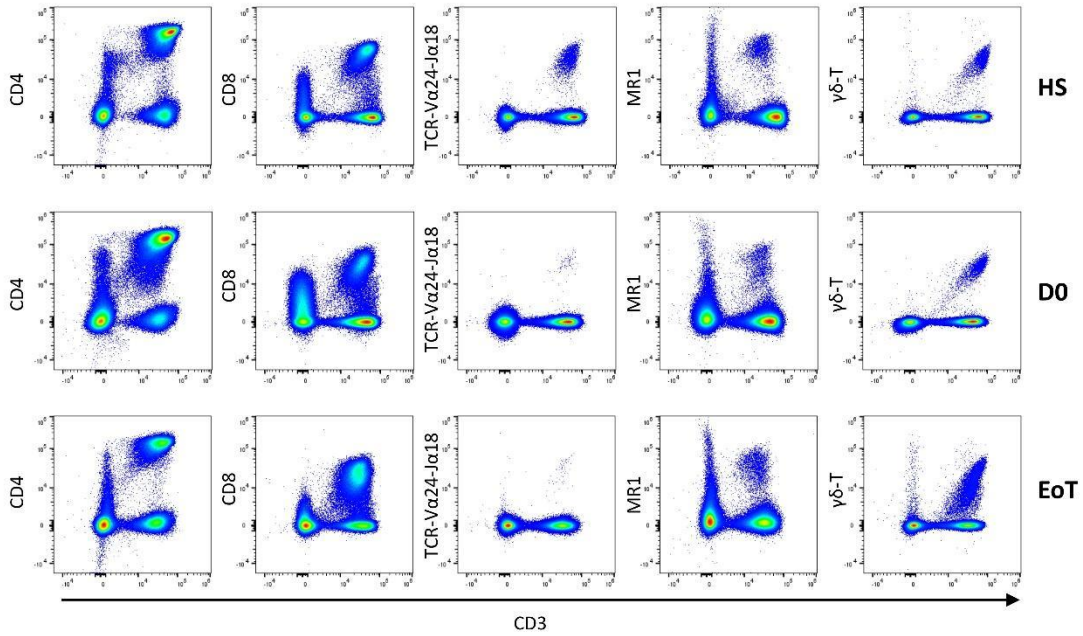
Supplementary Figure 2: Representing flow cytometry plot showing expression profile of the surface marker CD69 on conventional (CD3, CD4, and CD8) T cells and ITC (iNKT, MAIT, and γδ-T) subsets in peripheral blood of one representative healthy subject, one representative patient prior to LT (D0), and one representative patient at the end of LT (EoT). For detailed gating strategy, see **Supplementary Figure 1.** Numbers indicate percentage of cells expressing CD69 within the indicated T cell subset.



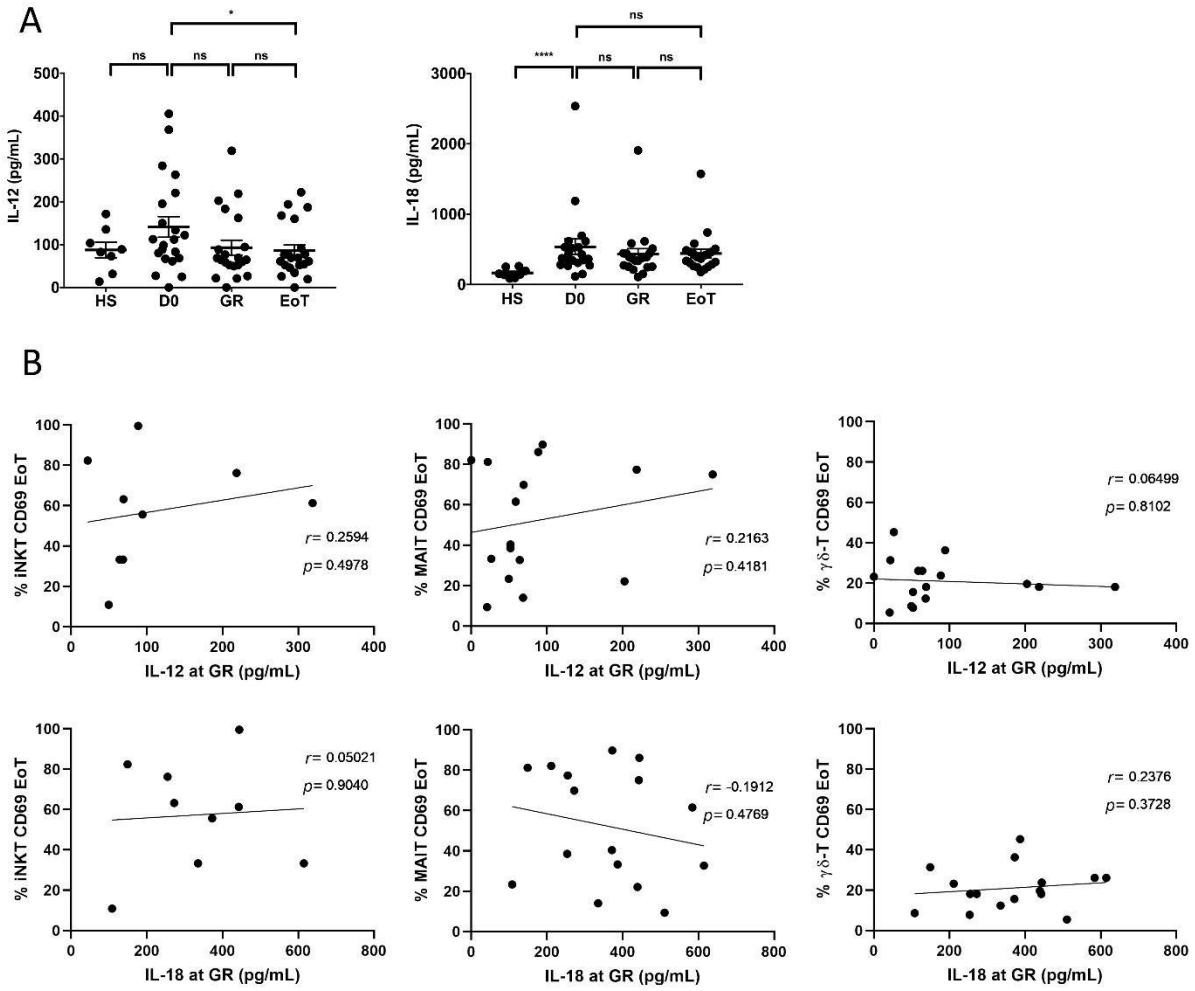
Supplementary Figure 3: Analysis of the influence of LT on the relative proportions of CD69-expressing CD4(+) *versus* CD4(-) iNKT cells and CD8(+) *versus* CD8(-) MAIT cells. Flow cytometry analysis showing frequencies of total (top panels) and CD69-expressing (bottom panels) CD4(+)/CD4(-) cells among iNKT cells (**A**) and of CD8(+)/CD8(-) cells among MAIT cells (**B**) in peripheral blood of healthy subjects (HS; n=11), patients at beginning (D0: n=8-17) and end (EoT: n=9-16) of LT. Of note, iNKT cells could not be detected in 9 (out of 17) and 7 (out of 16) patients before and at the end of LT, respectively. For detailed gating strategy, see **Supplementary Figure 1**. Horizontal solid lines indicate means. Unpaired (independent) two-tailed Mann-Whitney U test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns: not significant. Each symbol represents one HS or a LT patient.



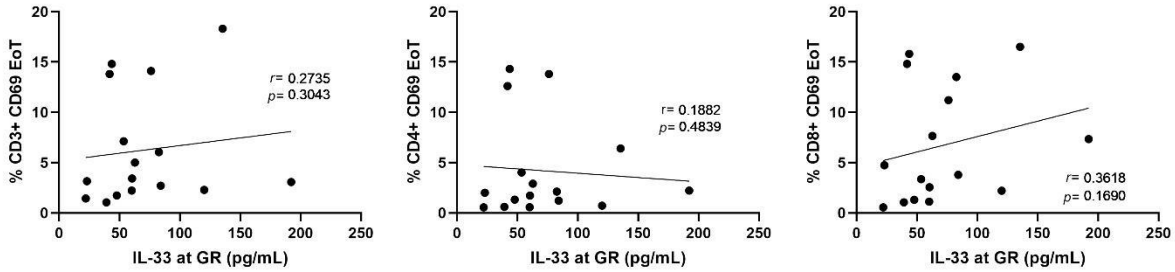
Supplementary Figure 4: Heatmap (A) and histogram concatenation (B) representing CD3 expression level (mean of fluorescence intensity (MFI)) according to expression of CD69 on blood conventional T cell subsets (CD3+, CD4+ and CD8+ T cells) and ITC subsets (iNKT, MAIT and γδ-T cells) from patient before (D0) and at the end (EoT) of LT. No significative difference of CD3 expression level was observed between CD69+ and CD69- cell fractions for each T cell compartment analyzed.



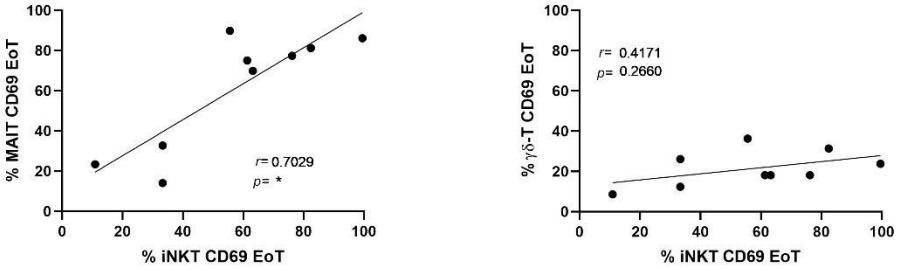
Supplementary Figure 5: Representing flow cytometry plot showing expression of the surface marker CD3 on conventional (CD4 and CD8) T cells and ITC (iNKT, MAIT, and γδ-T) subsets among gated live PBMC. One representative healthy subject (HS), one representative patient prior to LT (D0), and one representative patient at the end of LT (EoT) was shown.



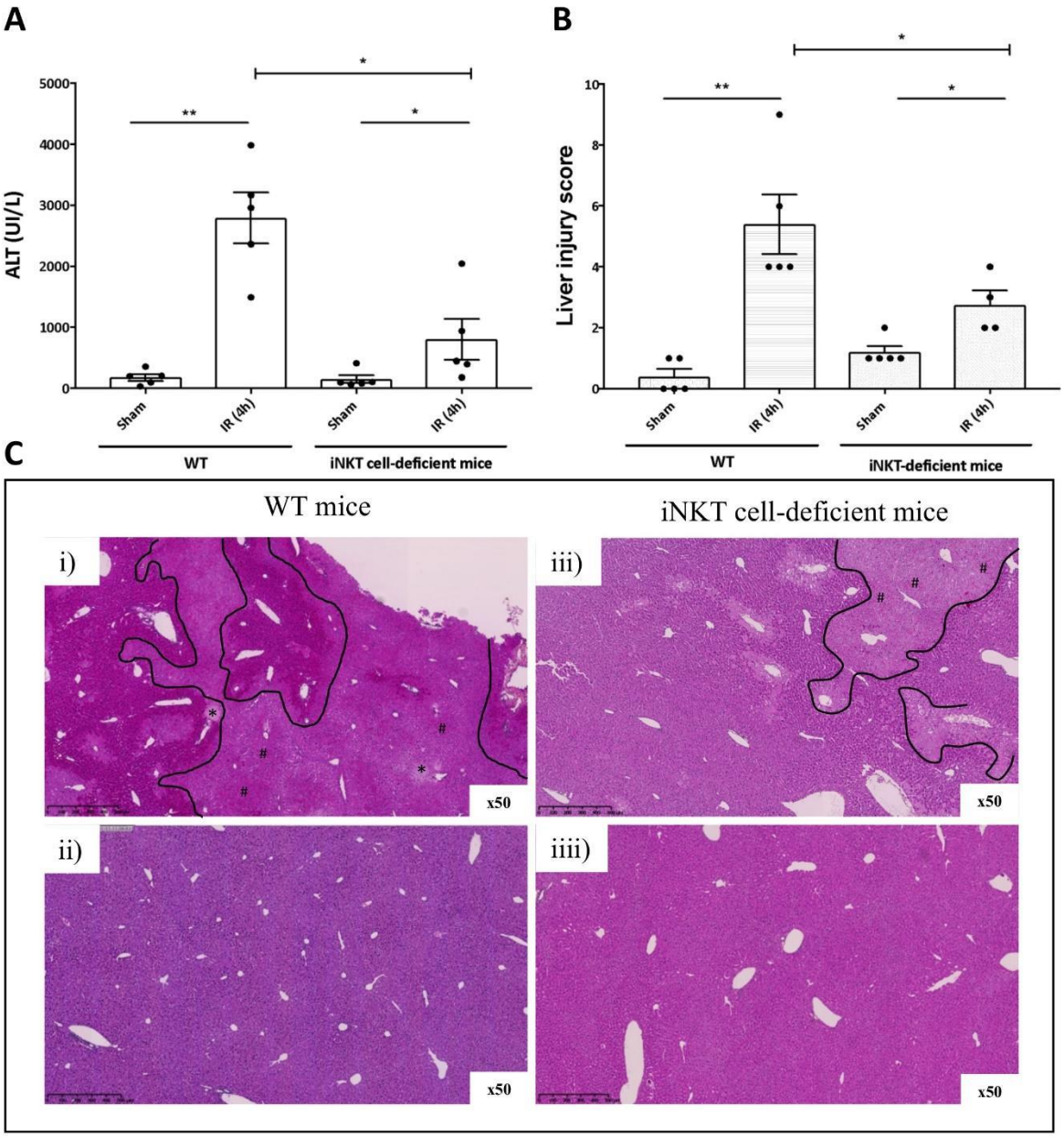
Supplementary Figure 6: Analysis of the association between IL-12/IL-18 release and ITC activation in LT patients. (**A**) Serum levels (pg/mL) of IL-12 (left panel) and IL-18 (right panel) in healthy subjects (HS: n=8) and in patients prior to LT (D0: n=21), at graft reperfusion (GR: n=21), and at the end of LT (EoT: n=21) Horizontal lines represent means. Unpaired (independent) two-tailed Mann-Whitney U test. *P<0.05, ****P<0.0001, ns: not significant. Each symbol represents one HS or a LT patient. (**B**) Spearman's rank correlation of CD69 expression (%) on blood ITC subsets (iNKT, MAIT, γδ-T cells) at the end of LT and serum levels of IL-12 (top panels) and IL-18 (bottom panels) at graft reperfusion (n=9-16). Of note, iNKT cells could not be detected in 7 out of 16 patients at the end of LT. Analysis was performed by Spearman test. Each symbol represents one LT patient.



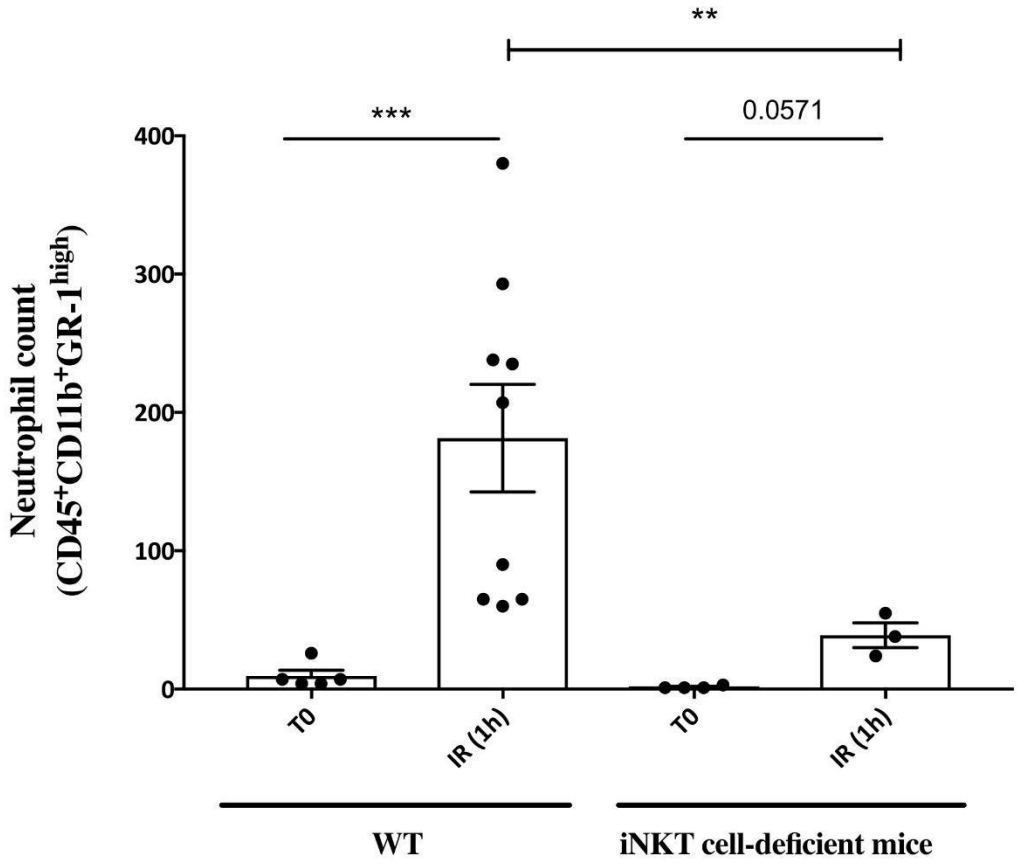
Supplementary Figure 7: Spearman's rank correlation of CD69 expression (%) on blood conventional T cell subsets (CD4+ and CD8+ T cells) at the end of LT and serum levels of IL-33 at graft reperfusion (n=16). Analysis was performed by Spearman test. Each symbol represents one LT patient.



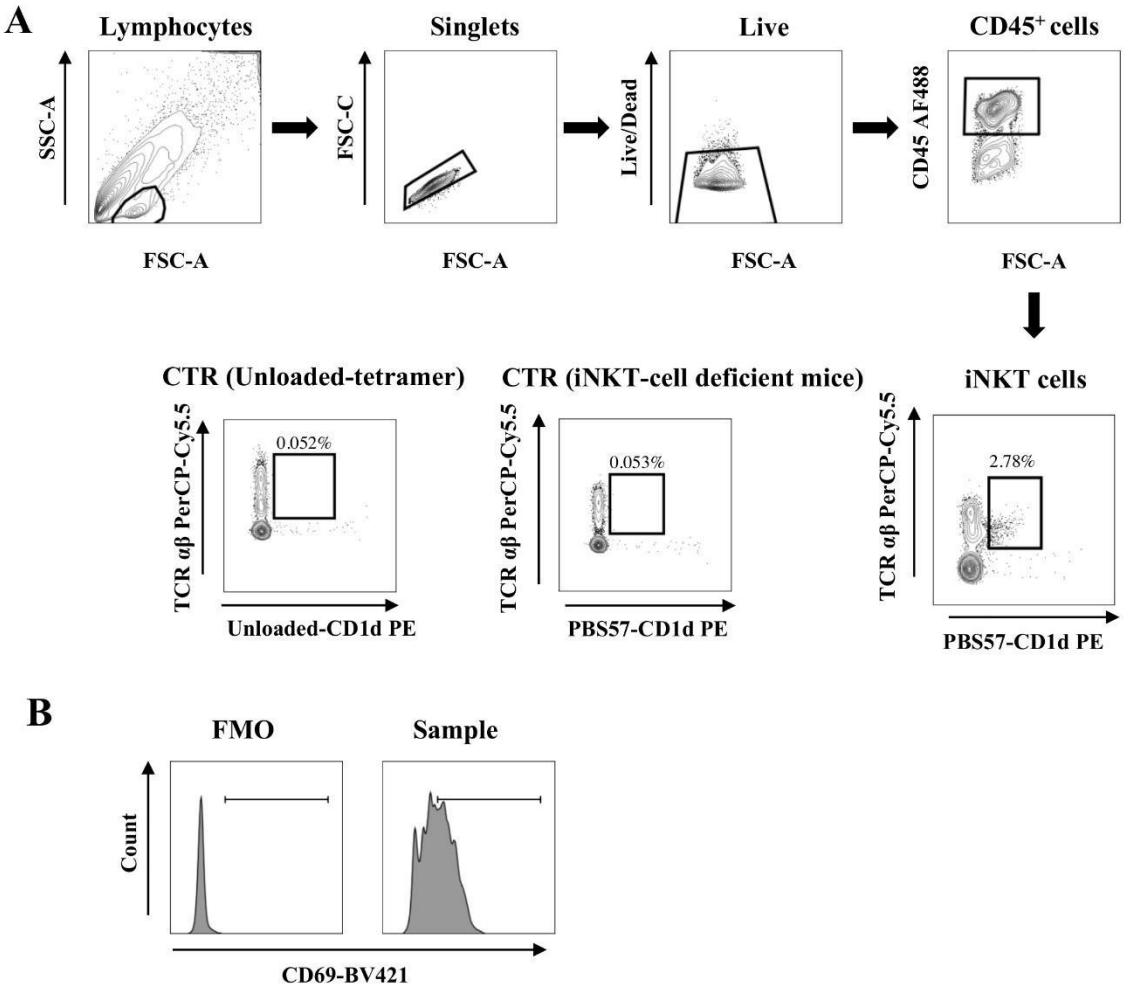
Supplementary Figure 8: Spearman's rank correlation of CD69 expression (%) on blood iNKT cells and CD69 expression on blood MAIT/or γδ-T cells at the end of LT (n=9). Analysis was performed by Spearman test. *$p<0.05$. Each symbol represents one LT patient.



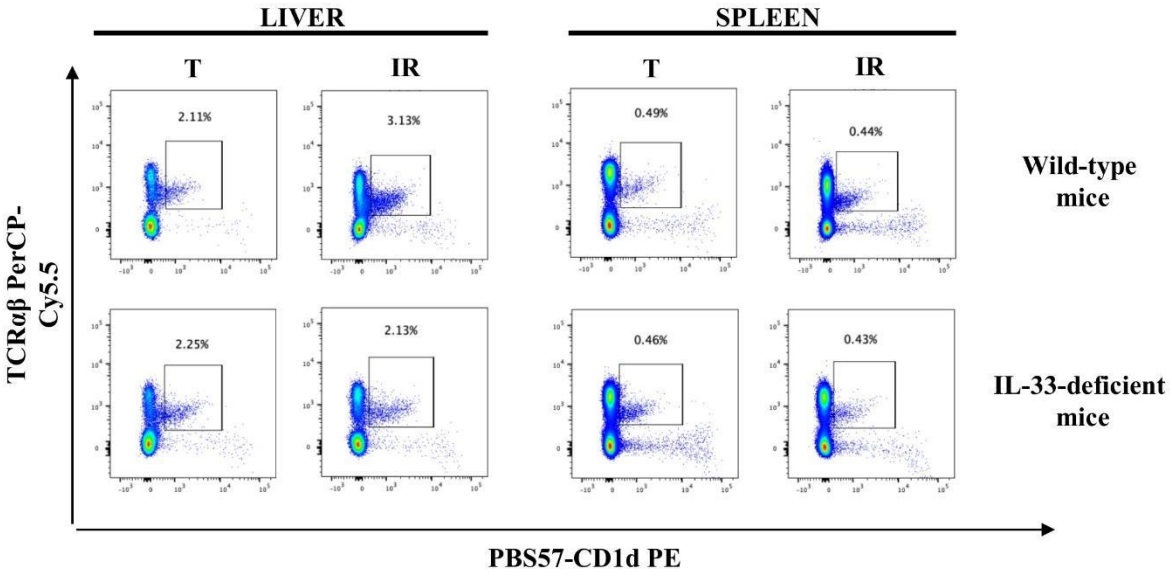
Supplementary Figure 9: Plasma levels of ALT and liver injury score after liver IR: comparison between wild-type and iNKT cell-deficient mice. (A) Plasma levels of ALT (UI/L) in wild-type (WT) (left) and iNKT cell-deficient mice (right) in sham animals and after 4 hours of reperfusion (IR (4 h)). n = 5 mice per group. **(B)** Liver injury score in WT (left) and iNKT cell-deficient mice (right) in sham animals and after 4 hours of reperfusion (IR (4 h)). n = 4–5 mice per group. Data are expressed as means ± SEM. *P<0.05, **P<0.01. Two-tailed Mann-Whitney U test. **(C)** Tissue sections after paraffin embedding and hematoxylin phloxine saffron staining. **i)** Clamped liver lobes of a WT mouse after 4 hours of reperfusion (x50 magnification). *Shows an area with suffering hepatocytes; # shows an area with sinusoidal congestion and dilatation (red blood cells in sinusoidal spaces). Outside of the demarcation line, lesions are less intense. **ii**) Liver of a Sham WT mouse (x50 magnification) showing a normal liver. **iii**) Clamped liver of an iNKT cell-deficient mouse after 4 hours of reperfusion (x50 magnification). Lesions are located inside the demarcation. **iiii**) liver of a sham iNKT cell-deficient mouse (x50 magnification) showing a normal liver.



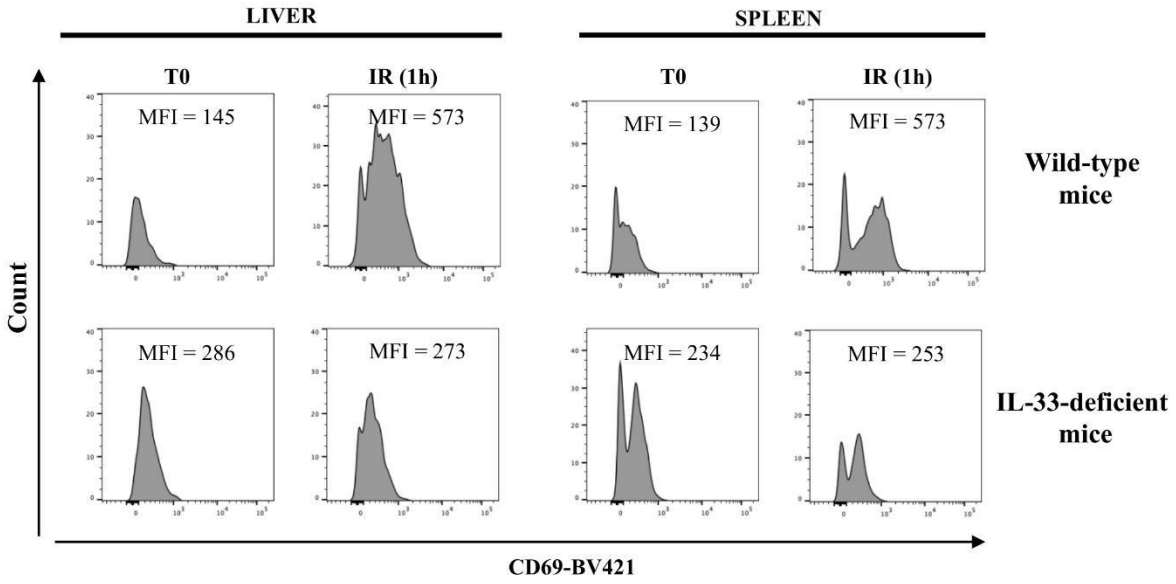
Supplementary Figure 10: Neutrophil cell number in liver at T0 and 1 hour after declamping of liver lobes : comparison between wild-type and iNKT cell-deficient mice. Freshly isolated cells from liver were gated based on size (FSC-A) vs granularity (SSC-A), and singlets were selected from FSC-A and FSC-H dot plot following by Zombie NIR exclusion and gating on CD45 expression to identify live leukocytes. Among CD45(+) cells, neutrophils were identified as CD11b(+)GR-1(high). Data are expressed as means±SEM. Unpaired two-tailed Mann-Whitney U test. **P<0.01, ***P<0.001, ns: not significant. Each symbol represents one mouse.



Supplementary Figure 11: Flow cytometry gating strategy to identify liver and spleen iNKT cells (A) and to analyze their CD69 expression level (MFI) (B) in mouse. (**A**) Freshly isolated cells from spleen and liver were gated based on size (FSC-A) *vs.* granularity (SSC-A), and singlets were selected from FSC-A and FSC-H dot plot followed by Zombie NIR exclusion and gating on CD45 expression to identify live leukocytes. Among CD45(+) cells, iNKT cells were identified as PBS57-loaded CD1d TT(+) with intermediate TCR-αβ expression (PBS57-loaded CD1d TT(+) TCR-αβ (int)). A sample was membrane-labeled with anti-TCR-αβ mAb and an unloaded CD1d-TT (CTR Unloaded-tetramer) to validate the staining of the PBS57-loaded CD1d TT. Mice lacking iNKT cells served as negative controls (CTR iNKT-deficient mice) to validate iNKT cell identification using the PBS57-loaded CD1d TT in WT mice. (**B**) Surface CD69 expression on iNKT cells. CD69 mean fluorescence intensity (MFI) levels on iNKT cells (PBS57-loaded CD1d TT(+) TCR-αβ (int)) after gating on CD45(+) cells. Left histogram represents the Fluorescence Minus One control (FMO). Right histogram is representative of surface CD69 expression on iNKT cells after 1 hour of hepatic reperfusion.



Supplementary Figure 12: **Representative flow cytometry plots of frequencies of iNKT cells** among CD45(+) in liver and spleen from wild-type (top plots) and IL-33-deficient mice (bottom plots) before IR (T0) and after 1 hour of reperfusion (IR 1h).



Supplementary Figure 13: **Representative histograms of mean of fluorescence intensity (MFI) of surface CD69 expression on iNKT cells** in liver and spleen from wild-type mice (top plots) and IL-33-deficient mice (bottom plots) before IR (T0) and after 1 hour of reperfusion (IR 1h).

Recipient characteristics	n=21
Recipient age (years)	55 (±2.2)
MELD score	18.2 (±2.4)
Indication for LT :	
Hepatocellular carcinoma	1 (5%)
Alcoholic liver disease	14 (67%)
Hepatitis C	3 (14%)
Other	3 (14%)
Donor and LT characteristics	
Donor age (years)	50.2 (±4.5)
Extended criteria grafts*	10 (48%)
Cold Ischemia time (min)	370 (±24)
Temporary portocaval shunt	10 (48%)
Outcomes	
Ischemia-reperfusion syndrome	8 (38%)
MEAF score	5.2 (±0.3)
Primary non function	0 (0%)
Clavien-Dindo ≥ 3	0 (0%)
Length of stay (days)	8 (±1)
Acute kidney injury requiring dialysis	1 (5%)
1-y graft survival rate	21 (100%)

Supplementary Table 1: Baseline demographic, related outcome measures, and clinical information of the study group of LT patients (n=21). Qualitative variables are expressed as absolute numbers and %. Quantitative variables are expressed as (mean±SEM). MELD, model for end-stage liver disease; MEAF, Model for early allograft function. *Extended criteria for liver grafts according to Eurotransplant definition : donor age >65 years, intensive care unit stay with ventilation >7 days, body mass index >30 kg/m2, steatotic liver >40%, serum sodium >165 mmol/L, AST >105 UI/L, ALT >90 UI/L, serum bilirubin >3 mg/dL, donation after circulatory death.

Antibodies/Reagents	*Conjugate*	*Specificity*	*Provider*	*Clone*
Anti-pan TCRγδ	BUV661	Human	BD biosciences	11f2
Anti-TCR Vα24-Jα18	BUV805	Human	BD biosciences	6B11
5-OP-RU MR1 tetramer	APC	Human	NIH	
Anti-CD161	BV480	Human	BD biosciences	HP-3G10
Anti-CD69	BV750	Human	BioLegend	FN50
Anti-CD3	Spark550	Human	BioLegend	SK7
Anti CD4	cFluor YG584	Human	Cytek	SK3
Anti CD8	APC-Fire810	Human	BioLegend	SK1
Live/dead	blue	Human	Thermo Fischer	
Zombie NIR fixable kit	APC-Cy7	Mouse	BioLegend	
Anti-CD45	Alexa Fluor 488	Mouse	BioLegend	30-F11
Anti-TCRαβ	PerCpCy5.5	Mouse	BioLegend	H57
PBS57 CD1d tetramer	PE	Mouse	NIH tetramer Core Facility	
Anti-CD69	BV421	Mouse	BD biosciences	H1.2F3
Anti-CDllb	PE	Mouse	BioLegend	M1/70
Anti-GR-1	BV421	Mouse	BioLegend	RB6-8C5

Supplementary Table 2. List of conjugated antibodies and reagents for flow cytometry in human and mouse immune cells.

MANUSCRIT N°2

Severity of hepatic IR injury is associated with early systemic release of nuclear amphiregulin by suffering hepatocytes and predicts dysfunction after liver transplantation

Romain Bost , Aurélie Robin , Amélie Pioch , Estelle Lemarie , Louise Barbier , Ephrem Salamé , Luc Pellerin , Jean-Marc Gombert , et André Herbelin

Ce manuscrit s'inscrit dans le second objectif général de cette thèse, celui de mettre en évidence un axe réparateur IL-33/AREG/LT au décours de l'IR hépatique. Sur la base de la littérature, nous avons d'abord postulé l'existence d'une mise en jeu de l'AREG au cours et/ou au décours immédiat de la séquence d'IR, ceci en analysant l'expression et la libération locale et systémique de l'AREG et son possible lien avec le statut fonctionnel du greffon.

Pour atteindre cet objectif, une étude observationnelle a été menée à partir de la même bio-collection de patients que celle utilisée dans le Manuscrit n°1 [226], ceci en mesurant l'AREG systémique avant et jusqu'à trois jours suivant la TH. Un modèle murin d'IR hépatique a été utilisé pour interpréter les observations faites sur la cohorte humaine et identifier au sein du foie, la source cellulaire principale d'AREG dont la libération extra-cellulaire est déclenchée par la séquence d'IR hépatique.

Comme illustré dans le schéma récapitulatif de la Figure 24, cette partie de ma thèse a permis de proposer l'existence d'une source constitutive d'AREG par les hépatocytes, laquelle est libérée dans le milieu extracellulaire suite à la souffrance hépatocytaire induite par l'IR. Ces éléments nouveaux sous-jacents à l'inflammation stérile aiguë induite par la séquence d'IR hépatique posent les questions de la fonction protectrice ou délétère de ce relargage précoce de l'AREG et de son impact sur le système immunitaire. Cette dernière question a pu être abordée expérimentalement lors de ma thèse et les résultats obtenus qui sont encore préliminaires, seront décrits et interprétés dans la partie « Discussion Générale et Perspectives ».

A ce jour, l'article scientifique est en cours de finalisation et sera soumis prochainement dans la revue d'hépatologie : Journal of Hepatology reports.

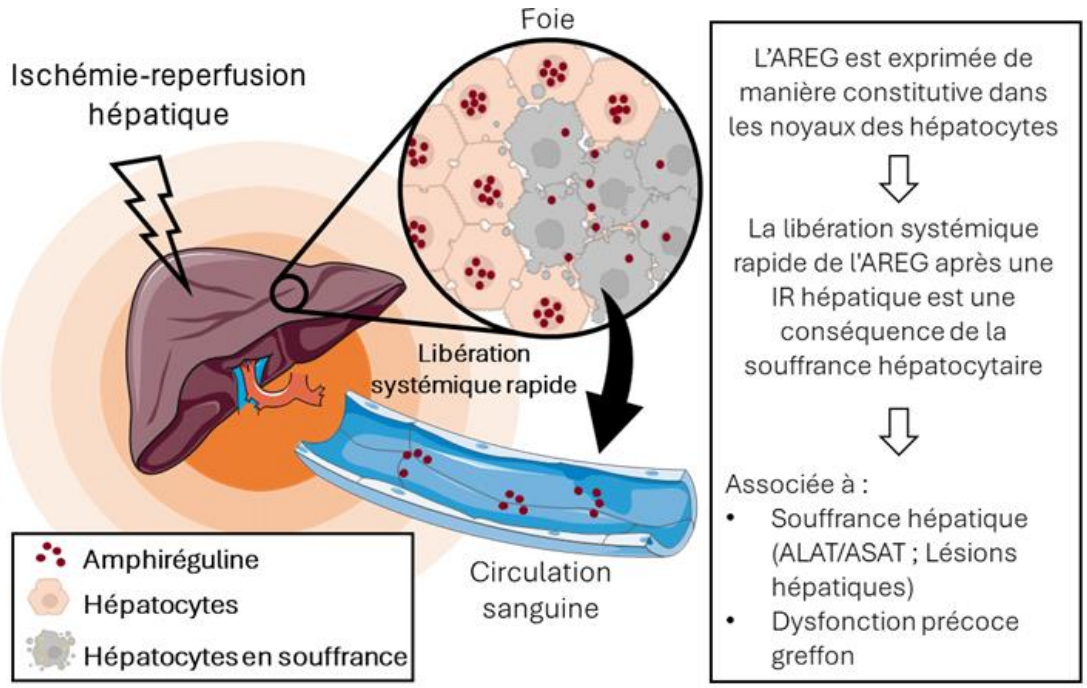


Figure 24 : Schéma récapitulatif des principaux résultats du Manuscrit n°2. BioRender et Servier Medical Art *[9,108]*

Introduction

Liver transplantation (LT) is the treatment of choice for patients with end-stage liver disease. However, this procedure is intrinsically associated with ischaemia-reperfusion (IR) syndrome, a complex phenomenon that impacts graft survival and recovery of liver function. However, many of the cellular and molecular pathways governing IR in liver transplantation remain poorly described. A priority area of research in organ transplantation is therefore to gain a better understanding of the factors that influence the survival, function and regeneration of graft tissues, leading to the use of new biomarkers for diagnosis and monitoring, as well as new therapeutic targets.

To date, non-invasive tests in LT exist to assess the suffering and post operative liver dysfunction, the Model for Early Allograft Function (MEAF) score [1] or, more recently the Liver Graft Assessment Following Transplantation (L-GrAFT) risk model [2]. These scores, which play an essential role in the management of liver transplant patients, are based on several biomarkers and clinical factors to reflect impairment of liver function. However, these tools have limitations, such as the fact that the scores are based on data taken over several days and may not perfectly reflect liver damage. In this context, the development of new biomarkers is proving crucial in order to gain a better understanding of pathophysiological processes, detect rapidly graft suffering and dysfunction, and refine and individualise the prediction of post-transplant complications.

Among the mediators involved in IR, cytokines play a key role as early players in inflammatory and reparative processes, making them potential candidates for predictive biomarkers [3]. Amphiregulin (AREG), a member of the epidermal growth factor family, is recognized for its dual role in immunity and tissue repair [4–6]. It is known to exert immune-regulatory effects on regulatory T lymphocytes (Tregs), which express its receptor, the epidermal growth factor receptor (EGFR) [5,7–9]. In addition, AREG can also be produced by Tregs themselves, contributing to their protective and reparative functions [7,10]. This mechanism positions AREG as a key mediator in maintaining immune balance and promoting tissue recovery.

AREG has been described in various pathological contexts, particularly in chronic liver diseases, where it appears to play a deleterious role by promoting the survival of malignant cells [11–13] or inducing significant fibrosis, ultimately impairing organ function [14,15]. Although AREG has been detected in the blood of patients with chronic liver diseases [16,17], its release and specific role in the acute setting of LT-related IR have, to our knowledge, never been investigated. Understanding its contribution in this context could provide new insights into the mechanisms of immune modulation and tissue repair during IR.

We hypothesized that AREG could be induced by the IR sequence and released in proportion to the severity of the IR syndrome during LT. To this aim, we decided to analyse the kinetics of systemic AREG release, its possible intrahepatic source, and its possible links with liver injury and graft function in a biological cohort of LT patients and in a mouse model of hepatic IR. Taken together, these data open up a new avenue of research for AREG as a potential early mediator of acute sterile inflammation and/or its resolution.

Materials and methods

Human samples

Human samples were obtained from a prospective biological collection of 40 patients with liver transplantation (LT). This cohort has already been used and described by Barbier *et al.* in a previous article (réf.). Recipients, donor characteristics, and outcomes of LT are detailed in Supplementary Table 1. who were included at the Transplant Unit of the University Hospital of Tours between July 1, 2017 and June 2, 2019 (Table S1). Healthy donor adult samples (mean age 36±10 years) (n =15) without liver disease were obtained from the French Blood Institute (Etablissement Français du Sang, Lyon, France). This study was approved by a regional ethics committee (comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale Tours-Région Centre-Ouest 1 under registration number DC-2016-2651) and by the French regulatory agency (Agence de la Biomédecine,

the national authority for organ procurement and transplantation in France, under registration number PFS16-005). Written informed consents were obtained for each patient and healthy donor according to the Declaration of Helsinki. All data were collected anonymously in a prospectively maintained database declared to the French Data Protection Authority. No potentially identifiable human images or data are presented in this study.Early allograft dysfunction was assessed by the model of early allograft function (MEAF) score defined by Pareja *et al.* in 2015 [1] (mathematical model based on bilirubinemia levels, International Normalized Ratio and ALT during the first three post-operative days, giving a continuous score ranging from 0 to 10). End-stage liver disease was assesed by the model for end-stage liver disease (MELD) score defined by Kamath *et al.*, in 2000 [18]. The human healthy liver biopsy was kindly provided by the anatomopathology department of Poitiers University Hospital.

Animal and Experimental model of warm IRI

All animal experiments were performed in compliance with the European Directive (2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific purposes and with the approval of the regional ethical committee (Comethea Poitou-Charentes, study approval #31776-202105211623478). Eight-to-twelve-week-old C57BL/6 male mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Food and water were available *ad libitum*.

The entire procedure of warm IR was adapted from the technique described by Abe *et al.* [19]. Briefly, mice received analgesia (buprenorphine 0.05 mg/kg, S.C) and were anesthetized with isoflurane inhalation. A pre-surgical local analgesia (lidocaine 7 mg/kg, I.D) was performed following vetedine disinfection of the abdomen. After midline laparotomy, a micro serre-fine was applied to the hepatic triad above the bifurcation to clamp the flow of the hepatic artery, portal vein and bile duct and saline solution was added to the abdominal cavity for hydration. After 70 min of ischemia, the micro serre-fine was removed and the peritoneum was sutured, and the surgical wound was closed before isoflurane cessation. Animals were killed by cervical dislocation at various time points after

the initiation of reperfusion, and blood was collected via retro-orbital bleed. Additionally, livers were perfused with PBS 1X to remove remaining blood, and left liver lobes were collected.

Human serum and mouse plasma collection

For human samples, serum was isolated from peripheral blood of healthy subjects (n=15) and LT patients at D0 (n=40), at graft reperfusion (GR: just after unclamping of the caval and portal anastomoses, usually around 3-4 hours after the beginning of the procedure, and at EoT. Blood was collected and after centrifugation (10 minutes, 2000g), serum samples were stored at -80°C at the Centre de Ressource Biologique Santé of Tours (BB-0033-00013).

For mouse samples, blood was collected before (D0) (n=46), or after 70 minutes of ischemia (H0) (n=6) and 1 (n=22), 4 (n=9) and 8 (n=5) hours (H), 1 (n=18) ,3 (n=15),7 (n=5),15 (n=16) days (D) of reperfusion via retro-orbital bleed and after centrifugation (10 minutes, 2000g), plasma samples were collected and stored at -20°C. Same procedure have been applied for control SHAM mice (n=17).

Isolation, culture and treatment of primary mouse hepatocytes

The first step of hepatocytes isolation was based on the perfusion technique developed by Miltenyi Biotec, according to the manufacturer's instructions. A 8-14 week-old C57BL/6 mouse was sacrified and the left lateral lobe was gently dissected and placed in a gentleMACS™ Perfusers (Miltenyi Biotec™) tube. The perfusion of mouse liver was performed on the gentleMACS™ Octo Dissociator with Heaters (Miltenyi Biotec) equipped with gentleMACS™ Perfusion Sleeves in combination with gentleMACS™ Perfusers. The liver tissue was enzymatically digested using the components of the Liver Perfusion Kit (Miltenyi Biotec). Afterwards, single cells were liberated from the tissue by a short mechanical disruption of the perfused tissue using the gentleMACS™ Octo Dissociator with

Heaters and a gentleMACS™ C Tube (Miltenyi Biotec). The cell suspension was filtered through a 100 µm-strainer (Corning) in a sterile 50 ml conical tube on ice. Hepatocytes were collected by a low-spin centrifugation (40 g for 5 min at 4°C) after removed the supernatant and resuspended the cells pellet gently in 1X Phosphate-buffered saline (PBS).

In the second step, cells were immediately processed for hepatocytes culture. Isolated primary mouse hepatocytes (PMH) were enumerated and seeded with required number of cells into an appropriate culture dish (Corning) and in a x-well® cell culture chambers (Sarstedt) in Dulbecco's Modified Eagle Medium//F-12 (DMEM:F12; 1:1) medium (Gibco™) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco™) and 1% penicillin and streptomycin (Gibco™). The cells were incubated at 37°C in a 5% CO_2 humidified incubator and the medium was replaced after 4 hours with HepatoZYME-SFM medium (Gibco™) supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco™) and 1% penicillin and streptomycin (Gibco™). Culture of PMH in x-well® cell culture chambers were harvested 24h after for immune-cytofluorescence staining.

Treatments were performed the day after hepatocyte isolation and culture in Collagen 12-well culture plate (Corning Biocoat) in the absence of serum. Cells were treated with Lipopolysaccharides (LPS) (Sigma-Aldrich) (1µg/ml) during 24h, before determination of AREG levels in the culture medium.

HepG2 culture

The human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines HepG2 were enumerated and seeded with required number of cells into a x-well® cell culture chambers (Sarstedt) in Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (Gibco™) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Gibco™), 1% GlutaMax (Gibco™) and 1% penicillin and streptomycin (Gibco™). Cultures of HEPG2 were harvested 48h after for immune-cytofluorescence staining.

Measurement of Amphiregulin

Amphiregulin concentration in patient serum, in mouse plasma and in cell culture were analysed using ELISA Quantikine and DuoSets kits (Bio-Techne) and the Multiskan Spectrum plate reader (Thermo Labsystems) according to the manufacturer's protocol (Bio-Techne).

Measurement of Alanine Aminotransferase and Aspartate Aminotransferase in serum and plasma

Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST) were measured using the ALT/GPT and AST/GOT kits (Roche Diagnotic) with a Cobas C701 automatic analyzer (Roche Diagnostic) according to the manufacturer's instruction.

Immunocytofluorescence

Primary mouse hepatocytes and HepG2 cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min. For HepG2 cells, an additional permeabilization step was performed in 1X PBS supplemented with 0.3% triton and 0.3% saponin for 10 minutes. Afterwards, cells were incubated with 1% fetal bovine serum (SVF) and immune-labeled with primary antibodies for 2h. After washing, the sections were incubated with secondary antibodies for 1h. After washing, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used in the mounting medium (Invitrogen) to stain the cell nuclei.

Paraffin tissue section

Murine and resected human liver tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature and embedded in paraffin, and serially sectioned at 3 µm using a cutting microtome (CM3050S- LEICA). Deparaffinization, following rehydratation and antigen retrieval (SignalStain®Citrate or SignalStain®EDTA Unmasking

Solution (Cell signaling)) were done on the slides. A permeabilization step was performed in 1X PBS supplemented with 0.3% triton and 0.3% saponin for 10 minutes before immunofluorescence staining.

Frozen tissue section

Fresh ischemia-reperfusion murine hepatic lobes were frozen in Cryomatrix (Thermo Scientific) and stored at -80°C. Tissues were cut into 10-μm thick sections using a cryostat on glass slides and stored at -20°C. Before immunofluorescence staining, the sections were immersed in cold acetone for 10 min.

Histology and quantification of hepatic Injury after Hepatic IR

For histological analysis, the murine liver sections in paraffin were stained with hematoxylin and eosin. Percentage of IR area injury was quantified with the QuPATH software. Briefly, for liver cross-sections from mice that had undergone IR, the sections to be analysed were automatically delineated by the software. The lesion areas were automatically determined by the HES staining positivity threshold (positive staining threshold determined on the basis of healthy areas). The μm^2 of each injured area was extracted and the ratio of the area of the lesioned areas to the total area of the sections was calculated to determine the percentage of lesioned areas.

Immunofluorescence (IF) staining

Cryo-conserved and paraffin sections were incubated with 1% fetal bovine serum (SVF) before being immune-labeled with primary antibodies at 4°C overnight. After that, the sections were incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. After washing, DAPI was used in the mounting medium (Invitrogen) to stain the cell nuclei.

All antibodies for IF staining are provided in Table 1.

Name	Supplier	Cat n°	Isotype
Anti-mouse/human amphiregulin	AbClonal	A1860	Rabbit
Anti-human albumin	Proteintech	66051	Goat
Anti-mouse albumin	Biorbyt	orb15518949	Goat
Anti-Rabbit Alexa Fluor 568	Invitrogen	A10042	Donkey
Anti-Goat Alexa Fluor 488	Invitrogen	A110055	Donkey

Immunofluorescence analysis

Images were analysed using a confocal microscopy (Olympus FV3000) or with a slide scanner (Olympus VS200) and OlyVIA software. Quantification of fluorescent amphiregulin in cell nuclei was performed with the QuPATH software. Briefly, over an area of 2500µmx2500µm (representing an average of 30,000 cells), healthy and injured areas were determined manually. Automated detection of nuclei in each area was performed based on DAPI expression. The positivity threshold for nuclear AREG expression was then determined from the mean fluorescence intensity (MFI) (MFI determined by the software on cells manually designated as positive and negative). This positivity threshold was used to automatically measure the percentage of AREG-positive nuclei in each zone.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 10 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla) and are indicated in the figure legends. Data shown were presented in mean ± standard error of the mean (SEM). For human samples, comparison between multiple groups of continuous variables was conducted using the ANOVA test due to parametric distributions, while a Mann-Whitney U test for non-parametric distributions for

a comparison between two independent groups. For mouse samples, due to non-parametric distributions and non-continuous variables, comparison between multiple groups was conducted using the Kruskal-Wallis test, and a Mann-Whitney U test was performed between two groups. For the assessment of correlations between biological and clinical data with AREG systemic levels, we used Pearson's correlation for parametric distributions and Spearman's correlation for non-parametric distributions. A $p<0.05$ was considered statistically significant.

Results

Serum AREG levels are significantly higher in pre-transplant patients than in healthy donors, and are positively correlated with disease severity and short-term fate of the diseased liver

It has been documented that serum AREG levels can be elevated in patients with chronic liver diseases such as cirrhosis [16] and hepatocarcinoma [17], two of the main indications for LT. In line with these data, in our pilot cohort of 40 LT patients (whose baseline characteristics and LT procedure are described in Supplementary Table, pre-transplant (D0) serum AREG levels (Figure 1A, left panel) were significantly higher, as compared to healthy donors whose levels were nil or virtually absent. Furthermore, serum AREG levels at D0 were closely associated with the MELD (for "model for end-stage liver disease") score, which assesses disease severity and predicts vital prognosis at three months. Indeed, at D0, patients with a MELD score above 13 had serum AREG levels almost 7-fold higher than patients with a MELD score below 13 (Figure 1A, right panel), while a positive correlation between serum AREG levels at D0 and MELD score was demonstrated ($r=0.59$; $p<0.0001$) (Figure 1B).

Overall, our data confirm the existence of systemic AREG release in chronic liver disease, and show that this release is closely associated with both disease severity and the short-term fate of the diseased liver.

Systemic AREG release is induced during LT

We then used the same cohort to investigate possible AREG release during LT and on the first and the third day thereafter (Figure 2). Kinetic analysis indicated that serum AREG levels were increased immediately after reperfusion (nearly 5-fold higher than at D0; p=0.0005) with a peak at the end of LT (6.6-fold higher than at D0; p=<0.0001), before returning to basal levels on day 3 post-LT. Notably, there was no association between high or low MELD score and AREG levels measured immediately after reperfusion and at the end of LT (Supplementary Figure 1). This suggests that diseases associated with end-stage liver failure do not influence AREG release during LT.

Early systemic AREG release during LT is specifically linked to the IR sequence

To determine whether early systemic AREG release was a consequence of graft IR rather than tissue attrition, we used a mouse model of warm hepatic IR, comparing mice that had undergone an IR sequence with control mice that had undergone a laparotomy without an IR sequence (Figure 3).

Similar to the phenomenon observed in LT patients, AREG levels in mouse plasma showed a dramatic increase as soon as reperfusion (75.6-fold higher at de-clamping than at D0) with a peak 1 hour after reperfusion (125.4-fold higher than at D0; p=<0.0001), before returning to basal levels between 8 hours and 1 day after IR. In contrast, SHAM mice that had not undergone hepatic pedicle clamping showed no increase in plasma AREG levels, demonstrating that this effect is indeed a consequence of hepatic pedicle clamping rather than tissue attrition in mice.

These data obtained in mice suggest that the early increase in circulating AREG levels observed in patients is due to the IR sequence applied to the liver during LT.

Early release of AREG in response to the IR sequence is closely associated with hepatic suffering and severity of liver damage

To determine whether there was a possible relationship between AREG release and liver injury in response to the IR sequence, we first decided, both in LT patients and in our mouse model of liver IR, to compare the kinetics of systemic AREG release with those of the aminotransferases, alanine aminotransferase (ALT) (Figure 4) and aspartate aminotransferase (AST) (Supplementary Figure 2), two major markers of hepatocyte injury.

In LT patients, there was a significant increase in serum ALAT (Figure 4A) and ASAT (Supplementary Figure 2A) levels from the end of reperfusion (7.7-fold higher ($p=0.0074$) and 9.8-fold higher ($p=0.0005$) vs. D0 for ALAT and ASAT, respectively) peaking at the end of LT (12.4-fold higher ($p<0.0001$) and 18.29-fold higher ($p<0.0001$) vs. D0 for ALAT and ASAT, respectively), i.e. kinetics similar to those obtained with circulating AREG (Figure 2). Moreover, there was a positive correlation between peak systemic aminotransferases and AREG at the end of transplantation ($r=0.58$ ($p=<0.0001$) and $r=0.68$ ($p<0.0001$) for ALAT and ASAT, respectively) (Figure 4B).

This phenomenon also occurred in the mouse model of IR with systemic aminotransferase release peaking 1 hour after liver reperfusion (94.4-fold higher ($p=<0.0001$) and 29.3-fold higher ($p=<0.0001$) vs. D0 for ALAT (Figure 4C) and ASAT (Supplementary Figure 2C), respectively), and also correlating with the peak release of systemic AREG at the same time point ($r=0.68$ ($p= 0.0164$) and $r=0.72$ ($p= <0.0092$) for ALAT (Figure 4D) and ASAT (Supplementary Figure 2D), respectively).

According to the notion that AREG release during LT results from hepatocyte cell stress/death, AREG serum level was closely associated with tissue lesions (Figure 5A). Indeed, at the end of LT, patients with a moderate to severe hepatocellular injury had a

serum AREG level 1.8 times higher (p=0.0189) than patients with no to mild hepatocellular injury. Similarly, in the mouse IR model, a positive correlation was observed one-hour post-reperfusion between serum AREG levels and percentages of injury area on histological liver sections (Figure 5 B).

Hepatocytes constitutively express AREG in situ and are capable of releasing it in cell culture.

The concomitance of AREG release and hepatocyte suffering raises the question of whether hepatocytes themselves can serve as a cellular source of released AREG during IR.

To test this hypothesis, we conducted immunofluorescence analyses on liver tissue obtained from healthy donors (Figure 6A; for control staining, see Supplementary Figure 3A) and unmanipulated mice (Figure 6B; for control staining, see Supplementary Figure 3B). In both human and mouse liver sections, immunofluorescence staining revealed a constitutive expression of AREG, predominantly localized in the nucleus (as evidenced by the superposition of AREG labelling with DAPI labelling that was used for the identification of nuclei) of hepatic cells. Co-labelling with albumin, a hepatocyte-specific marker, demonstrated that AREG was abundantly expressed within hepatocyte nuclei, as attested by the full overlap of AREG and DAPI labelling in albumin-expressing cells. Of note, constitutive nuclear expression of AREG was also shown in the human hepatocyte cell line HepG2 (Figure 6C; for control staining, see Supplementary Figure 3C) as well as in primary murine hepatocytes (Figure 6D; for control staining, see Supplementary Figure 3D), which was accompanied by AREG release into culture supernatants under basal conditions (Supplementary Figure 4A). Overall, short-term treatment of primary murine hepatocytes in culture with lipopolysaccharide resulted in increased AREG release into the culture medium, implying that hepatocytes respond under stress conditions by increasing their AREG release (Supplementary Figure 4A).

Systemic AREG in response to IR is closely associated with its loss from suffering tissues

To evaluate whether release of AREG into the circulation in response to the IR sequence could results from suffering tissues due to loss of hepatocyte integrity, we compared immunofluorescence staining of AREG in liver sections from unmanipulated (T0), 1-hour post-IR, and 1-hour post-laparotomy (SHAM) operated animals (Figure 7; for control staining, see Supplementary Figure 5).

As depicted in Figure 7A, mice subjected to ischaemia followed by one hour of reperfusion, (Figure 7A, right column), displayed a notable reduction in nuclear expression of AREG in liver cells (right column - Fig. 7A and control in Supp. Fig. 5A), as compared to both SHAM-operated and unmanipulated animals (T0) (left and middle columns - Fig. 7A and control in Supp. Fig. 5A). Importantly, the decrease in nuclear expression of AREG in 1-hour post-IR mice was concentrated in areas of injury (Fig. 7B and control in Supp. Fig. 5B), as attested by our quantification analysis indicating that nuclear AREG was expressed 3.93-fold less ($p=0.0006$) in living hepatic cells from injured areas compared to those from healthy areas (Figure 7C).

This loss of AREG expression in 1-hour post-IR, but not in SHAM operated mice, coinciding with the systemic peak of AREG, supports our hypothesis that AREG is released into the circulation following stress and/or loss of integrity of hepatocyte in response to the IR sequence.

Early release of AREG is associated with early graft dysfunction in LT

Lastly, we investigated whether early AREG release could be a relevant functional marker associated with cardinal features of early liver injury-associated disorders as observe before LT in Fig.1 (Fig. 8).

Considering graft function, patients with a MEAF score>6 showed higher levels of serum AREG after reperfusion than patients with a MEAF score≤6 (1.91-fold higher; $p=0.0247$) (Fig. 8B). Moreover, a positive correlation was observed between systemic AREG

at EoT and MEAF in LT patients (r=0.48; p=0.0015) (Fig. 8C), while an ROC curve showed that the optimal serum AREG threshold associated with a MEAF score >6 was 233.2 pg/ml, with a specificity of 46.43% and sensitivity of 90.91% (determined by calculation of the Youden index), with an area under the curve of 0.74 and a p-value of 0.0192 (Fig. 8D). Furthermore, serum levels of AREG at EoT were significantly higher in patients with intra-operative postreperfusion syndrome (2.02-fold higher vs. patients without intra-operative postreperfusion syndrome; p=0.0098) (Supp. Fig. 6A).

On opposite, no correlation was observed between AREG serum levels and the duration of ischemia (r=-0.03; p=0.81) or microvascular steatosis (r=-0.12; p=0.46) (data no shown). Lastly, no difference in serum AREG levels at EoT was observed between groups of patients with regard to renal failure (p=0.276) (Supp. Fig. 6B) or acute kidney injury (p=0.182) (Supp. Fig. 6B).

Taken together, these data show that the release of AREG is directly linked to an early loss of graft function after LT.

Discussion

Our study highlights new findings regarding the involvement of AREG in hepatic IR. We demonstrated an early systemic release of AREG following hepatic stress induced by IR, predominantly originating from injured hepatocytes that constitutively express this protein at the nuclear level. These results position AREG as an early biomarker of hepatic injury and dysfunction following LT.

For the first time, early systemic AREG release was observed during LT, regardless of their pre-existing pathology. These observations, reproduced in a murine model of hepatic IR, establish a direct link between IR and AREG release. Our pre-LT data also align with findings from chronic liver diseases, where AREG is detected in circulation in patients with end stage liver diseases [16,17], thereby reflecting the chronic inflammatory state.

The strong correlations between systemic AREG concentrations, hepatic injury markers (ALT, AST), and hepatic dysfunction scores (MELD, MEAF) reinforced the hypothesis of a hepatocyte origin, where hepatocytes are the liver's primary functional epithelial cells. This hypothesis was confirmed through immunofluorescence, which revealed constitutive nuclear expression of AREG in human and murine hepatocytes, including bi- and tri-nucleated cells. Although other epithelial cells have been reported to express constitutive AREG [20,21], limited evidence had previously identified this expression in hepatocytes [14], and its localization had not been clarified. The presence of a nuclear localization signal (NLS) on AREG protein might explain this specificity [22], although the function of this nuclear pool remains uncertain.

Our findings suggest that this nuclear pool might serve as a mobilizable reservoir under conditions of cellular stress. The decrease in nuclear AREG expression in hepatic lesion zones, correlated with systemic AREG peaks, provides insights into the potential role of this protein in the hepatic stress response, particularly in an organ frequently subjected to diverse forms of aggression. Notably, we cannot exclude a partial contribution of de novo synthesis, as suggested by data describing early transcriptional induction of AREG following partial hepatectomy [16] or liver transplantation in mice [23].

Although our study does not establish whether AREG plays a protective or deleterious role in hepatic IR, several hypotheses emerge. AREG, which distinguishes itself from other members of the EGF family by its potential to induce cellular differentiation [24], could play a role in hepatocyte proliferation or progenitor cell activation to promote rapid regeneration of the injured liver. Furthermore, AREG may modulate the activity of Tregs, which are known to express its receptor [7,8]. Our preliminary data suggest a correlation between post-LT systemic AREG peaks and Treg activation, aligning with a recent study by Sabapathy *et al*. on the IL-33/Treg axis in renal IR protection [25]. That study demonstrated that, in vivo, supplementation with AREG alone induced reparative Treg functions and reduced hypoxia-induced lesions in renal organoids co-cultured with IL-33 receptor-deficient Tregs. These observations, supported by our preliminary data and existing

literature, suggest that, in addition to signaling injury, AREG could exhibit immuno-alert properties, initiating a response geared toward repair and regulation.

Furthermore, we propose that nuclear AREG could act as an alarmin, a concept introduced by Oppenheim in 2006 [26] . Alarmins are proteins constitutively expressed and released upon cellular damage to alert the immune system and initiate tissue repair. This hypothesis is supported by AREG's systemic release kinetics, though further studies are needed to clarify its precise role in hepatic IR.

Regarding its potential as a systemic biomarker, AREG presents distinct and promising characteristics compared to IL-33 for early evaluation of hepatic status post-transplantation. In our previous work, we elucidated the role of IL-33 in the genesis of IR-induced injury, proposing it as a predictive biomarker of IR severity [27]. While IL-33 is rapidly released during reperfusion in response to endothelial stress induced by IR, its kinetics—marked by a rapid decline in circulating levels—and its lack of specificity for hepatocellular injury limit its direct clinical utility. In contrast, AREG, constitutively expressed by hepatocytes, directly reflects the distress of the liver's functional cells. The systemic release of AREG observed in our study thus serves as a direct and immediate marker of hepatocellular injury and overall liver function. AREG provides an additional advantage through its progressive kinetics, peaking at the end of the transplantation procedure. This allows for a more precise and extended assessment of graft status, facilitating immediate clinical interpretation at the end of the transplantation. Moreover, unlike IL-33, which is associated with systemic and extra-hepatic complications (notably renal dysfunction), AREG specifically reflects hepatic injury. This hepatocyte-specificity makes it a particularly relevant tool for distinguishing patients at risk of early graft dysfunction. Finally, due to its constitutive nuclear origin in hepatocytes, AREG enables an objective evaluation of early cellular distress directly linked to IR. Its kinetic profile and specificity for hepatocellular injury provide an immediate and integrated view of hepatic function post-reperfusion. This represents a significant asset for clinicians, allowing for better patient stratification and early adaptation of post-transplantation therapeutic strategies.

Our study positions AREG as a key biomarker of hepatic stress in liver transplantation. Its early and specific release by injured hepatocytes makes it a promising tool to evaluate IR-induced injury and predict graft function. Moreover, our findings on the source and release of AREG suggest unexplored underlying biological mechanisms. Its potential role as an alarmin and its interaction with Tregs open therapeutic avenues to mitigate IR injury and optimize grafted liver regeneration. Larger prospective studies and in-depth mechanistic investigations will be necessary to confirm these results and integrate AREG into multiparametric prognostic models.

Figures:

Figure 1

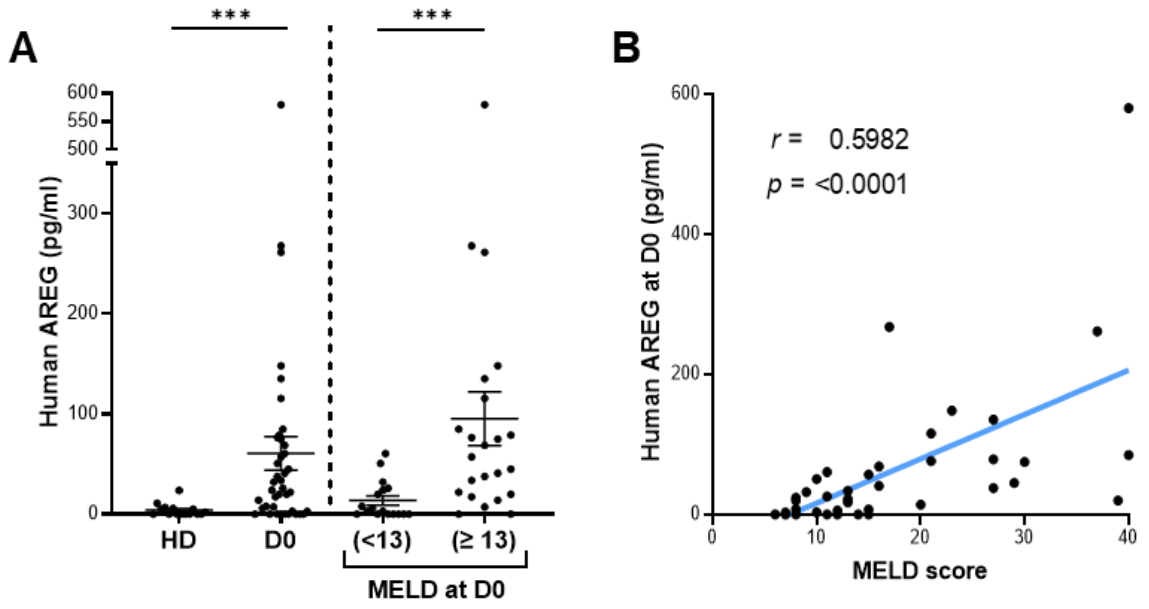


Figure 1. Serum AREG levels are detectable in pre-transplant patients and are positively correlated with end-stage liver diseases.

(A) Comparison of serum AREG levels (in pg/mL) between healthy donors (HD) (n=16) and patients awaiting transplantation (D0) (right panel) (n=40) or according to end-stage liver disease score (MELD) score (left panel) (MELD <13, n=17; MELD >13, n=23). Data are expressed as means ± SEM; ***p<0.001 (Mann-Whitney test). (B) Positive correlation between MELD scores and AREG serum levels in patients awaiting transplantation (D0). (n=40); Simple linear regression: r=0.5982; ***p<0.001 (Pearson test).

Figure 2

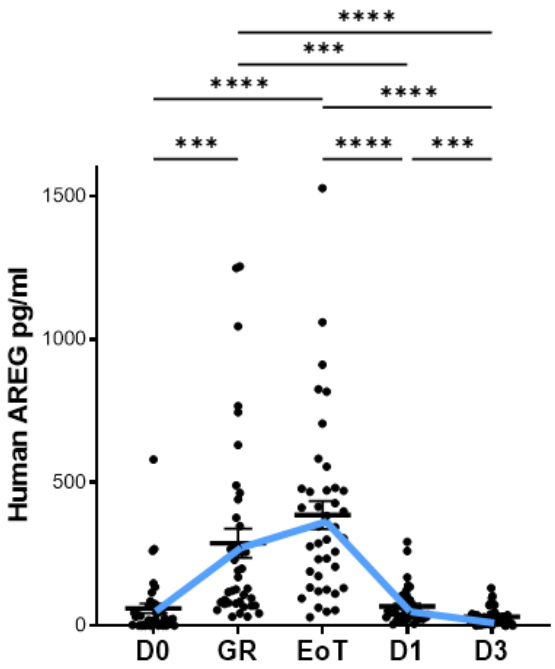


Figure 2. Serum AREG levels are early increased during LT.

Kinetics of serum AREG levels (in pg/mL) were measured in patients before LT (D0), at graft reperfusion (GR), at the end of LT (EoT), and 1 day (D1) and 3 days (D3) post-LT (n=40). Data are expressed as means ± SEM. ***p<0.001; ****p<0.0001 (ANOVA test).

Figure 3

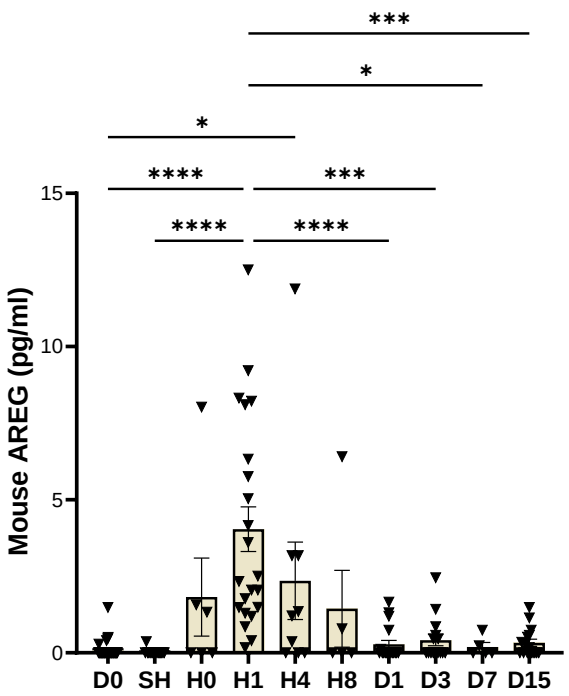


Figure 3. AREG is immediately released after liver reperfusion in mice

Plasma AREG levels (in pg/mL) were measured in mice before (D0) (n=46) or after 70 minutes of ischemia (H0) and 1, 4 and 8 hours (H), 1, 3, 7 and 15 days (D) of reperfusion (n=5-18). Laparotomy control mice (SH) were pooled (n=17). Data are expressed as means ± SEM. *p<0.05; **p<0.01; ****p<0.0001 (Kruskal-Wallis test).

Figure 4

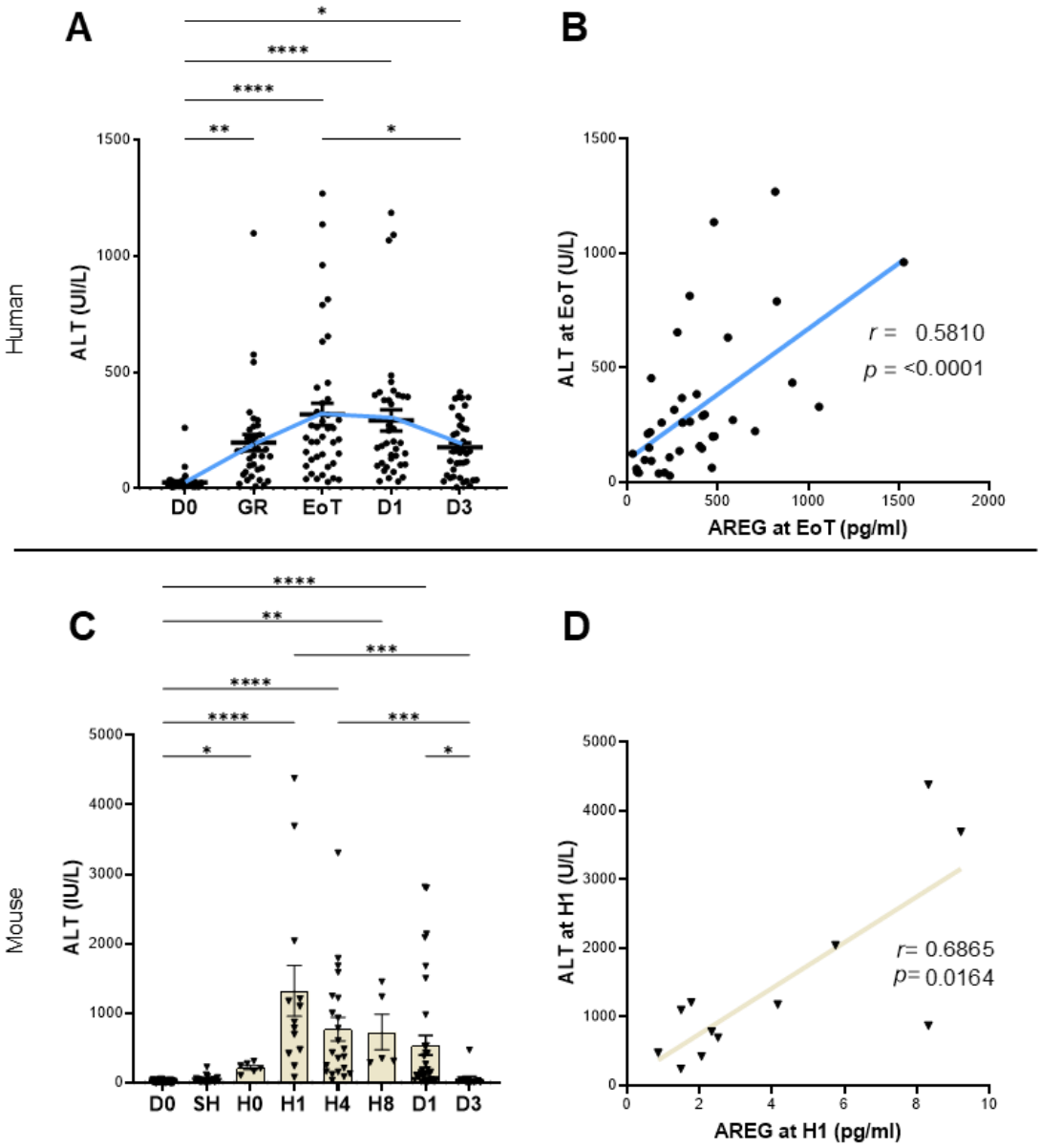


Figure 4. The increase in circulating AREG induced by LT in patients or hepatic IR in mice is closely associated with liver injury.

(A) Kinetics of serum ALAT levels (in U/L): before LT (D0), at graft reperfusion (GR), at the end of LT (EoT), and 1 day (D1) and 3 days (D3) post-LT (n=40). Data are expressed as means ± SEM; *p<0.05; **p<0.01; ****p<0.0001 (ANOVA test). (B) Positive correlation between ALAT (in U/L) and AREG levels (in pg/mL) (n=40) in serum from patients at EoT. Simple linear regression: r=0.5810; p<0.0001 (Pearson test). (C) Plasma AREG (in pg/mL) in mice, before (D0) (n=46) or after 70 minutes of ischemia (H0) and 1, 4 and 8 hours (H), 1 and 3 days (D) of reperfusion (n=5-31). Laparotomy control mice (SH) were pooled n=23). Data are expressed as means ± SEM; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 (Kruskal-Wallis test). (D) Positive correlation between plasma ALAT (in U/L) and serum AREG (in pg/mL) levels in mice at H1 (n=12); Simple linear regression: r=0.6865; p=0.0164 (Spearman test).

Figure 5

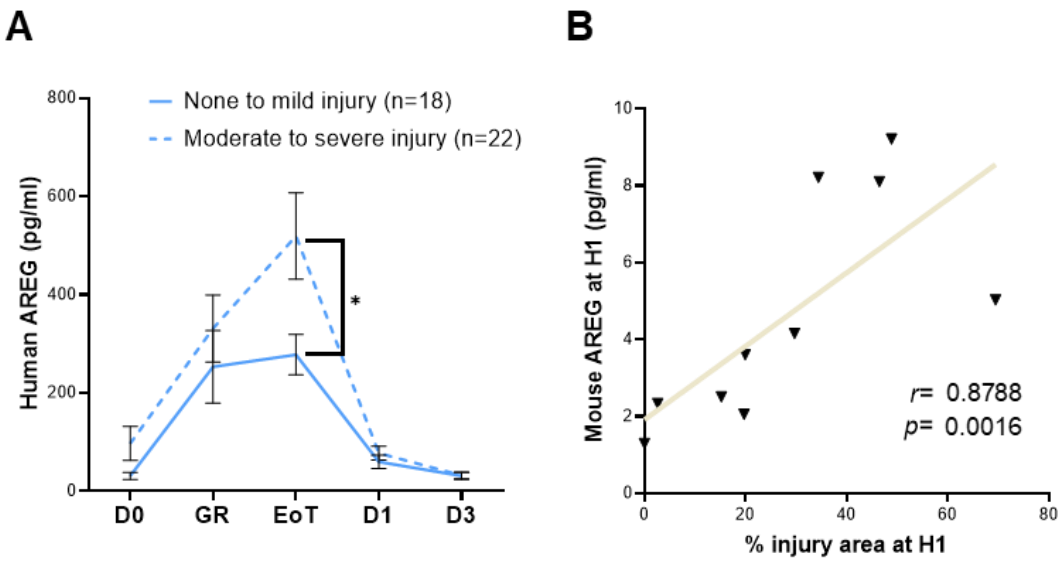


Figure 5. The increase in circulating AREG induced by LT in patients or hepatic IR in mice is closely associated with severity of hepatocyte damage

(A) Kinetics of serum AREG levels: before LT (D0), at graft reperfusion (GR) at the end of LT (EoT), and 1 day (D1) and 3 days (D3) post-LT according to hepatocyte suffering (absent/slight, n=22; moderate/severe, n=18); Data are expressed in means ± SEM. *p<0.05 (Mann-Whitney test). (B) Positive correlation between tissue injury (in percentage of area) and serum AREG (in pg/mL) levels 1 hour after liver reperfusion (n=10); Simple linear regression: r=0.8788; p<0.0016 (Spearman test).

Figure 6

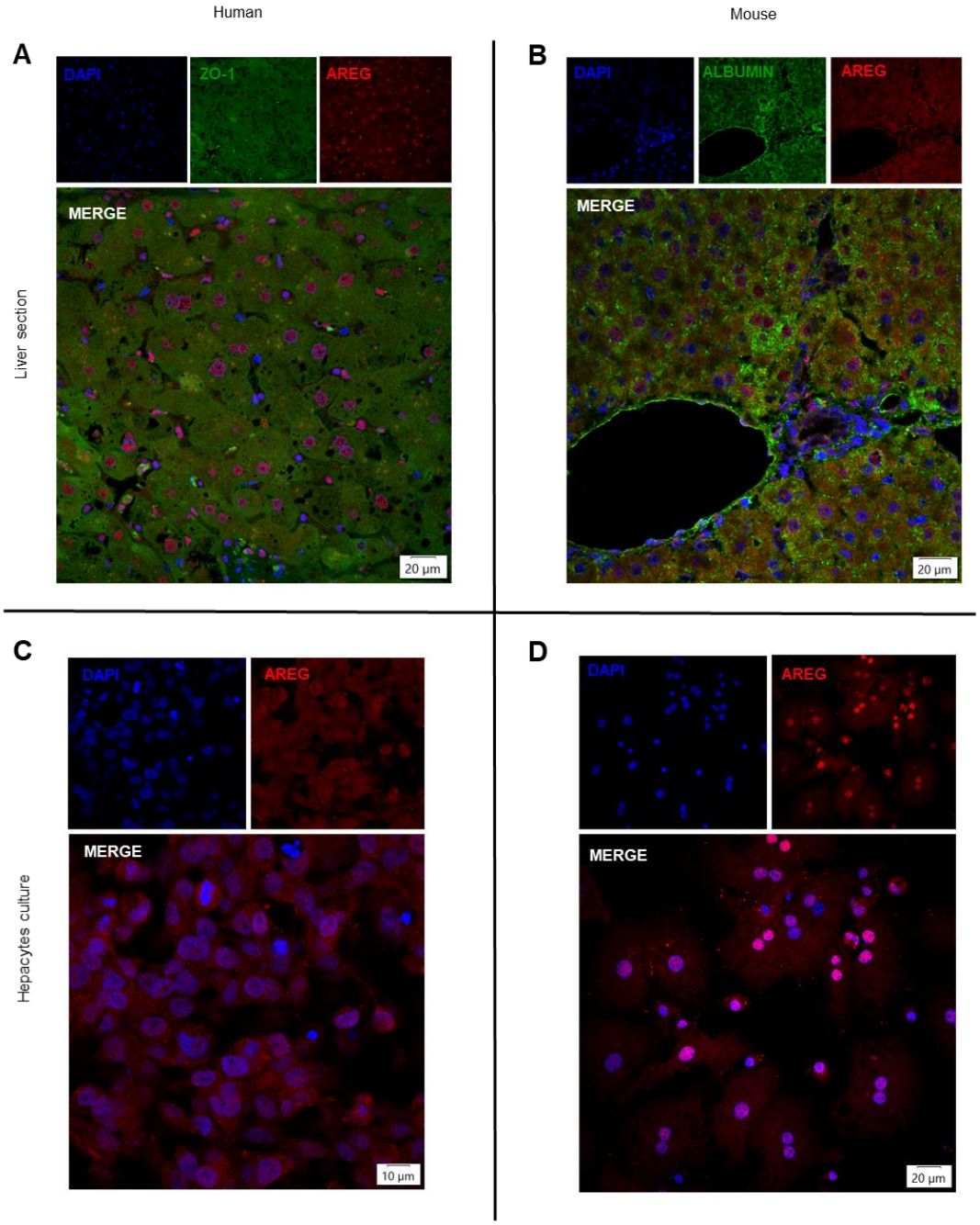


Figure 6. AREG is constitutively expressed in healthy liver and predominantly localized to hepatocytes nuclei.

Representative images of AREG staining in healty humans and unmanipulated mice liver sections **(A-B)**, and human and mouse hepatocytes in culture *in vitro* **(C-D)**. Scale bars represent 20 µm except for panel C (10 µm). **(A)** Human healthy liver sections were co-stained for AREG (red), Zo-1 (green) and DAPI (blue). **(B)** Mouse healthy liver sections were co-stained for AREG (red), albumin (green) and DAPI (blue). **(C)** HepG2 cells were co-stained for AREG (red) and DAPI (blue). **(D)** Mouse primary hepatocytes were co-stained for AREG (red), and DAPI (blue).

Figure 7

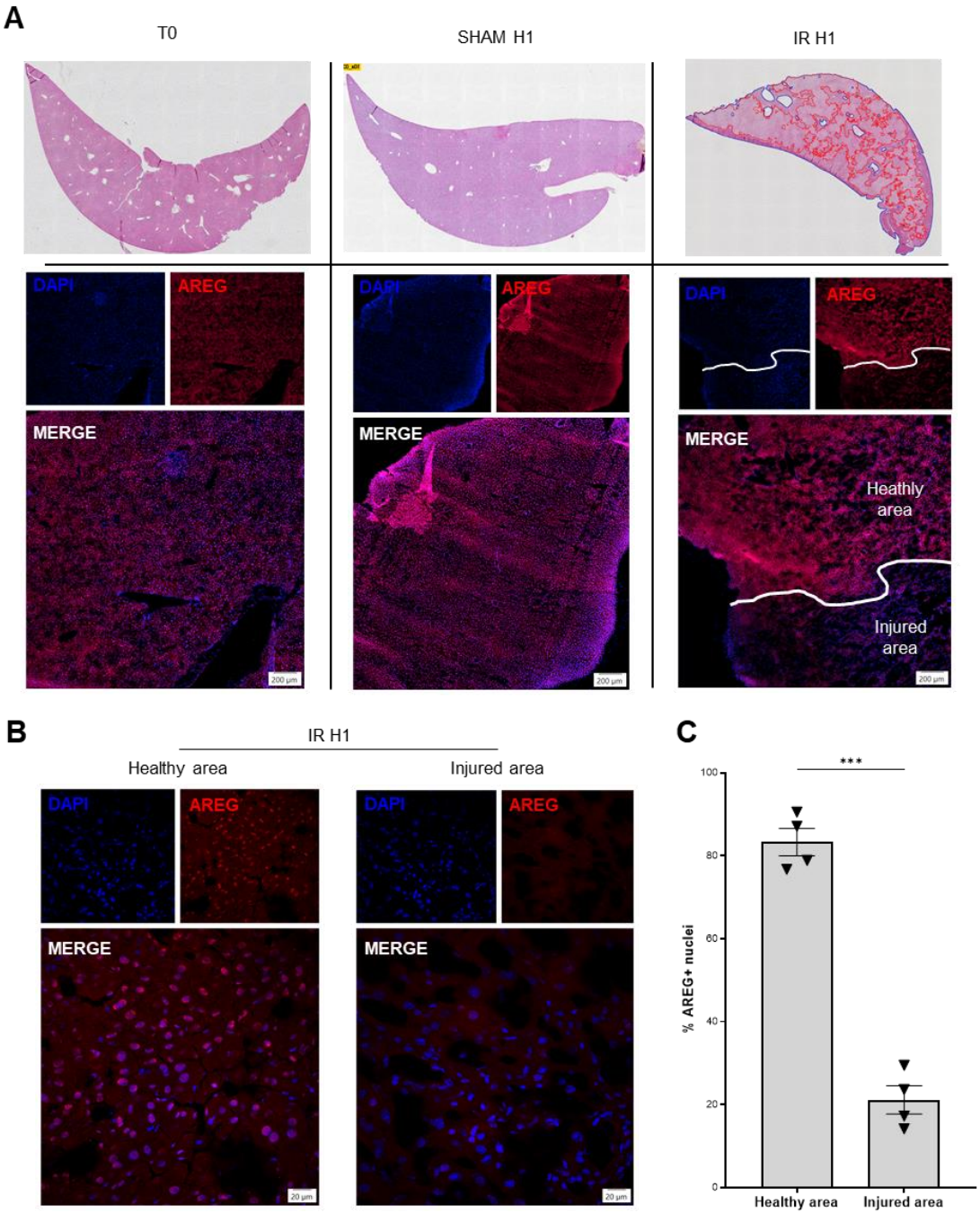


Figure 7. Suffering tissues following IR are characterized by a loss of constitutive nuclear AREG

(A) Representative mouse liver sections stained with H&E associated with immunofluorescence images (frozen liver or paraffin sections) obtained from unmanipulated mice (T0) or mice after one hour after laparotomy (SH H1), 1 hour after ischemia (IR H1) stained with AREG (red) and DAPI (blue). The white line shows the border of the injury area. Scale bars represent 200 µm (B) Comparative images of co-staining of AREG (red) and DAPI (blue) in healthy vs. injured area in mice after 1 hour of reperfusion. Scale bars represent 20 µm (C) Quantification of nuclear AREG in hepatic cells from healthy vs. injured area in mice after 1 hour of reperfusion. Data are expressed as means ± SEM.***p<0.001 (Paired t test).

Figure 8

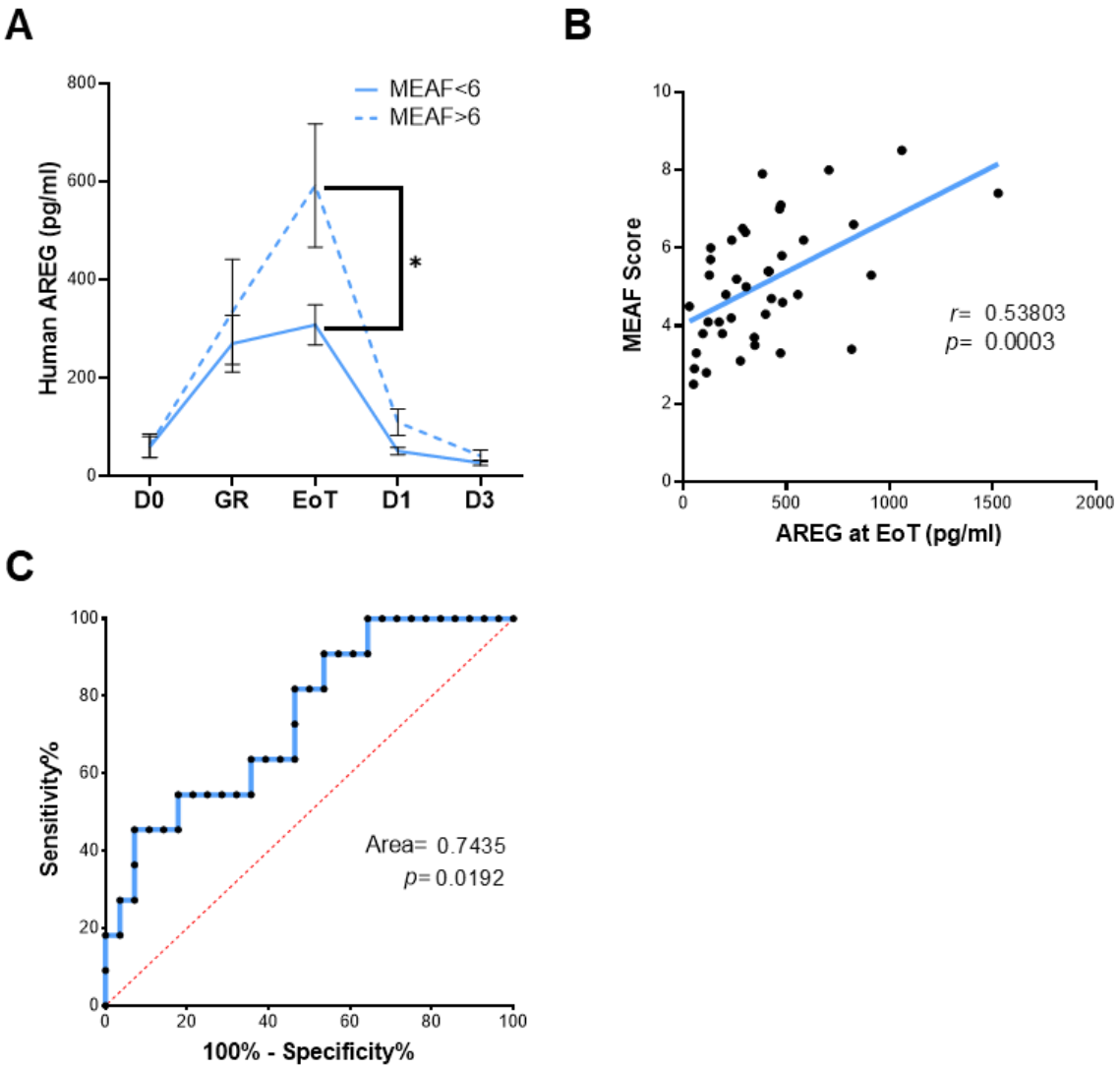
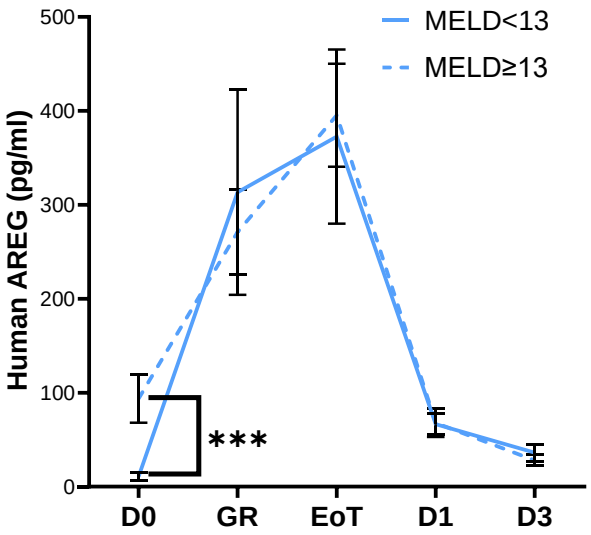


Figure 8. The increase in circulating AREG induced by LT is associated with early graft dysfunction.

(A) Kinetics of serum AREG levels (in pg/mL): before LT (D0), at graft reperfusion (GR), at the end of LT (EoT), and 1 day (D1) and 3 days (D3) post-LT according to the MEAF score (MEAF ≤6, n=29 vs. MEAF>6, n=11); Data are expressed as means ± SEM. *p<0.05 (Mann-Whitney test). (B) Positive correlation between MEAF scores and serum AREG levels (in pg/mL) (n=40) at EoT. Simple linear regression: r=0.53803. p=0.0003 (Pearson test). (C) ROC curve of serum AREG levels at EoT and MEAF score>6. Area under the ROC curve: 0.7435; p=0.0192.

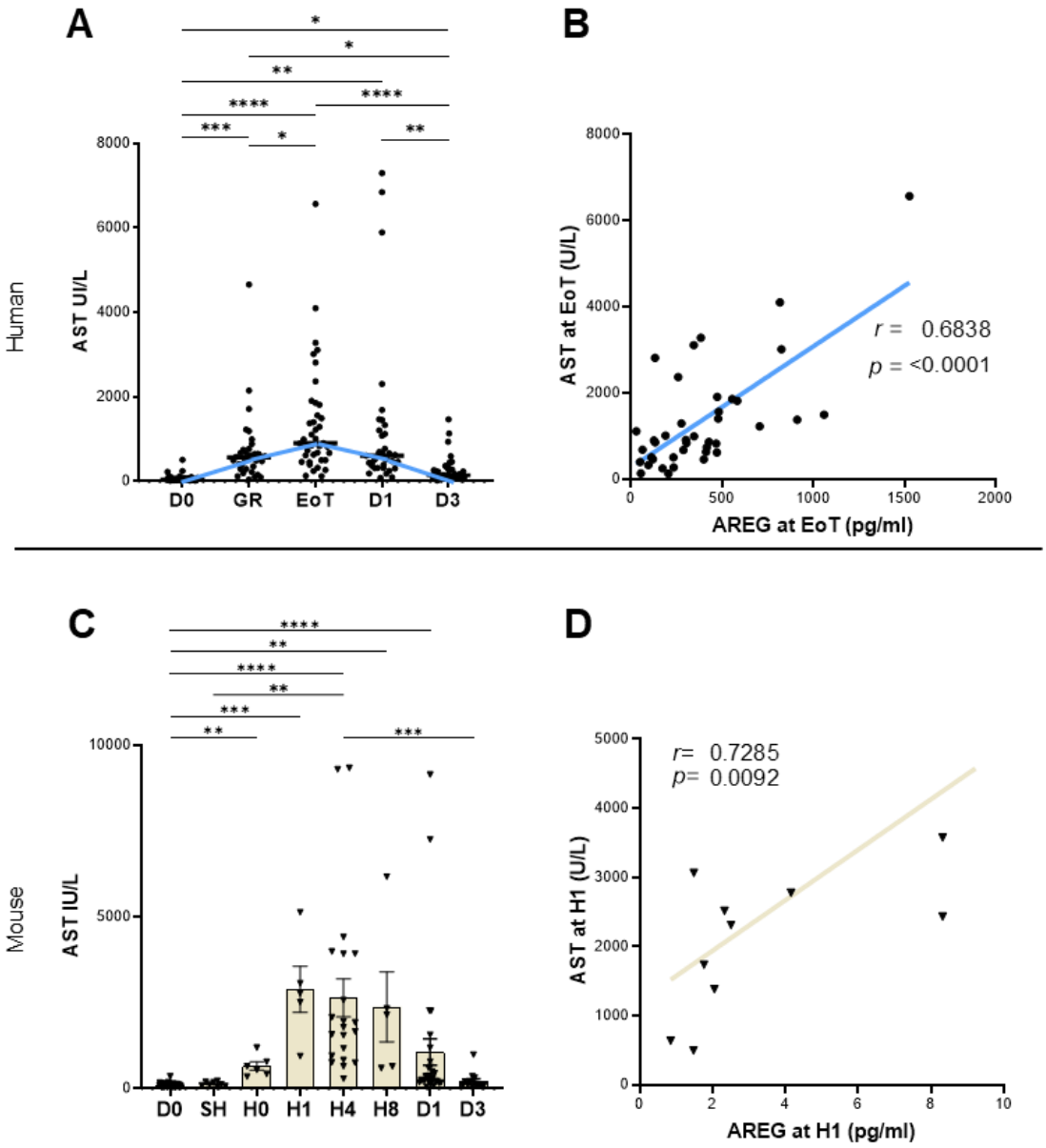
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. End-stage liver disease is not associated with early AREG release during LT.

Kinetics of serum AREG levels (pg/mL): before LT (D0), at graft reperfusion (GR), at the end of LT (EoT), and 1 day (D1) and 3 days (D3) post-LT according to end-stage liver disease score (MELD score): MELD<13, n=17 vs. MELD>13, n=23); Data are expressed in means ± SEM; *p<0.05 (Mann-Whitney test).

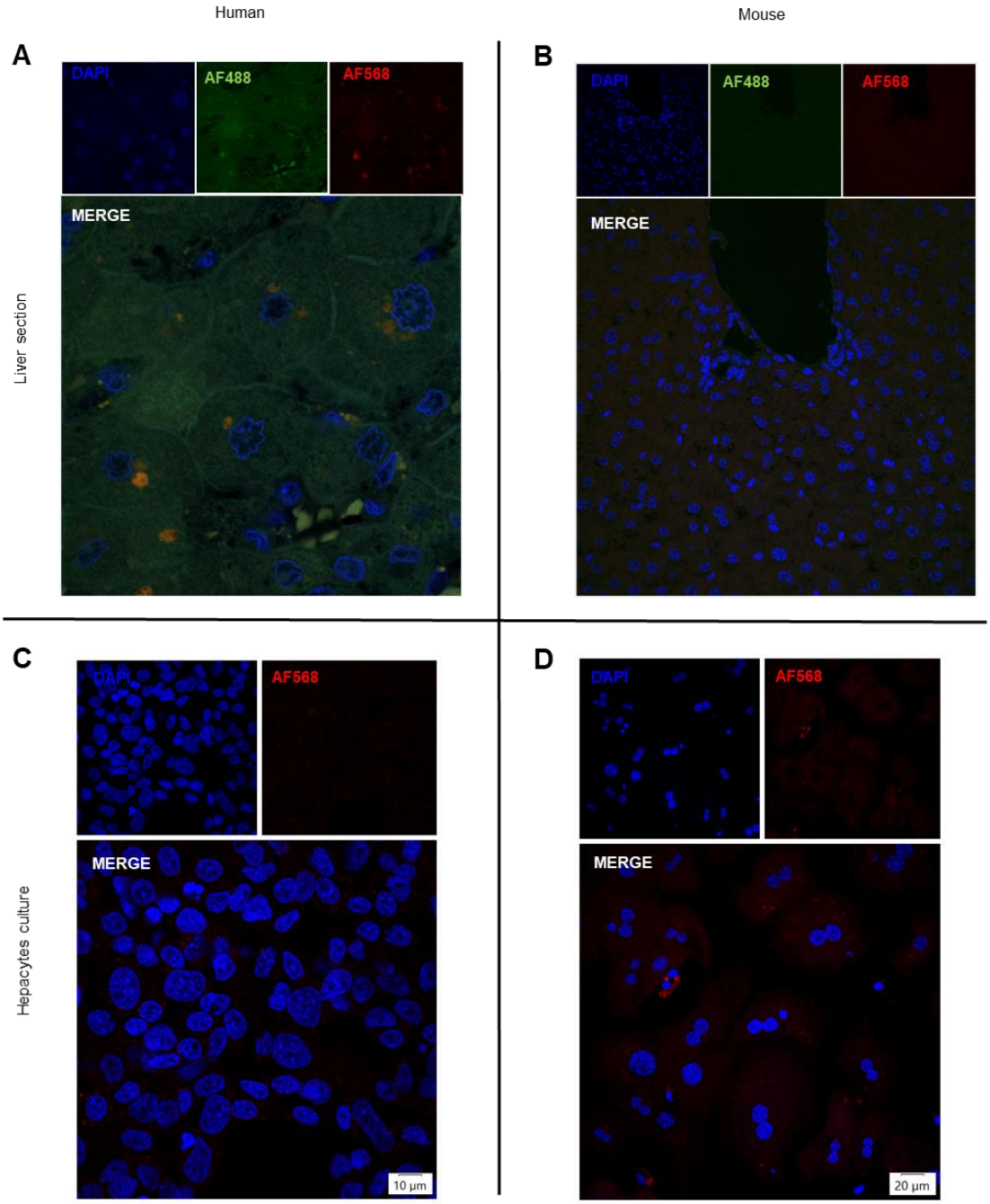
Supplementary figure 2



Supplementary Figure 2. AREG release is associated with hepatic suffering induced by LT in patients (A-B) or hepatic IR (C-D) in mice

(A) Kinetics of serum ASAT levels (in U/L): before LT (D0), at graft reperfusion (GR), at the end of LT (EoT), and 1 day (D1) and 3 days (D3) post-LT (n=40). Data are expressed as means ± SEM; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 ****p<0.0001 (ANOVA test). (B) Positive correlation between serum ASAT levels (in U/L) and serum AREG levels (in pg/ml) (n=40) in patients at EoT. Simple linear regression: r=0.6838; p<0.0001 (Pearson test). (C) Plasma AREG levels (in pg/ml) in mice, before (D0) (n=45), or after 70 minutes of ischemia (H0) and 1, 4, 8 hours (H), 1, 3 days (D) of reperfusion (n=5-29). Laparotomy control mice (SH) were pooled (n=8). Data are expressed in means ± SEM; **p<0.01; ****p<0.0001 (Kruskal-Wallis test). (D) Positive correlation between plasma ASAT levels (in U/L) in and serum AREG levels (in pg/ml) (n=12) in mice at H1; Simple linear regression: r=0.7285; p=0.0092 (Spearman test).

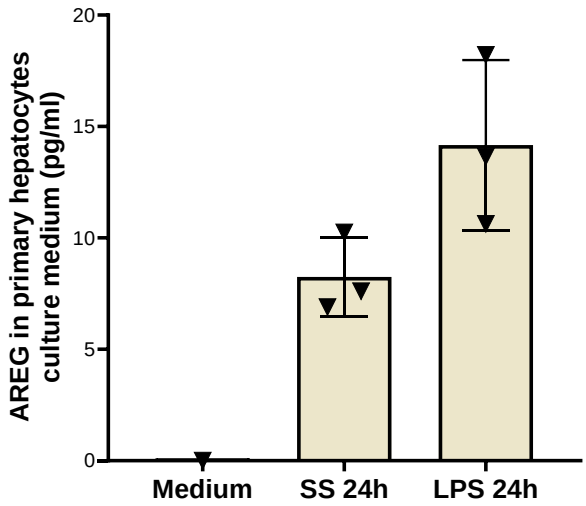
Supplementary figure 3



Supplementary Figure 3. Immunofluorescence staining controls on healthy human and mouse liver sections and on hepatocytes in culture.

Nucleus was stained with DAPI (blue). (A) AF568 (red) and AF488 (green) secondary antibody controls on a representative section of human healthy liver. (B) AF488 (green) and AF568 (red) secondary antibody controls on a representative section of mouse healthy liver. (C) AF568 (red) secondary antibody control on HepG2 cells in culture. (D) AF568 (red) secondary antibody control on mouse primary hepatocytes in culture. Scale bars represent 20 µm except for panel C (10 µm).

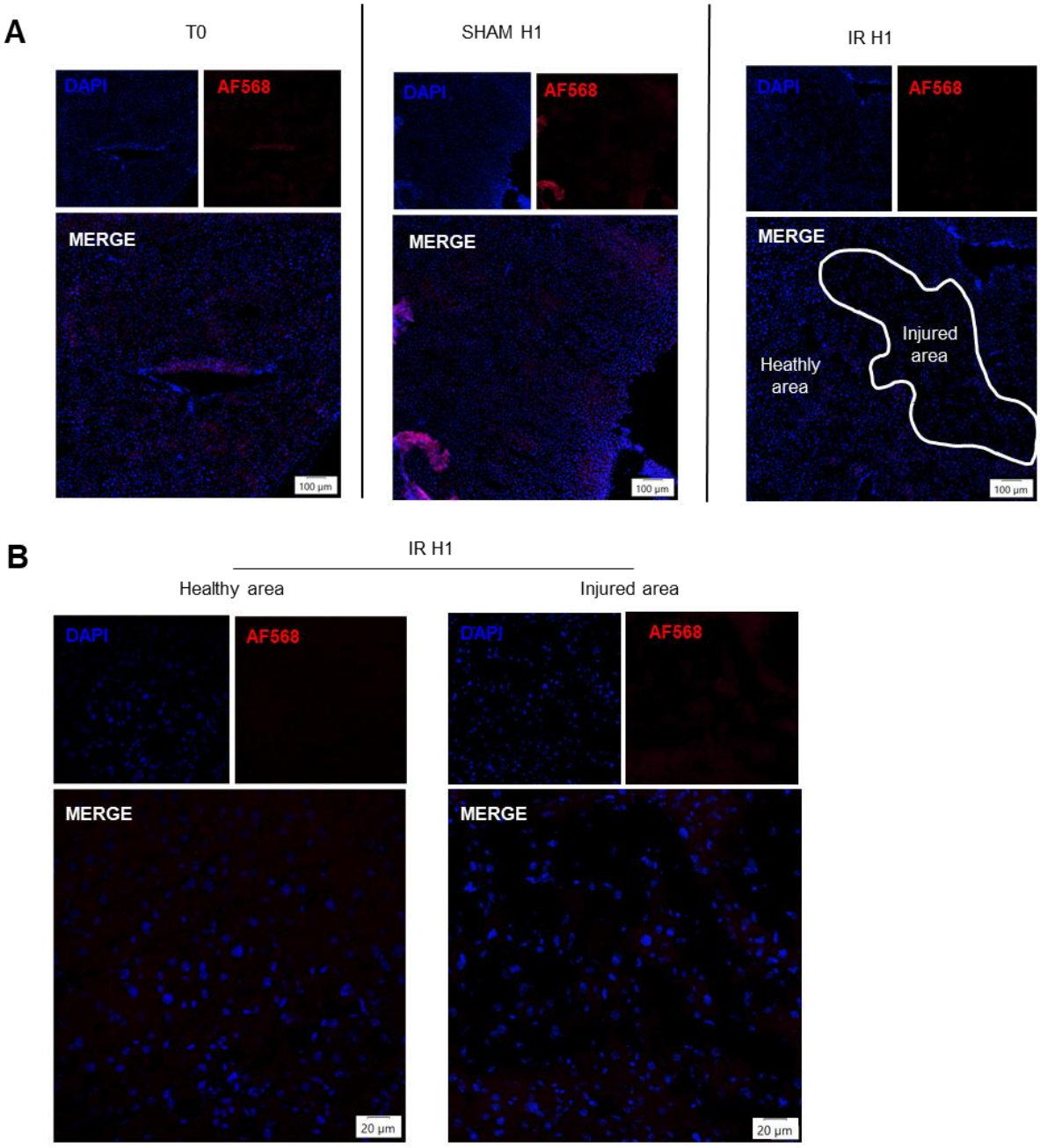
Supplementary figure 4



Supplementary Figure 4. AREG is released by primary hepatocytes in culture under basal conditions and in response to lipopolysaccharide.

AREG levels (pg/ml) in medium alone (Medium) or in primary hepatocytes in culture for 24 hours with medium alone (SS 24h; n=3) or supplemented with lipopolysaccharides (LPS 24h; n=3).

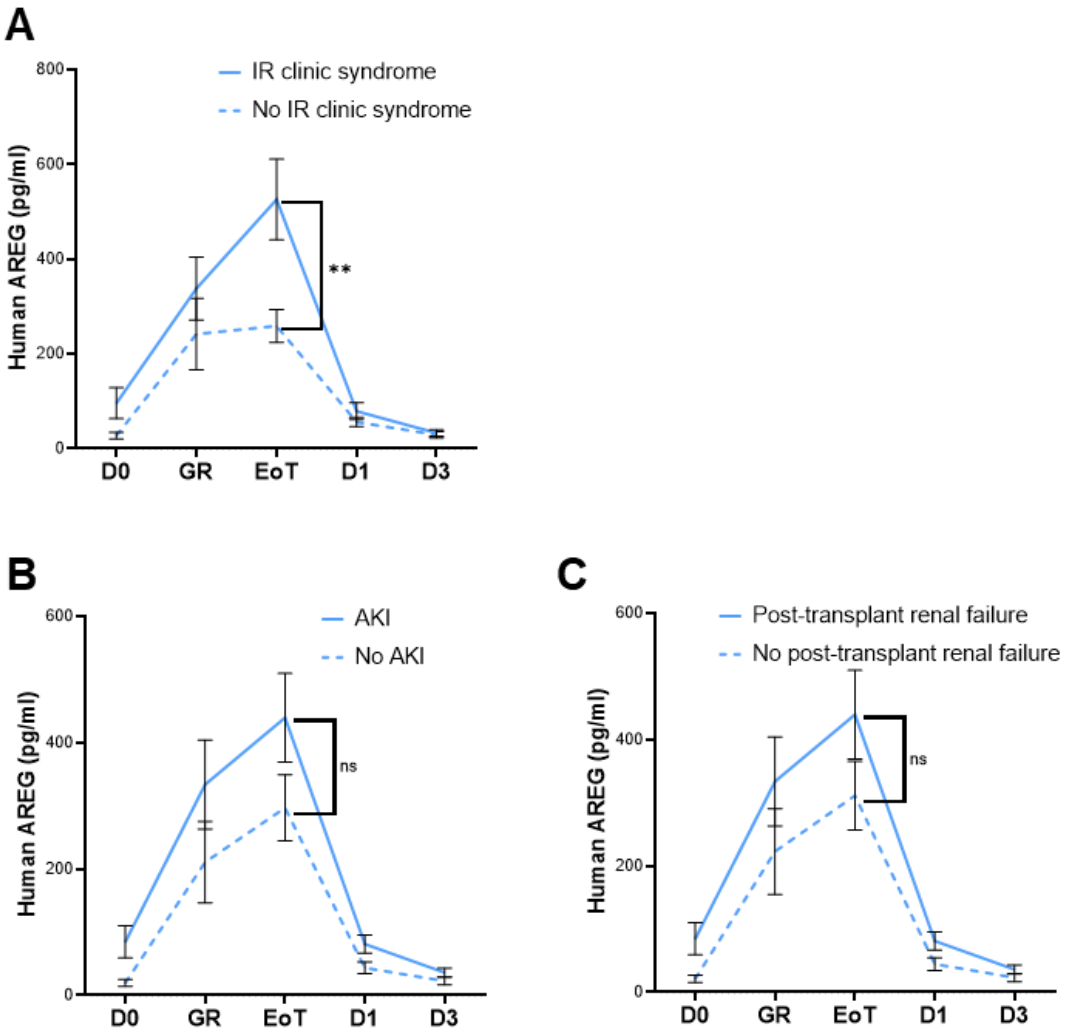
Supplementary figure 5



Supplementary Figure 5. Immunofluorescence staining controls on mouse liver sections after hepatic IR (or laparotomy)

Nucleus was stained with DAPI (blue). (A) AF568 (red) secondary antibody (hematoxylin-eosin-safran (HES)/immunofluorescence) control on representative sections of mouse livers at T0, after one hour after laparotomy (SH H1), and 1 hour after ischemia (IR H1); Column corresponds to the same mice. The white line delimitates injury area; Scale bars represent 100 µm. (B) AF568 (red) secondary antibody immunofluorescence control on a representative section of mouse liver 1 hour after ischemia (IR H1) for analysis of healthy vs. injured area. Scale bars represent 20 µm.

Supplementary figure 5



Supplementary Figure 6. Kinetics of serum levels of AREG in the peritransplant period according to clinic syndrome, acute kidney injury, and post-transplant renal failure

Kinetics of serum AREG levels (pg/ml) measured before LT (D0), at graft reperfusion (GR) at the end of LT (EoT), and 1 day (D1) and 3 days (D3) post-LT according to: (A) Clinic IR syndrome (yes, n=19 ; no, n=21) ; (B) Acute kidney injury (AKI) (yes, n=25 ; no, n=15) ; and (C) post-transplant renal failure (yes, n=25 ; no, n=15) ; Data are expresed in means ± SEM; **p<0.01 (Mann-Whitney test).

Bibliography

[1] Pareja E, Cortes M, Hervás D, Mir J, Valdivieso A, Castell JV, et al. A score model for the continuous grading of early allograft dysfunction severity. Liver Transpl 2015;21:38–46. https://doi.org/10.1002/lt.23990.

[2] Agopian VG, Markovic D, Klintmalm GB, Saracino G, Chapman WC, Vachharajani N, et al. Multicenter validation of the liver graft assessment following transplantation (L-GrAFT) score for assessment of early allograft dysfunction. J Hepatol 2021;74:881–92. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.015.

[3] Liu J, Luo R, Zhang Y, Li X. Current status and perspective on molecular targets and therapeutic intervention strategy in hepatic ischemia-reperfusion injury. Clin Mol Hepatol 2024;30:585–619. https://doi.org/10.3350/cmh.2024.0222.

[4] Berasain C, Avila MA. Amphiregulin. Seminars in Cell & Developmental Biology 2014;28:31–41. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.005.

[5] Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J. 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. Cell Physiol Biochem 2017;43:2155–69. https://doi.org/10.1159/000484295.

[6] Zaiss DM, Minutti CM, Knipper JA. Immune- and non-immune-mediated roles of regulatory T-cells during wound healing. Immunology 2019;157:190–7. https://doi.org/10.1111/imm.13057.

[7] Zaiss DMW, van Loosdregt J, Gorlani A, Bekker CPJ, Gröne A, Sibilia M, et al. Amphiregulin Enhances Regulatory T Cell-Suppressive Function via the Epidermal Growth Factor Receptor. Immunity 2013;38:275–84. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.023.

[8] Dai K, Huang L, Chen J, Yang L, Gong Z. Amphiregulin promotes the immunosuppressive activity of intrahepatic CD4+ regulatory T cells to impair CD8+ T-cell immunity against hepatitis B virus infection. Immunology 2015;144:506–17. https://doi.org/10.1111/imm.12400.

[9] Wang S, Zhang Y, Wang Y, Ye P, Li J, Li H, et al. Amphiregulin Confers Regulatory T Cell Suppressive Function and Tumor Invasion via the EGFR/GSK-3β/Foxp3 Axis. Journal of Biological Chemistry 2016;291:21085–95. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.717892.

[10] Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. Cell 2015;162:1078–89. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.021.

[11] Carruba G. Estrogens in Hepatocellular Carcinoma: Friends or Foes? Cancers 2021;13:2085. https://doi.org/10.3390/cancers13092085.

[12] Castillo J, Erroba E, Perugorría MJ, Santamaría M, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Res 2006;66:6129–38. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0404.

[13] Liu K, Lin D, Ouyang Y, Pang L, Guo X, Wang S, et al. Amphiregulin impairs apoptosis-stimulating protein 2 of p53 overexpression–induced apoptosis in hepatoma cells. Tumour Biol 2017;39:101042831769502. https://doi.org/10.1177/1010428317695026.
[14] McKee C, Sigala B, Soeda J, Mouralidarane A, Morgan M, Mazzoccoli G, et al. Amphiregulin activates human hepatic stellate cells and is upregulated in non alcoholic steatohepatitis. Sci Rep 2015;5:8812. https://doi.org/10.1038/srep08812.
[15] Savage TM, Fortson KT, de Los Santos-Alexis K, Oliveras-Alsina A, Rouanne M, Rae SS, et al. Amphiregulin from regulatory T cells promotes liver fibrosis and insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis. Immunity 2024;57:303-318.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.01.009.
[16] Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. Gastroenterology 2005;128:424–32. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.006.
[17] Isaac A, Mohamed SM, Ahmed OA, Hassan AGM, Rasmy HS. Amphiregulin as a novel diagnostic and prognostic biomarker of hepatocellular carcinoma before and after locoregional treatment. Egypt J Intern Med 2021;33:46. https://doi.org/10.1186/s43162-021-00078-5.
[18] Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A Model to Predict Survival in Patients With End–Stage Liver Disease. Hepatology 2001;33:464–70. https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22172.
[19] Abe Y, Hines I, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, et al. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. Free Radical Biology and Medicine 2009;46:1–7. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.029.
[20] Johnson GR, Saeki T, Gordon AW, Shoyab M, Salomon DS, Stromberg K. Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. The Journal of Cell Biology 1992;118:741–51. https://doi.org/10.1083/jcb.118.3.741.
[21] Johnson GR, Saeki T, Auersperg N, Gordon AW, Shoyab M, Salomon DS, et al. Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelial cells: Nuclear localization of endogenous amphiregulin. Biochemical and Biophysical Research Communications 1991;180:481–8. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)81090-3.
[22] Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Structure and Function of Human Amphiregulin: A Member of the Epidermal Growth Factor Family. Science 1989;243:1074–6. https://doi.org/10.1126/science.2466334.
[23] Liu Q, Rehman H, Krishnasamy Y, Haque K, Schnellmann RG, Lemasters JJ, et al. Amphiregulin Stimulates Liver Regeneration After Small-for-Size Mouse Liver Transplantation. American Journal of Transplantation 2012;12:2052–61. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04069.x.

[24] Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, Artis D. Emerging Functions of Amphiregulin in Orchestrating Immunity, Inflammation, and Tissue Repair. Immunity 2015;42:216–26. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.020.
[25] Sabapathy V, Stremska ME, Mohammad S, Corey RL, Sharma PR, Sharma R. Novel Immunomodulatory Cytokine Regulates Inflammation, Diabetes, and Obesity to Protect From Diabetic Nephropathy. Front Pharmacol 2019;10:572. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00572.
[26] Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. Current Opinion in Immunology 2005;17:359–65. https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.002.
[27] Barbier L, Robin A, Sindayigaya R, Ducousso H, Dujardin F, Thierry A, et al. Endogenous Interleukin-33 Acts as an Alarmin in Liver Ischemia-Reperfusion and Is Associated With Injury After Human Liver Transplantation. Front Immunol 2021;12:744927. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744927.

Discussion Générale et Perspectives

Au cours de ces trois années de travaux, notre objectif principal a été de contribuer à une meilleure compréhension des éléments immunitaires et de cytokines/alarmines impliqués dans les processus inflammatoires et réparateurs dans l'IR associée à la TH.

Par une démarche translationnelle combinant des investigations observationnelles chez l'humain en TH et mécanistiques en modélisation animale, nous avons tenté d'apporter des connaissances nouvelles sur les rôles respectifs de l'IL-33 et de l'AREG, ainsi que de leurs possibles liens avec les fonctions des LTI et des Treg dans l'IR hépatique.

Cette discussion générale vise à mettre en perspective les résultats de mon travail, en les confrontant aux connaissances actuelles disponibles dans la littérature, tout en explorant leurs implications futures dans la recherche fondamentale et clinique.

I- L'axe alarmine IL-33/LTI dans l'inflammation stérile associée à l'IR hépatique

Dans le **Manuscrit n°1**, nous apportons la démonstration de l'implication directe de l'alarmine IL-33, laquelle, en étant libérée précocement dans la circulation sanguine dès l'étape de reperfusion du greffon hépatique [46], contribue au recrutement précoce des LTI ainsi qu'*in fine*, aux lésions tissulaires d'IR.

a. Recrutement en périphérie des iNKT par l'IL-33 dans le modèle murin d'IR et en TH : contribution aux lésions tissulaires ?

i. L'IL-33 dans le recrutement des iNKT

L'activation précoce des iNKT lors de l'IR d'organe solide avait déjà été documentée dans la littérature dans divers organes [45,48,123,124], y compris dans le foie [48,125–127].

Dans le **Manuscrit n°1**, nous avons montré que l'IL-33 libérée dans la circulation lors de la séquence de reperfusion, en agissant comme une alarmine, est capable de piloter ce phénomène de recrutement des iNKT en IR hépatique. Ainsi, dans le modèle murin, tant l'activation des iNKT en périphérie (rate) que leur recrutement dans le foie au cours des premières heures suivant l'IR n'ont pas été retrouvés chez les souris IL-33KO. De plus, en TH, bien que cette population soit numériquement réduite dans le sang circulant des patients, son activation à la fin de la TH était étroitement associée à la libération d'IL-33 immédiatement après la reperfusion du greffon. Ces résultats suggèrent que le mécanisme décrivant, en modélisation animale, une activation précoce des iNKT dépendante de l'IL-33 s'applique bien aussi à la TH. Une démonstration définitive d'une action directe de l'IL-33 sur les iNKT lors de l'IR hépatique pourrait être obtenue en reconstituant des souris Jα18KO en iNKT provenant de souris WT ou déficiente en ST2 et donc insensibles à l'IL-33.

Notre analyse ayant été limitée aux iNKT circulants, il reste à déterminer si leur activation reflète leur migration dans le foie ou non. Pour ce faire, une analyse de leur expression membranaire du CXCR6, impliquée dans la migration des iNKT vers le foie, pourrait donner cette information [227].

ii. L'axe IL-33/iNKT dans l'induction des lésions d'IR

Une question posée est la possible contribution de l'axe biologique IL-33/iNKT dans la sévérité de l'IR associée à la TH.

Nous avons documenté dans le modèle animal que les iNKT contribuent aux lésions tissulaires après IR, celles-ci étant réduites chez les souris Jα18KO (Voir **Figures Supplémentaires 9** & **10** du **Manuscrit n°1**).

En accord avec ces données, celles que nous rapportons en TH montrent une corrélation positive entre la proportion d'iNKT activés et le score prédictif de dysfonction du greffon (score MEAF). De manière remarquable, la même conclusion peut être faite lorsqu'on considère l'alarmine IL-33 : nous avons noté une réduction de la souffrance hépatique chez les souris IL-33KO tandis qu'en TH, la libération d'IL-33 lors de la reperfusion était positivement corrélée avec les critères cardinaux des lésions hépatiques précoces [46].

Considérées ensemble, ces données permettent de proposer l'existence d'un axe pro-inflammatoire IL-33/iNKT responsable des lésions tissulaires associées à l'IR transposable à la situation clinique en TH.

iii. Mécanismes d'action des iNKT dans les lésions d'IR hépatique

Le rôle effecteur des PNN dans les lésions tissulaires au cours de la phase de reperfusion est bien documenté. Les travaux de Lappas *et al*. ont montré dans un modèle d'IR hépatique, que celui-ci dépend du recrutement précoce des iNKT, en partie via leur production d'IL-17 et d'IFN-γ [126], résultat que nous avons reproduit au sein du laboratoire pour le foie (Voir Figure Supplémentaire 10 du Manuscrit n°1) et démontré initialement dans un modèle d'IR rénale [45]. Le fait qu'à la fois dans le rein [45] et le foie [46],le même profil de réduction des lésions et de recrutement des PNN a été observé chez les souris IL-33KO et déficientes en iNKT, est en faveur de l'implication de iNKT recrutés par l'IL-33. Cependant, on ne peut exclure qu'une partie de la dépendance des lésions à l'IL-33 ne résulte pas d'un recrutement initial et direct des PNN par l'IL-33 [87].

En plus de leur effet indirect via le recrutement des PNN, les iNKT sont aussi connus pour exercer une hépatotoxicité directe par la voie Fas et son arsenal cytotoxique ou encore via leur production d'IFN-γ [61] . Nous pourrons rechercher par cytométrie en flux si ce phénomène est influencé par l'IL-33 en comparant dans notre modèle d'IR hépatique, le profil cytotoxique (perforine et granzyme B) des iNKT des souris WT et IL-33KO.

iv. Implication des iNKT intrahépatiques ?

Bien que nous ayons démontré que l'IL-33 recrute les iNKT en périphérie, nous ne pouvons pas exclure une contribution des iNKT intrahépatiques, lesquels, rappelons-le, sont enrichis dans le foie [11] . Afin d'évaluer les contributions respectives des iNKT périphériques et intrahépatiques dans les lésions d'IR hépatique, nous pouvons envisager dans le modèle murin une splénectomie afin de supprimer le recrutement des iNKT en provenance de la rate et ainsi de pouvoir évaluer la contribution des iNKT intrahépatiques. Dans l'hypothèse où la splénectomie conduirait à une réduction des lésions d'IR, la reconstitution par transfert adoptif d'iNKT spléniques chez des animaux splénectomisés permettrait alors de confirmer le rôle spécifique des iNKT périphériques recrutés dans le processus des lésions d'IR.

v. L'IL-33 comme acteur direct de l'activation des iNKT ?

Les travaux de Bourgeois *et al.* (2009) avaient montré chez la souris que l'IL-12, seule ou en combinaison avec l'IL-18, cible directement les iNKT en les activant indépendamment de la stimulation du récepteur TCR, tandis que l'IL-33 cible, elle aussi, directement les iNKT mais en agissant comme un cofacteur d'activation [85]. Par ailleurs, il a été démontré que la neutralisation de l'IL-12 (ou l'utilisation de souris déficientes en IL-12) atténue les lésions induites par l'IR hépatique [228]. Ces observations concordent avec l'hypothèse selon laquelle l'IL-33 joue un rôle de cofacteur dans l'activation des iNKT chez la souris, y compris en situation d'inflammation stérile induite par l'IR.

Chez l'humain, Thierry *et al.*, avaient documenté dans le laboratoire que l'IL-33 seule peut activer rapidement les iNKT [118] tandis que nos données ont révélé des libérations rapides et systémiques d'IL-12 et d'IL-18 à la fin de la TH [46], lesquelles ne sont pas corrélées à l'activation des iNKT.

Ces données sont en accord avec le fait que, chez l'humain, contrairement à l'IL-33, ces cytokines ne suffisent pas, à elles seules, à induire une activation significative des iNKT (Voir Figure Supplémentaire 6 du Manuscrit n°1). Cependant, en association avec l'IL-33, nous n'excluons pas l'implication de co-signaux d'activation apportés par les cytokines pro-inflammatoires IL-12 et IL-18 ou même un engagement du récepteur TCR via un ligand endogène surexprimé en réponse au stress cellulaire, lesquels contribueraient à l'amplitude de l'activation des iNKT observée à la fin de la TH chez les patients.

b. Implication d'autres LTI dans la phase précoce inflammatoire d'IR hépatique ?

L'un des objectifs de ce travail était de déterminer si, lors de la TH, l'IL-33 contribue également à l'activation des deux autres principaux sous-ensembles circulants de LTI : les MAIT et les T-γδ.

Les MAIT et les T-γδ, à l'image des iNKT, se sont avérés activés dès la fin de la TH. L'activation des MAIT était étroitement liée à la libération précoce d'IL-33 et à la gravité du dysfonctionnement hépatique après la reperfusion du greffon, de manière similaire aux iNKT. En revanche, l'activation des T-γδ en fin de TH ne montrait aucune corrélation avec l'IL-33 ni avec le dysfonctionnement du greffon. Ces observations suggèrent un phénomène spécifique à la voie de signalisation IL-33/ST2, les T-γδ n'étant pas directement ciblés par l'IL-33 [229] , contrairement aux iNKT [45,85,90] et MAIT [86] . Il est important de souligner que notre analyse portait sur l'ensemble des T-γδ sans distinction de sous-populations. Les futures études sur les T-γδ en contexte de TH devraient donc tenir compte des différences entre les deux principaux contingents T-γδ circulants (δ1 et δ2).

Concernant le rôle exact des MAIT dans le phénomène d'IR hépatique, des études complémentaires sont nécessaires. L'utilisation de souris déficientes en MR1, dépourvues de MAIT, pourrait permettre de déterminer leur contribution à la phase précoce inflammatoire d'IR. Étant donné que les MAIT sont peu représentées dans le foie de la souris, il serait pertinent d'exploiter des souris WT surexprimant des MAIT [230],ainsi que des souris déficientes en IL-33 mais surexprimant les MAIT. Ces modèles permettront de tester directement l'hypothèse d'un axe délétère IL-33/MAIT au cours des lésions d'IR hépatique.

c. Conclusion à propos de l'axe alarmine IL-33/LTI dans l'inflammation stérile associée à l'IR hépatique

Cette première partie de discussion souligne l'implication de l'axe IL-33/LTI lors de l'IR hépatique. Collectivement nos données chez l'humain en TH et dans le modèle animal d'IR hépatique permettent de proposer que l'alarmine IL-33, en ciblant les iNKT et les MAIT, induit leur activation et leur recrutement, contribuant ainsi aux lésions et aux dysfonctionnements du greffon au décours immédiat de la séquence d'IR hépatique.

En agissant de façon disproportionnée, l'inflammation stérile peut s'avérer délétère et impacter l'intégrité de l'organe considéré et ses fonctions. Cependant, cette réponse immunitaire peut aussi être coordonnée avec un versant réparateur contribuant à restaurer l'intégrité tissulaire. Pour éprouver ce paradigme, il convient d'attribuer une attention particulière à la capacité attribuée aux iNKT et MAIT [110,115,218,219,231,232], ainsi qu'à l'IL-33 [66,84,193,194], de conduire une réponse réparatrice.

La seconde partie de cette Discussion Générale et Perspectives est en partie consacrée à ce domaine d'étude, ceci en prenant appui sur les résultats du Manuscrit n°2 ainsi que sur une série de résultats expérimentaux non publiés produits au cours de mon stage de thèse.

II- Hypothèse d'un axe IL-33/AREG/LT dans la réparation hépatique

Le second volet de ce travail de thèse visait à appréhender les bases moléculaires et cellulaires de l'existence d'un axe réparateur IL-33/AREG/LT, tant dans le modèle murin d'IR hépatique que dans le contexte de la TH humaine.

Les Treg constituent la population T immunitaire la mieux décrite pour exercer des fonctions réparatrices/suppressives [199]. On a attribué plus récemment des fonctions similaires (réparatrices/protectrices) aux LTI, en particulier aux iNKT et aux MAIT [110,115,218,219,231,232], ainsi qu'à l'IL-33 [66,84,193,194]. Inspirés par le concept de Joost J. Oppenheim qui décrit les alarmines comme des chefs d'orchestre des phases d'inflammation et de réparation, nous avons postulé que ce processus de réparation pouvait être impulsé et coordonné par l'IL-33 via sa libération précoce au cours de la phase d'inflammation.

C'est ainsi que nous avons, dans le contexte de l'IR hépatique, d'abord étudié la mobilisation/homéostasie des Treg en réponse à l'IL-33 puis choisi d'explorer un rôle précoce de l'AREG, une cytokine décrite jusqu'ici comme produite par les Treg mais qui semble aussi pouvoir agir en contribuant à l'activation/la mobilisation des Treg ainsi qu'à l'amplification de leurs fonctions réparatrices. Nous avons finalement étendu notre étude aux LTI, éléments immunitaires reconnus plus récemment pour leurs fonctions réparatrices, et déjà reconnus comme réactifs à l'IL-33 (iNKT, MAIT) et impliqués dans la phase inflammatoire de l'IR hépatique (iNKT).

a. Contribution de l'AREG et de l'IL-33 à l'activation/recrutement et à l'expansion des Treg.

L'axe IL-33/Treg dans la protection des tissus avait déjà été décrit dans la littérature [89,198,206] mais pas jusqu'ici dans l'IR hépatique associé à la TH.

Par ailleurs, suite à la mise en évidence dans le Manuscrit n°2 d'un relargage précoce de l'AREG concomitante de la phase inflammatoire, une question clé émerge alors sur l'impact de ce relargage précoce d'AREG sur le système immunitaire, et en particulier sur les Treg, cible potentielle de l'AREG, connues pour leur expression du récepteur EGFR. Cette interaction entre les Treg et une source endogène d'AREG non portée par les Treg est déjà décrite dans la littérature [184,204]; elle pourrait dans le cadre de l'IR hépatique conférer aux Treg des propriétés réparatrices renforcées, contribuant ainsi à la réparation tissulaire et à l'atténuation de la réponse inflammatoire.

Les données récentes de l'étude de Sabapathy *et al.*, sur l'implication de l'IL-33 endogène sur les Treg dans la protection contre l'IR rénale, montrent que l'axe IL-33/ST2 est crucial pour un recrutement des Treg sur le site des lésions [206]. Notre travail dont les données sont récapitulées dans la Figure 25, a permis d'apporter la même démonstration pour l'IR hépatique. Ainsi, l'immuno-*monitoring* des patients TH a permis de mettre en évidence à J7-post-TH une augmentation significative des Treg circulants, laquelle corrèle positivement avec le pic sérique d'IL-33 obtenu lors de la reperfusion du greffon (Voir Figures 25 A et C). L'implication de l'IL-33 dans ce phénomène a pu être directement démontrée dans notre modèle animal où l'augmentation significative des Treg intrahépatiques à J7-post-IR était fortement atténuée chez les souris IL-33KO, comparativement aux souris WT (Voir Figure 25 E).

Par ailleurs, les données issues de l'étude de Sabapathy *et al.*, ont montré qu'*in vivo*, dans des organoïdes rénaux soumis à l'hypoxie en co-culture avec des Treg déficients en récepteur de l'IL-33, la supplémentation en AREG seule induisait les fonctions réparatrices des Treg et protégeait les organoïdes en réduisant les lésions induites par l'hypoxie [206]. En effet, l'activation des Treg observée chez l'humain dès la fin de la transplantation (EoT) (tendance) (et qui augmente jusqu'à J7) (Voir Figure 25 B) corrèle avec le taux d'AREG sérique mesuré à la reperfusion du greffon (Voir Figure 25 D). De façon intéressante, nos données montrent que la libération d'IL-33 n'est pas corrélée à l'activation précoce (EoT) ou tardive (D1/D7) des Treg (données non illustrées).

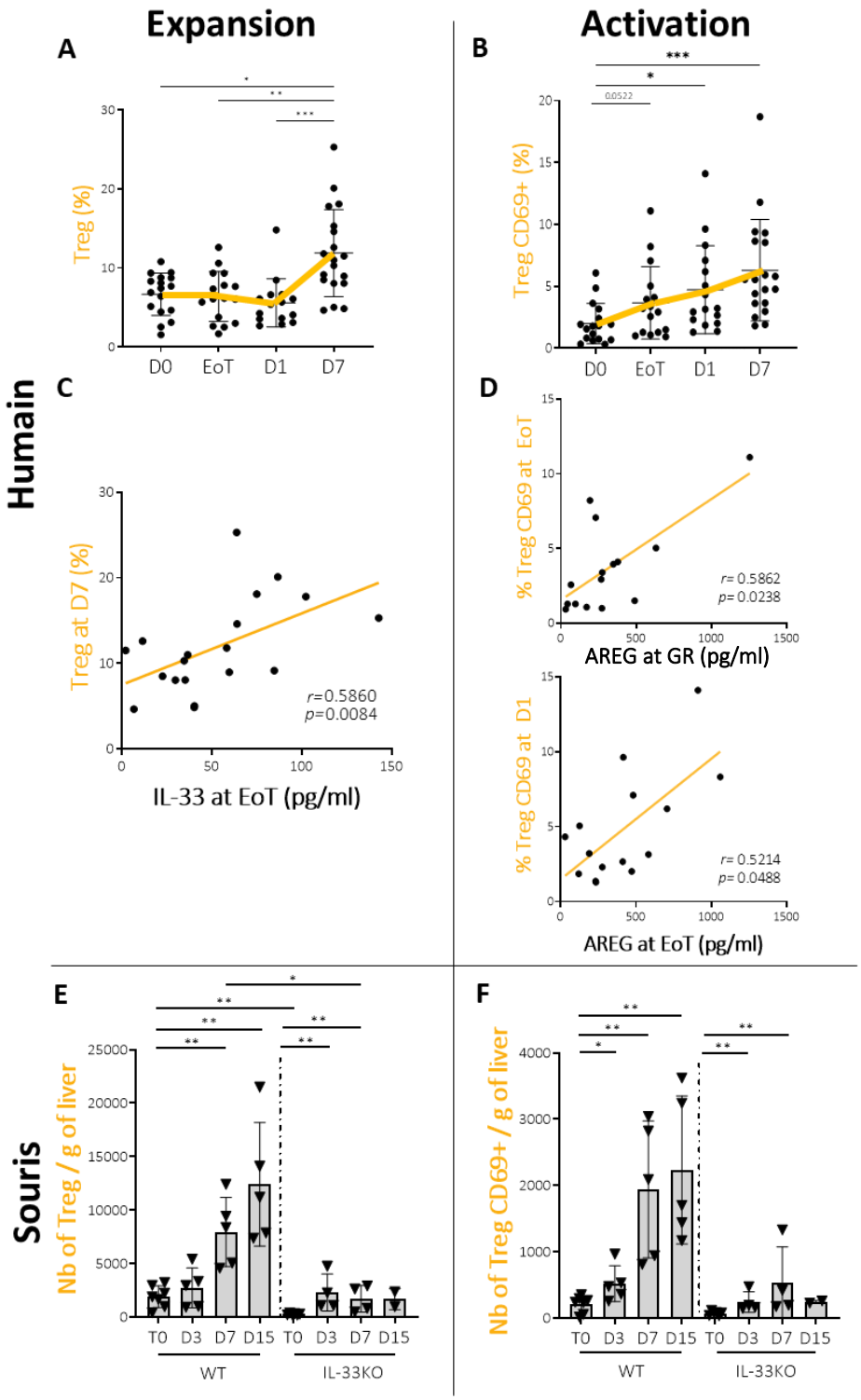


Figure 25 : Contribution de l'AREG et de l'IL-33 à l'activation/recrutement et à l'expansion des Treg. (A-B) : Proportion de Treg (en %) parmi les LT CD4(+) (A) et proportion de cellules activées (CD69+) parmi les Treg (en %) (B) avant et après TH chez l'humain. Analyse par CFS réalisée à partir des PBMC de patients TH avant greffe (D0), à la fin de la greffe (EoT), 1 jour (D1) et 7 jours (D7) après greffe (n=14-19). Moyenne ± SEM ; test de Mann-Whitney : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. C : Corrélation positive entre la proportion des Treg (en %) parmi les LT CD4(+) 7 jours après TH (D7) et la concentration sérique d'IL-33 en fin de TH (EoT) (n=18). Test de Spearman. D : Corrélation positive entre la proportion de cellules activées (CD69+) parmi les Tregs (en %), à la fin de la TH (EoT) ou 1 jour après TH (D1) avec respectivement, la concentration sérique d'AREG à la reperfusion du greffon (GR) (n=15) ou en fin de TH (EoT) (n=14). Test de Spearman. (E – F) : Nombre (en cellules/g de foie) de Treg parmi les CD45(+) (E) et de Treg activées parmi les Treg (F) chez la souris WT ou IL-33KO. Analyse par CFS réalisée dans le foie des souris avant IR (T0), après 70 minutes d'ischémie, suivi de 3 jours (J3), 7 jours (J7) et 15 jours (J15) de reperfusion (n=3-5). Moyenne ± SD ; test de Mann-Whitney : *p<0,05 ; **p<0,01.

Dans notre modèle murin, nous avons également mis en évidence une augmentation du niveau d'activation des Treg dans le foie des souris après IR et jusqu'à 15 jours post-IR. Ces données issues du modèle murin ont apporté la preuve directe des observations faites chez l'humain, puisque les IL-33KO ne montraient pas de perte de l'activation et de différence significative avec les souris WT (Voir Figure 25 F).

Nos observations préliminaires faites chez l'humain et la souris pourraient venir étoffer l'étude de Sabapathy *et al.*, suggérant que malgré une implication de l'IL-33 dans l'induction de l'AREG portée par les Treg, agissant en boucle autocrine amplifiant leur phénotype immuno-supresseur/réparateur, l'AREG produite localement suite à une souffrance cellulaire est également un facteur clé dans l'activation des Treg.

b. AREG : signification physiopathologique dans la réparation tissulaire suite à l'IR associée à la TH

i. Une fonction non-immunitaire de l'AREG ?

Bien que nous ayons mis en relation l'AREG libérée dans le milieu extracellulaire avec les Treg, celle-ci pourrait également avoir un effet non immunitaire périphérique. Une signalisation autocrine comme décrite dans le cadre de cancers [152,163,163] ou paracrine des hépatocytes en souffrance vers les hépatocytes sains est possible pour induire une prolifération rapide permettant au foie de rétablir rapidement ses fonctions. Par ailleurs, Berasain *et al.* ont montré qu'*in vitro*, l'AREG était capable de cibler directement les hépatocytes [142,177]. De même, Murthy *et al.*, a montré qu'*in vitro* une apoptose des hépatocytes induite par la voie Fas, provoque une augmentation extracellulaire de l'AREG [233].

Nos données rejoignent leurs observations, puisque le traitement à court terme des hépatocytes murins primaires en culture avec du lipopolysaccharides (LPS) a entraîné une augmentation de la libération d'AREG dans le milieu de culture (Voir Figure Supplémentaire 4 du Manuscrit n°2). Ces observations ont été également faites dans un modèle d'hypoxie/réoxygénation de la lignée humaine HEPG2. Les HEPG2 ayant subi un stress hypoxique suivi de deux heures de réoxygénation durant huit heures, entraînant une mort cellulaire, ont libéré une quantité plus importante d'AREG dans leur milieu que deux heures en condition normoxique (Voir Figure 26). Ensemble, ces données impliquent que les hépatocytes eux même réagissent aux conditions de stress en augmentant leur libération d'AREG et, possiblement par cette voie, induisent une protection juxtacrine/paracrine.

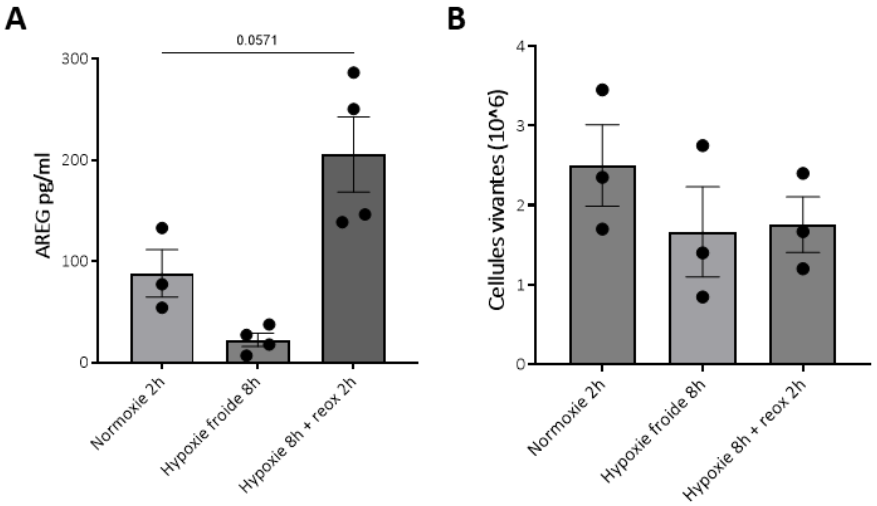


Figure 26 : Les HEPG2 réagissent aux conditions de stress induit par une hypoxie en augmentant leur libération d'AREG. A : Concentrations en AREG (en pg/ml) dans le milieu de culture des HEPG2 mesurées après 2 heures de normoxie, 8 heures d'hypoxie froide ou 8 heures d'hypoxie froide suivie de 2 heures de réoxygénation (reox). Données en moyenne ± SEM ; test de Man & Whitney. B : Nombre de cellules HEPG2 vivantes après 2 heures de normoxie, 8 heures d'hypoxie froide ou 8 heures d'hypoxie froide suivie de 2 heures de réoxygénation (reox). Données en moyenne ± SEM.

Par ailleurs, comme évoqué dans la Partie III de l'Introduction générale, lors de dommages hépatiques importants, une voie secondaire de régénération hépatique est mise en place par les cellules progénitrices du foie [130]. On sait que l'AREG se distingue des autres EGF par sa capacité à induire, en plus d'une prolifération, une différenciation des cellules [201], comme dans le cadre de la régénération gastrique [234].

A ce jour, l'effet de l'AREG sur les cellules progénitrices hépatiques n'a pas été documenté mais on peut très bien imaginer que l'AREG pourrait directement agir sur les cellules progénitrices du foie afin d'initier une différenciation vers un phénotype d'hépatocytes. Il serait ainsi intéressant de voir *in vitro* si d'une part, une stimulation AREG peut induire une différenciation des cellules progénitrices vers un profil d'hépatocytes et si, un blocage de l'EGFR en utilisant du Gefitinib abroge cet effet. Si tel est le cas, cela pourrait apporter une meilleure compréhension d'une réparation moins efficace chez les souris AREGKO après une hépatectomie partielle et des effets non-immunitaires de l'AREG dans le cadre de l'IR associé à la TH.

ii. L'AREG sous l'influence de l'alarmine IL-33 ?

Dans la **Partie III** de l'**Introduction Générale**, nous avons discuté de la capacité de l'IL-33 à protéger les lésions d'IR et à enclencher une régénération des tissus [84]. Sakai *et al*. en 2012, à travers un modèle *in vitro* d'hypoxie/réoxygénation d'hépatocytes primaires, a décrit les propriétés hépatoprotectrices directes de l'IL-33 [194].

A travers les Treg, l'IL-33 est connue pour stimuler la production d'AREG, il n'est donc pas improbable que l'IL-33 induisent une néosynthèse d'AREG à travers des cellules non-immunitaires comme les hépatocytes ou LSEC, en particulier quand le pic de libération de l'IL-33 arrive en amont de celui de l'AREG.

Ces hypothèses sont appuyées par la description par Berasain *et al*., où ils ont décrit une cinétique des transcrits de l'*Areg* après une hépatectomie partielle augmentant rapidement dès les trente premières minutes atteignant un pic à six heures et redescendant à des taux basaux à vingt-quatre heures [142].Nous avons, par ailleurs, observé dans nos données, une néosynthèse d'AREG rapide et transitoire (Voir **Figure 27**).

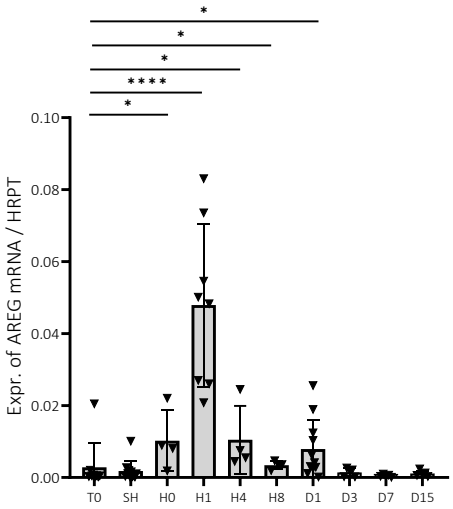


Figure 27 : Expression rapide et transitoire des transcrits d'Areg dans le modèle murin d'IR hépatique. qPCR réalisée à partir de tissus hépatiques de souris sauvages C57Bl/6 avant IR hépatique (T0), après une laparotomie (souris « Sham » contrôles : SH) ou après 70 minutes d'ischémie et 1, 4, 8 heures (H) et 1, 3, 7, 15 jours (D) de reperfusion (n=4-11). Test de Mann-Whitney : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ****p<0,0001.

En comparant la cinétique de relargage de l'AREG chez les souris WT à celle des souris IL-33KO, nous avons observé un pic d'AREG à H1 significativement réduit chez les IL-33KO (Voir Figure 28 A). A partir de ces observations, trois hypothèses se sont imposées.

L'IL-33 pourrait influencer la transcription transitoire d'*Areg*, dont nous avons discuté en amont, et une partie de l'AREG systémique libérée serait issue d'une source inductible. En effet, chez les IL-33KO, nous avons constaté une diminution notable des transcrits d'*Areg* par rapport aux WT (Voir Figure 28 B). Ces résultats, bien qu'ils nécessitent d'être confirmés sur un plus grand nombre de souris IL-33KO, semblent indiquer un lien entre l'IL-33 et la transcription transitoire d'*Areg*. L'IL-33 en ciblant les hépatocytes ou les HSC (connues pour exprimer le ST2 [235]), pourrait induire une expression rapide d'*Areg* par ces cellules intrahépatiques suite au stress induit par l'IR. Comme observé, les taux de transcrits chez les souris IL-33KO ne sont pas nuls à une heure post-IR, suggérant une autre voie indépendante de l'IL-33 impliquée dans l'induction de la transcription d'*Areg*. Un élément en amont qui pourrait induire cette transcription, en dehors d'une participation de l'IL-33, est le stress mitochondrial induit par l'IR hépatique. En effet, comme montré par Hino *et al*., une dysfonction mitochondriale déclenche une voie de signalisation rétrograde, qui induit de manière significative l'expression de l'*AREG* dans les cellules hépatiques [236].

Par ailleurs, des modifications épigénétiques sont observées en réponse au stress mitochondrial modifiant la structure de la chromatine autour des activateurs de l'AREG devenant plus accessible, favorisant ainsi la régulation positive du gène AREG. Par ailleurs, comme discuté précédemment, cette analyse a été faite sur un ensemble non trié de cellules hépatiques et mériterait que celle-ci soit effectuée sur des cellules triées afin de mieux appréhender ce rôle de l'IL-33 dans la phase précoce de transcription d'*Areg*.

La deuxième hypothèse s'appuie sur nos données précédemment publiées et interprétées dans la première partie de la Discussion Générale, qui montrent que les souris IL-33KO présentent moins de souffrance (Voir Figure 28 C) et moins de lésions [46]. Par conséquent, en accord avec nos données du Manuscrit n°2, où l'AREG est relarguée proportionnellement à la sévérité de l'IR, cette diminution systémique de l'AREG chez les IL-33KO pourrait être attribuée à une sévérité diminuée et donc, à une libération moindre d'AREG dans le milieu extracellulaire.

Enfin, une hypothèse probable repose sur le rôle actif de l'IL-33 comme déclencheur du relargage actif d'AREG via un axe ST2/hépatocytes, ou encore sur une réduction de l'expression constitutive nucléaire d'AREG dans les hépatocytes des souris IL-33KO. Pour valider ces hypothèses, des analyses d'immunofluorescence avant et après IR seraient nécessaires afin de quantifier et localiser précisément l'AREG dans les hépatocytes de souris IL-33KO.

Chez l'humain, il est à noter que nos données indiquent qu'il n'existe aucune corrélation entre le relargage de ces deux cytokines, IL-33 et AREG, que ce soit en termes de pics moyens au cours de la cinétique ou de pics relatifs observés pour chaque patient (Voir Figure 28). Le relargage d'AREG semble majoritairement lié à la perte d'intégrité cellulaire et semble complété par une néosynthèse transitoire, induite par l'IL-33 mais également d'autres signaux. Ainsi, l'effet de l'IL-33 pourrait être masqué ou dilué par ces mécanismes divergents, complexifiant l'identification d'un lien direct dans les contextes cliniques humains.

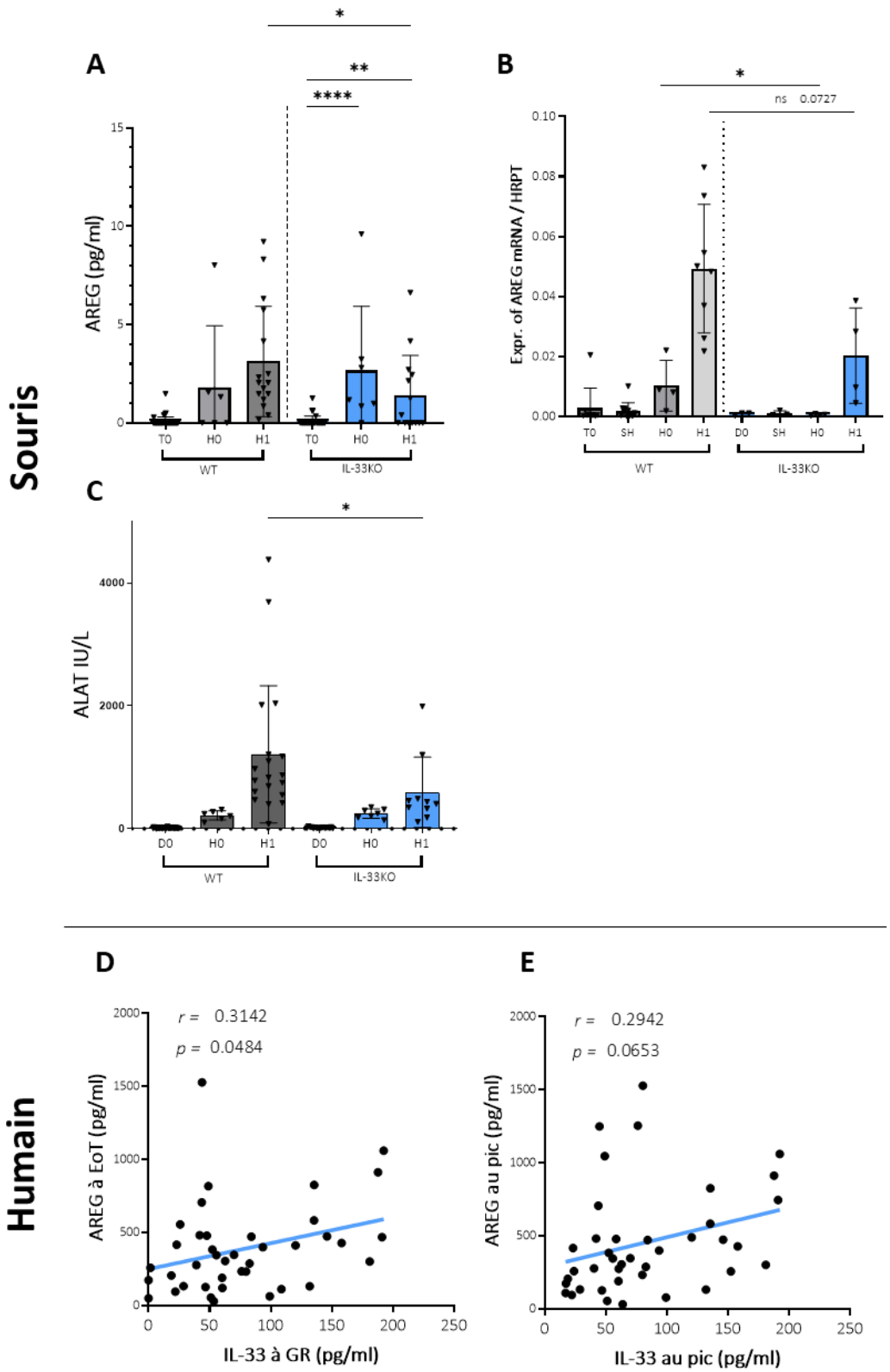


Figure 28 : Données préliminaires en faveur d'un lien entre l'IL-33 et l'AREG. (A-C) : Comparaison des concentrations plasmatiques d'AREG (en pg/ml) (A), de l'expression des transcrits d'AREG intrahépatique (B) et de la concentration plasmatique d'ALAT (en IU/L) (C) chez des souris WT et IL-33KO mesurées avant (T0), ou après 70 minutes d'ischémie (H0) et 1 heure (H1). Données en moyenne ± SEM ; test de Man & Whitney ; *p<0,05 ; **p<0,01 ; ****p<0,0001. D : Corrélation entre la concentration d'AREG et d'IL-33 sérique à leurs pic moyens (respectivement à GR : reperfusion du greffon et EoT : fin de transplantation) (D) et à leurs pics respectifs pour chaque patients LT (n=40). Test de Pearson.

iii. Impact de l'AREG sur les LTI : *switch* vers un système LTI pro-*repair* ?

Nos données issues du **Manuscrit n°1** ont montré un recrutement précoce des LTI par l'IL-33. Cependant, comme indiqué dans la **Partie III** de l'**Introduction générale**, les LTI pourraient constituer une population importante dans les phénomènes de résolution de par leur capacité à la fois immuno-régulatrices et réparatrices décrites dans la littérature.

L'AREG au même titre que les Treg pourrait cibler les LTI pour amplifier ou induire un *switch* vers des fonctions pro-*repair*. En effet, bien qu'aucune étude ne montre que les iNKT ou les MAIT expriment l'EGFR, les travaux de Gutierrez-Arcelus *et al.*, apportent un indice sur sa probable expression par les LTI [94]. Comme discuté dans mon introduction de thèse, les travaux de Gutierrez-Arcelus *et al.*, visaient à définir un gradient *innateness* par scRNAseq. L'AREG fait partie des transcrits analysés. Les données montrent une expression des transcrits d'AREG dont le niveau suit un gradient d'innateness (Voir **Figure 29**). Plus les cellules ont un profil inné, plus elles expriment des taux d'AREG élevés, suggérant une implication majeure des LTI dans les phénomènes immuno-régulateurs.

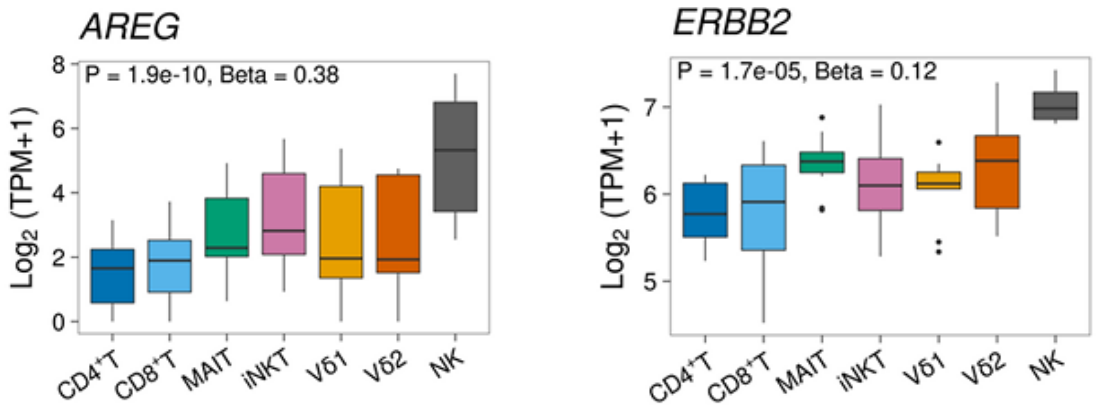


Figure 29 : Gradient innateness AREG et ERBB2. Issue de Gutierrez-Arcelus et al., (2019) [94].

Il n'existe pas de données portant sur l'AREG dans les travaux de Gutierrez-Arcelus *et al.*, lequel aurait pu constituer un élément en faveur d'une AREG ciblant directement les LTI.

Cependant, ERRB2, qui est quant à lui connu pour constituer un hétérodimère avec l'EGFR, suite à la liaison de l'AREG avec ce dernier et, conduisant ainsi à une activation cellulaire. Par ailleurs, son expression suit également un gradient d'*innateness* (Voir Figure 29). ERRB2 pourrait constituer une signature indirecte du potentiel de réponse des LTI à l'AREG. Ainsi, bien que nos données soient préliminaires, l'élargissement de notre étude aux LTI est prometteuse pour valider notre hypothèse d'un axe IL-33/AREG/LTI associé à la TH.

c. Un axe AREG/LTI dans la réparation des lésions d'IR ?

Nos données ont montré au sein de notre cohorte, une augmentation transitoire des proportions relatives des iNKT et des MAIT à la fin de la TH, avec une diminution constatée dès J1 (Voir Figure 30 A). Cependant, l'activation des iNKT et des MAIT, observée dès la fin de la TH, est maintenue jusqu'à J7 post-TH (Voir Figure 30 B). Contrairement à l'activation précoce que nous avions décrite en fin de TH comme une conséquence du relargage de l'IL-33 dans le Manuscrit n°1 [226], cette activation à J1 post-TH des iNKT et des MAIT est corrélée avec la libération systémique d'AREG observée dès la fin de la TH (Voir Figure 30 C). De plus, les données du modèle murin ont montré une augmentation du nombre de iNKT et MAIT intra-hépatiques activées, respectivement jusqu'à J7 et J15 post-IR, attestant une activité sur plusieurs jours des LTI (Voir Figure 30 D et E).

A ce jour, l'implication des iNKT dans une protection des lésions d'IR dans le foie résultait principalement d'un pré-conditionnement par stimulation à l'α-GalCer [212–214], bien que la littérature suggère également que les iNKT, via des stimulations endogènes, puissent protéger si l'on se réfère au travail de Liew *et al.*, dans leur modèle de lésion thermique hépatique [110]. Récemment, les travaux de A du Halgouet *et al.*, ont montré que les MAIT partagent avec les Treg des fonctions réparatrices mettant en jeu la synthèse d'AREG, dans un modèle expérimental de réparation (excision de la peau) chez la souris [115].

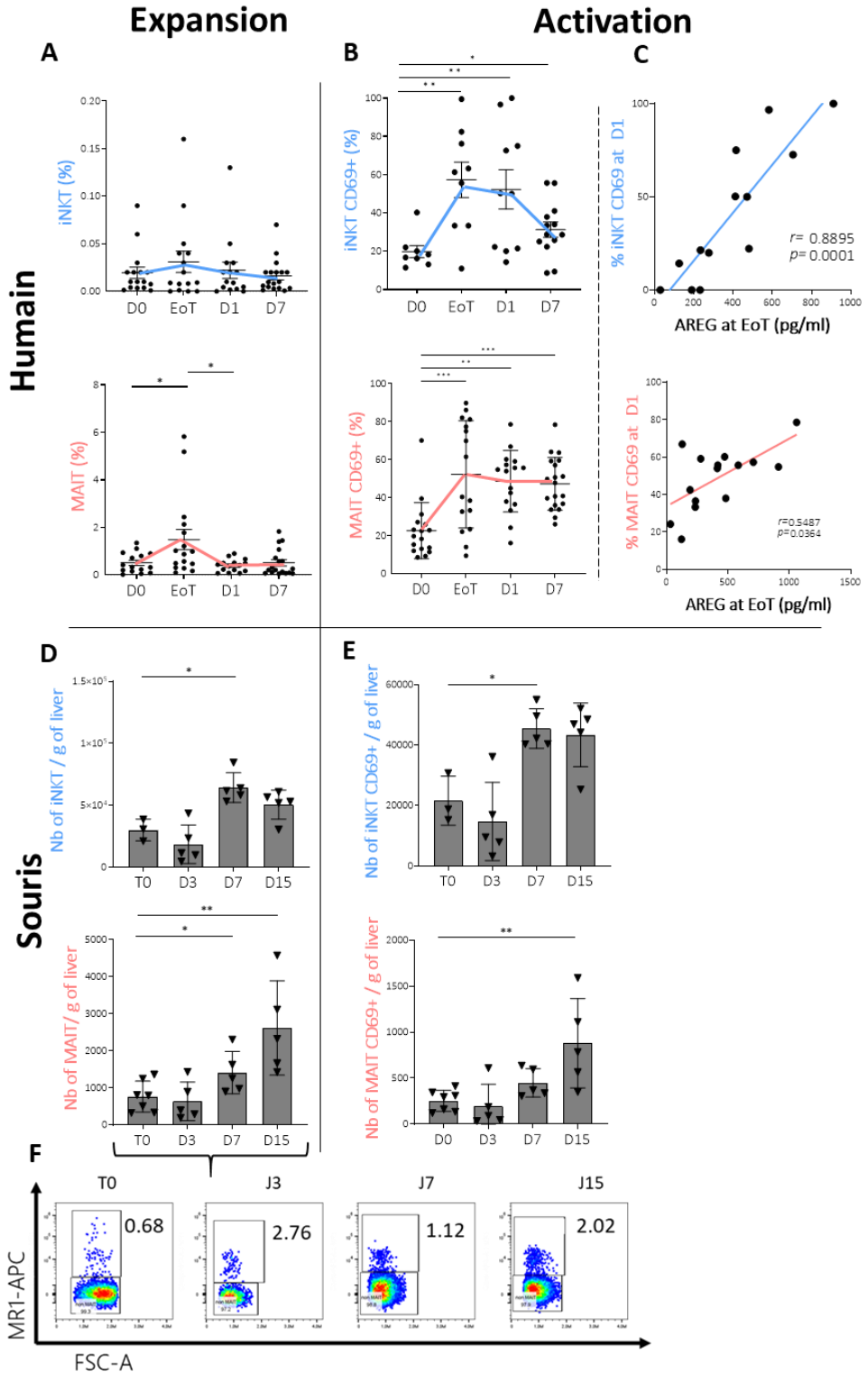


*Figure 30 : Données préliminaires en faveur de l'existence d'un axe réparateur IL-33/AREG/LTI. (A-B) : Proportion d'iNKT et MAIT (**A**) et de cellules activées (CD69+) parmi les iNKT ou MAIT (**B**) (en %) avant et après TH chez l'humain. Analyse par CFS réalisée à partir des PBMC de patients TH avant greffe (D0), à la fin de la greffe (EoT), 1 jour (D1) et 7 jours (D7) après greffe (n=18). Moyenne ± SEM ; test de Mann-Whitney : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. **C** : Corrélation positive entre la proportion de cellules activées (CD69+) parmi les iNKT ou MAIT (en %), 1 jour après TH (D1) avec la concentration sérique d'AREG libérée en fin de TH (EoT) (n=14). Test de Spearman. **(D – E)** : Nombre (en cellule/g de foie) d'iNKT et MAIT parmi les CD45(+) **(D)** et d'iNKT et MAIT activées parmi les iNKT et MAIT **(E)** chez la souris WT. Analyse par CFS réalisée dans le foie des souris avant IR (T0), après 70 minutes d'ischémie, suivi de 3 jours (J3), 7 jours (J7) et 15 jours (J15) de reperfusion (n=3-5). Moyenne ± SD ; test de Mann-Whitney : *p<0,05 ; **p<0,01. **F** : Données de cytométrie en flux représentatives des fréquences des MAIT parmi les cellules CD3(+) dans le foie de souris WT avant IR (T0), après 70 minutes d'ischémie, suivi de 3 jours (D3), 7 jours (D7) et 15 jours (D15) de reperfusion.*

Bien que leur implication dans ces phénomènes de résolution soit décrite dans la littérature, l'implication de l'IL-33 ou de l'AREG dans ce phénomène n'a pas été étudiée et à ce jour aucune littérature ne montre que les iNKT ou MAIT possèdent l'EGFR à leur surface de manière constitutive ou induite.

En documentant ce phénomène d'activation maintenu des MAIT et iNKT, nous posons la question d'un possible relais de l'activation des LTI par l'AREG suite à leur recrutement initial par l'IL-33, lequel contribuerait à une boucle de régulation de production en relais de l'AREG portée par les LTI.

Une étude phénotypique à ce sujet pourra être entreprise par cytométrie en flux ou *western-blot* sur cellules triées avec ou sans stimulation afin de vérifier la possibilité d'une expression de l'EGFR par ces cellules. Par ailleurs, bien qu'une corrélation existe, il pourrait s'agir d'un effet indirect. Comme pour les Treg, il sera nécessaire de vérifier ces hypothèses par une analyse phénotypique de leur statut d'activation chez des souris AREGKO ou en bloquant l'AREG.

De même, notre étude ne permet pas de préjuger du rôle des LTI intrahépatiques *versus* périphériques, et donc au même titre que pour la phase inflammatoire, des splénectomies dans le modèle murin d'IR hépatique pourraient être réalisées afin d'étudier l'effet d'une suppression du recrutement des LTI en provenance de la rate.

En documentant ce phénomène d'activation maintenu des LTI, nous posons là l'interrogation d'un possible relais de l'activation des LTI par l'AREG (après leur recrutement initial par l'IL-33), lequel contribuerait à une boucle de régulation de production en relais de l'AREG porté par les LTI.

i. Un lien privilégié entre l'AREG et les iNKT ?

Une corrélation particulièrement intéressante émerge entre les niveaux d'AREG mesurés à la fin de la transplantation et l'activation prolongée des iNKT observée à un jour post-TH. Ces données suggèrent un lien potentiel entre l'AREG et les iNKT au cours des phénomènes d'IR.

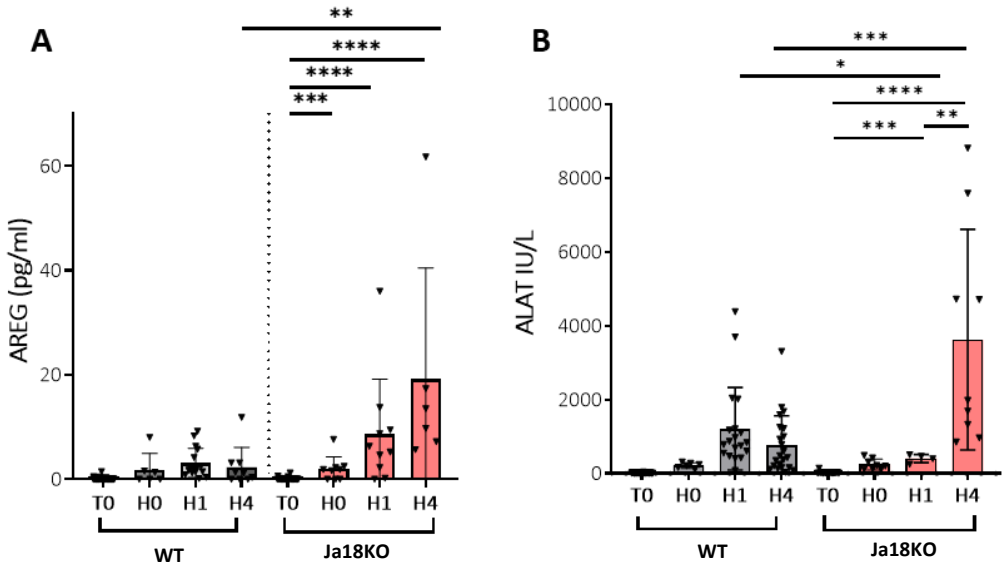


*Figure 31 : Analyse comparative entre la libération d'AREG après IR hépatique chez les souris WT et Ja18KO. A : Comparaison de la concentration plasmatiques d'AREG (en pg/ml) chez des souris WT et IL-33KO mesurées avant (J0), ou après 70 minutes d'ischémie (H0) et 1 heure (H1). Moyenne ± SEM ; test de Man & Whitney : *p<0,05 ; ***p<0,001 ; ****p≤0,0001. B : Comparaison de la concentration plasmatique d'ALAT (IU/L) chez des souris WT et IL-33KO mesurée avant (J0), ou après 70 minutes d'ischémie (H0) et 1 heure (H1). Moyenne ± SEM; test de Man & Whitney: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p≤0,0001.*

Comme démontré précédemment, le taux d'AREG libéré dans la circulation en réponse à l'IR atteint un pic une heure post-IR chez les souris WT. Cependant, bien que statistiquement non significatif, les souris JαKO montrent une augmentation de trois fois des niveaux d'AREG dans le plasma à une heure post-IR, et de manière plus surprenante, ces niveaux atteignent des valeurs huit fois supérieures à celles des souris WT, quatre heures post-IR. Ces résultats suggèrent un lien étroit entre les iNKT et le relargage systémique d'AREG.

Deux hypothèses principales peuvent être envisagées pour expliquer ces observations :

1. Hypothèse d'un rôle direct de l'AREG sur les iNKT : En admettant que les iNKT possèdent l'EGFR et que l'AREG participe à leur activation comme le suggèrent les données chez l'humain, l'AREG pourrait agir comme une cytokine ciblant directement les iNKT, lesquelles représentent la principale population de LTI dans le foie murin. En l'absence des iNKT chez les souris JαKO, l'AREG ne serait pas utilisée localement, ce qui entraînerait une augmentation systémique par rapport aux souris WT. Cette hypothèse sera à vérifier en regardant l'état d'activation des iNKT post-IR en utilisation de souris AREGKO.

2. Hypothèse d'une fonction protectrice des iNKT : Le relargage accru d'AREG chez les souris JαKO pourrait indiquer un rôle protecteur des iNKT au cours de la phase précoce de l'IR, en limitant les lésions hépatiques. Leur absence pourrait exacerber les dommages, entraînant une libération accrue d'AREG en réponse à un stress cellulaire plus important. Cela viendrait accentuer l'hypothèse du rôle des iNKT périphériques *versus* intrahépathiques et/ou en fonction du profil phénotypique des iNKT ciblés. En effet, comme évoqué dans la Partie II de l'Introduction Générale, les iNKT sont composés de différents sous-ensembles aux fonctions distinctes. On peut imaginer que les iNKT Foxp3 soient impliqués dans ces phénomènes de protection. L'expression de Foxp3 dans les iNKT n'est pas constitutive suite au développement thymique mais peut être induite à la périphérie dans des conditions spécifiques, tel qu'un environnement riche en TGF-β.Les iNKT migrent ensuite vers le foie et conservent leur phénotype régulateur [106,107].

Ces hypothèses soulignent la nécessité d'études complémentaires pour clarifier le lien des iNKT avec l'AREG au cours des phénomènes d'IR hépatique. Cela pourrait inclure des études sur l'interaction directe entre l'AREG et les iNKT, ainsi que des analyses fonctionnelles plus approfondies des mécanismes transcriptionnels et cellulaires en jeu.

d. Eprouver l'hypothèse d'un axe IL-33/AREG/LT/AREG protecteur

i. Eprouver un rôle protecteur ou délétère de l'AREG et de l'IL-33

Si l'AREG endogène observée joue un rôle actif dans la réponse au stress hépatique, une question centrale se pose quant à sa fonction précise dans la physiopathologie de l'IR hépatique. A de nombreuses reprises dans le cadre d'IR d'organe, l'AREG a été décrite comme protectrice [150,180,181,237–239]. Cependant, l'AREG a également été décrite en tant que cytokine pouvant aggraver l'inflammation stérile aiguë comme dans le cas de la glomérulonéphrite aiguë [240] et il a été également montré que l'AREG joue un rôle important dans la dysfonction chronique des allogreffes pulmonaires en contribuant au remodelage des voies respiratoires [241]. À ce jour, nous ne pouvons pas déterminer si l'AREG exerce un effet protecteur ou délétère dans ce contexte. Pour répondre à cette interrogation, l'utilisation d'un modèle murin d'IR hépatique sur des souris AREGKO sera essentielle. Si une augmentation de la souffrance hépatique et des lésions est observée chez ces souris après une IR hépatique, cela indiquerait un rôle protecteur de l'AREG constitutivement exprimée. Cette hypothèse semble plausible, car d'autres études ont déjà souligné l'importance de l'AREG dans la résolution des situations d'inflammation stérile aiguë hépatique comme l'hépatectomie partielle. Discriminer le rôle de l'AREG constitutif et néosynthétisé sera également important car nous ne pouvons pas exclure une action pro-inflammatoire délétère de l'AREG constitutive qui serait alors suivie d'une action protectrice/réparatrice expliquée par plusieurs sources cellulaires et/ou une production continue d'AREG.

De même, pour l'IL-33, une approche par blocage de l'IL-33 en utilisant des anticorps neutralisants dans un modèle murin d'IR à différents temps (phase précoce : alarmine *versus* phase tardive : néosynthèse) serait à envisager pour tenter de discriminer les rôles délétères et protecteurs de l'IL-33 constitutive, de celle néosynthétisée.

ii. Confirmer l'influence de l'IL-33 sur le relargage de l'AREG

Les observations faites dans le modèle murin d'IR montrent que le relargage et/ou la néosynthèse d'AREG pourraient être influencés par l'IL-33. Une façon de vérifier ces hypothèses serait de, *in vitro,* induire un stress hypoxique à des hépatocytes comme présenté avec les HepG2 en supplémentant le milieu avec de l'IL-33 lors de la réoxygénation pour mimer le relargage de l'IL-33 lors de la reperfusion en IR. Si une augmentation des transcrits d'*AREG* est observée avec de l'IL-33 *versus* un contrôle alors celle-ci induit bien une néosynthèse d'AREG. Si une perte plus importante d'AREG nucléaire avec de l'IL-33 est observée par immunofluorescence, alors l'IL-33 participe probablement à un relargage actif sous condition que la souffrance, elle, ne diffère pas.

iii. Les Treg et les LTI dans la réparation

Une étude phénotypique des Treg et LTI par cytométrie en flux en modélisation animale d'IR hépatique (WT *versus* transgéniques : AREGKO et IL-33KO / neutralisation IL-33 et AREG) et observationnelle en TH clinique avec des panels permettant d'observer l'influence de l'IR et la TH sur l'activation et le phénotype réparateur (expression de l'AREG et de son récepteur EGFR) de ces cellules devra être envisagé.

De façon plus intéressante, nous pourrions utiliser des souris transgéniques inductibles (AREG et IL-33) permettant de contrôler dans le temps et dans l'espace, l'inactivation de l'AREG ou de l'IL-33 afin d'observer par cytométrie en flux si, en l'absence de ces cytokines, sous certaines conditions, cela induit chez les Treg et LTI un déficit d'activation et/ou de production d'AREG et comment cela influence la physiopathologie de l'IR hépatique.

Il serait enrichissant de compléter ces données avec une modélisation *in vitro* de stimulation des Treg ou des LTI par l'IL-33 et l'AREG (combinée ou non) dans le but d'observer par cytométrie en flux des possibles effets de ces cytokines sur l'activation et l'expression membranaire de l'AREG et de l'EGFR.

iv. L'AREG en tant qu'alarmine ?

L'ensemble des observations énumérées dans le **Manuscrit 2** et la 2ème partie de cette **Discussion Générale** suggère que l'AREG nucléaire constitutivement exprimée par les hépatocytes pourrait constituer un « réservoir prêt à l'emploi », libéré en réponse à un stress cellulaire pour signaler un danger, à l'image des DAMPs. Plus précisément, l'AREG pourrait être considérée comme une alarmine selon les critères suivants :

1. **Expression constitutive et localisation nucléaire :** L'AREG est constitutivement exprimée et localisée dans les noyaux des cellules, comme l'atteste sa distribution homogène, y compris dans les hépatocytes bi- ou tri-nucléés. Cette expression constitutive et son confinement intracellulaire initial sont cohérents avec l'idée d'un « réservoir prêt à l'emploi », caractéristique des alarmines.

2. **Libération en réponse au stress aigu :** Dans le contexte de l'ischémie-reperfusion hépatique, nos données montrent une libération précoce et significative d'AREG dans la circulation systémique en réponse au stress aigu des hépatocytes, qui est un autre critère fondamental des alarmines.

3. **Capacité d'alerte immunitaire :** Plusieurs éléments discutés précédemment suggèrent que l'AREG possède une capacité à activer une réponse immunitaire en signalant un état de danger. En particulier, la corrélation avec l'activation des Treg dès la fin de la transplantation.

4. Propriétés protectrices/réparatrices : De nombreuses études ont mis en évidence les propriétés importantes de l'AREG dans la résolution de différents modèles d'inflammation aiguë. En effet, la déficience en AREG dans des contextes d'inflammation stérile aiguë entraîne une exacerbation des lésions, une altération de la fonction organique et un retard notable de la régénération tissulaire, soulignant son rôle crucial dans les mécanismes de protection et de réparation.

5. Relai de production par le système immunitaire : A l'image de l'IL-33 avec les cellules innées myéloïdes, un relai de production par le système immunitaire est observé suite à un contexte pro-inflammatoire, ici porté par des cellules lymphocytaires.

Cette hypothèse est purement spéculative, puisqu'à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas confirmer ce rôle de l'AREG. Cependant, cette étude ouvre des perspectives intéressantes, notamment sur la possibilité que ce « *pool* nucléaire » d'AREG puisse servir de réserve mobilisable en cas de stress cellulaire, en particulier dans le contexte d'un organe particulièrement sujet à diverses formes d'agressions. Pour se faire, son mécanisme de relargage précis et sa forme nucléaire devront être étudiés plus en détail afin de vérifier cette hypothèse.

v. L'AREG en tant que biomarqueur prédictif pour la clinique

Enfin comme évoqué dans le Manuscrit n°2, les résultats sur l'AREG en lien avec la sévérité de l'IR soulignent aussi son potentiel en tant que biomarqueur fiable pour évaluer la souffrance hépatique, notamment dans des contextes pathologiques tels que l'IR, et les maladies chroniques avancées.

Son dosage dans les machines à perfusion pourrait permettre de prédire un état de souffrance hépatique. L'intégration des taux d'AREG aux outils d'évaluation clinique actuels, tels que les MEAF [242] ou plus récemment, le score « *liver graft assessment following transplantation* » (L-GrAFT) [243], pourrait représenter une avancée significative dans l'évaluation fonctionnelle et pronostique des maladies hépatiques. Ces perspectives ouvrent la voie à des études complémentaires à travers une étude prospective de plus grande ampleur, visant à valider l'utilité clinique de l'AREG en tant que biomarqueur précoce.

Au-delà d'un biomarqueur « délétère », en concertation avec la littérature actuelle, et les données produites lors de cette thèse, il convient de poser l'AREG comme biomarqueur d'une mise en place de la réparation robuste. En effet, bien que le Manuscrit n°2, l'AREG est été associée à de la souffrance et des lésions suite à l'IR, elle n'en reste pas moins une cytokine protectrice en situation inflammatoire aiguë, mise ne place rapidement dans un processus de réparation. Bien que cela ne soit qu'une simple idée, celle-ci pourrait être intéressante pour des centres de réhabilitation des greffons comme celui présenté dans la Partie I de l'Introduction Générale. L'idée de pouvoir doser sur des machines à perfusion un élément issu d'un système de réparation, associé à un score, pourrait permettre de vérifier la viabilité/fonctionnalité à court ou long terme d'un greffon.

Conclusion Générale

Un enjeu scientifique et clinique majeur en transplantation d'organe réside dans la meilleure compréhension des facteurs influençant la survie, la fonction et la régénération des tissus après l'IR.

Dans le cadre de ce travail, le rôle des LTI recrutés par l'IL-33 a été mis en évidence dans la genèse des lésions d'IR et le dysfonctionnement précoce du greffon. Pour la première fois, l'AREG a été décrite comme une protéine constitutivement exprimée par les cellules hépatocytaires et libérée précocement dans le milieu extracellulaire en réponse à leur souffrance. Ce relargage est associé à un recrutement rapide des Treg en lien avec l'IL-33, suivi d'un recrutement plus tardif des LTI.

De manière générale, les résultats obtenus lors cette thèse offrent une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le syndrome d'IR hépatique. Ils proposent un nouveau modèle hypothétique mettant en lumière un axe immuno-régulateur IL-33/AREG/LTI, qui s'active dès la phase de reperfusion et s'étend sur plusieurs jours, comme illustré en Figure 32.

Ainsi, la dualité fonctionnelle de l'alarmine IL-33 a été soulignée, avec d'abord, un rôle délétère impliquant les LTI dans la genèse des lésions post-IR, puis, potentiellement en coordination avec l'AREG, dans une phase de protection/réparation du tissu hépatique, impliquant à la fois des Treg et des LTI.

À terme, il sera essentiel de mieux caractériser le rôle de l'AREG, qu'il soit délétère et/ou protecteur, dans le contexte de l'IR hépatique et, plus largement, dans les processus d'inflammation stérile.

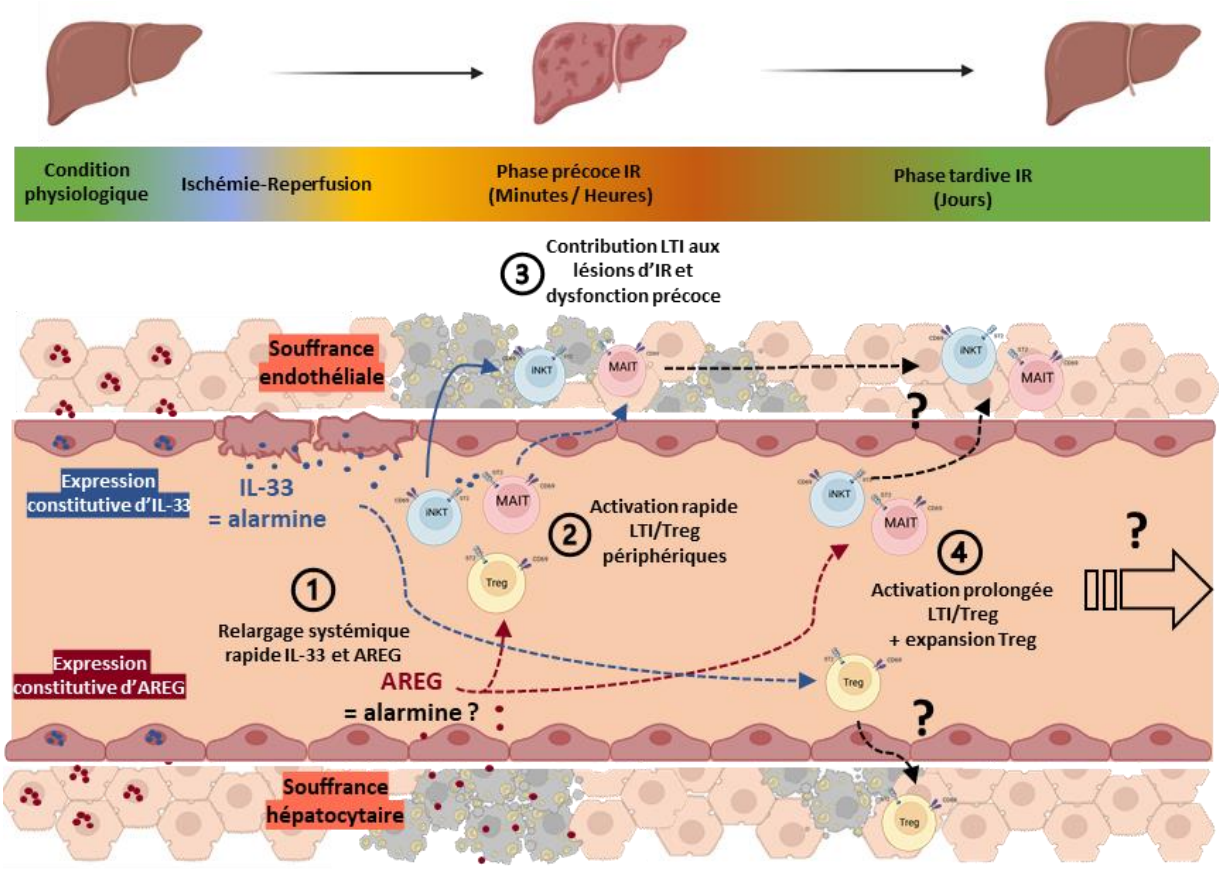


Figure 32 : Intégration des données expérimentales dans une chronologie des événements survenant lors d'une transplantation hépatique. 1 : Sous l'effet des souffrances endothéliales et hépatocytaires, une libération rapide d'IL-33 et d'AREG est observée, agissant comme des "alarmines". 2 : Activation rapide des lymphocytes périphériques (iNKT, MAIT, Treg) en réponse à la libération de l'IL-33 ou l'AREG. 3 : Contribution des lymphocytes innés (iNKT, MAIT) activées au dysfonctionnement tissulaire précoce induites par l'IR. 4 : Activation prolongée des LTI et des Tregs accompagnée d'une expansion des Treg. Les liens indiqués par des flèches en pointillées indiquent des résultats ou hypothèses à éprouver. BioRender et Servier Medical Art [9,108]

Bibliographie

Les références présentées ci-dessous correspondent celles du manuscrit de thèse en dehors des articles.

[1] ABM - Rapport d'activité 2023 n.d. https://rapport-annuel.agence-biomedecine.fr/page02 (accessed January 26, 2025).

[2] Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A Model to Predict Survival in Patients With End–Stage Liver Disease. Hepatology 2001;33:464–70. https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22172.

[3] Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. Exp Mol Pathol 2003;74:86–93. https://doi.org/10.1016/s0014-4800(03)00008-x.

[4] Solutions E, Park F. Organ Regeneration Lab: Saving Organs. Saving Lives. Kearns Mancini Architects 2022. https://kmai.com/updates/organ-regeneration-lab-saving-organs-saving-lives/ (accessed January 27, 2025).

[5] Elsayes KM, editor. Cross-Sectional Imaging of the Abdomen and Pelvis: A Practical Algorithmic Approach. New York, NY: Springer New York; 2015. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1884-3.

[6] Bessaguet F, Desmoulière A. Le foie. Actualités Pharmaceutiques 2021;60:57–61. https://doi.org/10.1016/j.actpha.2021.02.013.

[7] Namur J. Microsphères d'embolisation pour la vectorisation de principes actifs : étude de la libération in vivo par microspectroscopies optiques, 2009.

[8] Les fondamentaux de la pathologie digestive | Livre + Compl. | 9782294731181. Elsevier Masson SAS n.d. https://www.elsevier-masson.fr/les-fondamentaux-de-la-pathologie-digestive-9782294731181.html (accessed January 26, 2025).

[9] SMART. Servier Medical Art n.d. https://smart.servier.com/ (accessed January 30, 2025).

[10] Mackay IR. Hepatoimmunology: A perspective. Immunol Cell Biol 2002;80:36–44. https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2002.01063.x.

[11] Racanelli V, Rehermann B. The Liver as an Immunological Organ. Hepatology 2006;43:S54–62. https://doi.org/10.1002/hep.21060.

[12] Stamataki Z, Swadling L. The liver as an immunological barrier redefined by single-cell analysis. Immunology 2020;160:157–70. https://doi.org/10.1111/imm.13193.

[13] Aizarani N, Saviano A, Sagar null, Mailly L, Durand S, Herman JS, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. Nature 2019;572:199–204. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1373-2.

[14] Gong J, Tu W, Liu J, Tian D. Hepatocytes: A key role in liver inflammation. Front Immunol 2023;13:1083780. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1083780.

[15] Fazel Modares N, Polz R, Haghighi F, Lamertz L, Behnke K, Zhuang Y, et al. IL-6 Trans-signaling Controls Liver Regeneration After Partial Hepatectomy. Hepatology 2019;70:2075–91. https://doi.org/10.1002/hep.30774.

[16] Van Golen RF, Van Gulik TM, Heger M. The sterile immune response during hepatic ischemia/reperfusion. Cytokine & Growth Factor Reviews 2012;23:69–84. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.04.006.

[17] Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol 2020;20:95–112. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7.

[18] Zeissig S, Peuker K, Iyer S, Gensollen T, Dougan SK, Olszak T, et al. CD1d-Restricted pathways in hepatocytes control local natural killer T cell homeostasis and hepatic inflammation.

Proceedings of the National Academy of Sciences 2017;114:10449–54. https://doi.org/10.1073/pnas.1701428114.
[19] Lett MJ, Mehta H, Keogh A, Jaeger T, Jacquet M, Powell K, et al. Stimulatory MAIT cell antigens reach the circulation and are efficiently metabolised and presented by human liver cells. Gut 2022;71:2526–38. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324478.
[20] Knolle PA, Wohlleber D. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. Cell Mol Immunol 2016;13:347–53. https://doi.org/10.1038/cmi.2016.5.
[21] McKee C, Sigala B, Soeda J, Mouralidarane A, Morgan M, Mazzoccoli G, et al. Amphiregulin activates human hepatic stellate cells and is upregulated in non alcoholic steatohepatitis. Sci Rep 2015;5:8812. https://doi.org/10.1038/srep08812.
[22] Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, et al. Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses. Immunity 2007;26:117–29. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.11.011.
[23] Charles R, Chou H-S, Wang L, Fung JJ, Lu L, Qian S. Human Hepatic Stellate Cells Inhibit T-Cell Response Through B7-H1 Pathway. Transplantation 2013;96:17–24. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318294caae.
[24] Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver Immunology. In: Prakash YS, editor. Comprehensive Physiology. 1st ed., Wiley; 2013, p. 567–98. https://doi.org/10.1002/cphy.c120011.
[25] Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver — from homeostasis to disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2016;13:88–110. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200.
[26] Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. Nature 2015;518:547–51. https://doi.org/10.1038/nature13989.
[27] Kurioka A, Walker LJ, Klenerman P, Willberg CB. MAIT cells: new guardians of the liver. Clin Transl Immunology 2016;5:e98. https://doi.org/10.1038/cti.2016.51.
[28] Tang T, Sui Y, Lian M, Li Z, Hua J. Pro-Inflammatory Activated Kupffer Cells by Lipids Induce Hepatic NKT Cells Deficiency through Activation-Induced Cell Death. PLoS One 2013;8:e81949. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081949.
[29] Ochel A, Tiegs G, Neumann K. Type 2 Innate Lymphoid Cells in Liver and Gut: From Current Knowledge to Future Perspectives. Int J Mol Sci 2019;20:1896. https://doi.org/10.3390/ijms20081896.
[30] Chen Y, Tian Z. Innate lymphocytes: pathogenesis and therapeutic targets of liver diseases and cancer. Cell Mol Immunol 2021;18:57–72. https://doi.org/10.1038/s41423-020-00561-z.
[31] Rubartelli A, Lotze MT, Latz E, Manfredi A. Mechanisms of Sterile Inflammation. Front Immunol 2013;4:398. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00398.
[32] Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of Sterile Inflammation. The Journal of Immunology 2013;191:2857–63. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301539.
[33] McDonald B, Kubes P. Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. Gastroenterology 2016;151:1087–95. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.048.
[34] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol 1994;12:991–1045. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.005015.
[35] Janeway C. Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. Immunol Today 1989;10:283–6. https://doi.org/10.1016/0167-5699(89)90081-9.
[36] Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. Immunol Rev 2012;249:158–75. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.
[37] Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. Journal of Leukocyte Biology 2007;81:1–5. https://doi.org/10.1189/jlb.0306164.

[38] Ignat S-R, Dinescu S, Hermenean A, Costache M. Cellular Interplay as a Consequence of Inflammatory Signals Leading to Liver Fibrosis Development. Cells 2020;9:461. https://doi.org/10.3390/cells9020461.
[39] Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. Current Opinion in Immunology 2005;17:359–65. https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.06.002.
[40] Yang D, Han Z, Oppenheim JJ. Alarmins and immunity. Immunological Reviews 2017;280:41–56. https://doi.org/10.1111/imr.12577.
[41] Li G, Liang X, Lotze MT. HMGB1: The Central Cytokine for All Lymphoid Cells. Front Immunol 2013;4. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00068.
[42] Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. Mol Aspects Med 2014;40:1–116. https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.05.001.
[43] Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. EMBO Rep 2002;3:995–1001. https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf198.
[44] Foglio E, Pellegrini L, Russo MA, Limana F. HMGB1-Mediated Activation of the Inflammatory-Reparative Response Following Myocardial Infarction. Cells 2022;11:216. https://doi.org/10.3390/cells11020216.
[45] Ferhat M, Robin A, Giraud S, Sena S, Goujon J-M, Touchard G, et al. Endogenous IL-33 Contributes to Kidney Ischemia-Reperfusion Injury as an Alarmin. JASN 2018;29:1272–88. https://doi.org/10.1681/ASN.2017060650.
[46] Barbier L, Robin A, Sindayigaya R, Ducousso H, Dujardin F, Thierry A, et al. Endogenous Interleukin-33 Acts as an Alarmin in Liver Ischemia-Reperfusion and Is Associated With Injury After Human Liver Transplantation. Front Immunol 2021;12:744927. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744927.
[47] Barbier L, Ferhat M, Salamé E, Robin A, Herbelin A, Gombert J-M, et al. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. Front Immunol 2019;10:2014. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02014.
[48] Ferhat MH, Robin A, Barbier L, Thierry A, Gombert J-M, Barbarin A, et al. The Impact of Invariant NKT Cells in Sterile Inflammation: The Possible Contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33. Front Immunol 2018;9:2308. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02308.
[49] Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Samson M. IL-33 and HMGB1 alarmins: sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. Liver Int 2012;32:1200–10. https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02802.x.
[50] Maspero M, Yilmaz S, Cazzaniga B, Raj R, Ali K, Mazzaferro V, et al. The role of ischaemia-reperfusion injury and liver regeneration in hepatic tumour recurrence. JHEP Reports 2023;5:100846. https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2023.100846.
[51] Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia–reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2013;10:79–89. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.225.
[52] Liu J, Man K. Mechanistic Insight and Clinical Implications of Ischemia/Reperfusion Injury Post Liver Transplantation. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology 2023;15:1463–74. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.03.003.
[53] Middleton P, Vergis N. Mitochondrial dysfunction and liver disease: role, relevance, and potential for therapeutic modulation. Therap Adv Gastroenterol 2021;14:17562848211031394. https://doi.org/10.1177/17562848211031394.
[54] Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. J Gastroenterol Hepatol 2011;26 Suppl 1:173–9. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06592.x.

[55] Tang S, Mao X, Chen Y, Yan L, Ye L, Li S. Reactive Oxygen Species Induce Fatty Liver and Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Inflammation and Cell Death. Front Immunol 2022;13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.870239.
[56] Zuidema MY. Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. WJC 2010;2:325. https://doi.org/10.4330/wjc.v2.i10.325.
[57] Tsoulfas G, Geller DA. NF-κB in transplantation: friend or foe?: NF-κB in transplantation: friend or foe? Transplant Infectious Disease 2001;3:212–9. https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2001.30405.x.
[58] Thorgersen EB, Barratt-Due A, Haugaa H, Harboe M, Pischke SE, Nilsson PH, et al. The Role of Complement in Liver Injury, Regeneration, and Transplantation. Hepatology 2019;70:725–36. https://doi.org/10.1002/hep.30508.
[59] Nakamura K, Kageyama S, Kupiec-Weglinski JW. The Evolving Role of Neutrophils in Liver Transplant Ischemia-Reperfusion Injury. Curr Transplant Rep 2019;6:78–89. https://doi.org/10.1007/s40472-019-0230-4.
[60] Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290:G1083-1088. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00568.2005.
[61] Zhao W, Li M, Song S, Zhi Y, Huan C, Lv G. The role of natural killer T cells in liver transplantation. Front Cell Dev Biol 2024;11. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1274361.
[62] Klune JR, Tsung A. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. Surg Clin North Am 2010;90:665–77. https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.003.
[63] Friedman SL. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. Physiol Rev 2008;88:125–72. https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007.
[64] Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. Liver Transpl 2010;16:1016–32. https://doi.org/10.1002/lt.22117.
[65] Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen F-E, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. Am J Pathol 2003;163:69–79. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63631-0.
[66] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity 2005;23:479–90. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.015.
[67] Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. Immunological Reviews 2018;281:154–68. https://doi.org/10.1111/imr.12619.
[68] Moussion C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? PLoS One 2008;3:e3331. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003331.
[69] Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A critical review of its biology and the mechanisms involved in its release as a potent extracellular cytokine. Cytokine 2022;156:155891. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155891.
[70] Liu X, Hammel M, He Y, Tainer JA, Jeng U-S, Zhang L, et al. Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:14918–23. https://doi.org/10.1073/pnas.1308651110.
[71] Saikumar Jayalatha AK, Hesse L, Ketelaar ME, Koppelman GH, Nawijn MC. The central role of IL-33/IL-1RL1 pathway in asthma: From pathogenesis to intervention. Pharmacology & Therapeutics 2021;225:107847. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107847.

[72] Bandara G, Beaven MA, Olivera A, Gilfillan AM, Metcalfe DD. Activated mast cells synthesize and release soluble ST2-a decoy receptor for IL-33. Eur J Immunol 2015;45:3034–44. https://doi.org/10.1002/eji.201545501.
[73] Liew FY, Girard J-P, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. Nat Rev Immunol 2016;16:676–89. https://doi.org/10.1038/nri.2016.95.
[74] Xu H, Turnquist HR, Hoffman R, Billiar TR. Role of the IL-33-ST2 axis in sepsis. Military Medical Research 2017;4:3. https://doi.org/10.1186/s40779-017-0115-8.
[75] Marvie P, Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. J Cellular Molecular Medi 2010;14:1726–39. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00801.x.
[76] Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S, Ezan F, et al. TRAIL but not FasL and TNFα, regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. Hepatology 2012;56:2353–62. https://doi.org/10.1002/hep.25893.
[77] Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, et al. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. Eur J Immunol 2011;41:2341–8. https://doi.org/10.1002/eji.201041332.
[78] Williams JW, Tjota MY, Clay BS, Vander Lugt B, Bandukwala HS, Hrusch CL, et al. Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. Nat Commun 2013;4:2990. https://doi.org/10.1038/ncomms3990.
[79] Hsu C-L, Neilsen CV, Bryce PJ. IL-33 Is Produced by Mast Cells and Regulates IgE-Dependent Inflammation. PLoS ONE 2010;5:e11944. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011944.
[80] Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. Immunology 2010;130:172–80. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03221.x.
[81] Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Morii E, Aozasa K, Flavell RA, et al. Caspase-1, Caspase-8, and Calpain Are Dispensable for IL-33 Release by Macrophages1. The Journal of Immunology 2009;183:7890–7. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802449.
[82] Gadani SP, Walsh JT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. Neuron 2015;85:703–9. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.013.
[83] Michaudel C, Mackowiak C, Maillet I, Fauconnier L, Akdis CA, Sokolowska M, et al. Ozone exposure induces respiratory barrier biphasic injury and inflammation controlled by IL-33. J Allergy Clin Immunol 2018;142:942–58. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.044.
[84] Dwyer GK, D'Cruz LM, Turnquist HR. Emerging Functions of IL-33 in Homeostasis and Immunity. Annu Rev Immunol 2022;40:15–43. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101320-124243.
[85] Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. European Journal of Immunology 2009;39:1046–55. https://doi.org/10.1002/eji.200838575.
[86] Azzout M, Dietrich C, Machavoine F, Gastineau P, Bottier A, Lezmi G, et al. IL-33 Enhances IFNγ and TNFα Production by Human MAIT Cells: A New Pro-Th1 Effect of IL-33. IJMS 2021;22:10602. https://doi.org/10.3390/ijms221910602.
[87] Yazdani HO, Chen H-W, Tohme S, Tai S, Van Der Windt DJ, Loughran P, et al. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. Journal of Hepatology 2018;68:130–9. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.010.
[88] Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J. 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. Cellular Physiology and Biochemistry 2017;43:2155–69. https://doi.org/10.1159/000484295.
[89] Wachtendorf S, Jonin F, Ochel A, Heinrich F, Westendorf AM, Tiegs G, et al. The ST2+ Treg/amphiregulin axis protects from immune-mediated hepatitis. Front Immunol 2024;15:1351405. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1351405.

[90] Smithgall MD, Comeau MR, Park Yoon B-R, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK Cells. International Immunology 2008;20:1019–30. https://doi.org/10.1093/intimm/dxn060.
[91] Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma & Clinical Immunology 2018;14:49. https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1.
[92] Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. Nat Immunol 2015;16:1114–23. https://doi.org/10.1038/ni.3298.
[93] Van Rhijn I, Moody DB. Donor Unrestricted T cells: a shared human T cell response. J Immunol 2015;195:1927–32. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500943.
[94] Gutierrez-Arcelus M, Teslovich N, Mola AR, Polidoro RB, Nathan A, Kim H, et al. Lymphocyte innateness defined by transcriptional states reflects a balance between proliferation and effector functions. Nat Commun 2019;10:687. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08604-4.
[95] Daniel L, Tassery M, Lateur C, Thierry A, Herbelin A, Gombert J-M, et al. Allotransplantation Is Associated With Exacerbation of CD8 T-Cell Senescence: The Particular Place of the Innate CD8 T-Cell Component. Front Immunol 2021;12. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674016.
[96] Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. Nat Rev Immunol 2011;11:131–42. https://doi.org/10.1038/nri2904.
[97] Rossjohn J, Pellicci DG, Patel O, Gapin L, Godfrey DI. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. Nat Rev Immunol 2012;12:845–57. https://doi.org/10.1038/nri3328.
[98] Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. Current Opinion in Immunology 2008;20:358–68. https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.018.
[99] Shissler SC, Webb TJ. The Ins and Outs of Type I iNKT Cell Development. Mol Immunol 2019;105:116–30. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.09.023.
[100] Savage AK, Constantinides MG, Han J, Picard D, Martin E, Li B, et al. The Transcription Factor PLZF Directs the Effector Program of the NKT Cell Lineage. Immunity 2008;29:391–403. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.011.
[101] Leite-de-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, Machavoine F, Koezuka Y, Schneider E, et al. A Distinct IL-18-Induced Pathway to Fully Activate NK T Lymphocytes Independently from TCR Engagement1. The Journal of Immunology 1999;163:5871–6. https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.11.5871.
[102] Cui Y, Wan Q. NKT Cells in Neurological Diseases. Front Cell Neurosci 2019;13:245. https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00245.
[103] Lee YJ, Holzapfel KL, Zhu J, Jameson SC, Hogquist KA. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. Nat Immunol 2013;14:1146–54. https://doi.org/10.1038/ni.2731.
[104] Kim EY, Lynch L, Brennan PJ, Cohen NR, Brenner MB. The transcriptional programs of iNKT cells. Semin Immunol 2015;27:26–32. https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.02.005.
[105] Chang P-P, Barral P, Fitch J, Pratama A, Ma CS, Kallies A, et al. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. Nat Immunol 2011;13:35–43. https://doi.org/10.1038/ni.2166.
[106] Lynch L, Michelet X, Zhang S, Brennan PJ, Moseman A, Lester C, et al. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. Nat Immunol 2015;16:85–95. https://doi.org/10.1038/ni.3047.
[107] Monteiro M, Almeida CF, Caridade M, Ribot JC, Duarte J, Agua-Doce A, et al. Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF-beta. J Immunol 2010;185:2157–63. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000359.

[108] Scientific Image and Illustration Software | BioRender n.d. https://www.biorender.com/ (accessed January 30, 2025).
[109] Tanno H, Kawakami K, Kanno E, Suzuki A, Takagi N, Yamamoto H, et al. Invariant NKT cells promote skin wound healing by preventing a prolonged neutrophilic inflammatory response. Wound Repair Regen 2017;25:805–15. https://doi.org/10.1111/wrr.12588.
[110] Liew PX, Lee W-Y, Kubes P. iNKT Cells Orchestrate a Switch from Inflammation to Resolution of Sterile Liver Injury. Immunity 2017;47:752-765.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.016.
[111] Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. Nature 2003;422:164–9. https://doi.org/10.1038/nature01433.
[112] Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Péguillet I, Premel V, Louis D, et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. Blood 2011;117:1250–9. https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-303339.
[113] Legoux F, Salou M, Lantz O. MAIT Cell Development and Functions: the Microbial Connection. Immunity 2020;53:710–23. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.09.009.
[114] Martin E, Treiner E, Duban L, Guerri L, Laude H, Toly C, et al. Stepwise Development of MAIT Cells in Mouse and Human. PLOS Biology 2009;7:e1000054. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000054.
[115] Halgouet A du, Darbois A, Alkobtawi M, Mestdagh M, Alphonse A, Premel V, et al. Role of MR1-driven signals and amphiregulin on the recruitment and repair function of MAIT cells during skin wound healing. Immunity 2023;56:78-92.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.12.004.
[116] Lin X, Wang Y, He Y. Mucosal-associated invariant T cells in infectious diseases of respiratory system: recent advancements and applications. J Inflamm (Lond) 2024;21:6. https://doi.org/10.1186/s12950-024-00376-z.
[117] Gao M, Zhao X. Insights into the tissue repair features of MAIT cells. Front Immunol 2024;15. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1432651.
[118] Thierry A, Giraud S, Robin A, Barra A, Bridoux F, Ameteau V, et al. The Alarmin Concept Applied to Human Renal Transplantation: Evidence for a Differential Implication of HMGB1 and IL-33. PLOS ONE 2014;9:e88742. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088742.
[119] Zhang J, Wang Z, Xu Z, Han Z, Tao J, Lu P, et al. The Potential Role of IL-33 in Renal Transplant Recipients with Chronic Allograft Dysfunction. Ann Transplant 2016;21:611–8. https://doi.org/10.12659/aot.899263.
[120] Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. Annu Rev Immunol 2007;25:297–336. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
[121] Nakajima S, Tanaka R, Yamashiro K, Chiba A, Noto D, Inaba T, et al. Mucosal-Associated Invariant T Cells Are Involved in Acute Ischemic Stroke by Regulating Neuroinflammation. JAHA 2021;10:e018803. https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018803.
[122] Snelgrove SL, Susanto O, Yeung L, Hall P, Norman MU, Corbett AJ, et al. T-cell receptor αβ+ double-negative T cells in the kidney are predominantly extravascular and increase in abundance in response to ischemia-reperfusion injury. Immunol Cell Biol 2023;101:49–64. https://doi.org/10.1111/imcb.12595.
[123] Li L, Huang L, Sung SJ, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. J Immunol 2007;178:5899–911. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5899.
[124] Wang Z-K, Xue L, Wang T, Wang X-J, Su Z-Q. Infiltration of invariant natural killer T cells occur and accelerate brain infarction in permanent ischemic stroke in mice. Neuroscience Letters 2016;633:62–8. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.09.010.

[125] Shimamura K, Kawamura H, Nagura T, Kato T, Naito T, Kameyama H, et al. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. Cell Immunol 2005;234:31–8. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.04.022.
[126] Lappas CM, Day Y-J, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. J Exp Med 2006;203:2639–48. https://doi.org/10.1084/jem.20061097.
[127] Zimmerman M, Martin A, Yee J, Schiller J, Hong J. Natural Killer T Cells in Liver Ischemia–Reperfusion Injury. JCM 2017;6:41. https://doi.org/10.3390/jcm6040041.
[128] de Graaf W, van Lienden KP, van Gulik TM, Bennink RJ. (99m)Tc-mebrofenin hepatobiliary scintigraphy with SPECT for the assessment of hepatic function and liver functional volume before partial hepatectomy. J Nucl Med 2010;51:229–36. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.069724.
[129] Walesky CM, Kolb KE, Winston CL, Henderson J, Kruft B, Fleming I, et al. Functional compensation precedes recovery of tissue mass following acute liver injury. Nat Commun 2020;11:5785. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19558-3.
[130] Michalopoulos GK, Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2021;18:40–55. https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4.
[131] Dinant S, de Graaf W, Verwer BJ, Bennink RJ, van Lienden KP, Gouma DJ, et al. Risk assessment of posthepatectomy liver failure using hepatobiliary scintigraphy and CT volumetry. J Nucl Med 2007;48:685–92. https://doi.org/10.2967/jnumed.106.038430.
[132] Davidson MD, Khetani SR. Intermittent Starvation Extends the Functional Lifetime of Primary Human Hepatocyte Cultures. Toxicol Sci 2020;174:266–77. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa003.
[133] Manco R, Leclercq IA, Clerbaux L-A. Liver Regeneration: Different Sub-Populations of Parenchymal Cells at Play Choreographed by an Injury-Specific Microenvironment. Int J Mol Sci 2018;19:4115. https://doi.org/10.3390/ijms19124115.
[134] Heinke P, Rost F, Rode J, Trus P, Simonova I, Lázár E, et al. Diploid hepatocytes drive physiological liver renewal in adult humans. Cell Systems 2022;13:499-507.e12. https://doi.org/10.1016/j.cels.2022.05.001.
[135] Tsuchiya A, Lu W-Y. Liver stem cells: Plasticity of the liver epithelium. World J Gastroenterol 2019;25:1037–49. https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i9.1037.
[136] Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. Cell Mol Life Sci 2008;65:1566–84. https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8.
[137] Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C, Chinkers M. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. J Biol Chem 1982;257:1523–31.
[138] Sung WJ, Kim D, Zhu A, Cho N, Yoo HM, Noh JH, et al. The lysosome as a novel therapeutic target of EGFR-mediated tumor inflammation. Front Pharmacol 2022;13:1050758. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1050758.
[139] Ichikawa T, Zhang YQ, Kogure K, Hasegawa Y, Takagi H, Mori M, et al. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. Hepatology 2001;34:918–25. https://doi.org/10.1053/jhep.2001.29132.
[140] Zhao Y, Ye W, Wang Y-D, Chen W-D. HGF/c-Met: A Key Promoter in Liver Regeneration. Front Pharmacol 2022;13:808855. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.808855.
[141] Michalopoulos GK. Regenerative responses to liver injury. Eur J Med Res 2014;19:S1. https://doi.org/10.1186/2047-783X-19-S1-S1.
[142] Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. Gastroenterology 2005;128:424–32. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.006.

[143] Shoyab M, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:6528–32. https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6528.
[144] Sebio A, Páez D, Salazar J, Berenguer-Llergo A, Paré-Brunet L, Lasa A, et al. Intergenic polymorphisms in the amphiregulin gene region as biomarkers in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR plus irinotecan. Pharmacogenomics J 2014;14:256–62. https://doi.org/10.1038/tpj.2013.29.
[145] Berasain C, Avila MA. Amphiregulin. Seminars in Cell & Developmental Biology 2014;28:31–41. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.005.
[146] AREG (amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)) n.d. https://atlasgeneticsoncology.org/gene/690/areg-(amphiregulin-(schwannoma-derived-growth-factor)) (accessed January 27, 2025).
[147] Bank RPD. RCSB PDB - 2RNL: Solution structure of the EGF-like domain from human Amphiregulin n.d. https://www.rcsb.org/structure/2rnl (accessed January 27, 2025).
[148] Kim H-S, Kim MS, Hancock AL, Harper JCP, Park JY, Poy G, et al. Identification of Novel Wilms' Tumor Suppressor Gene Target Genes Implicated in Kidney Development*. Journal of Biological Chemistry 2007;282:16278–87. https://doi.org/10.1074/jbc.M700215200.
[149] Bordoli MR, Stiehl DP, Borsig L, Kristiansen G, Hausladen S, Schraml P, et al. Prolyl-4-hydroxylase PHD2- and hypoxia-inducible factor 2-dependent regulation of amphiregulin contributes to breast tumorigenesis. Oncogene 2011;30:548–60. https://doi.org/10.1038/onc.2010.433.
[150] Koeppen M, Lee JW, Seo S-W, Brodsky KS, Kreth S, Yang IV, et al. Hypoxia-inducible factor 2-alpha-dependent induction of amphiregulin dampens myocardial ischemia-reperfusion injury. Nat Commun 2018;9:816. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03105-2.
[151] Taira N, Yamaguchi T, Kimura J, Lu Z-G, Fukuda S, Higashiyama S, et al. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. Proc Natl Acad Sci USA 2014;111:717–22. https://doi.org/10.1073/pnas.1313675111.
[152] Liu K, Lin D, Ouyang Y, Pang L, Guo X, Wang S, et al. Amphiregulin impairs apoptosis-stimulating protein 2 of p53 overexpression–induced apoptosis in hepatoma cells. Tumour Biol 2017;39:101042831769502. https://doi.org/10.1177/1010428317695026.
[153] Latasa MU, Salis F, Urtasun R, Garcia-Irigoyen O, Elizalde M, Uriarte I, et al. Regulation of amphiregulin gene expression by β-catenin signaling in human hepatocellular carcinoma cells: a novel crosstalk between FGF19 and the EGFR system. PLoS One 2012;7:e52711. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052711.
[154] Aguiari G, Bizzarri F, Bonon A, Mangolini A, Magri E, Pedriali M, et al. Polycystin-1 regulates amphiregulin expression through CREB and AP1 signalling: implications in ADPKD cell proliferation. J Mol Med (Berl) 2012;90:1267–82. https://doi.org/10.1007/s00109-012-0902-3.
[155] O'Reilly SM, Leonard MO, Kieran N, Comerford KM, Cummins E, Pouliot M, et al. Hypoxia induces epithelial amphiregulin gene expression in a CREB-dependent manner. Am J Physiol Cell Physiol 2006;290:C592-600. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00278.2005.
[156] Lamber EP, Horwitz AA, Parvin JD. BRCA1 represses Amphiregulin gene expression. Cancer Res 2010;70:996–1005. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2842.
[157] Du B, Altorki NK, Kopelovich L, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Tobacco Smoke Stimulates the Transcription of Amphiregulin in Human Oral Epithelial Cells: Evidence of a Cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein–Dependent Mechanism. Cancer Research 2005;65:5982–8. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0628.

[158] Barnard JA, Graves-Deal R, Pittelkow MR, DuBois R, Cook P, Ramsey GW, et al. Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor-related peptide family. J Biol Chem 1994;269:22817–22.
[159] Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell 1988;53:45–53. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90486-2.
[160] Al-Salihi M, Bornikoel A, Zhuang Y, Stachura P, Scheller J, Lang KS, et al. The role of ADAM17 during liver damage. Biological Chemistry 2021;402:1115–28. https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0149.
[161] Brown CL, Meise KS, Plowman GD, Coffey RJ, Dempsey PJ. Cell Surface Ectodomain Cleavage of Human Amphiregulin Precursor Is Sensitive to a Metalloprotease Inhibitor. Journal of Biological Chemistry 1998;273:17258–68. https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.17258.
[162] Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. Pharmacol Res 2014;79:34–74. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002.
[163] Johnson GR, Saeki T, Gordon AW, Shoyab M, Salomon DS, Stromberg K. Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. The Journal of Cell Biology 1992;118:741–51. https://doi.org/10.1083/jcb.118.3.741.
[164] Sternlicht MD, Sunnarborg SW, Kouros-Mehr H, Yu Y, Lee DC, Werb Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. Development 2005;132:3923–33. https://doi.org/10.1242/dev.01966.
[165] Willmarth NE, Ethier SP. Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. J Biol Chem 2006;281:37728–37. https://doi.org/10.1074/jbc.M606532200.
[166] Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. Trends Mol Med 2007;13:527–34. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.10.002.
[167] Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. FEBS Lett 1999;447:227–31. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00283-5.
[168] Macdonald-Obermann JL, Pike LJ. Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation. J Biol Chem 2014;289:26178–88. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.586826.
[169] Adam R, Drummond DR, Solic N, Holt SJ, Sharma RP, Chamberlin SG, et al. Modulation of the receptor binding affinity of amphiregulin by modification of its carboxyl terminal tail. Biochim Biophys Acta 1995;1266:83–90. https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)00224-3.
[170] Stern KA, Place TL, Lill NL. EGF and amphiregulin differentially regulate Cbl recruitment to endosomes and EGF receptor fate. Biochem J 2008;410:585–94. https://doi.org/10.1042/BJ20071505.
[171] Plowman GD, Green JM, McDonald VL, Neubauer MG, Disteche CM, Todaro GJ, et al. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. Mol Cell Biol 1990;10:1969–81.
[172] Luetteke NC, Qiu TH, Fssssenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, et al. Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. Development 1999;126:2739–50. https://doi.org/10.1242/dev.126.12.2739.
[173] Ciarloni L, Mallepell S, Brisken C. Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor α function in mammary gland development. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007;104:5455–60. https://doi.org/10.1073/pnas.0611647104.
[174] Johnson GR, Saeki T, Auersperg N, Gordon AW, Shoyab M, Salomon DS, et al. Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelial

cells: Nuclear localization of endogenous amphiregulin. Biochemical and Biophysical Research Communications 1991;180:481–8. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)81090-3.
[175] Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ. Structure and Function of Human Amphiregulin: A Member of the Epidermal Growth Factor Family. Science 1989;243:1074–6. https://doi.org/10.1126/science.2466334.
[176] Stoll SW, Stuart PE, Lambert S, Gandarillas A, Rittié L, Johnston A, et al. Membrane-Tethered Intracellular Domain of Amphiregulin Promotes Keratinocyte Proliferation. J Invest Dermatol 2016;136:444–52. https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.10.061.
[177] Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaría M, Lee DC, et al. Novel Role for Amphiregulin in Protection from Liver Injury. Journal of Biological Chemistry 2005;280:19012–20. https://doi.org/10.1074/jbc.M413344200.
[178] Singh SS, Chauhan SB, Kumar A, Kumar S, Engwerda CR, Sundar S, et al. Amphiregulin in cellular physiology, health, and disease: Potential use as a biomarker and therapeutic target. Journal Cellular Physiology 2022;237:1143–56. https://doi.org/10.1002/jcp.30615.
[179] Castillo J, Erroba E, Perugorría MJ, Santamaría M, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Res 2006;66:6129–38. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0404.
[180] Yu Y, Zhang X, Han Z, Zhao W, Zhang L. Expression and regulation of miR-449a and AREG in cerebral ischemic injury. Metab Brain Dis 2019;34:821–32. https://doi.org/10.1007/s11011-019-0393-9.
[181] Li N, Xia N, He J, Liu M, Gu M, Lu Y, et al. Amphiregulin improves ventricular remodeling after myocardial infarction by modulating autophagy and apoptosis. FASEB J 2024;38:e23488. https://doi.org/10.1096/fj.202302385R.
[182] Wang S-W, Oh CK, Cho SH, Hu G, Martin R, Demissie-Sanders S, et al. Amphiregulin expression in human mast cells and its effect on the primary human lung fibroblasts. J Allergy Clin Immunol 2005;115:287–94. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.11.037.
[183] Meulenbroeks C, Weelden H van, Schwartz C, Voehringer D, Redegeld FAM, Rutten VPMG, et al. Basophil-Derived Amphiregulin Is Essential for UVB Irradiation–Induced Immune Suppression. J Invest Dermatol 2015;135:222–8. https://doi.org/10.1038/jid.2014.329.
[184] Zaiss DMW, van Loosdregt J, Gorlani A, Bekker CPJ, Gröne A, Sibilia M, et al. Amphiregulin Enhances Regulatory T Cell-Suppressive Function via the Epidermal Growth Factor Receptor. Immunity 2013;38:275–84. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.023.
[185] Sinnema N. Amphiregulin producing ILC2s as a therapeutic target in allergic asthma: For better or for worse, 2015.
[186] Delacher M, Schmidleithner L, Simon M, Stüve P, Sanderink L, Hotz-Wagenblatt A, et al. The effector program of human CD8 T cells supports tissue remodeling. Journal of Experimental Medicine 2024;221:e20230488. https://doi.org/10.1084/jem.20230488.
[187] Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. Cell 2015;162:1078–89. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.021.
[188] Ge J, Yin X, Chen L. Regulatory T cells: masterminds of immune equilibrium and future therapeutic innovations. Front Immunol 2024;15. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1457189.
[189] Jiang T-J, Cao X-L, Luan S, Cui W-H, Qiu S-H, Wang Y-C, et al. Percentage and function of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with hyperthyroidism. Mol Med Rep 2018;17:2137–44. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8154.
[190] Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. Cancer Immunol Res 2016;4:721–5. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0193.

[191] Burghardt S, Claass B, Erhardt A, Karimi K, Tiegs G. Hepatocytes induce Foxp3^{+} regulatory T cells by Notch signaling. J Leukoc Biol 2014;96:571–7. https://doi.org/10.1189/jlb.2AB0613-342RR.
[192] Delacher M, Imbusch CD, Hotz-Wagenblatt A, Mallm J-P, Bauer K, Simon M, et al. Precursors for Nonlymphoid-Tissue Treg Cells Reside in Secondary Lymphoid Organs and Are Programmed by the Transcription Factor BATF. Immunity 2020;52:295-312.e11. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.002.
[193] Choi Y-S, Choi H-J, Min J-K, Pyun B-J, Maeng Y-S, Park H, et al. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. Blood 2009;114:3117–26. https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203372.
[194] Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin CR, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 Is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. Hepatology 2012;56:1468–78. https://doi.org/10.1002/hep.25768.
[195] Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. Nature 2014;513:564–8. https://doi.org/10.1038/nature13577.
[196] Kuswanto W, Burzyn D, Panduro M, Wang KK, Jang YC, Wagers AJ, et al. Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. Immunity 2016;44:355–67. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.009.
[197] Peine M, Marek RM, Löhning M. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. Trends Immunol 2016;37:321–33. https://doi.org/10.1016/j.it.2016.03.007.
[198] Popovic B, Golemac M, Podlech J, Zeleznjak J, Bilic-Zulle L, Lukic ML, et al. IL-33/ST2 pathway drives regulatory T cell dependent suppression of liver damage upon cytomegalovirus infection. PLOS Pathogens 2017;13:e1006345. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006345.
[199] Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J. 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. Cell Physiol Biochem 2017;43:2155–69. https://doi.org/10.1159/000484295.
[200] Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al. A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair. Cell 2013;155:1282–95. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.054.
[201] Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, Artis D. Emerging Functions of Amphiregulin in Orchestrating Immunity, Inflammation, and Tissue Repair. Immunity 2015;42:216–26. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.020.
[202] Zaiss DM, Minutti CM, Knipper JA. Immune- and non-immune-mediated roles of regulatory T-cells during wound healing. Immunology 2019;157:190–7. https://doi.org/10.1111/imm.13057.
[203] Nosbaum A, Prevel N, Truong H-A, Mehta P, Ettinger M, Scharschmidt TC, et al. Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing. J Immunol 2016;196:2010–4. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502139.
[204] Dai K, Huang L, Chen J, Yang L, Gong Z. Amphiregulin promotes the immunosuppressive activity of intrahepatic CD4+ regulatory T cells to impair CD8+ T-cell immunity against hepatitis B virus infection. Immunology 2015;144:506–17. https://doi.org/10.1111/imm.12400.
[205] Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. Nat Rev Immunol 2017;17:165–78. https://doi.org/10.1038/nri.2016.150.
[206] Sabapathy V, Price A, Cheru NT, Venkatadri R, Dogan M, Costlow G, et al. ST2+ T-Regulatory Cells in Renal Inflammation and Fibrosis after Ischemic Kidney Injury. Journal of the American Society of Nephrology 2025;36:73. https://doi.org/10.1681/ASN.0000000000000471.

[207] Lu L, Li G, Rao J, Pu L, Yu Y, Wang X, et al. In vitro induced CD4+CD25+Foxp3+ Tregs attenuate hepatic ischemia–reperfusion injury. International Immunopharmacology 2009;9:549–52. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.01.020.
[208] Zhu L, Chen Y, Ding W, Duan Y, Sun D, Lu Y. Caspase-3/Treg and PI3K/AKT/mTOR pathway is involved in Liver Ischemia Reperfusion Injury (IRI) protection by everolimus. Transplant Immunology 2022;71:101541. https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101541.
[209] Han JW, Joo DJ, Kim JH, Rha M-S, Koh JY, Park HJ, et al. Early reduction of regulatory T cells is associated with acute rejection in liver transplantation under tacrolimus-based immunosuppression with basiliximab induction. American Journal of Transplantation 2020;20:2058–69. https://doi.org/10.1111/ajt.15789.
[210] Jiang X, Morita M, Sugioka A, Harada M, Kojo S, Wakao H, et al. The importance of CD25+CD4+ regulatory T cells in mouse hepatic allograft tolerance. Liver Transpl 2006;12:1112–8. https://doi.org/10.1002/lt.20787.
[211] Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. J Hepatol 2012;56:26–33. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.03.022.
[212] Cao Z, Yuan Y, Jeyabalan G, Du Q, Tsung A, Geller DA, et al. Preactivation of NKT cells with α-GalCer protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mouse by a mechanism involving IL-13 and adenosine A2A receptor. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009;297:G249–58. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00041.2009.
[213] Goto T, Ito Y, Satoh M, Nakamoto S, Nishizawa N, Hosono K, et al. Activation of iNKT Cells Facilitates Liver Repair After Hepatic Ischemia Reperfusion Injury Through Acceleration of Macrophage Polarization. Front Immunol 2021;12:754106. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.754106.
[214] Goto T, Ito Y, Nishizawa N, Kuroda Y, Nakamoto S, Hosono K, et al. Expansion of iNKT Cells Promotes Liver Repair Following Hepatic Ischemia Reperfusion Injury. In Vivo 2022;36:2604–14. https://doi.org/10.21873/invivo.12995.
[215] Salou M, Franciszkiewicz K, Lantz O. MAIT cells in infectious diseases. Curr Opin Immunol 2017;48:7–14. https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.009.
[216] Wu S, Yang X, Lou Y, Xiao X. MAIT cells in bacterial infectious diseases: heroes, villains, or both? Clin Exp Immunol 2023;214:144–53. https://doi.org/10.1093/cei/uxad102.
[217] Constantinides MG, Link VM, Tamoutounour S, Wong AC, Perez-Chaparro PJ, Han S-J, et al. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. Science 2019;366:eaax6624. https://doi.org/10.1126/science.aax6624.
[218] Hinks TSC, Marchi E, Jabeen M, Olshansky M, Kurioka A, Pediongco TJ, et al. Activation and In Vivo Evolution of the MAIT Cell Transcriptome in Mice and Humans Reveals Tissue Repair Functionality. Cell Reports 2019;28:3249-3262.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.039.
[219] Leng T, Akther HD, Hackstein C-P, Powell K, King T, Friedrich M, et al. TCR and Inflammatory Signals Tune Human MAIT Cells to Exert Specific Tissue Repair and Effector Functions. Cell Reports 2019;28:3077-3091.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.050.
[220] Talvard-Balland N, Lambert M, Chevalier MF, Minet N, Salou M, Tourret M, et al. Human MAIT cells inhibit alloreactive T cell responses and protect against acute graft-versus-host disease. JCI Insight 2024;9. https://doi.org/10.1172/jci.insight.166310.
[221] Böttcher K, Rombouts K, Saffioti F, Roccarina D, Rosselli M, Hall A, et al. MAIT cells are chronically activated in patients with autoimmune liver disease and promote profibrogenic hepatic stellate cell activation. Hepatology 2018;68:172–86. https://doi.org/10.1002/hep.29782.
[222] Hegde P, Weiss E, Paradis V, Wan J, Mabire M, Sukriti S, et al. Mucosal-associated invariant T cells are a profibrogenic immune cell population in the liver. Nat Commun 2018;9:2146. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04450-y.

[223] Mayor S. Mouse genome shows many disease genes shared with humans. BMJ 2002;325:1319.
[224] Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 2002;420:520–62. https://doi.org/10.1038/nature01262.
[225] Abe Y, Hines I, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, et al. Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. Free Radical Biology and Medicine 2009;46:1–7. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.029.
[226] Robin A, Mackowiak C, Bost R, Dujardin F, Barbarin A, Thierry A, et al. Early activation and recruitment of invariant natural killer T cells during liver ischemia-reperfusion: the major role of the alarmin interleukin-33. Front Immunol 2023;14:1099529. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1099529.
[227] Wehr A, Baeck C, Heymann F, Niemietz PM, Hammerich L, Martin C, et al. Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis. J Immunol 2013;190:5226–36. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202909.
[228] Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, Warner RL, Cheadle WG, Ward PA, et al. Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. Hepatology 1999;30:1448–53. https://doi.org/10.1002/hep.510300615.
[229] Duault C, Franchini DM, Familliades J, Cayrol C, Roga S, Girard J-P, et al. TCRVγ9 γδ T Cell Response to IL-33: A CD4 T Cell-Dependent Mechanism. J Immunol 2016;196:493–502. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500260.
[230] Cui Y, Franciszkiewicz K, Mburu YK, Mondot S, Le Bourhis L, Premel V, et al. Mucosal-associated invariant T cell-rich congenic mouse strain allows functional evaluation. J Clin Invest 2015;125:4171–85. https://doi.org/10.1172/JCI82424.
[231] Trottein F, Paget C. Natural Killer T Cells and Mucosal-Associated Invariant T Cells in Lung Infections. Front Immunol 2018;9:1750. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01750.
[232] Lamichhane R, Schneider M, De La Harpe SM, Harrop TWR, Hannaway RF, Dearden PK, et al. TCR- or Cytokine-Activated CD8+ Mucosal-Associated Invariant T Cells Are Rapid Polyfunctional Effectors That Can Coordinate Immune Responses. Cell Reports 2019;28:3061-3076.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.054.
[233] Murthy A, Defamie V, Smookler DS, Di Grappa MA, Horiuchi K, Federici M, et al. Ectodomain shedding of EGFR ligands and TNFR1 dictates hepatocyte apoptosis during fulminant hepatitis in mice. J Clin Invest 2010;120:2731–44. https://doi.org/10.1172/JCI42686.
[234] Lee S-H, Won Y, Gibbs D, Caldwell B, Goldstein A, Choi E, et al. Amphiregulin Switches Progenitor Cell Fate for Lineage Commitment During Gastric Mucosal Regeneration. Gastroenterology 2024;167:469–84. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2024.03.009.
[235] Tan Z, Liu Q, Jiang R, Lv L, Shoto SS, Maillet I, et al. Interleukin-33 drives hepatic fibrosis through activation of hepatic stellate cells. Cell Mol Immunol 2018;15:388–98. https://doi.org/10.1038/cmi.2016.63.
[236] Hino Y, Nagaoka K, Oki S, Etoh K, Hino S, Nakao M. Mitochondrial stress induces AREG expression and epigenomic remodeling through c-JUN and YAP-mediated enhancer activation. Nucleic Acids Research 2022;50:9765–79. https://doi.org/10.1093/nar/gkac735.
[237] Liu Q, Rehman H, Krishnasamy Y, Haque K, Schnellmann RG, Lemasters JJ, et al. Amphiregulin Stimulates Liver Regeneration After Small-for-Size Mouse Liver Transplantation. American Journal of Transplantation 2012;12:2052–61. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04069.x.
[238] Liu J, Pan L, Hong W, Chen S, Bai P, Luo W, et al. GPR174 knockdown enhances blood flow recovery in hindlimb ischemia mice model by upregulating AREG expression. Nat Commun 2022;13:7519. https://doi.org/10.1038/s41467-022-35159-8.
[239] Lee JW, Koeppen M, Seo S-W, Bowser JL, Yuan X, Li J, et al. Transcription-independent Induction of ERBB1 through Hypoxia-inducible Factor 2A Provides Cardioprotection during

Ischemia and Reperfusion. Anesthesiology 2020;132:763–80. https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003037.
[240] Melderis S, Hagenstein J, Warkotsch MT, Dang J, Herrnstadt GR, Niehus CB, et al. Amphiregulin Aggravates Glomerulonephritis via Recruitment and Activation of Myeloid Cells. J Am Soc Nephrol 2020;31:1996–2012. https://doi.org/10.1681/ASN.2019111215.
[241] Todd JL, Kelly FL, Nagler A, Banner K, Pavlisko EN, Belperio JA, et al. Amphiregulin contributes to airway remodeling in chronic allograft dysfunction after lung transplantation. American Journal of Transplantation 2020;20:825–33. https://doi.org/10.1111/ajt.15667.
[242] Pareja E, Cortes M, Hervás D, Mir J, Valdivieso A, Castell JV, et al. A score model for the continuous grading of early allograft dysfunction severity. Liver Transpl 2015;21:38–46. https://doi.org/10.1002/lt.23990.
[243] Agopian VG, Markovic D, Klintmalm GB, Saracino G, Chapman WC, Vachharajani N, et al. Multicenter validation of the liver graft assessment following transplantation (L-GrAFT) score for assessment of early allograft dysfunction. J Hepatol 2021;74:881–92. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.015.