



**HAL**  
open science

# Rôle de la mucine MUC1 en pathologie rénale non tumorale

Jean-Baptiste Gibier

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Gibier. Rôle de la mucine MUC1 en pathologie rénale non tumorale. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS002 . tel-03467329

**HAL Id: tel-03467329**

**<https://theses.hal.science/tel-03467329>**

Submitted on 6 Dec 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE-LILLE*

**THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE**

**Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé**

## **Rôle de la mucine MUC1 en pathologie rénale non tumorale**

**Présentée et soutenue publiquement le 25 janvier 2021**

**Par Jean-Baptiste GIBIER**

**Jury**

**Présidente : Madame le Professeur COPIN**

**Rapporteurs : Monsieur le Professeur GUERROT**

**Monsieur le Professeur HERTIG**

**Examinatrice : Madame le Docteur CAUFFIEZ**

**Directeur de thèse : Madame le Docteur GNEMMI**

Je remercie les membres du jury de Thèse de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail.

Je remercie Madame le Professeur Marie-Christine Copin, Monsieur le Professeur Alexandre Hertig, Monsieur le Professeur Dominique Guerrot et Madame le Docteur Christelle Cauffiez d'avoir accepté de juger mes travaux.

Je remercie Madame le Docteur Viviane Gnemmi, de m'avoir aidé à mener à terme ce travail de recherche. Je tiens à la remercier pour sa patience, ses nombreux conseils et réflexions pertinentes qui m'ont guidé tout au long de ces années.

Je remercie Monsieur le Docteur Michael Perrais pour m'avoir toujours soutenu et conseillé depuis mon entrée, au cours d'un Master 2 recherche, au sein du groupe « Rein ».

Je remercie Monsieur le Professeur Sebastien Aubert pour ses conseils.

Je remercie Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen de m'avoir accueilli dans son équipe de Recherche anciennement équipe 5 "Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliale" UMR837 puis UMRS-1172 et qui est maintenant l'UMR9020-U1277 - CANTHER (Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapie).

Je remercie tous les membres du groupe CANTHER (Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapie) avec qui j'ai eu la chance d'échanger. Merci pour vos conseils avisés, vos critiques constructives et vos travaux inspirants.

Un merci particulier à Brigitte Hemon, à Melanie Fanchon et à mon co-thésard Thomas Swierczewski sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Merci également à Marie Csyani pour son implication pendant son master 2.

Je remercie l'ensemble des personnes -médecins, ingénieure, techniciens et secrétaires- de l'Institut d'Anatomie et Cytologie pathologiques du CHU de Lille, pour leur soutien dans la poursuite de ces travaux.

Merci également aux médecins du service (en particulier à ceux de l'UF1) qui m'ont aidé à libérer du temps pendant des périodes pas toujours faciles.

Enfin, je remercie mes proches pour leur soutien indéfectible.

## **TABLE DES MATIERES**

<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS</u></b> .....	<b>1</b>	
<b><u>RESUME</u></b> .....	<b>4</b>	
<b><u>SUMMARY</u></b> .....	<b>6</b>	
<b><u>PREAMBULE</u></b> .....	<b>8</b>	
<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	<b>10</b>	
<b>PARTIE I</b> .....	<b>11</b>	
<b>I- Présentation de la famille des mucines</b>	<b>11</b>	
I-1 Généralités	11	
I-2 Structure commune aux mucines	11	
I-3 Les différentes classes de mucines	12	
<b>II- La mucine MUC1</b>	<b>14</b>	
II-1 Découverte de MUC1	14	
II-2 Régulation de l'expression de MUC1		14
II-3 Structure de MUC1	15	
II-4 Voies de signalisation	17	
II-5 Glycosylation de MUC1	20	
II-6 Isoformes de MUC1	21	
II-7 Expression de MUC1	22	
<b>III- MUC1 et rein</b>	<b>23</b>	
<b>PARTIE II</b> .....	<b>25</b>	
<b>I- Insuffisance rénale aiguë et nécrose tubulaire aiguë</b>	<b>25</b>	
I-1 Définition : Insuffisance rénale aiguë	25	
I-2 Définition : Nécrose tubulaire aiguë	26	
<b>II- Régénération rénale dans le modèle d'ischémie reperfusion</b>	<b>27</b>	
II-1 Introduction	27	
II-2 Le modèle d'IR	28	
II-2-1 Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion	29	
II-2-2 Lésions associées à l'ischémie	30	

II-2-3 Phase de maintenance et inflammation stérile	31
II-2-4 Lésions associées à la reperfusion	32
II-3 Théories de la régénération rénale	33
II-3-1 Dédifférenciation et plasticité épithéliale	34
II-3-2 Théorie des cellules souches progénitrices	35
II-3-3 Théorie de l'endoréplication	36
II-4 Transition de l'IRA vers l'IRC	37
II-4-1 Introduction	37
II-4-2 Modification du compartiment épithélial	38
II-4-3 Modification de la microcirculation	39
II-4-4 Inflammation chronique	40
<b>III Résultats antérieurs de l'équipe sur le rôle de MUC1 dans l'IR</b>	<b>40</b>
III-1 Modèle d'IR chez les souris <i>Muc1</i> <sup>+/+</sup> ou <i>Muc1</i> <sup>-/-</sup>	40
III-1-1 Induction de l'expression de MUC1	40
III-1-2 Rôle néphroprotecteur de MUC1 (temps précoces)	42
III-2 MUC1 en régénération rénale humaine	43
III-2-1 Expression de MUC1 dans les biopsies de greffons	44
III-2-2 Expression de MUC1 associée à une TEM partielle	45
III-2-3 Impact pronostique de l'expression de MUC1	47
<b>PARTIE III</b>	<b>49</b>
<b>I- Reins et sepsis</b>	<b>49</b>
I-1 Définition : Sepsis, infection, réponse inflammatoire	49
I-2 IRA secondaire au sepsis	49
I-3 Modèles animaux de sepsis	50
I-3-1 Injection de toxine bactérienne	50
I-3-2 Instillation de bactéries	51
I-3-3 Modèles de péritonite	52
I-4 Lésions histologiques au cours de l'IRA septique	53
I-5 Physiopathologie de l'IRA septique	54
I-5-1 Atteinte de la microcirculation	56
I-5-2 Désordres du métabolisme énergétique	57
I-5-3 Inflammation	58

<b>II Toll-like recepteurs et sepsis</b>	<b>61</b>
II-1 Présentations de la famille des récepteurs TLRs	61
II-1-1 Généralités	61
II-1-2 Voies de signalisation des TLR4	61
II-2 Le récepteur TLR4	63
II-3 Rôle du TLR4 dans l'IRA secondaire au sepsis	65
<b>III MUC1 et sepsis</b>	<b>68</b>
III-1 MUC1 : Un rôle de barrière physique	68
III-2 MUC1 : inhibiteur des TLRs	70
III-3 MUC1 : inhibiteur de NLRP3	73
III-4 MUC1 et la voie de la $\beta$ -caténine dans l'inflammation	73
III-5 MUC1 et inflammation : Boucle de régulation	74
<b><u>OBJECTIFS</u></b> .....	<b>76</b>
<b><u>RESULTATS</u></b> .....	<b>78</b>
<b>PARTIE 1</b> .....	<b>79</b>
<b>1- Etude de l'expression de MUC1 sur biopsies rénales humaines</b>	<b>79</b>
1-1 MUC1 est exprimée au niveau des TP en souffrance	79
1-2 Induction de MUC1 dans les cellules proximales «dédiﬀérenciées»	80
<b>2- Expression et rôle de MUC1 au cours des expériences d'hypoxie</b>	<b>82</b>
2-1 Induction de MUC1	82
2-2 Expression des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux	84
<b>3- MUC1 et anoikis</b>	<b>87</b>
<b>4- Modèle murin d'ischémie-reperfusion</b>	<b>88</b>
4-1 Expression de MUC1 et mort cellulaire	88
4-2 Expression des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux au cours de l'IR	89
4-2.1 Au cours des temps précoces	89
4-2.2 Au cours des temps tardifs	90
4-3 MUC1 et fibrose	90
4-4 MUC1 et inflammation chronique	92
<b>PARTIE 2</b> .....	<b>94</b>

<b>1- Rôle néphroprotecteur de MUC1 dans le modèle d'injection de LPS</b>	<b>94</b>
<b>2- Rôle anti-inflammatoire de MUC1 dans le modèle d'injection de LPS</b>	<b>97</b>
<b>3- Etude des populations inflammatoires dans le modèle d'injection de LPS</b>	<b>99</b>
<b>4- MUC1 et polarisation des macrophages</b>	<b>101</b>
<b>5- Etude de l'expression de MUC1 dans les macrophages humains et murins</b>	<b>103</b>
5-1 Macrophages humains	103
5-2 Macrophages murins	104
<b>6- Rôle anti-inflammatoire de MUC1 dans les macrophages M1</b>	<b>106</b>
<b>7- MUC1 inhibe l'activation de la voie du TLR4</b>	<b>107</b>
<b>8- Etude du mécanisme d'inhibition de la voie TLR4 par MUC1</b>	<b>109</b>
<b><u>DISCUSSION</u></b> .....	<b>111</b>
<b>PARTIE 1</b> .....	<b>112</b>
<b>1- MUC1 : Expression dans les cellules épithéliales tubulaires proximales</b>	<b>112</b>
1-1 Expression de MUC1 au cours de la NTA chez l'homme	112
1-2- Expériences in vitro (modèle hypoxique)	113
<b>2- MUC1 favorise une TEM des cellules épithéliales proximales</b>	<b>114</b>
<b>3- MUC1, voie Wnt / <math>\beta</math>-caténine et mort cellulaire</b>	<b>116</b>
<b>4- Rôle de MUC1 dans la transition vers l'insuffisance rénale chronique</b>	<b>117</b>
<b>PARTIE 2</b> .....	<b>119</b>
<b>1- MUC1 rôle néphroprotecteur et anti-inflammatoire dans l'IRA septique</b>	<b>119</b>
<b>2- MUC1 et recrutement de cellules immunitaires en réponse au LPS</b>	<b>119</b>
2.1- Neutrophiles	119
2.2- Monocytes / Macrophages	120
<b>3- MUC1 : Un rôle clé dans les macrophages M1</b>	<b>121</b>
3.1- MUC1 influence la polarisation des macrophages <i>in vivo</i>	121
3.2- MUC1 : marqueur de macrophages M1	122
<b>4- Inhibition de TLR4 par MUC1 et régulation de l'inflammation</b>	<b>123</b>
<b>5- Rôle respectif de compartiments épithélial et immunitaire dans le modèle d'IRA</b>	<b>125</b>
<b><u>PERSPECTIVES</u></b> .....	<b>127</b>
<b>PARTIE 1</b> .....	<b>128</b>



1- MUC1 marqueur de cellules souches et/ou de cellules dédifférenciées	128
2- Explorer le rôle de MUC1 au cours de la phase d'inflammation stérile	128
3- Etudier l'influence de MUC1 sur les différentes populations macrophagiques	129
<b>PARTIE 2</b> .....	<b>131</b>
1- Rôle des macrophages dans le modèle d'injection ip. de LPS	131
2- Rôle respectif de MUC1 dans le compartiment épithélial et immunitaire	131
3- Influence des cellules épithéliales tubulaires sur la polarisation macrophagique	132
4- Etudier le rôle de MUC1 sur la voie du TLR4 indépendante de MYD88	132
<b><u>METHODES</u></b> .....	<b>134</b>
<b><u>REFERENCES</u></b> .....	<b>162</b>
<b><u>ANNEXE - PUBLICATIONS</u></b> .....	<b>182</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

AA : acide aminé  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire  
AP-1: activator protein 1  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
ATP : adenosine triphosphate  
bMDM : Macrophages dérivés de progéniteurs médullaires  
BUN : Blood urea nitrogen  
CD: cluster of differentiation  
CT : cytoplasmic tail domain  
DAMP : danger-associated molecular patterns  
DCs : cellules dendritiques  
DFG : débit de filtration glomérulaire  
GFP : green fluorescence protein  
HIF : hypoxic inductible factor  
ICAM-1 : intercellular adhesive molecule-1  
IR : ischémie-reperfusion  
IFN $\gamma$  : interferon-gamma  
IL : interleukine  
IRA : insuffisance rénale aiguë  
IRC : insuffisance rénale chronique  
iNOS : inducible nitrous oxide  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
KIM : kidney injury marker  
KO : knockout  
LPS lipopolysaccharide  
M0 : macrophages non polarisé  
M1 : macrophages polarisés vers un phénotype M1 (pro-inflammatoires)  
M2 : macrophages polarisés vers un phénotype M1 (pro-inflammatoires)  
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1  
Mp : macrophages péritonéaux  
MUC1-C : sous-unité C-terminale de MUC1  
MUC1- N : sous-unité N-terminale de MUC1 extra-cellulaire  
MUC1 CT : domaine intra-cytoplasmique de  
MUC1 ED : partie extra-cellulaire de MUC1-C  
MUC1 TM : domaine transmembranire de  
MyD88: myeloid Differentiation Factor 88  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NLRP : nod-like receptor protein  
NO : monoxyde d'azote  
NTA : nécrose tubulaire aiguë  
PAMP : pathogen-associated molecular pattern  
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase  
PLA : proximity ligature assay  
PNN : polynucléaire neutrophile  
PRR pattern recognition receptor  
PTS : proline, thréonine, sérine  
qPCR quantitative real-time PCR  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
RT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse  
SEA : sea-urchin sperm protein  
TCP : tubes contournés proximaux  
TD : tubes distaux  
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse  
TLR : Toll-like receptor  
TM : transmembran domain  
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor  $\alpha$

TP : tubes proximaux  
TR : tandem repeat  
VNTR : variable number of tandem repeats  
vWF : von Willebrandt Factor  
WB: western blot

**RESUME**

MUC1 est une glycoprotéine exprimée au niveau des tubes distaux et collecteurs du rein adulte. En pathologie rénale, elle est principalement connue pour être exprimée dans certains carcinomes rénaux et en raison de l'existence de mutations du gène responsables d'une forme rare d'insuffisance rénale chronique. Des travaux précédents de notre équipe ont mis en évidence une induction et un rôle néphroprotecteur de MUC1 dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion (IR). Afin de compléter les données sur le rôle de MUC1 dans ce modèle, nous avons spécifiquement étudié l'expression de MUC1 au niveau des tubes proximaux qui sont à l'origine des propriétés uniques de régénération du rein. Nous avons montré que MUC1 est induit dans les cellules épithéliales tubulaires et que son expression s'associe à une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) partielle qui est à l'origine de la plus grande plasticité de ces cellules. Par ailleurs, nous avons observé que l'expression persistante de MUC1 dans le parenchyme rénal est associée à une réparation incomplète des lésions parenchymateuses et à l'évolution vers la fibrose interstitielle et la dysfonction rénale chronique.

Dans un deuxième temps de notre travail, nous avons souhaité étudier le rôle immunomodulateur de MUC1. Dans le modèle d'IR, l'entretien des lésions ischémiques est secondaire à la mise en place d'une inflammation stérile caractérisée par l'activation de l'immunité innée qui succède à la libération de signaux de danger lors de la mort des cellules tubulaires. Dans le tractus respiratoire et digestif, il a été montré que MUC1 joue un rôle anti-inflammatoire notamment *via* l'inhibition des Toll Like Receptors (TLRs), une famille de récepteurs spécialisés dans la reconnaissance de ces signaux de danger. Dans le rein, le TLR4 est le principal TLR impliqué à la fois dans la réponse à l'IR et au sepsis. En utilisant un modèle d'insuffisance rénale aiguë septique par injection de lipopolysaccharide (LPS), un ligand spécifique du TLR4, nous avons pu montrer que MUC1 a une action néphroprotectrice *via* une diminution des signaux inflammatoires. Cette action de MUC1 est secondaire à son expression au niveau des macrophages pro-inflammatoires qui jouent un rôle central dans le sepsis. Plus précisément, l'effet anti-inflammatoire de MUC1 découle de l'inhibition du recrutement de la protéine adaptatrice MYD88 dès les premières étapes de la voie du TLR4. Au total, nos résultats montrent que MUC1 joue un rôle préalablement méconnu au cours de l'agression rénale aiguë qu'elle soit d'origine ischémique ou septique.

## **SUMMARY**

MUC1 is a glycoprotein expressed in the distal and collecting tubes of the adult kidney. In renal diseases, it is mainly known to be expressed in certain renal carcinomas and also because mutations in the *MUC1* gene are responsible for a rare form of chronic interstitial disease. Previous work from our team has demonstrated the increased expression and the nephroprotective effects of MUC1 in a mouse model of ischemia-reperfusion (IR). To further explore the role of MUC1 in this model, we specifically studied the expression of MUC1 within the proximal tubules which are known to be responsible for the kidney's unique regenerative properties. We have shown that MUC1 is indeed induced in proximal tubular epithelial cells and that its expression is associated with a partial epithelial-mesenchymal transition (TEM) which is responsible for the greater plasticity of those cells. In addition, we have observed that persistent expression of MUC1 in the renal parenchyma is associated with incomplete repair of parenchymal lesions and progression to interstitial fibrosis and chronic renal dysfunction.

In a second part, we aimed to study the immunomodulatory functions of MUC1. In the IR model, maintenance of ischemic damage is secondary to the development of a sterile inflammation characterized by the activation of innate immune cells by danger signals released following the death of tubular cells. In the respiratory and digestive tracts, MUC1 has been shown to play an anti-inflammatory role, notably through the inhibition of Toll Like Receptors (TLRs), a family of receptors specializing in the recognition of these danger signals. In the kidney, TLR4 is the primary TLR involved in both the response to IR and sepsis. Using a model of acute septic renal failure by injection of lipopolysaccharide (LPS), a ligand specific for TLR4, we were able to show that MUC1 has a nephroprotective action *via* a decrease in inflammatory signals. This action of MUC1 is secondary to its expression in pro-inflammatory macrophages which play a central role in sepsis. Moreover, we showed that the anti-inflammatory effect of MUC1 results from the inhibition of the recruitment of the adapter protein MYD88 at the early stages of the TLR4 pathway activation. Overall, our results show that MUC1 plays a previously unrecognized role in acute renal injury, whether of ischemic or septic origin.



**PREAMBULE**

Lorsque ce travail de thèse a débuté (2015), l'implication de MUC1 en pathologie rénale non tumorale était méconnue et les données publiées concernaient principalement la forme mutée de MUC1 (MUC1-fs) dont l'accumulation est à l'origine d'une forme génétique rare d'insuffisance rénale chronique (Kirby *et al.*, 2013). Depuis plusieurs années, les travaux de notre équipe ont permis d'avancer sur l'expression de MUC1 dans le rein adulte et sur son rôle en pathologie rénale tumorale (Leroy *et al.*, 2003 ; Aubert *et al.*, 2009). A l'occasion de ces travaux, le Pr Aubert a notamment mis en évidence un lien entre MUC1 et la réponse à l'hypoxie (Aubert *et al.*, 2009). Au cours de sa thèse d'Université, le Dr Gnemmi a montré que ce mécanisme de régulation de MUC1 était impliqué dans la réponse du rein dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion. Elle a notamment montré que l'expression de MUC1 s'associait à des modifications de phénotype des cellules épithéliales tubulaires suggérant une TEM partielle. Le premier objectif de mon travail de thèse a été de s'appuyer sur ces données pour étudier plus particulièrement les cellules épithéliales proximales. En effet, en condition physiologique, MUC1 est exprimée uniquement au niveau des tubes distaux alors que ce sont les cellules épithéliales proximales qui sont à l'origine de la régénération rénale (Bonventre *et al.*, 2011).

Dans la première partie de ce travail (Partie 1), je présenterai donc mes résultats obtenus sur le rôle de MUC1 dans les cellules épithéliales tubulaires proximales en réponse à l'hypoxie.

Pendant mon travail de thèse, le rôle de MUC1 comme régulateur de l'inflammation a émergé dans la littérature notamment dans le tractus digestif et respiratoire (Dhar *et al.*, 2019). Nous avons fait l'hypothèse que ce rôle original de MUC1 est également pertinent en pathologie rénale. En particulier, nous avons ciblé la voie du TLR4 qui est déterminante dans plusieurs modèles d'agression rénale aiguë. Pour des raisons de faisabilité technique mais également pour étudier spécifiquement l'interaction entre MUC1 et TLR4, j'ai mis au point pendant ma thèse un modèle murin d'insuffisance rénale aiguë septique par injection de lipopolysaccharide (un ligand spécifique du TLR4).

Dans la seconde partie de ce travail (Partie 2), je présenterai et discuterai mes résultats obtenus dans ce nouveau modèle.

## **INTRODUCTION**

## **PARTIE I**

### **I- Présentation de la famille des mucines**

#### **I-1 Généralités**

Les mucines constituent une famille de protéines hautement O-glycosylées présentes à la surface de nombreux types cellulaires. Elles partagent une organisation structurale commune caractérisée par la présence d'un réseau dense d'oligosaccharides O-liés attachés aux résidus sérine ou thréonine. Ce réseau hautement glycosylé à la surface des cellules joue un rôle clé dans la protection des épithéliums, le maintien de la polarité cellulaire et la régulation des propriétés d'adhérence entre cellules, avec la matrice extracellulaire et également dans les interactions avec certains agents pathogènes (Buscaglia *et al.*, 2006). Dans le cancer, suite à des modifications de la glycosylation, les mucines interviennent dans de nombreux processus clés de la progression tumorale (Kufe, 2009). Plus récemment, il a été mis en évidence que les mucines intervenaient aussi comme des régulateurs de la réponse immunitaire face à l'agression d'agents pathogènes (Martin *et al.*, 2019)

Les mucines sont codées par les gènes MUC numérotés par ordre de découverte. A ce jour, les gènes MUC suivant ont été identifiés chez l'homme : MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC12, MUC13, MUC14, MUC15, MUC16, MUC17, MUC19, MUC20, MUC21 et MUC22.

#### **I-2 Structure commune aux mucines**

Toutes les mucines ont certaines caractéristiques structurales communes : une masse moléculaire élevée (à l'exception de MUC7), une grande richesse en acides aminés proline, thréonine, sérine et de nombreuses chaînes O-glycanniques. Des expériences de protéolyse ont montré que les mucines sont composées d'un axe peptidique constitué d'une alternance de domaines hautement glycosylés (résistants à la protéolyse) et de courtes régions « nues » qui sont moins glycosylées (libérées par la protéolyse) (Rose *et al.*, 1989). Les régions richement glycosylées et hydrophiles traduisent la présence de domaines constitués de nombreux résidus proline, thréonine et sérine (domaine PTS) auxquels sont attachés de nombreuses chaînes oligosaccharidiques par des liaisons O-glycosidique (de type séryl ou thréonyl N-acétyl galactosamine) (Fig1). Cette organisation est la conséquence de la structure des gènes des mucines où l'on retrouve des motifs répétés en tandem qui codent pour les domaines PTS. Ce motif répété est codé par un unique exon dont la taille varie de 2.2 à 21 kilobases (kb) (Nollet *et al.*, 1998). La taille et la séquence du motif répété sont spécifiques de chaque mucine. Lorsque le domaine répété est long, le nombre de répétitions est instable et cela engendre une variabilité du nombre de tandem observés chez un

individu. Ce phénomène est responsable d'un polymorphisme inter-individuel et inter-allélique du VNTR (Variable Number Tandem Repeat).

### **I-3 Les différentes classes de mucines**

On distingue classiquement les mucines sécrétées des mucines membranaires.

#### **Mucines sécrétées**

Elles sont parfois appelées « mucines vraies » ou mucines sécrétées gélifiantes car elles interviennent dans la formation du mucus. Chez l'homme, elles sont au nombre de 5 : MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19 si l'on exclut MUC7 qui est une mucine sécrétée mais non gélifiante. Chacune possède un orthologue murin que l'on désigne alors : Muc2, Muc5ac, Muc5b, Muc6 et Muc19. Elles sont exprimées par une petite partie des épithéliums car elles sont synthétisées par des cellules épithéliales spécialisées, les cellules caliciformes (Perez-Vilar *et al.*, 2007). Les gènes MUC2, MUC5AC, MUC5B et MUC6 sont localisés en cluster de 400 kb au sein du locus 11p15.5 (Pigny *et al.*, 1996) tandis que MUC19 est situé en 12q12 (Chen *et al.*, 2004). Les structures génomiques de ces cinq gènes sont superposables avec notamment un exon central codant pour le TR suggérant qu'ils partagent un gène ancestral commun (Desseyn *et al.*, 1998). 18 exons ont été identifiés en aval de l'exon central pour MUC2, MUC5B, MUC5AC et MUC19 et il en existe seulement 2 pour le gène MUC6 (Desseyn *et al.*, 2008). La région amino-terminale ou N-terminale est homologue au facteur von Willebrand (vWF) avec lequel elles partagent un ancêtre commun (Desseyn *et al.*, 2000). Comme décrit pour le vWF (Sadler *et al.*, 2009), la position des résidus Cys dans le domaine de type D, serait impliquée dans la dimérisation des mucines (Ridley *et al.*, 2014). Les séquences codant les régions carboxy-terminales ou C-terminales sont riches en résidus Cys et composées de domaines D, B, C et cystin-knot. Le motif « Cystine Knot » est constitué d'environ 85 acides aminés (AA) avec notamment 11 résidus Cys sur des positions hautement conservées (Fig 1). Il serait important dans la formation des hétérodimères et homodimères de mucines (Torres *et al.*, 2012).

#### **Mucines membranaires**

Contrairement aux mucines sécrétées, elles sont exprimées par de nombreux types de cellules épithéliales non spécialisées. Elles ont été appelées « mucin-like » car elles ne participent pas directement à la formation du mucus. Pour autant, par épissage alternatif ou par clivage (Moniaux *et al.*, 2001), elles peuvent être détachées de la membrane plasmatique. La famille des mucines membranaires comprenait historiquement MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC18, MUC20 (Rose and Voynow, 2006) et MUC21 (Itoh *et al.*, 2008). Toutefois, MUC18 n'est aujourd'hui

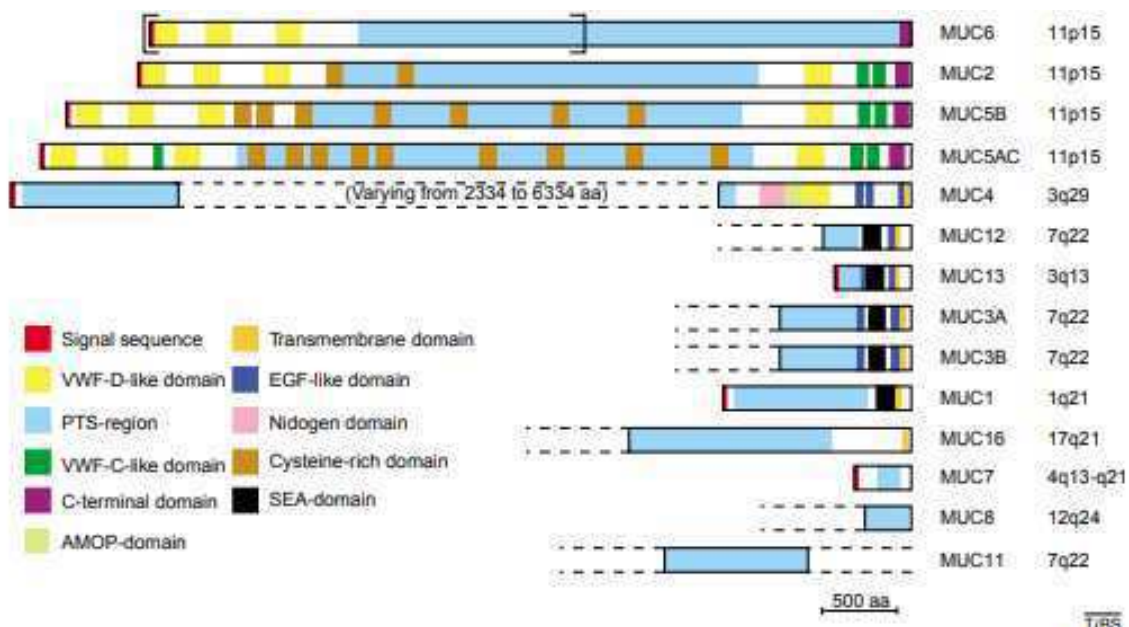
plus considérée comme un membre des mucines et a été renommée METCAM. Concernant MUC13, 15 et 20 elles sont encore membres de cette famille même si la taille de leur domaine PTS est trop petite (ou absente pour MUC15) pour qu'elles partagent les caractéristiques structurales propres aux mucines. A noter enfin, qu'il est probable que MUC3A et MUC3B soient deux séquences d'un unique gène MUC3 et non deux mucines à part entière (Desseyn *et al.*, 2008).

Les mucines membranaires sont constituées de 3 parties (Fig 1) :

- Une large sous-unité extracellulaire, qui comporte le TR hautement glycosylé. Au niveau de la région N-terminale, on peut trouver plusieurs domaines en fonction du type de la mucine considérée : des domaines EGF-like dans les MUC3, -4, -12, -13, -17 ; SEA (sea urchin sperm protein enterokinase and agrin) dans les MUC1, -3A, -3B, -12, -13, -16, -17, et d'autres domaines retrouvés uniquement dans MUC4 (AMOP : adhesion associated domain in MUC4 and other protein), vWFD, NIDO (nidogen-like)) (Fig 1).

- Un domaine hydrophobe transmembranaire unique

- Une courte région intra-cytoplasmique. Par la présence de sites de phosphorylation sur des résidus sérines, thréonines et tyrosines cette région intra-cytoplasmique est impliquée dans la transduction du signal.



**Figure 1 : Structure des mucines.** Figure reproduite à partir de Dekker *et al.*, 2002. Les séquences protéiques des différentes mucines sont alignées au niveau de l'extrémité C-terminale. Les différents domaines sont représentés dans des couleurs différentes.

## **II- La mucine MUC1**

### **II-1 Découverte de MUC1**

La protéine MUC1 a été identifiée pour la première fois dans la membrane des globules gras du lait et était parfois appelée antigène HMFG (Human Milk Fat Globule). C'est une protéine riche en sérine, thréonine, proline, glycine et alanine qui a la particularité d'être porteuse de nombreuses chaînes O-glycanniques qui rendent compte de son haut poids moléculaire. MUC1 a été la première mucine à être identifiée c'est pourquoi elle porte le numéro 1 dans la nomenclature des mucines mais elle est aussi connue sous de nombreuses autres appellations dont les plus fréquentes sont : la mucine épithéliale polymorphe (PEM), l'antigène de la membrane épithéliale (EMA), l'épisialine, le CD227 ou encore l'antigène DF3 (Albrecht *et al.*, 2011). L'équipe de Gendler *et coll.* a été la première à cloner le gène de MUC1 à partir de lignées de cellules tumorales mammaire en 1987. Le gène est situé sur le chromosome 1 en q21-24 et comporte 7 exons et 6 introns (Swallow *et al.*, 1987).

### **II-2 Régulation de l'expression de MUC1**

#### **Régulation épigénétique de MUC1**

La régulation épigénétique de MUC1 a principalement été étudiée dans le cancer. Il a été montré que la méthylation de l'histone H3-K9 et des îlots CpG dans le promoteur de *MUC1* provoque une répression transcriptionnelle alors que l'hypométhylation et l'acétylation des H3-K9 sont indispensables à son expression (Yamada *et al.*, 2008).

#### **Régulation transcriptionnelle**

La région promotrice de *MUC1* a été très étudiée pour comprendre les déterminants de sa surexpression dans les cellules tumorales. Elle contient différents types de site de liaisons qui permettent la fixation de nombreux facteurs de transcription: Sp-1, le récepteur aux oestrogènes et à la progestérone, les protéines activatrices AP-1 à 4, NF-1 (Nuclear Factor 1), GATA1-4, Yin Yang 1 (YY1), le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes (PPAR) et STAT3 (Abba *et al.*, 2006). Kovarik *et coll.* ont déterminé que le fragment -150/-60 du promoteur contient un élément *cis* permettant la fixation de Sp1 et une E-Box (parfois appelée E-MUC1), tous les deux essentiels à l'expression tissulaire spécifique de MUC1 (Kovarik *et al.*, 1993). La même équipe a mis en évidence d'autres sites de fixation potentiels pour le facteur de transcription Sp1 (un site distal en -576/-568 et un site proximal en -99/-90) dans différentes lignées tumorales épithéliales (Kovarik *et al.*, 1996). A noter qu'au niveau de ce site proximal en -99/90, il a été décrit une fixation compétitrice de SpA qui régule négativement l'expression de *MUC1*. Il a par ailleurs été décrit cinq sites potentiels d'interaction avec STAT dont 4 sont situés au niveau des sites -90, -75, -55 et -35 proches

de la boîte TATA et des GC-boxes (Zaretsky *et al.*, 1999) et le dernier en amont du site d'initiation de la transcription (Gaemers *et al.*, 2001). Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  induisent une forte induction de *MUC1* par les actions indépendantes de NF- $\kappa$ B p65 et STAT1 $\alpha$  sur la région située entre -589 et -495 du promoteur de *MUC1* (Lagow *et al.*, 2002). Par ailleurs, le TNF- $\alpha$  peut également induire l'expression de *MUC1* via la voie des MAP-kinases (Koga *et al.*, 2007). Des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) permettant la fixation de HIF-1 $\alpha$  ont été décrits au sein du promoteur de *MUC1* et régulent son expression dans les carcinomes rénaux à cellules claires (Aubert *et al.*, 2009).

### II-3 Structure de MUC1 (Fig 2)

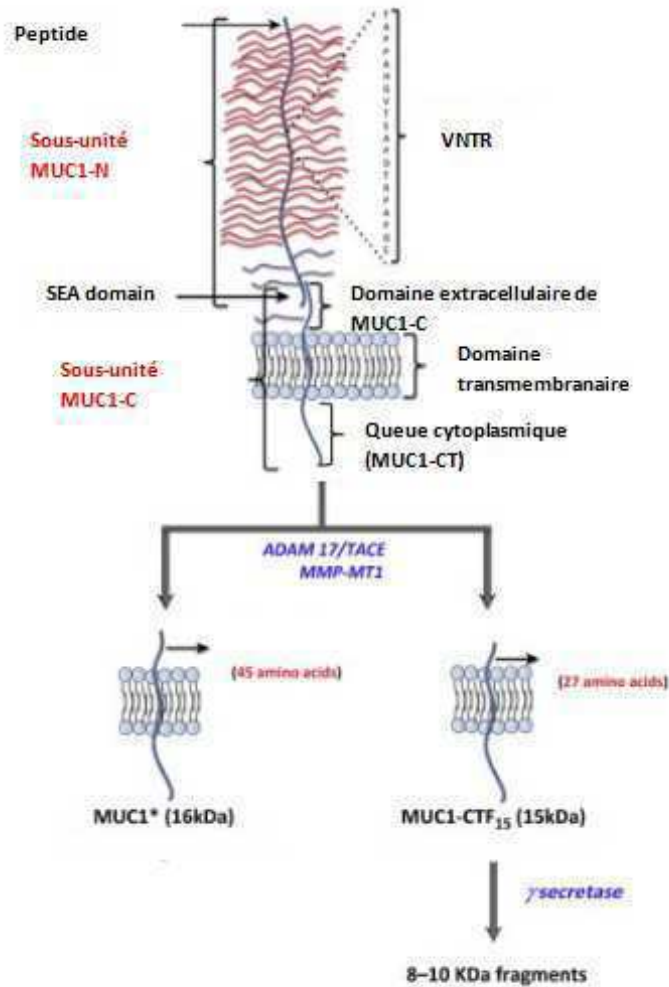
MUC1 est d'abord traduite sous forme d'un précurseur monomérique. C'est seulement dans le réticulum endoplasmique que ce précurseur est clivé aboutissant à la constitution de deux sous-unités (MUC1-N et MUC1-C) reliées entre elles par une liaison non covalente (Ligtenberg *et al.*, 1992). Le clivage s'effectue par autoprotéolyse au niveau d'une séquence FRPG/SVVV, hautement conservée et partagée avec MUC3 et MUC12, située dans le domaine SEA (Palmai-Pallag *et al.*, 2005, Macao *et al.*, 2006). Les deux-sous unités sont présentées ci-dessous (Fig 2) :

- La sous-unité N-terminale MUC1-N, ou sous-unité alpha, constitue le domaine extracellulaire qui s'étend au-delà de la surface cellulaire. Il est codé par les exons 1-4 du gène de *MUC1*. Le premier exon code pour un peptide signal, une séquence d'acides aminés d'environ 20-25 AA qui guide la translocation de la protéine vers la membrane (Gendler *et al.*, 1990). Il est suivi du TR qui est composé d'un nombre variable de répétitions (25 à 120) d'un motif de 20 AA : GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP (Swallow *et al.*, 1987; Ligtenberg *et al.*, 1991; Vos *et al.*, 1991). Du fait de la variabilité du nombre de répétitions, le squelette protéique a une masse moléculaire qui varie de 120 à 300 kDa. En Europe du Nord, le VNTR est constitué de 20 à 120 répétitions. Flanquant le VNTR, il existe de courtes séquences dégénérées qui ont une légère similitude de séquence avec le TR. Dans un environnement pro-inflammatoire, des protéases, en particulier l'enzyme de conversion du TNF- $\alpha$  (TACE), MMP-14 et ADAM17 sont capables d'induire la libération du domaine extracellulaire MUC1-N en agissant sur un site de clivage dans le module SEA situé dans la partie extracellulaire de MUC1-C (Thathiah *et al.*, 2003; Brayman *et al.*, 2004; Thathiah et Carson., 2004; Macao *et al.*, 2006). Ce mécanisme de clivage joue un rôle anti-infectieux (Lindén *et al.*, 2009) et modifie l'adhérence des épithéliums (Cullen *et al.*, 2011).



- La sous-unité C-terminale MUC1-C, ou sous-unité bêta, contient un domaine extracellulaire de 58 AA, un domaine transmembranaire de 28 AA et un domaine intra-cytoplasmique terminal (également appelé la queue cytoplasmique) de 72 AA (MUC1-CT). Les trois premiers résidus du domaine cytoplasmique (Cys-Gln-Cys) constituent un motif CQC qui permet l'adressage de MUC1 à la membrane (Kinlough *et al.*, 2006). Un motif RRK (Lysine-Lysine-Arginine), adjacent au motif CQC, permet de maintenir le domaine cytoplasmique à l'extérieur de la membrane (Singh *et al.*, 2006). Ces deux motifs sont également impliqués dans la dimérisation de MUC1-C et la translocation nucléaire de MUC1-CT en favorisant son interaction avec l'importine  $\beta$  et la nucléoporin p62 (Nup62) (Li *et al.*, 2003, Leng *et al.*, 2007). MUC1-CT comporte sept résidus tyrosine, dont 4 se sont avérés être phosphorylables et impliqués dans la transduction du signal. Sur ces sept résidus tyrosines, six sont hautement conservés parmi les espèces de mammifères, ce qui reflète l'importance de cette région (Lillehoj *et al.*, 2013). De nombreuses tyrosines kinases pouvant interagir avec ces sites de phosphorylation ont été recensées dans la littérature : ZAP-70, Lyn, Lck (Li *et al.*, 2004 ; Sousa *et al.*, 2016), Shc, PLC $\gamma$ 1, c-Src, Grb-2, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Wang *et al.*, 2003). MUC1-CT est également un substrat pour GSK3 $\beta$ , EGFR, and platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (PDGFR) (Singh *et al.*, 2007, Schroeder *et al.*, 2001). Après phosphorylation MUC1-CT peut engager d'autres voies de signalisation intracellulaire, il a par exemple été montré qu'après phosphorylation par l'EGFR, MUC1-CT devient un site d'ancrage pour des protéines contenant un domaine Src homology 2 (SH2) (Li *et al.*, 2001). De même après engagement par erB, MUC1 peut interagir avec les protéines du choc thermique HSP70, HSP90 (Ren *et al.*, 2006a, Ren *et al.*, 2006b). Après phosphorylation par erB ou EGFR, il semble que MUC1-CT soit également capable d'activer la voie mitogen activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) (Meerzaman *et al.*, 2001). Enfin des interactions directes de MUC1-CT avec les récepteurs  $\alpha$  aux œstrogènes, p53, p120, APC, et le calcium cyclophilin ligand (CAML) ont aussi été rapportées (Singh *et al.*, 2008, Molock and Lillehoj., 2006).

Après séparation des deux sous-unités, l'enzyme  $\gamma$ -Secretase est également capable de cliver MUC1-C (Julian *et al.*, 2009) ce qui est nécessaire à sa translocation nucléaire. De manière surprenante, MUC1-N a aussi été détectée dans le noyau sans que le mécanisme soit élucidé (Kumar *et al.*, 2012).



**Figure 2 : Structure de MUC1 et sites de clivage.** Figure librement adaptée de Nath *et al.*, 2014. La glycoprotéine MUC1 est constituée des deux sous-unités MUC1-N et MUC1-C reliées entre elles par une liaison non covalente. MUC1-N est majoritairement constituée par le tandem repeat dont le nombre peut varier (VNTR). Il existe également, au niveau N-terminal, un peptide signal qui guide la protéine à la membrane. MUC1-C est constituée de 3 domaines : Un court domaine extracellulaire qui contient le domaine SEA, une partie transmembranaire et la queue cytoplasmique (MUC1-C) qui permet la transduction du signal. MUC1 peut être clivée au niveau de son domaine SEA par plusieurs protéases dont TACE, MMP-14 et ADAM17. La forme clivée peut subir un deuxième clivage par la  $\gamma$ -sécrétase.

## II-4 Voies de signalisation

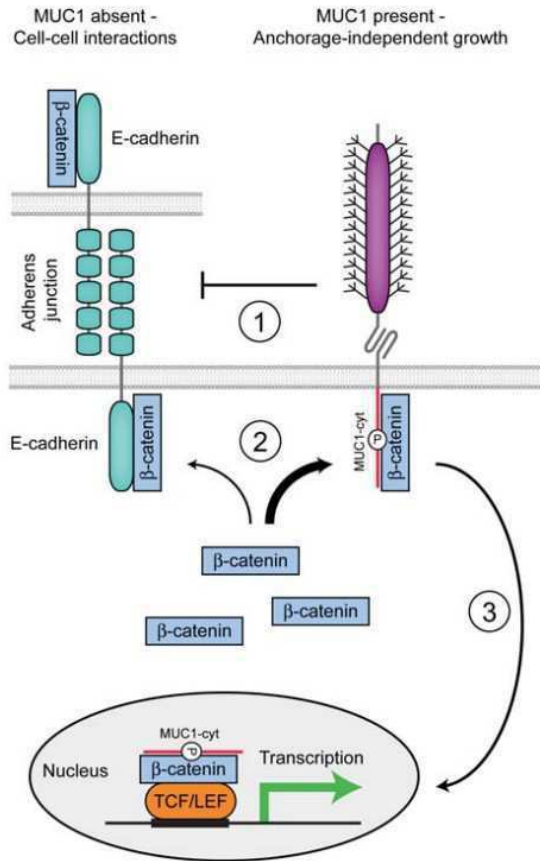
Par l'intermédiaire de son domaine intra-cytoplasmique, MUC1 peut interagir avec de nombreux partenaires et activer des voies de signalisations variées. La description de chacune de ces voies est en dehors du cadre de ce travail de thèse, d'autant plus, qu'elles ont été décrites dans des cellules cancéreuses et ne sont pas nécessairement transposables aux fonctions de MUC1 dans les cellules épithéliales non tumorales. Par exemple, dans les cellules tumorales, il a été montré que MUC1-C et la sous-unité p65 du complexe NF- $\kappa$ B

étaient colocalisées au niveau des promoteurs des gènes des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  ce qui suggère que MUC1 promeut un environnement pro-inflammatoire (Ahmad *et al.*, 2009). Pour autant, l'étude du rôle de MUC1 dans l'inflammation non tumorale (détaillée dans une partie ultérieure) montre que MUC1 a principalement une activité anti-inflammatoire.

### **Interaction avec la voie Wnt / $\beta$ -catenin**

A l'état normal, la  $\beta$ -caténine forme un complexe avec l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes entre les cellules épithéliales. En cas de perte de polarité cellulaire, l'expression délocalisée de MUC1 entraîne une interaction compétitive de la queue cytoplasmique de MUC1 avec la  $\beta$ -caténine ce qui déstabilise le complexe E-cadhérine /  $\beta$ -caténine. Par ailleurs, il a été montré que l'interaction de MUC1-CT avec la  $\beta$ -caténine favorise la translocation nucléaire de cette dernière ce qui favorise l'interaction entre la  $\beta$ -caténine et les facteurs de transcription LEF1 (Lymphoid Enhancer Factor 1) et TCF (T-cell Factor) et active *in fine* la transcription des gènes cibles de la voie Wnt comme c-Myc ou encore la cycline D1 (Lillehoj *et al.*, 2007) (Fig 3). L'interaction de MUC1-CT avec la  $\beta$ -caténine est régulée par les différentes kinases capables de phosphoryler MUC1-CT. Ainsi, la phosphorylation de MUC1-CT par c-SRC ou PKC $\delta$  augmente l'affinité du complexe MUC1-CT /  $\beta$ -caténine alors que la phosphorylation par GSK3 $\beta$  l'inhibe (Ren *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 1998).

La voie Wnt /  $\beta$ -caténine a une place importante en pathologie rénale notamment *via* son implication dans le phénomène de TEM (Gewin *et al.*, 2018). Dans le rein non tumoral, la TEM partielle est caractérisée par la diminution transitoire et réversible de l'expression des marqueurs épithéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux par les cellules épithéliales tubulaires pendant les phases de régénération et au cours de la fibrogenèse (Gewin *et al.*, 2018). Il ne s'agit pas d'une TEM complète comme elle peut être observée au cours du développement car le changement phénotypique n'est pas total (conservation de l'expression des marqueurs épithéliaux) et parce que les études de traçage cellulaire semble montrer que les cellules épithéliales tubulaires ne se transforment pas en fibroblastes ou myofibroblastes interstitiels (Mezni *et al.*, 2015).



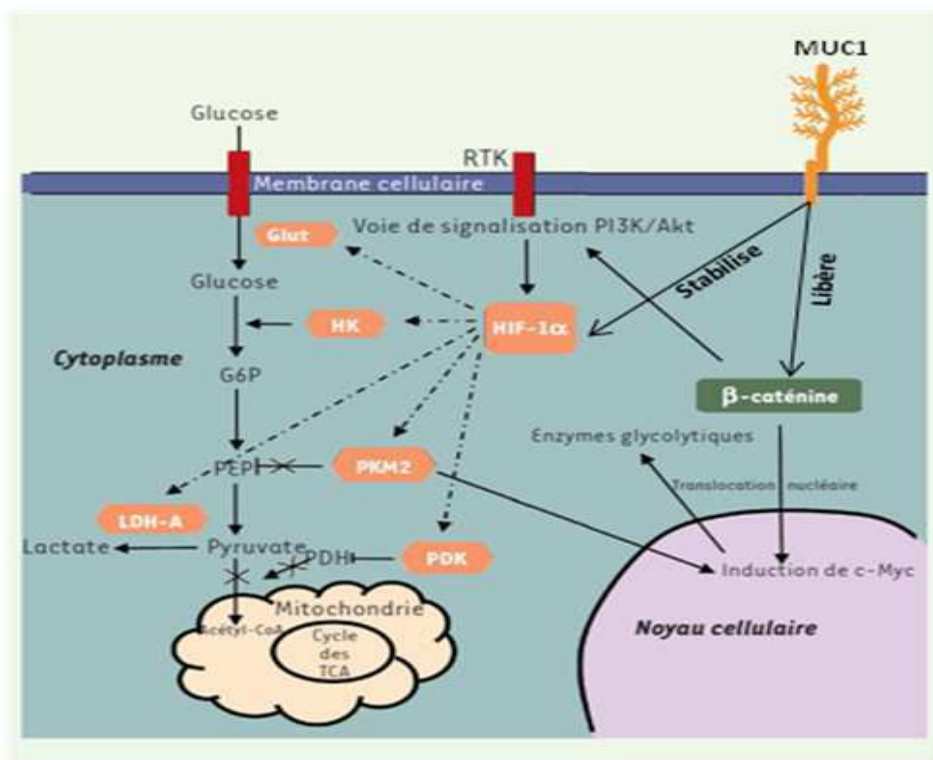
**Figure 3 : Interaction entre MUC1 et la  $\beta$ -caténine.** Figure librement adaptée à partir de Van Putten *et al.*, 2017. La  $\beta$ -caténine forme normalement un complexe avec l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes. En cas de surexpression ou de délocalisation de MUC1, MUC1-CT phosphorylée entre en compétition avec l'E-cadhérine pour le recrutement de la  $\beta$ -caténine ce qui favorise sa translocation nucléaire et déstabilise les jonctions intercellulaires.

### Rôle anti-apoptotique

Dans les cellules tumorales, *via* son rôle dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine aboutissant notamment à la synthèse de la cycline D1, l'expression de MUC1 favorise l'activation de facteurs pro-survie dans les cellules (Wang *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans des modèles *in vitro*, la surexpression de MUC1 et la phosphorylation de sa queue cytoplasmique aboutit à une augmentation de l'expression mitochondriale de la protéine anti-apoptotique cell lymphoma extra-large (Bcl-xL) (Raina *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2004) et au contraire à une inhibition de la protéine pro-apoptotique Bcl2-associated agonist of cell death (Bad) (Raina *et al.*, 2004). Un autre mécanisme important dans son rôle anti-apoptotique de MUC1-CT provient de son interaction avec un domaine protéine p53. Cette liaison favorise la translocation nucléaire de la p53 qui inhibe la transcription de la protéine pro-apoptotique Bax et favorise la transcription de p21 ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire (Wei *et al.*, 2005).

## Rôle dans la régulation du métabolisme énergétique

Le passage de la phosphorylation oxydative à la glycolyse aérobie est aussi un mécanisme observé à la fois dans le cancer et dans des atteintes inflammatoires. MUC1 peut intervenir à plusieurs niveaux dans la régulation du métabolisme énergétique. Par son action sur la voie Wnt /  $\beta$ -caténine, la surexpression de MUC1 favorise la transcription du facteur HIF-1 $\alpha$  par l'intermédiaire de la voie PI3K / AKT (Murthy *et al.*, 2018). HIF-1 $\alpha$  est une protéine majeure de la balance énergétique. Elle favorise l'expression des enzymes glycolytiques (HK, PKM2, LDH-A) et des transporteurs de glucose (Luo *et al.*, 2011) nécessaires à la mise en place d'une glycolyse aérobie élevée, avec une augmentation de la production de lactate et une diminution de la phosphorylation oxydative mitochondriale. MUC1 peut également interagir directement avec le facteur HIF-1 $\alpha$  et le stabiliser comme cela l'a été rapporté dans des cellules tumorales pancréatiques (Chaika *et al.*, 2012) (Fig4)



**Figure 4: Rôle de MUC1 dans la régulation du métabolisme énergétique des cellules.** Figure librement adaptée à partir de l'article «Activation de la glycolyse aérobie par la voie canonique WNT/ $\beta$ -caténine » par A. Vallée 2018. MUC1 *via* son rôle stabilisateur de la protéine HIF-1 $\alpha$  et son rôle dans la translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine favorise la mise en place de la glycolyse aérobie au dépend de la phosphorylation oxydative.

### II-5 Glycosylation de MUC1

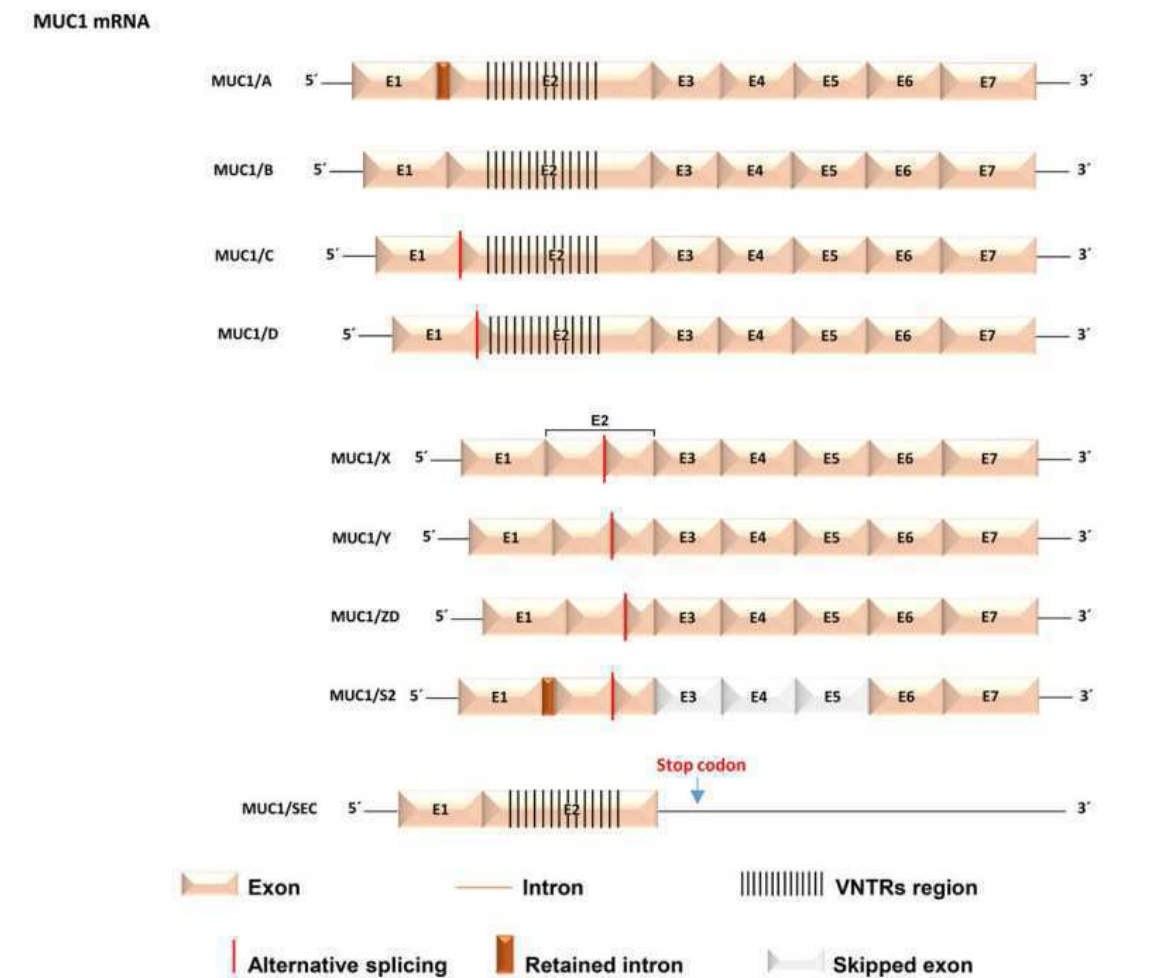
Dans les cellules normales, MUC1 est fortement glycosylée ce qui la protège des clivages protéolytiques. Par ailleurs, la glycosylation stabilise MUC1 à la surface des cellules en

l'empêchant de subir une endocytose médiée par la clathrine (Altschuler *et al.*, 2000). MUC1 est principalement O-glycosylée au niveau des résidus sérine et thréonine dans le VNTR mais également modérément N-glycosylée (Chang *et al.*, 2000). La glycosylation contribue pour 50 à 90% du poids total de MUC1. En fonction de la taille du VNTR, la masse moléculaire de la protéine glycosylée peut représenter entre 250 et 500 kDa. Cinq sites de N-glycosylation ont été répertoriés au niveau de résidus d'asparagine. Quatre de ses sites sont retrouvés dans les séquences dégénérées flanquant le VNTR et un dans le domaine extracellulaire de MUC1-C. Le modèle de glycosylation de MUC1 varie en fonction de l'expression tissulaire spécifique des glycosyltransférases (Hattrup *et al.*, 2008). La N-glycosylation démarre dans le réticulum endoplasmique, alors que l'initiation et l'élongation de la O-glycosylation se déroulent dans le *cis*- et *trans*-Golgi (Hilkens *et al.*, 1988). Les propriétés biologiques de MUC1 sont dépendantes de l'O-glycosylation, tandis que la N-glycosylation joue un rôle majeur dans le repliement de la protéine, son tri et sa sécrétion ainsi que dans l'expression apicale dans les cellules polarisées (Parry *et al.*, 2006). La glycosylation de MUC1 est modifiée en condition pathologique. Par exemple dans le cancer, MUC1 est hypoglycosylée ce qui favorise son internalisation dans les cellules tumorales (Nath *et al.*, 2014).

## II-6 Isoformes de MUC1

Il existe plusieurs isoformes de MUC1 issus de l'épissage alternatif au cours de la transcription et aboutissant à la rétention de un ou plusieurs introns et/ou au saut de un ou plusieurs exons. Chez l'homme, environ 78 isoformes de MUC1 ont été observés (Nath and Mukherjee, 2014), dont les isoformes les plus courants sont MUC1 / A, MUC1 / B, MUC1 / C, MUC1 / D, MUC1 / X (ou MUC1 / Z), MUC1 / Y et MUC1 / ZD (Fig 5). Les isoformes MUC1 / A, MUC1 / B, MUC1 / C et MUC1 / D sont des isoformes dits «pleine longueur» (Ligtenberg *et al.*, 1990, Obermair *et al.*, 2001). MUC1 / B est l'ARNm dit «normal» de MUC1. MUC1 / A est généré en raison de la rétention d'une séquence de 27 paires de bases (pb) de l'intron 1 dans l'ARNm, ce qui le rend plus long. MUC1 / C et MUC1 / D sont caractérisés par des pertes de séquences de l'exon 2 (Fig 5). Comme c'est l'exon qui code le VNTR, ces variantes ont donc des longueurs plus courtes. Les isoformes MUC1 / X (ou MUC1 / Z), MUC1 / Y et MUC1 / ZD n'ont pas de VNTR en raison du saut de l'exon 2 (Zrihan-Licht *et al.*, 1994, Oosterkamp *et al.*, 1997). L'isoforme MUC1 / Y est plus court de 54 pb que MUC1 / X et est fortement exprimée dans les cellules cancéreuses du sein et de l'ovaires (Schut *et al.*, 2003, Baruch *et al.*, 1997). MUC1 / ZD a perdu le VNTR ainsi que les séquences dégénérées flanquantes et contient un domaine C-terminal unique de 43 AA qui résulte d'un décalage dans le cadre de lecture (Levitin *et al.*, 2005). L'isoforme MUC1 / SEC est sécrétée dans le milieu extracellulaire suite à un épissage alternatif conduisant à la perte du domaine

transmembranaire et est capable de se lier à la forme MUC1/Y entraînant la phosphorylation de résidus tyrosine (Baruch *et al.*, 1999). Actuellement, il existe peu de données dans la littérature sur la signification fonctionnelle de chacun de ces isoformes de MUC1 (Hanisch et Müller., 2000; Nath et Mukherjee., 2014).



**Figure 5 : Illustration des différents isoformes de MUC1.** Figure reproduite à partir de l'article « Reflections on MUC1 glycoprotein: the hidden potential of isoforms in carcinogenesis » par Sousa *et al.*, 2016.

## II-7 Expression de MUC1

### Cellules épithéliales

MUC1 est exprimée dans les cellules épithéliales de façon quasiment ubiquitaire chez l'homme. Son expression est élevée au sein des épithéliums canaux et glandulaires notamment dans le tractus gastro-intestinal (estomac, pancréas, vésicule biliaire, duodénum, rectum et côlon), respiratoire (nasopharynx et bronche), uro-génital (reins, prostate, trompe, col et utérus). Une expression moindre de MUC1 est retrouvée au niveau des reins, des glandes mammaires, de la conjonctive et de l'oreille moyenne (Uhlen *et al.*, 2015).

## Cellules hématopoïétiques

MUC1 est exprimée, bien qu'à un degré moindre comparativement aux cellules épithéliales, dans différents types de cellules immunitaires. Chez l'homme, son expression a été caractérisée dans les lymphocytes T activés (Correa *et al.*, 2003). Dans cette population, le niveau d'expression de MUC1 est très faible comparé à celui des cellules épithéliales (de l'ordre de 50 fois moins en qPCR) et MUC1 présente un profil de glycosylation différent de celui connu dans les cellules épithéliales (Correa *et al.*, 2003). La queue cytoplasmique de MUC1 peut être phosphorylée par les tyrosines kinases Lck, ZAP-70 et Lyn (Li *et al.*, 2003, 2004). Cette phosphorylation de MUC1-CT favorise la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine ce qui va impacter les fonctions immunitaires des lymphocytes. En condition inflammatoire, la cytokine IL-7 augmenterait d'autant plus l'interaction entre MUC1-CT et la  $\beta$ -caténine (Vasir *et al.*, 2005). Il faut noter que l'expression de MUC1 au niveau des lymphocytes B et les plasmocytes est peu connue et les données de la littérature concernent principalement le myélome multiple dans lequel une induction de MUC1 a été rapportée (Treon *et al.*, 1999, Duperray *et al.*, 1989).

Dans les cellules de l'immunité innée, l'expression de MUC1 a été documentée sur les cellules dendritiques, les monocytes / macrophages et les neutrophiles (Vasir *et al.*, 2005, Wykes *et al.*, 2002, Pentheroudakis *et al.*, 2004, Leong *et al.*, 2003). Le rôle de MUC1, au niveau des cellules dendritiques et des macrophages sera détaillé dans une autre partie.

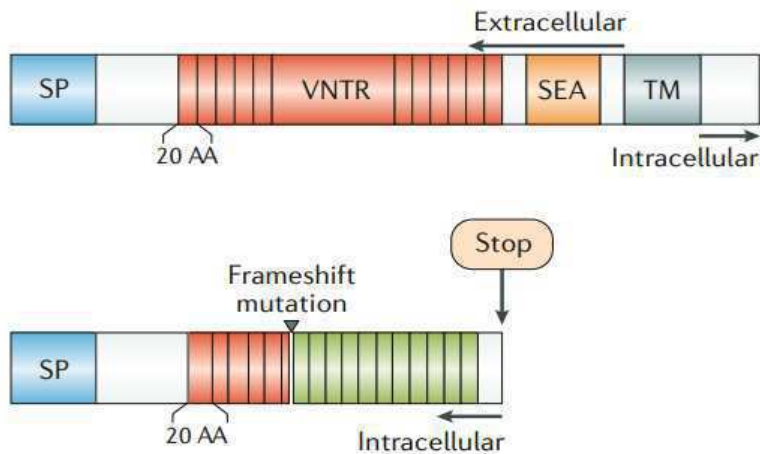
### III- MUC1 et rein

Dans le rein adulte normal, MUC1 est exprimée au pôle apical des cellules constituant les tubes contournés distaux et les tubes collecteurs. Si les mucines -3, -4, -6, -20 sont également retrouvées dans le rein (Leroy *et al.*, 2003), MUC1 est la mucine la plus représentée. Son expression est détectée dès la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation au niveau du blastème métanéphrique, au bourgeon urétéral et aux tubes contournés distaux et collecteurs (Leroy *et al.*, 2002b). Aucune expression n'est observée au niveau des différents types cellulaires constituant les glomérules (podocytes, cellules mésangiales, cellules pariétales épithéliales) que ce soit au cours de la vie fœtale ou adulte.

La majorité des études sur MUC1 dans le rein s'intéressent aux formes mutées de MUC1. Ces dernières sont responsables d'une maladie rénale fibrosante de transmission autosomique dominante qui est maintenant appelée « MUC-1 kidney disease » par les anglo-saxons (Carney *et al.*, 2019). Plusieurs mutations différentes ont été décrites à l'origine de cette maladie. Elles ont pour point commun d'entraîner l'insertion d'une cytosine dans un des motifs répétés du TR entraînant un décalage du cadre de lecture et l'apparition



d'un codon stop (Fig 6) (Kirby *et al.*, 2013). En l'absence de la région nécessaire à l'insertion membranaire, cette protéine MUC1 pathologique, appelée MUC1-fs (pour MUC1-frameshift), s'accumule dans le cytoplasme des cellules épithéliales tubulaires pendant des années. De manière progressive, cette accumulation de MUC1-fs entraîne une toxicité au niveau des cellules épithéliales tubulaires et une fibrose du parenchyme rénal aboutissant à l'insuffisance rénale chronique (IRC) à l'âge adulte (Dvela-Levitt *et al.*, 2019).



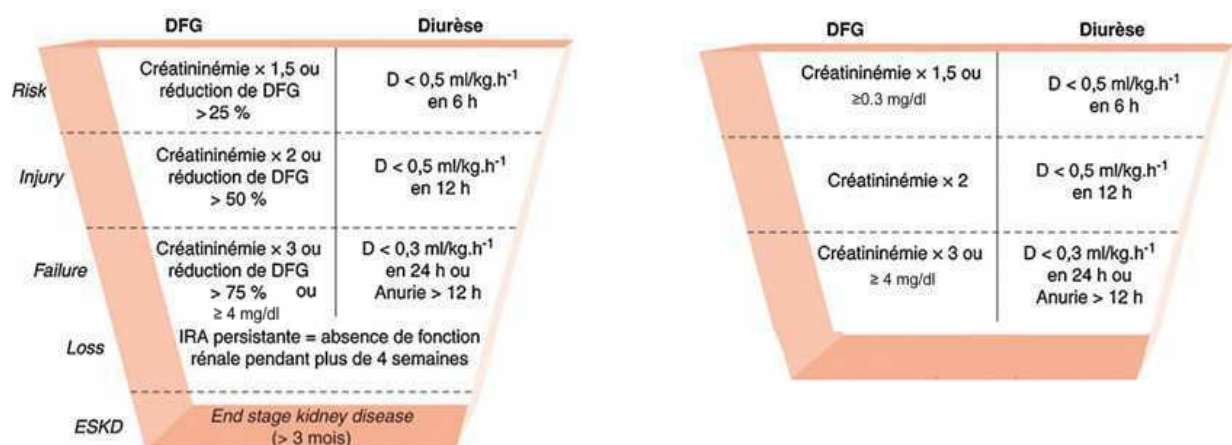
**Figure 6 : Mutation pathologique de MUC1 responsable du développement d'une insuffisance rénale chronique.** Figure reproduite à partir de l'article « Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease » par Devuyst *et al.*, 2019. Les mutations pathologiques de MUC1 surviennent dans le VNTR et entraînent un décalage du cadre de lecture responsable de l'apparition précoce d'un codon STOP. L'accumulation de cette protéine dans le cytoplasme des cellules épithéliales tubulaires est responsable du développement à bas bruit d'une insuffisance rénale chronique.

## PARTIE II

### I- Insuffisance rénale aiguë et nécrose tubulaire aiguë

#### I-1 Définition : Insuffisance rénale aiguë

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) désigne un syndrome caractérisé par une diminution brutale (survenant en 1 à 7 jours) et maintenue dans le temps (plus de 24 heures) de la de la fonction rénale (Makris *et al.*, 2016). Cette définition très large regroupe des atteintes rénales de sévérité très variable et de mécanismes physiopathologiques très différents. Pour uniformiser la recherche clinique et distinguer différents stades de gravité dans les essais cliniques, une première définition consensuelle a été suggérée en 2004 par l'ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative) : la classification RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, ESRD) (Fig 7). Cette classification est basée sur le taux de créatinine plasmatique et le débit urinaire (Bellomo *et al.*, 2004). En 2007, une seconde classification portant le nom d'AKIN a été proposée par le réseau AKI (Acute Kidney Injury) (Mehta *et al.*, 2007) et à ce jour les deux classifications sont toujours utilisées (Fig 7). Si elles ont été validées sur un grand nombre de patients (Joannidis *et al.*, 2009, Thakar *et al.*, 2009), ces classifications ne sont pas exemptes de défauts. Elles utilisent par exemple la valeur de base de la créatinine dans le calcul du stade ce qui les rendent difficilement applicable en pratique clinique (Ricci *et al.*, 2011a). Par ailleurs, elles ne sont pas applicables en recherche animale où l'on utilise essentiellement la valeur de l'urée ou de la créatininémie plasmatique.



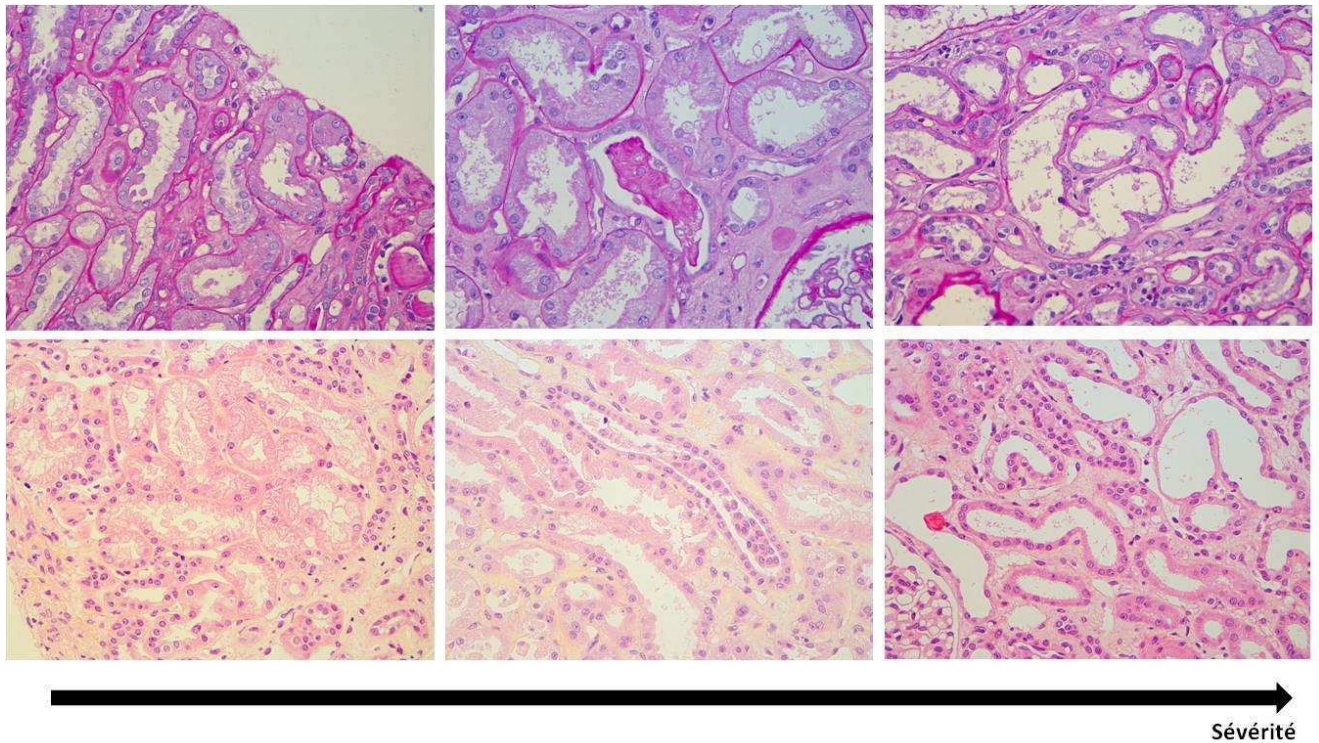
**Figure 7 : Présentation des classifications RIFLE et AKIN** proposées respectivement en 2004 et 2007 afin d'uniformiser les définitions de l'insuffisance rénale aiguë. Ces deux classifications reposent sur l'évolution de taux de la créatininémie plasmatique et sur la mesure du débit urinaire.

Malgré l'avantage de bénéficier de classifications uniformisées, ces dernières ne rendent pas compte du mécanisme physiopathologique ce qui peut être à l'origine de confusion. En effet,

l'IRA au sens large englobe les causes dites prérénales ou post-rénales qui ne traduisent pas une lésion intra-rénale. Par ailleurs, dans les causes intra-rénales, on peut encore distinguer les causes glomérulaires, vasculaires et tubulaires. La grande majorité des cas d'IRA étant secondaire à une dysfonction tubulaire, on associe parfois l'IRA à la lésion élémentaire des tubules en microscopie optique : la nécrose tubulaire aiguë (NTA). La NTA peut être secondaire à une ischémie ou à un sepsis ou à un mécanisme néphrotoxique et le plus souvent à une association de ces différentes causes (Hanif *et al.*, 2020).

### **I-2 Définition : Nécrose tubulaire aiguë**

Comme mentionné précédemment, la NTA correspond à un ensemble de lésions tubulaires visibles en microscopie optique qui traduisent une souffrance des cellules tubulaires secondairement à une agression ischémique et/ou néphrotoxique. Le terme de nécrose tubulaire aiguë est un mauvais terme car la nécrose n'est pas le mécanisme lésionnel prédominant chez l'homme où d'autres formes de mort cellulaire comme l'apoptose ou l'anoïkis sont observées (Hanif *et al.*, 2020). De ce fait, on lui substitue de plus en plus souvent les termes de souffrance tubulaire aiguë ou lésions tubulaires aiguës. D'un point de vue microscopique, les lésions de NTA peuvent être débutantes et caractérisées par un gonflement des cellules épithéliales tubulaires, une desquamation de leur pôle apical ou plus sévères et caractérisées par une perte de la hauteur épithéliale, une perte de la bordure en brosse des tubes proximaux et la formation de cylindres protéiques intra-tubulaires. Dans le stade le plus avancé, la membrane basale tubulaire est mise à nue et les tubes apparaissent contournés avec une lumière béante (Fig 8). A ce stade, deux points sont importants à préciser : 1° Même si la NTA correspond à des lésions morphologiques, le diagnostic est le plus souvent fait *a priori* sans réalisation de ponction biopsie rénale 2° Il n'existe pas de corrélation entre la sévérité des lésions histologiques et celle de l'atteinte clinique (Rosen *et al.*, 2008). Dans la plupart des études traitant de l'IRA, il est donc sous-entendu que l'origine de la dysfonction tubulaire est causée par une NTA sans que celle-ci soit effectivement objectivée sur biopsies. Comme nous l'illustrerons dans la suite de ce manuscrit, il existe pourtant des différences entre les étiologies à l'origine d'une IRA qui traduisent des différences physiopathologiques dans les mécanismes de la dysfonction tubulaire. Par exemple, concernant les lésions histologiques tubulaires au cours de l'ischémie-reperfusion (IR) et du sepsis, bien qu'elles soient toutes deux assimilables à de la NTA, elles sont au premier plan dans l'IR et beaucoup plus ténues au cours du sepsis.



**Figure 8 : Spectre des lésions histologiques de nécrose tubulaire aiguë.** La première ligne correspond à des colorations au PAS et la deuxième ligne à des colorations de l'HES. Sur la première colonne, on peut observer des lésions de NTA débutantes caractérisées par un gonflement des cellules épithéliales tubulaires et une desquamation du pôle apical. Sur la deuxième colonne, les lésions sont plus sévères avec une baisse de la hauteur épithéliale, une desquamation des cellules épithéliales tubulaires dans la lumière des tubes et la formation de cylindres protéiques intra-tubulaires. Sur la dernière colonne, les lésions tubulaires sont sévères avec une mise à nu de la membrane basale tubulaire.

## II- Régénération rénale dans le modèle d'ischémie reperfusion

### II-1 Introduction

A l'état physiologique, l'épithélium tubulaire rénal est dans un état quiescent et les figures de mitose sont rares contrairement aux épithéliums à division rapide comme dans l'intestin grêle, la peau ou le côlon (Johansson *et al.*, 2014). Pour autant, le rein est le seul organe avec le foie qui a la capacité de récupérer tout ou partie de sa fonction dans les suites d'une atteinte aiguë, ce qui témoigne de profondes capacités de régénération (Little *et al.*, 2003). Ainsi, dans les études, la majorité des patients récupèrent une fonction rénale normale après un épisode d'IRA même lorsque les lésions de NTA sont objectivées sur biopsies rénales (Gill *et al.*, 2005). Les mécanismes à l'origine de cette capacité de renouvellement du compartiment épithélial seront discutés dans les parties suivantes. En cas d'agression trop sévère ou prolongée dans le temps, les mécanismes de régénération rénale sont dépassés et l'évolution se fera vers l'établissement d'une fibrose du parenchyme rénale responsable d'une perte irréversible de la fonction rénale (Bonventre *et al.*, 2011). Par ailleurs, des études

récentes ont également établi un lien entre la survenue d'un épisode d'IRA et le risque de développer une IRC au long terme même en cas de récupération totale de la fonction rénale (Coca *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent que les mécanismes de la réparation rénale entraînent des modifications de l'homéostasie tissulaire qui favorisent le développement de la fibrose rénale (Bonventre *et al.*, 2011). Ces données montrent à quel point la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la régénération rénale sont importants à étudier à la fois pour répondre de manière optimale dans les phases aiguës mais aussi pour prévenir les complications dans les phases plus tardives.

## **II-2 Le modèle d'ischémie/reperfusion**

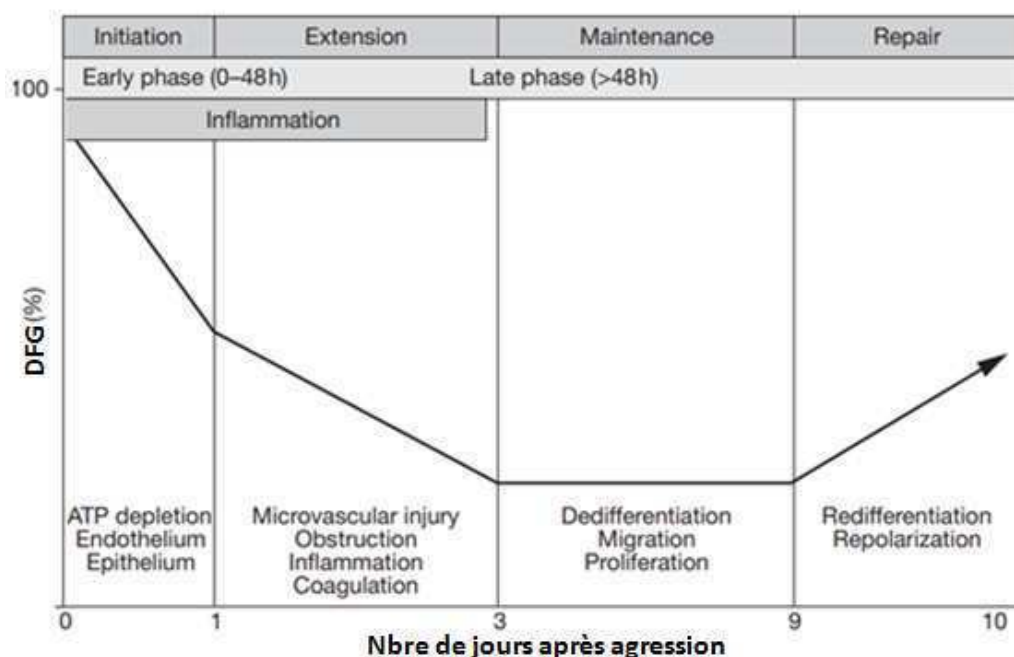
L'IRA, lorsqu'elle est présumée d'origine tubulaire, est rarement une indication de biopsie rénale ; par conséquent, les données histologiques chez l'homme sont limitées et l'expérimentation animale est cruciale pour étudier la cinétique des lésions et explorer les mécanismes physiopathologiques. Dans cette optique, les modèles d'ischémie-reperfusion (IR) par clampage du pédicule rénal sont les plus fréquemment utilisés. Ils présentent plusieurs avantages par rapport aux modèles par injection de néphrotoxiques (Shiva *et al.*, 2020) : 1) L'atteinte ischémique est le type d'agression le plus souvent à l'origine d'une IRA chez l'homme 2) Ils reflètent mieux la physiopathologie de l'IRA humaine (notamment la transplantation rénale) 3) L'atteinte de l'épithélium rénal est le plus souvent sévère ce qui permet d'étudier la réparation à la phase aiguë 4) Il est également possible de moduler la sévérité de l'atteinte en contrôlant le temps d'ischémie ce qui offre la possibilité d'étudier l'évolution vers la fibrose dans le même modèle (Le Clef *et al.*, 2016). Bien entendu, ils présentent aussi plusieurs limites : 1) Il existe de nombreuses variantes dans la réalisation technique à la fois sur le plan du matériel utilisé (type de clamp, type d'anesthésie, etc...) et des modalités de la procédure (ischémie unilatérale ou bilatérale, avec ou sans néphrectomie du rein controlatéral, ischémie froide ou chaude) ce qui rend parfois difficile la comparaison des résultats obtenus entre différentes équipes 2) La partie chirurgicale est délicate et en particulier la durée d'ischémie ce qui peut à la fois entraîner une perte d'un certain nombre d'animaux (décès en 48h en cas d'ischémie trop prolongée) ou au contraire des lésions minimales avec récupération spontanée. Il existe donc un risque de variabilité à la fois si les expériences sont réalisées par plusieurs opérateurs mais également intra-individuelle (Shiva *et al.*, 2020). Dans nos expériences, nous avons choisi une ischémie unilatérale de 25 minutes sans néphrectomie controlatérale. Ce type d'intervention nous permettant à la fois d'étudier la réparation rénale aux temps précoces mais aussi l'évolution vers la fibrose aux temps tardifs (Le Clef *et al.*, 2016).

## II-2-1 Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion

L'atteinte rénale de l'IR est classiquement découpée en 4 phases qui rendent compte de l'évolution de la fonction rénale après l'agression ischémique (Bonventre *et al.*, 2004) (Fig 9):

- Une phase d'initiation qui correspond à la mise en place des lésions cellulaires pendant l'ischémie.
- Une phase d'extension qui est caractérisée par la réponse de l'organisme à la mort de l'épithélium tubulaire avec mise en place d'une réaction inflammatoire dite stérile. Cette inflammation va potentialiser les lésions initiales et entraîner une chute de la fonction rénale.
- Une phase de maintenance pendant laquelle le débit de filtration glomérulaire (DFG) est stabilisé à son niveau le plus bas. Cette phase est notamment caractérisée par un dérèglement de la libération de médiateurs vasoactifs des cellules endothéliales, la congestion des vaisseaux sanguins médullaires et les dommages causés par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des médiateurs inflammatoires produits par les leucocytes et les cellules rénales après reperfusion.
- Une phase de récupération caractérisée par la réparation (et la régénération) de l'épithélium tubulaire et le retour progressif du DFG à sa base.

En pratique la durée respective de ces différentes phases dépend de la durée de l'ischémie. En effet, en cas d'ischémie très courte, les modifications cellulaires induites par l'ischémie sont alors totalement réversibles. En l'absence de mort cellulaire, les phases d'extension et de maintenance sont donc minimales. Au contraire en cas d'ischémie prolongée, en plus des effets délétères qui sont directement liés à l'agression ischémique s'ajoutent dans un deuxième temps des lésions qui surviennent plus tardivement et qui sont associées à l'inflammation stérile (en réponse à la mort cellulaire) et même directement au phénomène de reperfusion (Li *et al.*, 2006). Dans les parties suivantes, nous détaillerons les principaux mécanismes physiopathologiques ayant lieu pendant et après l'ischémie.



**Figure 9 : Présentation des différentes phases du mécanisme d'ischémie-reperfusion** (librement adaptée de « Blocking the immune response in ischemic acute kidney injury: the role of adenosine 2A agonists » de Li *et al.*, 2006)

## II-2-2 Lésions associées à l'ischémie

Le premier changement induit par l'ischémie est associé à la diminution de l'apport d'oxygène. Une diminution des taux d'O<sub>2</sub> induit le passage de l'aérobie à un métabolisme anaérobie du glucose (Kosieradzki *et al.*, 2008). Le passage à un métabolisme anaérobie entraîne une baisse des niveaux intracellulaires en ATP. De plus, la production d'ATP par un mécanisme lactate-dépendant provoque une acidose intracellulaire par accumulation d'ions hydrogène dans les cellules. Pour compenser cette accumulation d'ions hydrogène, l'échangeur Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> excrète alors un excès d'ions hydrogène, ce qui produit en retour un afflux important d'ions sodium (Sanada *et al.*, 2011) et conduit à la formation d'oedème. Par ailleurs, l'abaissement à la fois du pH intracellulaire et des niveaux d'ATP inhibent les pompes ioniques et en particulier les Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATPases ce qui favorise d'autant plus l'entrée massive d'ions Na<sup>+</sup> et d'eau (Kato *et al.*, 1987). En raison de l'accumulation de sodium, l'échangeur Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup> arrête de pomper le calcium hors de la cellule et son flux s'inverse (Kosieradzki *et al.*, 2008). Les niveaux intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> sont encore augmentés par l'inhibition de la recapture de Ca<sup>2+</sup> dans le réticulum endoplasmique en raison de la déplétion en ATP (Sanada *et al.*, 2011). Au total, ces phénomènes produisent une surcharge calcique qui active la phospholipase A2 dépendante du calcium, l'endonucléase et les protéases dans la cellule qui déclenchent l'apoptose cellulaire (Orrenius *et al.*, 2003).

Les études histologiques ont montré que les tubules proximaux (TP) sont plus sensibles à l'agression ischémique en particulier au niveau de la médullaire externe (segment S3 des TP). Cette observation s'explique notamment parce que cette région est constitutivement hypoxique (Bonventre *et al.*, 2004).

### **II-2-3 Maintenance et inflammation stérile**

En réponse à l'ischémie, plusieurs modifications favorisent la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire. Tout d'abord, les cellules épithéliales tubulaires sont capables de sécréter des cytokines et chémokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , RANTES en réponse à l'ischémie ce qui va favoriser l'afflux et l'activation des cellules inflammatoires (Bonventre *et al.*, 2004). Par ailleurs, lorsqu'elles meurent les cellules épithéliales tubulaires sécrètent des signaux de danger qui activent les cellules de l'immunité innée *via* notamment les récepteurs Toll (qui seront abordés plus en détails dans une partie ultérieure). Les cellules endothéliales endommagées par l'ischémie et la réponse vasoconstrictrice compensatoire jouent également un rôle crucial dans l'inflammation en favorisant l'afflux de cellules inflammatoires *via* l'augmentation de l'expression accrue de molécules d'adhésion cellulaire telles que ICAM-1 et l'augmentation de l'expression des contre-récepteurs sur les leucocytes (Kelly *et al.*, 1996). Cela se traduit par l'activation des leucocytes, l'obstruction des capillaires et des veinules postcapillaires, une activation et une transmigration supplémentaires des leucocytes, la production de cytokines et un état pro-inflammatoire intense (Bonventre *et al.*, 2004).

Les premières cellules inflammatoires qui infiltrent le rein sont les polynucléaires neutrophiles dès les premières minutes suivant l'agression ischémique. Les neutrophiles se fixent à l'endothélium activé et s'accumulent dans le rein en particulier dans le réseau capillaire péri-tubulaire (Solez *et al.*, 1979). Ils libèrent des protéases et des ROS ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire et une réduction de l'intégrité des cellules épithéliales et endothéliales tubulaires aggravant les lésions rénales (Awad *et al.*, 2009). L'importance exacte des neutrophiles dans l'IR est méconnue contrairement à celle des macrophages dont le rôle déterminant a été prouvé. En effet, en déplaçant les macrophages en utilisant du clodronate liposomale, plusieurs équipes ont montré l'implication des macrophages dans l'établissement des lésions précoces (Jo *et al.*, 2007). Toutefois, il a également été montré que d'autres populations de macrophages intervenaient également dans les phases plus tardives de réparation et de régénération mais aussi en cas d'évolution vers la fibrose en établissant un dialogue avec les cellules épithéliales et également les cellules de l'immunité adaptative (Lee *et al.*, 2011). La grande complexité de



ce type cellulaire est liée à la grande diversité phénotypique des populations de macrophages.

Les lymphocytes peuvent eux aussi être activés dès les phases précoces. En effet, les cellules épithéliales tubulaires expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ainsi que les molécules co-activatrices nécessaires à la présentation des antigènes aux lymphocytes. Par ailleurs, dans le parenchyme rénal, il existe un réseau de macrophages et de cellules dendritiques qui jouent un rôle de sentinelles et qui peuvent rapidement activer l'immunité adaptative. L'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> favorise initialement la réponse inflammatoire. Ainsi, les cellules CD4<sup>+</sup> expriment le ligand CD40, qui favorise la production de MCP-1 et d'IL-8 et également la production de cytokines pro-inflammatoires par les épithéliums tubulaires rénaux humains (Li *et al.*, 2002). Ce mécanisme est amplifié par la production d'IL-4 et d'IL-13 par les cellules TH2, une sous-population de cellules T (Deckers *et al.*, 1998). Au contraire à des stades plus tardifs d'autres populations lymphocytaires comme les T régulateurs (Treg) ont une action anti-inflammatoire 3 à 10 jours après IR (Gandolfo *et al.*, 2009).

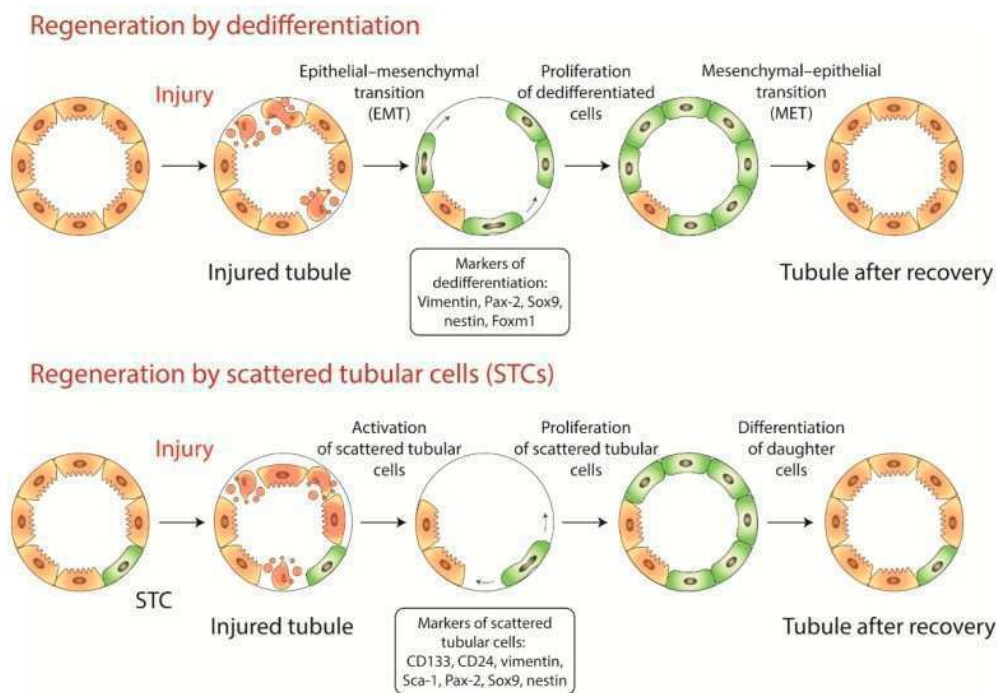
#### **II-2-4 Lésions associées à la reperfusion**

Lors de la restauration du flux sanguin, les niveaux d'oxygène augmentent rapidement et le pH extracellulaire se normalise. Paradoxalement, ces modifications peuvent être délétères pour les cellules ayant subi une ischémie prolongée. Ce concept est né il y a plus de 50 ans, quand on a observé que la reperfusion semblait accélérer le développement de la nécrose dans les cœurs soumis à une ligature coronarienne (Jennings *et al.*, 1960). A la fin de l'agression ischémique, les cellules sont fragilisées et lorsque l'organe est reperfusé, le retour rapide du pH extracellulaire à des valeurs physiologiques crée instantanément un gradient H<sup>+</sup> extrême à travers la membrane plasmique ce qui déclenche un échange Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> et un afflux massif d'ions Na<sup>+</sup> puis de Ca<sup>+</sup> (Sanada *et al.*, 2011). Par ailleurs, la normalisation liée à la reperfusion du pH intracellulaire active les calpaïnes et participe à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale impliqué dans le déclenchement de la mort cellulaire.

Une autre caractéristique importante de la phase de reperfusion est la formation de ROS et de radicaux libres au retour de la circulation sanguine. Ce stress oxydatif majeur conduit à la mort cellulaire d'autant plus que l'ischémie a entraîné une réduction des mécanismes de défense face au stress oxydatif (Li *et al.*, 2002).

### II-3 Théories de la régénération rénale

Plusieurs équipes ont étudié les mécanismes à l'origine de la plasticité épithéliale grâce à des techniques de traçage cellulaire. Ces différentes expériences ont toutes confirmées, qu'au cours des phases de réparation, certaines cellules épithéliales rénales tubulaires avaient un potentiel prolifératif élevé et permettaient le renouvellement des épithéliums. La caractérisation de ces cellules a permis de montrer qu'elles étaient le siège d'importantes modifications phénotypiques avec notamment : une induction de l'expression de marqueurs mésenchymateux, une baisse d'expression des marqueurs épithéliaux, l'expression de marqueurs de souffrance rénale, une réexpression de certains marqueurs embryonnaires et une expression de marqueurs habituellement exprimés par les cellules souches (Smeets *et al.*, 2013). Si l'existence de ces cellules n'est pas débattue, une controverse quant à leur origine a émergé dans la littérature au cours des dernières années. Certaines équipes ont suggéré que toutes les cellules épithéliales tubulaires résiduelles après l'agression ischémique avaient la capacité de se dédifférencier transitoirement afin de permettre la réparation rénale (Humphreys *et al.*, 2014). D'autres équipes, en revanche, ont proposé que seule une petite population de cellules progénitrices puisse être responsable du renouvellement des épithélium (Romagnani *et al.*, 2013) (Fig 10). Récemment l'équipe de Romagnani *et coll.* a proposé un nouveau modèle offrant l'avantage de concilier ces deux vues en apparence opposée (Lazzeri *et al.*, 2018).



**Figure 10 : Illustrations des deux théories de la régénération rénale** (librement adaptée de « Kidney Cells Regeneration: Dedifferentiation of Tubular Epithelium, Resident Stem Cells and Possible Niches for Renal Progenitors » par Andrianova *et al.*, 2019).

### II-3-1 Dédifférenciation et plasticité épithéliale

La plupart des études à l'origine de cette théorie ont utilisé des techniques de traçage cellulaire. Tout d'abord, il a été montré que seules les cellules rénales étaient responsables de la restauration des épithéliums tubulaires. Pour l'objectiver, l'équipe de Humphrey *et coll.*, a utilisé un traceur permettant de marquer au stade embryonnaire l'ensemble des cellules épithéliales rénales (Humphreys *et al.*, 2008). En réalisant des expériences d'IR sur ces souris, ils ont montré qu'il n'y avait pas de dilution du marqueur à distance de l'agression et que donc les cellules à l'origine de la réparation étaient de nature rénale. Par la suite, une autre équipe a montré qu'une large partie des cellules épithéliales tubulaires matures étaient en phase G1 et capables d'entrer en phase S suite à une agression (Vogetseder *et al.*, 2008). En utilisant un marquage avec le marqueur de prolifération Ki67 associée avec l'incorporation de chlorodéoxyuridine, une autre équipe a ainsi pu préciser que 48 h après IR plus de 55% des cellules tubulaires, notamment au niveau du segment S3, re-rentrent dans le cycle cellulaire (Humphreys *et al.*, 2011).

L'équipe de Humphrey *et coll.* a ensuite utilisé deux types d'analogues de la thymidine injectés à des moments différents : 24h et 45h après l'IR. L'hypothèse était qu'en cas de population de cellules souches progénitrices, ces dernières incorporaient les deux marqueurs alors que si c'étaient des cellules survivantes qui proliféraient de manière stochastique alors le pourcentage de cellules doublement marquées serait faible. Avec ces modalités, ils n'ont retrouvé que 5% de cellules avec les deux marquages et ont donc conclu à la deuxième hypothèse (Humphreys *et al.*, 2011). Ces résultats ont été confortés par une tout autre approche : Une équipe qui cherchait à marquer des progéniteurs podocytaires dans la capsule de Bowman a mis en évidence un marquage de certaines cellules épithéliales tubulaires proximales. Ils ont fait l'hypothèse que ces cellules étaient des progéniteurs de cellules tubulaires et utilisé leur modèle inductible pour essayer de le démontrer. Ils ont rapporté qu'après IR il n'y avait pas d'expansion clonale de cette population qui n'était donc pas une population progénitrice (Berger *et al.*, 2014). En revanche, en déclenchant l'induction du marquage au cours de la phase aiguë de l'IR (et non avant), une grande partie des cellules étaient alors marquées suggérant que les cellules épithéliales tubulaires sont capables de dédifférenciation, ce phénomène s'accompagnant d'un changement phénotypique.

Une troisième expérience de marquage a apporté d'autres éléments en faveur de cette théorie. Cette fois-ci, les auteurs ont utilisé un traceur inductible permettant de marquer les transporteurs exprimés par les cellules proximales différenciées. Sur le même principe que les expériences précédentes, ils ont montré qu'après IR il n'y avait pas de dilution du traceur

et donc qu'il n'y avait pas de population de cellules immatures qui se divisent de manière clonale (Kusaba *et al.*, 2014).

### **II-3-2 Théorie des cellules souches progénitrices**

L'existence de cellules progénitrices tubulaires chez l'homme a été supposée secondairement à la découverte, dans le rein normal et en dehors de toute agression, d'une population de cellules présentant une morphologie et un phénotype particulier. Comparées aux cellules épithéliales conventionnelles, ces cellules contiennent moins de cytoplasme, moins de mitochondries et n'ont pas de bordure en brosse (Smeets *et al.*, 2013). Par ailleurs, elles expriment à l'état basal deux marqueurs de cellules progénitrices : le CD133 et le CD24 ainsi que certains marqueurs mésenchymateux comme la vimentine (Smeets *et al.*, 2013). Elles sont dispersées dans le tube proximal du rein normal, notamment dans le segment S3, et représentent un peu moins de 5% des cellules épithéliales tubulaires (Angelotti *et al.*, 2012). Depuis leur découverte, il a été montré qu'elles exprimaient de nombreux autres marqueurs non exprimés par les cellules épithéliales différenciées notamment l'aldéhyde déshydrogénase 1 ou des marqueurs embryonnaires comme Pax-2 et Sox9 (Andrianova *et al.*, 2019).

Ces cellules peuvent être isolées par tri magnétique avec des billes couplées avec le CD24 et le CD133 ce qui a permis de vérifier par des expériences qu'elles remplissent toutes les conditions pour être qualifiées de cellules souches *i.e.* des capacités d'expansion, d'auto-renouvellement et de différenciation épithéliale à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bussolati *et al.*, 2005). *In vitro*, elles ont la capacité de former des sphères, ce qui est une particularité des cellules souches (Lindgren *et al.*, 2011) et de proliférer longtemps sans signes de sénescence cellulaire (Brossa *et al.*, 2018). Les cellules CD133+ démontrent une expression accrue de Bcl-2 ce qui pourrait expliquer pourquoi elles résistent mieux à l'apoptose induite par l'ischémie que les cellules épithéliales tubulaires conventionnelles (Smeets *et al.*, 2013).

Afin de déterminer l'origine de ces cellules, l'expression du CD133 et du CD24 a été étudiée au cours de la néphrogénèse (Angelotti *et al.*, 2012). Cela a permis d'observer que ces marqueurs sont exprimés pendant le développement rénal au niveau du pôle urinaire de la capsule de Bowman mais aussi dans les tubules distaux à la jonction avec le glomérule. Une hypothèse est donc, qu'au cours de la croissance du rein, les cellules se propagent le long des tubules et forment cette population dispersée de cellules progénitrices observées dans le rein adulte (Romagnani *et al.*, 2013).

Récemment, l'équipe du Pr Romagnani a utilisé deux modèles de souris transgéniques pour étudier le devenir de ces cellules après IR. Dans l'un des modèles, l'ensemble des cellules

tubulaires étaient marqués avec un reporteur couplé à PAX8 et dans l'autre un reporteur était couplé à PAX2 afin de marquer la population de cellules progénitrices. Ils ont observé qu'après IR, il y avait bien une expansion clonale de la population PAX2 alors que le nombre total de cellules épithéliales tubulaires était réduit. Toutefois, ils ont aussi observé qu'un certain nombre de cellules pendant les phases de réparation exprimaient également PAX2 en immunohistochimie mais pas le rapporteur ce qui suggère une réexpression de PAX2 par des cellules non progénitrices tubulaires (Lazzeri *et al.*, 2018).

### **II-3-3 Théorie de l'endoréplication**

Les travaux de l'équipe du Pr Romagnani ont fourni une explication aux résultats apparemment discordants des équipes travaillant sur la caractérisation des cellules progénitrices rénales et des équipes utilisant du traçage cellulaire à l'aide de témoin de prolifération (incorporation d'analogues de la thymidine). Cette équipe a montré que 1) les capacités de régénération des cellules épithéliales après IR étaient surestimées. En effet, après un épisode d'IR, même en cas de récupération totale de la fonction rénale, ils ont pu observer une baisse significative du nombre total de cellules épithéliales tubulaires. 2) Les marqueurs de prolifération ne permettent pas de statuer sur l'existence ou non de cellules progénitrices en raison de l'existence de mécanisme d'endoréplication par les cellules épithéliales tubulaires (Lazzeri *et al.*, 2018). L'endoréplication signifie que les cellules rénales peuvent enchaîner des cycles de réplication de l'ADN en omettant totalement la mitose (Ovrebo *et al.*, 2018).

Considérant ces résultats, on comprend alors qu'au cours des expériences de l'équipe de Humphrey, ces derniers n'aient pas observé un grand nombre de cellules doublement marquées en utilisant les analogues de thymidine. En effet, les cellules ayant incorporées au moins un des traceurs sont des cellules différenciées en cours d'endoréplication (cette endoréplication survenant manifestement de façon stochastique). Seules les cellules ayant incorporées les deux traceurs sont effectivement des cellules progénitrices mais l'expansion clonale étant plus limitée qu'anticipée elle n'est manifeste que si le nombre de ces cellules doublement marquées est ramené au nombre total de cellules épithéliales tubulaires.

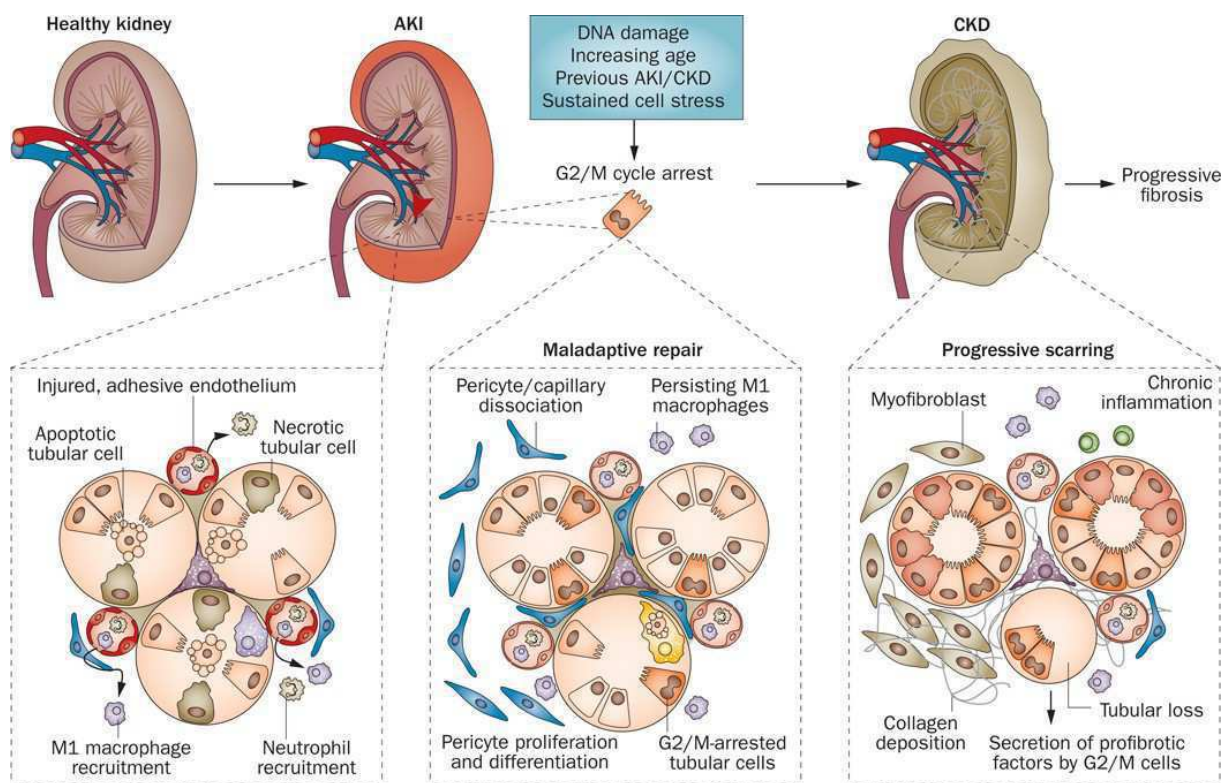
Toutefois, ce modèle ne résout pas l'ensemble des difficultés. En particulier, si des cellules progénitrices sont effectivement responsables de la régénération des épithéliums, le rôle des changements phénotypiques observés au niveau de la majorité des cellules épithéliales différenciées reste alors à définir.

## **II-4 Transition de l'IRA vers l'IRC**

### **II-4-1 Introduction**

Les modèles animaux ont permis d'établir que si l'agression (nature ischémique ou néphrotoxique) initiale était trop importante, malgré une récupération fonctionnelle partielle après les phases initiales, les lésions tubulo-interstitielles évoluaient vers la fibrose (Takaori *et al.*, 2016). Ces observations ont fait supposer qu'il existait des liens entre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la réparation rénale et ceux à l'origine de la fibrose. Par exemple, une notion qui a été développée dans la littérature pour expliquer la transition de l'agression aiguë au développement de la fibrose est la TEM partielle. Ce concept est associé aux changements phénotypiques observés dans les cellules dédifférenciées (perte des marqueurs épithéliaux, induction de marqueurs mésenchymateux) au cours de la réparation rénale et qui perdurent dans les tubes qui deviennent atrophiques ce qui favorisent le développement d'une fibrose environnante (Lovisa *et al.*, 2016).

Les études ont alors essayé d'élucider pourquoi, dans certains cas, les mécanismes de la régénération rénale n'étaient pas régulés et favorisaient le passage à des atteintes rénales chroniques alors que dans d'autres cas les patients récupéraient complètement. Récemment, cette vision a été remise en question. En effet, elle suppose que lorsque la récupération rénale fonctionnelle est totale, la régénération rénale est un processus bénin et transitoire. Mais plusieurs études ont montré que même les patients avec des antécédents d'épisodes d'IRA ayant totalement récupéré avaient un risque significativement plus élevé de développer une IRC par rapport aux patients sans antécédents d'IRA (Coca *et al.*, 2009 ; Coca *et al.*, 2012 ; See *et al.*, 2019). Quelque soit le degré de récupération fonctionnelle, le processus de régénération rénale s'effectue donc toujours au dépend de certaines modifications définitives qui font le terrain de la fibrose et de l'évolution vers l'IRC.



**Figure 11 : Illustrations des deux théories de la régénération rénale** (librement adaptée de « Kidney Cells Regeneration: Dedifferentiation of Tubular Epithelium, Resident Stem Cells and Possible Niches for Renal Progenitors » par Andrianova *et al.*, 2019).

#### II-4-2 Modification du compartiment épithélial

Comme discuté dans le sous-chapitre précédent, les travaux de l'équipe du P. Romagnani ont établi que le compartiment épithélial avait une capacité de régénération plus limitée que ce qui avait escompté auparavant (Lazzeri *et al.*, 2018). En effet, que ce soit dans des modèles néphrotoxiques ou ischémiques, ils ont pu montrer que le nombre total de cellules épithéliales tubulaires était diminué dans les suites d'une agression (Fig 11). Malgré l'existence probable de certaines cellules progénitrices, chaque agression du compartiment tubulaire diminue les réserves de cellules épithéliales tubulaires jusqu'à l'évolution vers la cicatrice fibreuse. Par ailleurs, une autre modification notable du compartiment épithélial observée dans les reins ayant subi une agression aiguë est la persistance de cellules ayant conservées des caractéristiques « dédifférenciées ». On parle alors de défaut de régénération ou d'échec de redifférenciation de ces cellules. Des équipes ont montré que ces cellules étaient notamment retrouvées au niveau des tubes atrophiques ou en voie d'atrophie. Malgré un aspect quiescent et atrophique, ces cellules présentent une activité de signalisation intense conduisant notamment à la sécrétion de facteurs pro-fibrotiques (Fig 11) (Lan *et al.*, 2012 ; Geng *et al.*, 2009). Ainsi, l'équipe de Yang *et coll.* ont remarqué que les cellules tubulaires anormalement différenciées étaient en arrêt de cycle phase en G2 / M

et qu'elles augmentaient la production de facteurs profibrotiques comme le TGF- $\beta$ 1 (Yang *et al.*, 2010) (Fig 11). La production autocrine de TGF- $\beta$ 1 empêche les cellules arrêtées de poursuivre le cycle cellulaire et améliore la production de cytokines profibrotiques, conduisant à la progression de la fibrose interstitielle en favorisant la transformation myofibroblastique des péricytes (Fig 11) (Wu *et al.*, 2013). De plus, l'expression du TGF- $\beta$  induit des modifications épigénétiques dans les fibroblastes ce qui pourrait expliquer le maintien sur le long terme de cet environnement pro-fibrosant (Bechel *et al.*, 2010). Par ailleurs, les cellules proximales lésées continuent également à exprimer des marqueurs de souffrance comme le kidney injury marker-1 (KIM-1) qui a une action pro-fibrosante et pro-inflammatoire (Humphreys *et al.*, 2013). Enfin, une équipe a également montré que l'activation de la voie Wnt dans les tubules proximales était pro-fibrosante (Maarouf *et al.*, 2016).

#### **II-4-3 Modification de la microcirculation**

Au même titre que les cellules épithéliales, il a été noté qu'un épisode d'agression rénale aiguë entraînait une perte des capillaires péri-tubulaires (Fig 11). Ainsi, l'évaluation quantitative par microangiographie par fluorescence a révélé que le nombre et les surfaces capillaires étaient diminués après IRA proportionnellement au degré de l'agression initiale (Kramann *et al.*, 2014). La perte de capillaires péri-tubulaires provoque une hypoxie qui endommage les cellules épithéliales tubulaires, active les cellules inflammatoires et les fibroblastes, et conduit finalement à une évolution vers l'IRC (Tanaka *et al.*, 2014). Cette hypoxie explique également qu'un certain nombre de gènes induits par la voie HIF-1 continuent à être exprimés par les cellules épithéliales tubulaires, en particulier les gènes à l'origine de la TEM partielle. Cette perte des capillaires péri-tubulaires pourrait être secondaire à une sécrétion insuffisante de facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF).

Enfin, un rôle important des métalloprotéases (MMP) a été découvert dans le maintien de la microcirculation rénale. Il a notamment été rapporté que la métalloprotéase MMP-9 est impliquée dans la réduction du VEGF. Chez les souris KO *Mmp-9*, la microvascularisation était bien maintenue après IRA par rapport aux souris témoins (Kramann *et al.*, 2017). L'activation anormale de cette MMP pourrait être secondaire à la transdifférenciation des péricytes en myofibroblastes au pourtour des tubes proximaux lésés. En effet, les péricytes rénaux permettent le maintien de la structure microvasculaire en produisant l'inhibiteur tissulaire métalloprotéinase 3 (TIMP-3) (Lin *et al.*, 2008, 2011).



#### **II-4-4 Inflammation chronique**

Nous avons vu qu'au cours des phases d'agression et de réparation, de nombreux types cellulaires infiltraient le parenchyme rénal. Dans les modèles de transition IRA-IRC, les cellules inflammatoires infiltrantes restent dans le tissu rénal en phase chronique avec des niveaux de cytokines pro-inflammatoires élevées et des marqueurs de lésion tissulaire (Black *et al.*, 2018). Il a même été démontré la persistance de ces cellules en cas de récupération fonctionnelle totale (Cheng *et al.*, 2017). Plusieurs éléments font suggérer que le devenir de ces cellules conditionne également la transition vers l'apparition de fibrose. Par exemple, si une certaine population de macrophages pro-inflammatoires favorise l'installation des lésions dans les phases précoces, d'autres populations de macrophages d'apparition plus tardive favorisent la réparation mais peuvent aussi participer à l'installation de la fibrose (Fig 11) (Lee *et al.*, 2011). En effet, il est rapporté que le nombre de ces macrophages dans le parenchyme rénal est en corrélation avec le degré de fibrose interstitielle dans différents modèles d'IRA (Ikezumi *et al.*, 2011).

Un autre élément en faveur du rôle de l'inflammation dans la transition vers l'IRC est le développement accru des tissus lymphoïdes tertiaires après IR chez les souris âgées (Sato *et al.*, 2016). Ces organes lymphoïdes tertiaires sont associés à la gravité des lésions rénales et à l'expression des cytokines pro-inflammatoires, ce qui suggère qu'ils peuvent contribuer à l'inflammation chronique.

### **III Résultats antérieurs de l'équipe sur le rôle de MUC1 dans l'ischémie-reperfusion**

#### **III-1 Modèle d'IR chez les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> ou *Muc1*<sup>-/-</sup>**

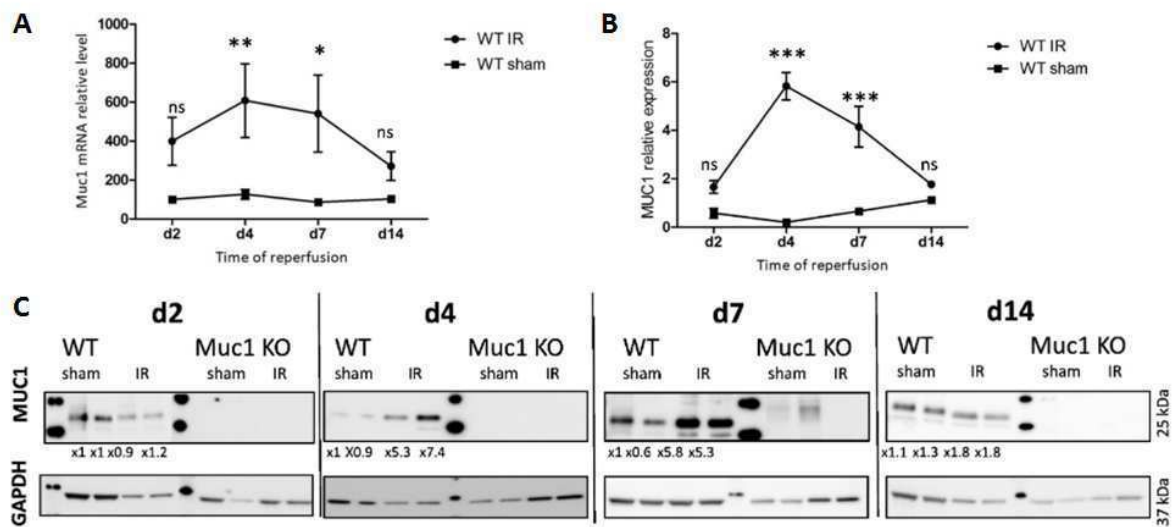
Dans notre laboratoire, un modèle d'IR a été induit par le clampage du pédicule rénal gauche pendant 25 minutes chez des souris âgées de 6 semaines et de fond génétique C57BL6/J, *Muc1*<sup>+/+</sup> ou *Muc1*<sup>-/-</sup>. L'anesthésie a été réalisée par inhalation d'isoflurane. Un contrôle visuel de l'ischémie était réalisé en observant le changement de couleur du rein clampé. Des souris opérées selon les mêmes procédures mais non soumises à l'ischémie constituaient le groupe contrôle (Sham). Les reins étaient récupérés après sacrifice à 2, 4, 7, 14 et 28 jours après la chirurgie.

Nous présenterons brièvement les principaux résultats obtenus sur ce modèle et nécessaires à la compréhension de la suite du manuscrit.

#### **III-1-1 Induction de l'expression de MUC1**

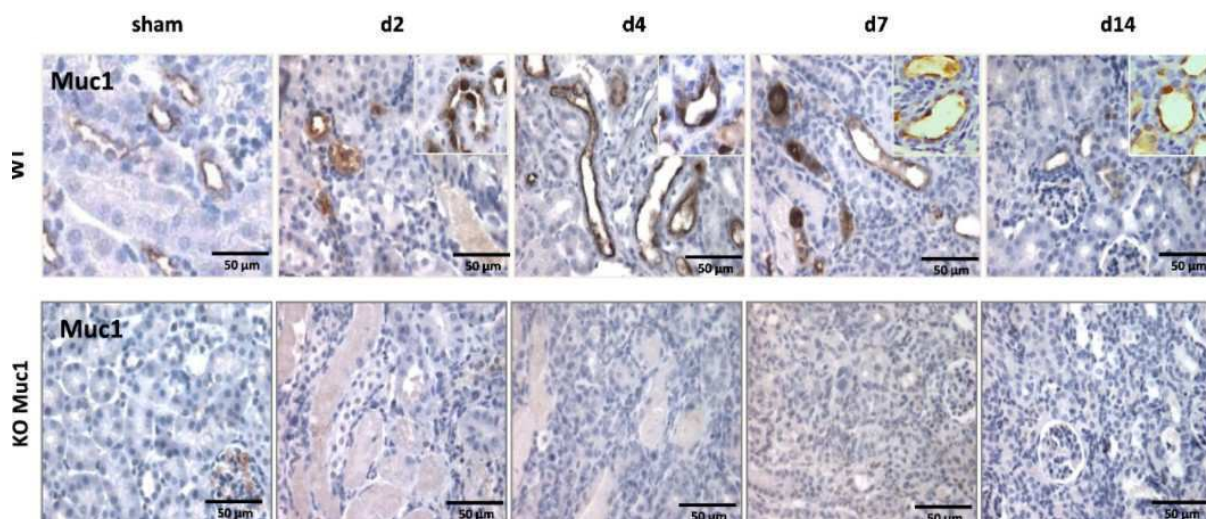
Dans le modèle d'IR, il a été observé une induction de l'expression de *Muc1* dans le parenchyme rénal des souris *Muc1*<sup>+/+</sup> soumises à l'IR comparativement aux souris sham.

Cette induction a été observée à la fois au niveau transcriptionnel par RT-qPCR sur extraits de reins totaux et également au niveau protéique par Western Blot (Fig 12).



**Figure 12 : Induction de l'expression de MUC1 dans le modèle d'ischémie-reperfusion.** (A) : Cinétique de l'expression relative de Muc1 étudiée par RT-qPCR sur reins totaux de souris sacrifiées à 2, 4, 7 et 14 jours après la chirurgie. On observe une induction significative de Muc1 comparativement aux souris Sham 4 et 7 jours après la chirurgie. (B) : Cinétique de l'expression de MUC1 contrôlée par Western Blot sur reins totaux. A l'instar de ce qu'il a été retrouvé par RT-qPCR, on visualise une induction du Muc1 à J4 et J7 après la chirurgie. (C) : Les résultats des Western Blot sont présentés avec les valeurs d'intégration.

Lorsque l'expression de MUC1 a été étudiée par immunohistochimie dans les souris *Muc1+/+*, de manière intéressante, il a été observé que si MUC1 continuait à être exprimée au niveau du pôle apical des tubules distaux et des tubes collecteurs, on observait également une expression de MUC1 au niveau de certaines cellules épithéliales tubulaires dans les tubes en souffrance (Fig 13). Cette observation suggérait une induction de MUC1 au niveau des tubules rénaux proximaux qui sont principalement ciblés par les lésions ischémiques. Au niveau des temps plus tardifs (J14), MUC1 continuait à être exprimée dans certains tubes atrophiques dont il n'était pas possible de déterminer la nature proximale ou distale.



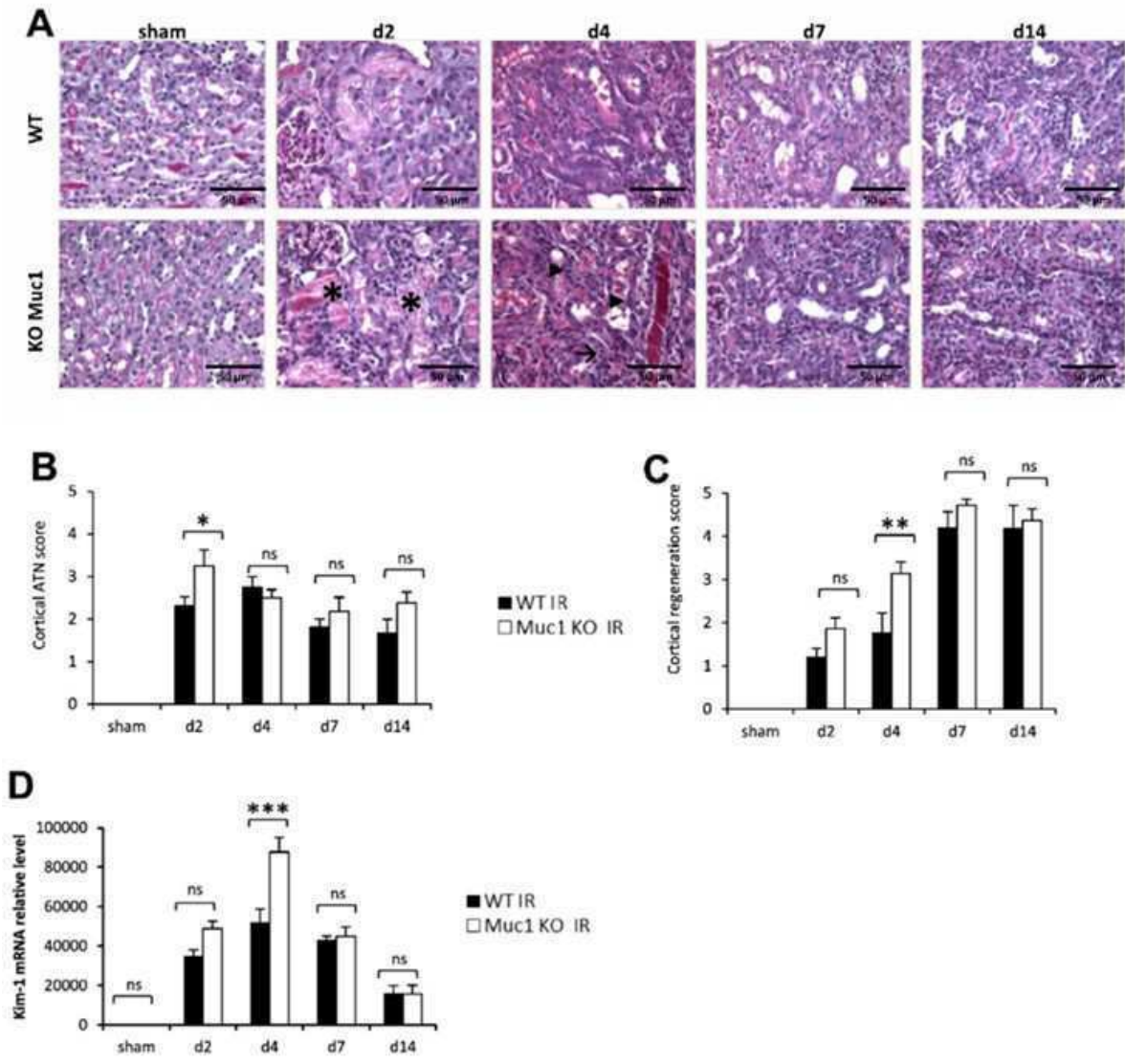
**Figure 13 : Expression de Muc1 par immunohistochimie.** Lors des temps précoces (J2, J4, J7), on observait un marquage de certains tubes présentant des lésions de NTA sévère. Lors des temps plus tardifs, Muc1 continuait à être exprimée au niveau de certains tubes atrophiques.

### III-1-2 Rôle néphroprotecteur de MUC1 au cours des temps précoces post-IR

Pour comparer les lésions des souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> soumises au protocole d'IR, l'analyse histologique des lésions a été conduite, en aveugle, à l'aide de scores semi-quantitatifs de NTA et également de régénération rénale. Dans le cortex rénal, il a été observé que les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> présentent un score de NTA plus sévère comparativement aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup> à J2 et un score de régénération plus important à J4 (Fig 14 A-C).

Afin de compléter ces résultats, une étude par RT-qPCR de l'expression du gène de souffrance rénale KIM-1 a été conduite et a confirmé que les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> présentaient une expression significativement plus élevée de KIM-1 à J4 post-IR comparativement aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 14-D).

Ces résultats suggèrent un rôle néphroprotecteur précoce de MUC1 dans ce modèle d'IR.



**Figure 14 : Rôle néphroprotecteur de Muc1 dans le modèle d'IR.** (A) : Illustration des lésions histologiques dans les reins des souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> à 2, 4, 7 et 14 jours après la chirurgie. On observe des lésions plus sévères de NTA dans le cortex rénal des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> caractérisées notamment par une diminution de la hauteur épithéliale et l'apparition de cylindres intra-tubulaires (B) : Le score de souffrance rénale évaluée en aveugle confirme qu'à J2 post IR les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> présentent des dommages significativement plus importants. (C) : A J4 post IR, les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> ont un score de régénération rénale plus important que les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> en accord avec la plus grande sévérité des lésions observées à J2. (D) : Par RT-qPCR, l'expression relative du marqueur de souffrance KIM-1 est augmentée dans les reins des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> J4 post IR.

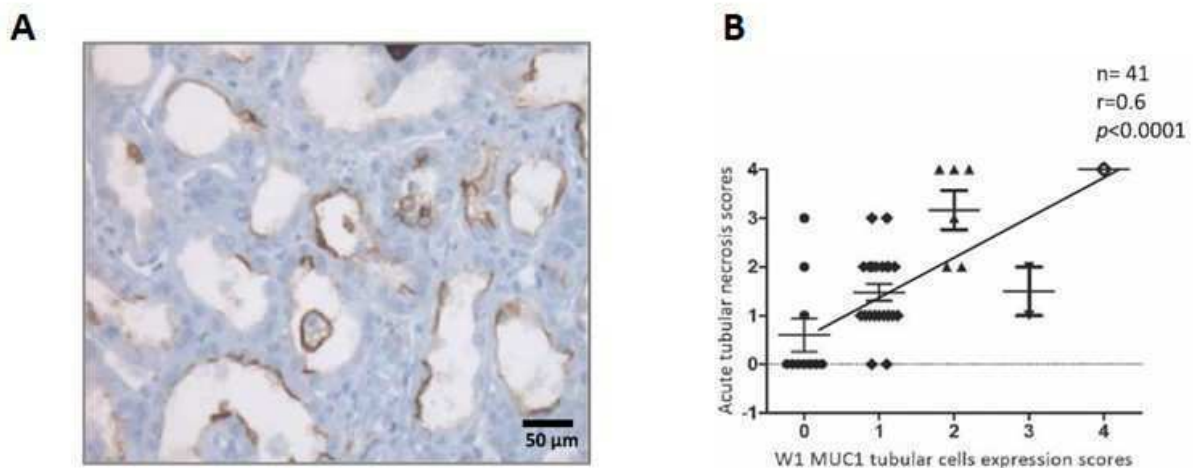
### III-2 MUC1 en régénération rénale humaine

Afin de vérifier la pertinence des résultats obtenus sur le modèle murin d'IR, nous avons eu recours à des biopsies de greffon rénal. En effet, lors des étapes de prélèvement et de transplantation des futurs greffons, ces derniers subissent des lésions de NTA liées à l'ischémie et à la reperfusion. En post-greffe, il se met en place des mécanismes de

régénération rénale. Dans une série de 38 patients ayant bénéficié d'une ponction biopsie du greffon à une semaine post greffe (W1) et protocolaire à trois mois post-greffe (M3), il était donc possible de suivre l'expression de MUC1 à la fois lors des temps précoces et tardifs (à 3 mois le greffon ne présente plus de lésions de NTA et la fonction rénale est normalement revenue à sa base) et son impact pronostique.

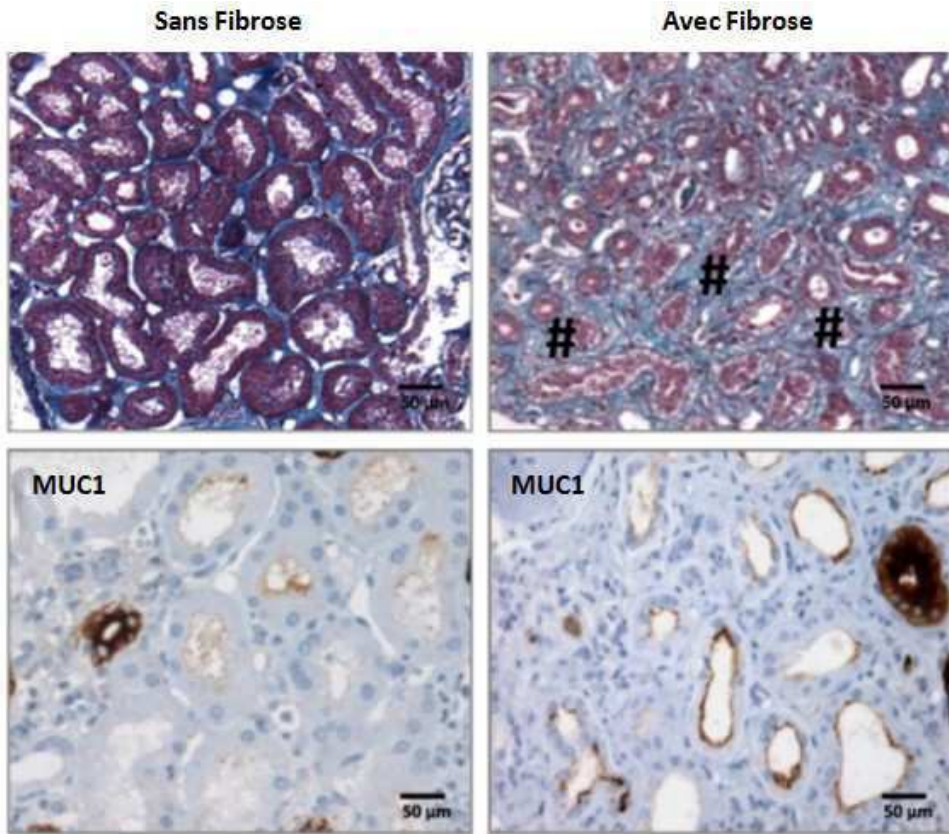
### III-2-1 Expression de MUC1 dans les biopsies de greffons

Sur les biopsies réalisées lors de la première semaine post-transplantation, à l'instar de ce qui a été observé chez la souris, on observait une induction de MUC1 au niveau des tubes en souffrance (Fig 15-A). En scorant la NTA, il a été mis en évidence que le niveau d'expression de MUC1 était corrélé à la sévérité des lésions de NTA (Fig 15-B).



**Figure 15 : Expression de MUC1 dans les ponctions biopsies de greffon réalisées une semaine après transplantation.** Au niveau des tubes en souffrance, on observe une expression de MUC1 en immunohistochimie (A). L'expression tubulaire de MUC1 est corrélée à la sévérité de la NTA au niveau du cortex rénal (B).

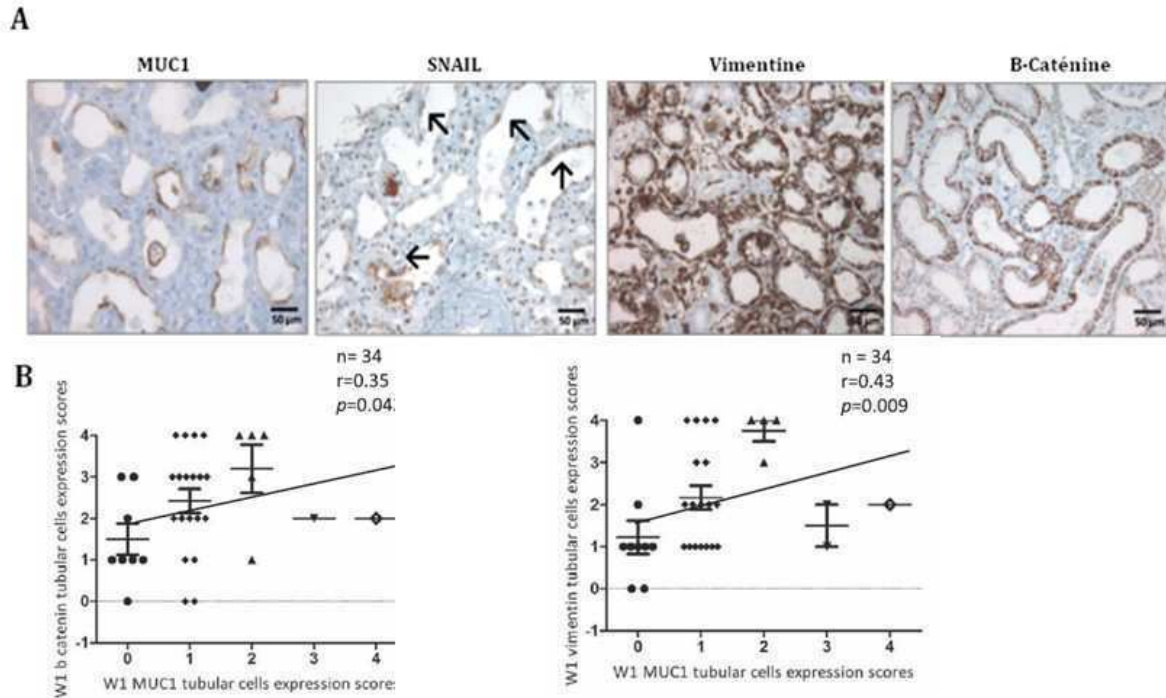
L'étude de l'expression de MUC1 sur les biopsies de greffon à trois mois post-transplantation a permis de montrer que lorsque les patients avaient récupéré sans mise en place de fibrose (quantifiée sur la coloration du Trichrome de Masson qui marque en vert le collagène) ils avaient une expression normale de MUC1 alors que chez les patients qui avaient évolués vers la fibrose, MUC1 continuait à être exprimée au niveau des tubes atrophiques (Fig 16).



**Figure 16 : Expression de MUC1 dans les ponctions biopsies de greffon réalisées à 3 mois post-transplantation.** Dans les biopsies de patients ayant totalement récupérés, on observe une expression physiologique de MUC1 dans les tubes distaux et dans les tubes collecteurs. En revanche, chez les patients ayant évolués vers la fibrose, l'expression de MUC1 était maintenue dans les tubes atrophiques.

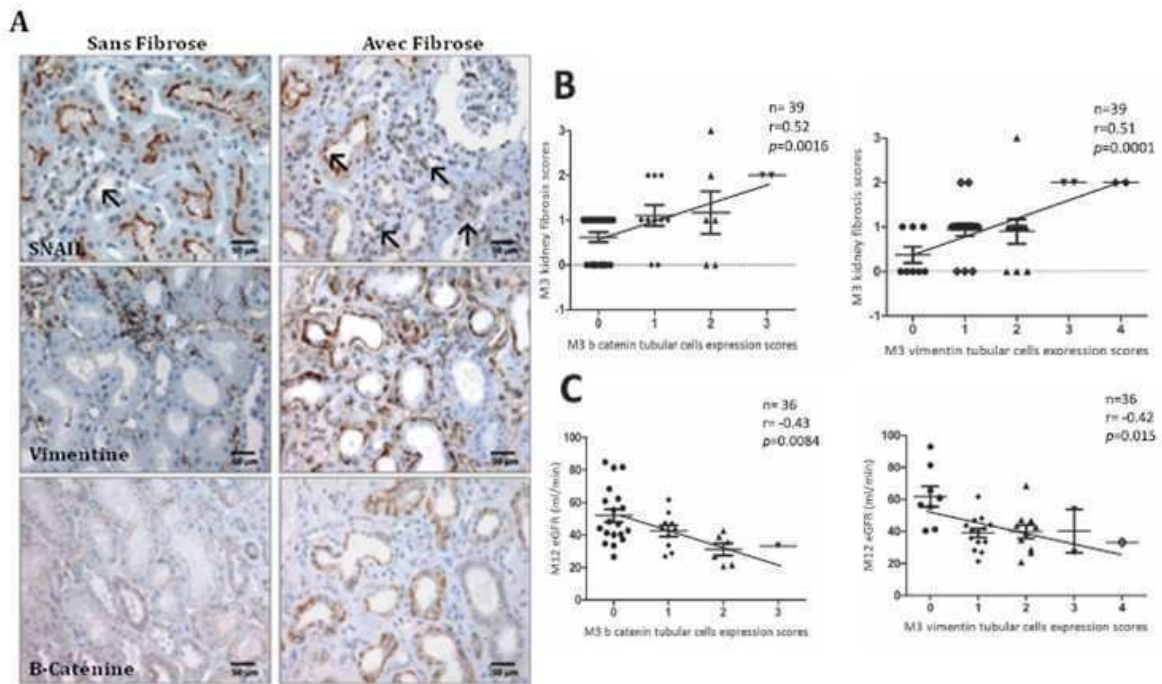
### **III-2-2 Expression de MUC1 associée à une transition épithélio-mésenchymateuse partielle.**

L'étude des marqueurs mésenchymateux sur les biopsies de greffon a permis d'observer que l'induction de MUC1 au niveau des tubes en souffrance était concomitante d'une néoexpression ou d'une surexpression de certains marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, la  $\beta$ -caténine, SNAIL1 (Fig 17-A). La quantification de ces marqueurs a confirmé que leur augmentation était associée à l'importance des lésions de NTA chez les patients et à l'expression tubulaire de MUC1 (Fig 17-B). Ces observations sont en lien avec les données de la littérature indiquant que les cellules dédifférenciées survivantes aux lésions ischémiques subissent un changement phénotypique favorisant une plus grande plasticité épithéliale.



**Figure 17 : Expression des marqueurs mésenchymateux dans les biopsies à 1 semaine.** Dans les tubes en souffrance, on observe une surexpression et une délocalisation des marqueurs mésenchymateux SNAIL, Vimentine et  $\beta$ -caténine (A). L'expression de ces marqueurs était corrélée à celle de MUC1 (B).

Comme ce qu'il avait été observé pour MUC1 sur les biopsies à 3 mois, en l'absence de fibrose, ces marqueurs revenaient à leur expression basale alors qu'ils persistaient au niveau des tubes atrophiques dans les cas avec fibrose (Fig 18-A). La persistance de l'expression de ces marqueurs était corrélée au degré de fibrose rénale (Fig 18-B) et inversement proportionnelle à la fonction rénale mesurée à 1 an post greffe (Fig 18-C).



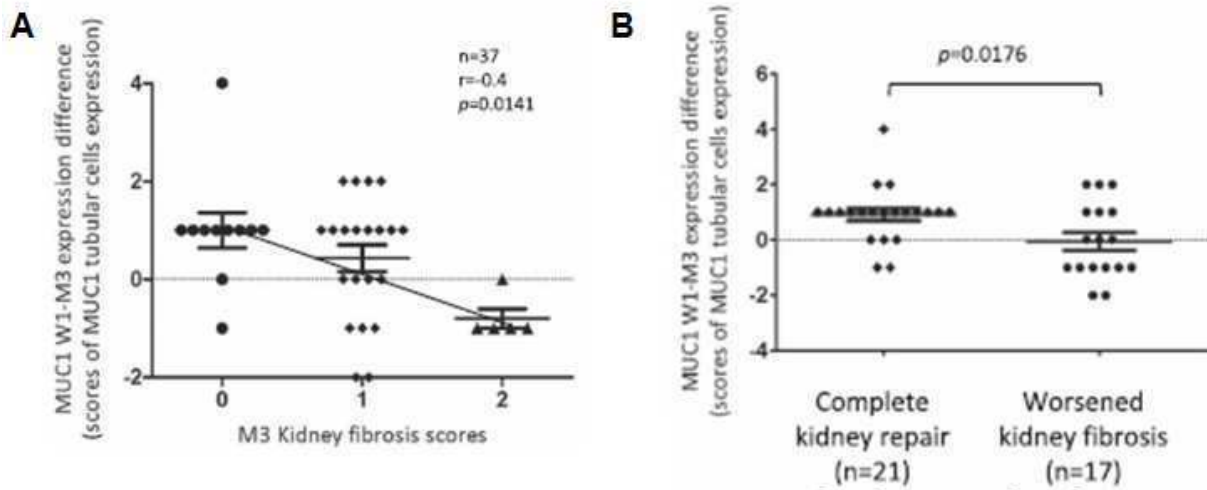
**Figure 18 : Expression des marqueurs mésenchymateux dans les biopsies à M3 post-transplantation.** Dans les biopsies des patients sans fibrose, on observe un retour à l'expression physiologique de SNAIL, Vimentine et  $\beta$ -caténine par immunohistochimie. Au contraire, dans les zones fibreuses, on observe un maintien de l'expression de ces marqueurs (A). L'expression de ces marqueurs était corrélée au degré de fibrose rénale (B) et inversement corrélée à la fonction rénale à M12 (C).

### III-2-3 Impact pronostique de l'expression de MUC1

Afin d'étudier la valeur pronostique de l'expression de MUC1 sur le développement de la fibrose et l'évolution vers l'IRC, un score basé sur le différentiel de l'expression immunohistochimique de MUC1 sur la biopsie à 1 semaine par rapport celui sur la biopsie à M3 a été considéré.

Plus ce score était faible (et donc plus l'expression de MUC1 était maintenue à M3), plus le degré de fibrose observée sur la biopsie à M3 était sévère (Fig 19-A). De plus, lorsque l'on comparait les patients ayant aggravé leur fibrose entre les deux biopsies, on mettait en évidence que les patients avaient un score significativement plus faible que les patients chez qui la fibrose était restée stable (Fig 19-B).





**Figure 19 : Impact pronostique de l'expression de MUC1 dans le développement de la fibrose.** Le différentiel d'expression de MUC1 entre la biopsie à une semaine et à 3 mois est corrélée à la sévérité de la fibrose à M3 (A). Les patients qui ont aggravés leur score de fibrose entre la biopsie réalisée à une semaine et la biopsie à 3 mois avaient un différentiel d'expression de MUC1 entre les deux biopsies plus faible que ceux ayant conservé un grade de fibrose stable.

## **PARTIE III**

### **I- Reins et sepsis**

#### **I-1 Définition : Sepsis, infection, réponse inflammatoire**

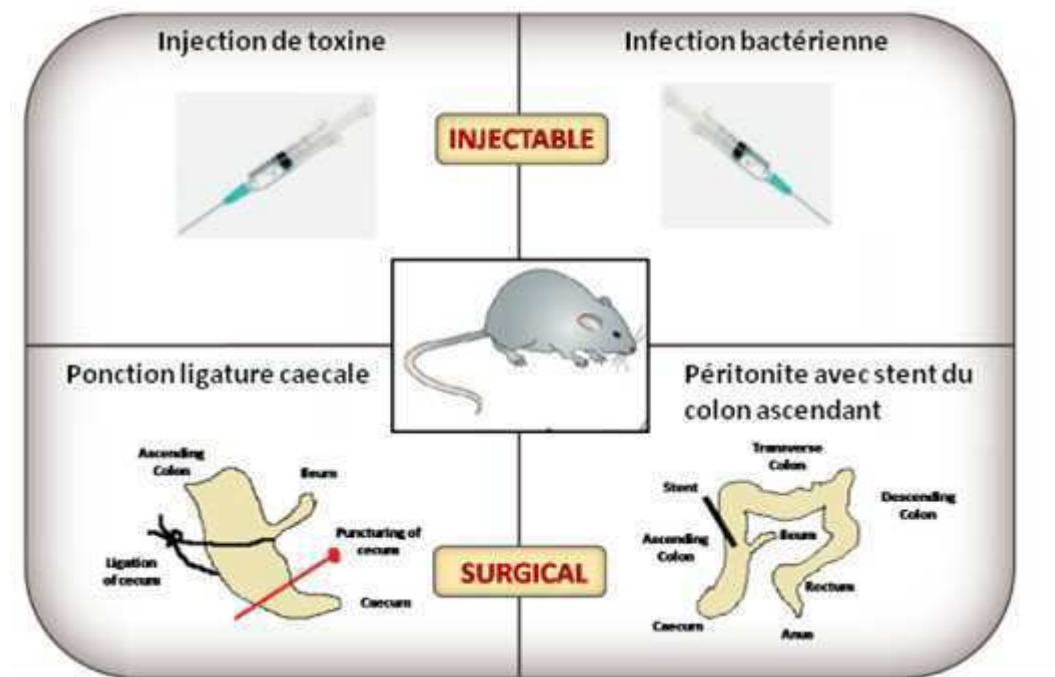
Le sepsis est défini par la présence d'une infection et d'une réponse inflammatoire excessive (Levy *et al.*, 2003). L'infection se définit comme un processus pathologique provoqué par l'invasion d'agents pathogènes ou potentiellement pathogènes au sein de l'organisme. Dans la majorité des cas, l'infection microbienne est secondaire à une bactérie Gram négatif. Parmi celles-ci, *Escherichia coli* est l'agent pathogène le plus courant à l'origine d'une septicémie (Bochud *et al.*, 2001), c'est pourquoi c'est également le modèle expérimental le plus utilisé. La définition d'une réponse inflammatoire systémique repose sur une association de certains signes cliniques (hyper/ hypothermie, tachycardie, hypotension, hyperventilation) avec des marqueurs biologiques traduisant une inflammation systémique (hyperleucocytose) ou une dysfonction d'organe (augmentation de la créatininémie, diminution de la diurèse). On distingue plusieurs niveaux de gravité dans le sepsis, ainsi on parle de sepsis sévère en cas de dysfonction d'au moins un organe associée à une hypotension artérielle et de choc septique en cas de dysfonction d'au moins un organe associée une hypotension artérielle persistante en dépit d'une expansion volémique adaptée (Singer *et al.*, 2016). Ces définitions sont utilisées en pratique clinique depuis plus de 25 ans.

#### **I-2 IRA secondaire au sepsis**

Il existe un lien fort entre sepsis et IRA. Ainsi, une septicémie est associée à près de 50% des cas d'IRA et jusqu'à 60% des patients atteints de septicémie ont une IRA (Uchino *et al.*, 2005, Bagshaw *et al.*, 2009). La fréquence de l'IRA secondaire au sepsis est en augmentation et s'accompagne d'une hausse de la morbidité et de la mortalité chez les patients hospitalisés (Martin *et al.*, 2003). Toutefois la mortalité chez les patients les plus graves semble diminuer ces dernières années (Wald *et al.*, 2015) probablement à cause d'une introduction de la dialyse plus précoce. La majorité des IRA en services de soins intensifs surviennent dans le cadre d'un syndrome de défaillances multi-viscérales dans des situations où la physiopathologie est complexe et les causes entremêlées. Pour autant, le sepsis est reconnu comme étant le facteur prédisposant le plus fréquemment associé à la survenue d'une IRA (Parmar *et al.*, 2009). Inversement, la survenue d'une IRA au cours du sepsis est un facteur de risque indépendant associé à la fois à une augmentation de la mortalité et de la morbidité (Bagshaw *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2007; Hoste *et al.*, 2006; Joannidis et Metnitz, 2005).

### I-3 Modèles animaux de sepsis

Il existe plusieurs modèles animaux de sepsis que nous présenterons avec leurs avantages et leurs inconvénients (Fig 20). Il est important de rappeler à ce stade que si les modèles animaux présentent des réponses histologiques et hémodynamiques parfois semblables à la pathologie humaine, il existe également d'importantes différences. Par exemple, certains Toll like récepteurs (TLRs) qui jouent un rôle crucial dans ces modèles sont exprimés différemment chez l'homme et l'animal (Stribos *et al.*, 2014). Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le modèle d'injection intra-péritonéale de lipopolysaccharide (LPS) chez la souris



**Figure 20 : Présentation des modèles de sepsis les plus couramment utilisés en expérimentation animale** (Figure adaptée de l'article Laboratory Animal Models to Mimic Human Sepsis: A Review par Verma *et al.*, 2016). On distingue les modèles « injectables » par instillation directe d'éléments bactériens ou de toxine bactérienne (comme le LPS) des modèles chirurgicaux qui reproduisent une péritonite par perforation caecale.

#### I-3-1 Injection de toxine bactérienne

Dans ce modèle expérimental, le LPS ou endotoxine est la toxine la plus fréquemment utilisée. Il s'agit de macromolécules contenues dans la paroi des bactéries Gram négatif et en particulier de *Escherichia coli*. Ce modèle de sepsis repose sur le principe que c'est la réponse de l'organisme au pathogène et non le pathogène en lui-même qui est délétère au cours du sepsis. Il est utilisé depuis très longtemps à des doses et avec des voies d'injection variées, l'injection intra-péritonéale étant la plus couramment observée. En pratique, il induit

une production très forte de cytokines pro-inflammatoires secondaire à la liaison du LPS à son récepteur spécifique : le TLR4 (Michie *et al.*, 1988). L'administration d'endotoxine entraîne le développement d'une IRA avec une réduction de la diurèse et l'augmentation de l'urée sanguine et de la créatinine (Cunningham *et al.*, 2004; Doi *et al.*, 2009). Des réponses similaires peuvent être obtenues en injectant des ligands du TLR9 (CpG DnA) ou du TLR2 (lipoprotéines bactériennes) à la place du LPS (Hemmi *et al.*, 2000, Plitas *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2004). C'est pourquoi, il est important d'utiliser du LPS pure ou ultrapure car les produits de pureté moindre peuvent contenir d'autres molécules telles que de l'ARN ou de l'ADN qui peuvent moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Vallance *et al.*, 2019). Ce modèle présente l'avantage d'être simple à mettre en place et à reproduire. Il est transposable à l'homme et des cas d'injection de LPS chez des patients sains ont montré qu'il induisait une réponse systémique chez l'homme qui partage de nombreuses caractéristiques avec le sepsis sévère (Lowry *et al.*, 2005, Andreasen *et al.*, 2008). Toutefois il présente un certain nombre de différences avec l'humain : 1) A forte dose, le LPS induit un état d'hypotension et d'hypothermie sévère non observé chez l'homme (Remick *et al.*, 2005) ; 2) Il induit une libération systémique de cytokines pro-inflammatoires plus importante que chez l'homme et sur une période plus brève (Rittirsch *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2014) ; 3) Il nécessite des doses beaucoup plus importantes chez l'animal et notamment la souris comparativement à l'homme (Flink *et al.*, 2014). A cause de ces différences, la traduction thérapeutique chez l'homme des essais réalisés chez les animaux est mauvaise (Deitch *et al.*, 1998). Par exemple, l'inhibition du TNF- $\alpha$  qui est très efficace dans les modèles murins n'a pas eu de traduction clinique chez l'homme (Rittirsch *et al.*, 2007). Malgré toutes ces limites, cela reste un modèle largement utilisé car il permet d'étudier facilement les phases initiales de l'inflammation dans le sepsis.

### **I-3-2 Instillation de bactéries**

Une injection bactérienne, par voie intra-péritonéale ou intra-veineuse, est parfois employée pour produire une septicémie chez l'animal. Il peut s'agir soit d'une injection polymicrobienne ou d'une espèce bactérienne précise. *Escherichia coli* est couramment utilisée pour reproduire la septicémie à Gram négatif et le *Staphylococcus* ou le *Pseudomonas* pour les Gram positif. De grands inoculums sont nécessaires en raison de l'incapacité de la plupart de ces souches à se répliquer *in vivo* après injection (Deitch *et al.*, 1998). Comme les agents pathogènes sont rapidement éliminés par le système du complément, c'est finalement un modèle très proche de l'injection de toxine préalablement décrit. Il peut avoir un intérêt lorsque la voie d'inoculation est différente pour mimer une septicémie à point de départ local.

C'est par exemple le cas pour les modèles de pneumonie qui évoluent sur le plan systémique en sepsis (Moore *et al.*, 2002).

### I-3-3 Modèles de péritonite

Deux modèles chirurgicaux de péritonite sont fréquemment utilisés dans la littérature : la ponction ligature caecale et le modèle de péritonite par perforation et pose de stent au niveau du colon ascendant (Fig 20). La méthode de ponction ligature caecale consiste dans la réalisation d'une laparotomie sous anesthésie générale suivie d'une ligature d'une partie du caecum avec la création d'une ou plusieurs points de ponction à l'aiguille (Baker *et al.*, 1983). Dans le modèle de péritonite avec pose de stent au niveau du colon ascendant, l'animal subit une anesthésie générale et une laparotomie médiane, suivie de l'insertion d'un stent en plastique dans le côlon ascendant à 1 cm en distal de la jonction iléo-caecale (Zantl *et al.*, 1998). Dans les deux cas, il y a fuite de matière fécale dans le péritoine, toutefois cette fuite est naturellement comblée par accolement d'une anse digestive dans la technique de ponction ligature caecale alors qu'elle se maintient plus longtemps dans la technique de pose de stent. La technique de ponction ligature caecale reproduit l'équivalent d'une rupture d'appendicite chez l'homme (Wichterman *et al.*, 1980). Ces deux méthodes ont une physiopathologie proche. Elles présentent l'avantage de reproduire une source d'infection polymicrobienne par la flore digestive et d'avoir un stimulus inflammatoire maintenu dans le temps par l'intermédiaire des tissus nécrosés (Wichterman *et al.*, 1980). En cela, ces techniques sont plus proches du sepsis humain. Les deux techniques provoquent une IRA qui s'aggrave dans le temps. Comme elles peuvent être réalisées relativement facilement, elles sont devenues très fréquentes en expérimentation animale. La principale limite du modèle de ponction ligature caecale est liée au fait que dans les premiers temps suivant le geste opératoire, le développement d'un choc septique est conditionné par la formation ou non d'un abcès au niveau du point de ponction (Maier *et al.*, 2004). De ce fait, il peut y avoir confusion entre les effets observés d'une protéine ou d'une thérapeutique sur son rôle dans la formation de l'abcès plutôt que dans la résolution du sepsis. Enfin que ce soit pour le modèle de ponction ligature caecale ou de la pose de stent dans le colon, ces modèles souffrent d'une mauvaise reproductibilité entre les différentes équipes. Cette variabilité est principalement liée à l'expérience de l'opérateur, au choix de la méthode chirurgicale et aux matériaux utilisés (Singleton *et al.*, 2003).

#### I-4 Lésions histologiques au cours de l'IRA septique

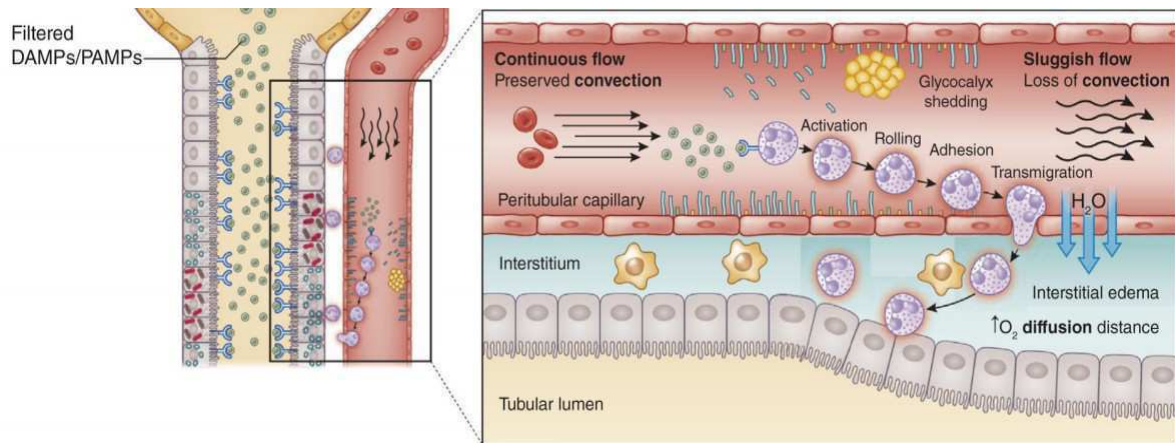
Dans les modèles animaux, indépendamment du modèle expérimental utilisé, il existe une dissociation entre l'importance de la dysfonction rénale et les lésions histologiques tubulaires qui sont focales et d'intensité légère. Dans une revue des lésions histologiques retrouvées dans les IRA septiques, seul 17,4% des animaux présentaient des lésions de NTA d'intensité modérée ou sévère et des lésions tubulaires plus légères à type de gonflement ou vacuolisation des cellules épithéliales tubulaires étaient retrouvées dans 40% des cas (Kosaka *et al.*, 2016). Le modèle murin d'injection intra-péritonéal de LPS induit des lésions histologiques tubulaires légères qui se constituent entre la 24 et 48h après l'injection (Cunningham *et al.*, 2004). Il est à noter que dans les études rapportant des formes sévères de NTA, le modèle expérimental de sepsis utilisé était associé à une hypoperfusion rénale profonde et ces lésions sont donc probablement plutôt le reflet d'un mécanisme lésionnel ischémique (Garofalo *et al.*, 2019). Au niveau glomérulaire, les modifications sont aussi très légères et se résument essentiellement à une congestion des capillaires glomérulaires. Chez l'homme, des données similaires ont été retrouvées. Ainsi l'équipe de Takasu *et coll.* a montré que des lésions tubulaires légères et focales étaient présentes chez environ 78% des patients (Takasu *et al.*, 2013). Ces données doivent toutefois être interprétées au regard de grande hétérogénéité dans la littérature avec une prévalence de la NTA au cours du sepsis qui varie entre 7 et 100% (Mustonen *et al.*, 1984, Lerolle *et al.*, 2010, Hotchkiss *et al.*, 1999, Diaz de Leon *et al.*, 2006). Cette variabilité en pathologie humaine traduit probablement l'évolution des définitions de l'IRA septique et l'hétérogénéité des critères d'évaluation de la NTA.

En lien avec la relative pauvreté des altérations morphologiques au niveau des cellules épithéliales tubulaires, le rôle de l'apoptose est débattu au cours du sepsis. Certains auteurs rapportent une augmentation de l'apoptose après injection de LPS dans des modèles murins (Takasu *et al.*, 2013, Cunningham *et al.*, 2004) qui n'est pas retrouvée dans d'autres modèles de sepsis (Dear *et al.*, 2006, Langenberg *et al.*, 2014). Chez l'humain, si le débat n'est pas tranché, les auteurs s'accordent toutefois à dire que la mort des cellules épithéliales par nécrose ou par apoptose n'est pas le mécanisme dominant de la dysfonction tubulaire dans l'IRA secondaire au sepsis (Peerapornratana *et al.*, 2019).

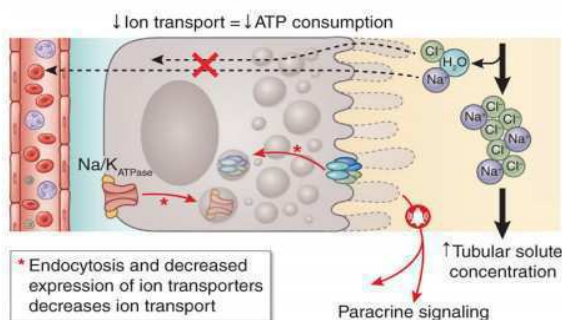
## I-5 Physiopathologie de l'IRA septique

### Introduction

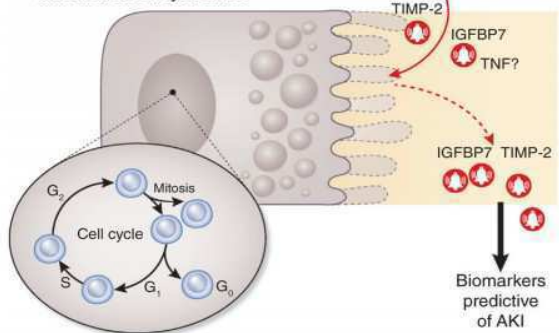
La physiopathologie de l'insuffisance rénale secondaire au sepsis est particulièrement complexe et imparfaitement comprise ce qui explique en partie l'absence d'évolution des modalités thérapeutiques qui reposent depuis des années sur la dialyse, les diurétiques et les solutés de remplissage (Wald *et al.*, 2015). Malgré cela, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension de cette maladie. Pendant longtemps, l'IRA secondaire au sepsis a été considérée comme la conséquence d'une ischémie secondaire à une hypoperfusion rénale. L'atteinte lésionnelle endothéliale entraîne une chute des résistances vasculaires systémiques et donc un état d'hypotension globale et une mauvaise perfusion rénale. Depuis, plusieurs études ont montré que ce modèle était imparfait car il existe des cas d'IRA secondaire au sepsis en l'absence d'hypoperfusion (Langenberg *et al.*, 2002; Prowle *et al.*, 2009; Murugan *et al.*, 2011) suggérant que des mécanismes alternatifs sont impliqués. Trois d'entre eux sont maintenant bien décrits chez l'homme et chez l'animal et vont être discutés plus en détail : l'atteinte de la microcirculation, les désordres du métabolisme énergétique et l'inflammation.



① Reprioritization of energy consumption  
Decreased ATP consumption for nonvital functions

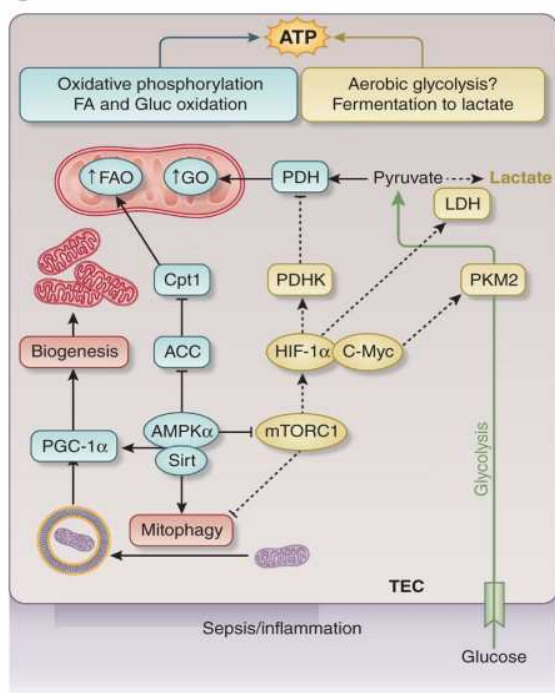


Induction of cell cycle arrest



② Reprogramming of metabolism

③ Restoration of the mitochondrial pool



**Figure 21 : Physiopathologie de l'IRA septique** (Reproduite et adaptée à partir de l'article « Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment » de Peerapornratana *et al.*, 2019). Au cours du sepsis, les dommages des cellules endothéliales et du glycocalyx au niveau des capillaires péri-tubulaires conduit à un état procoagulant et au recrutement de cellules inflammatoires aboutissant à des obstructions focales et à des alterations de la microcirculation. L'atteinte de la microcirculation est renforcée par la mise en place d'un œdème interstitiel qui accentue la privation en O<sub>2</sub> des cellules épithéliales tubulaires. Par ailleurs, au niveau des cellules épithéliales tubulaires, on observe des modifications majeures du métabolisme cellulaire afin de rediriger les dépenses énergétiques en faveur de la survie (diminution de l'expression des transporteurs ioniques au niveau de la membrane). Le passage à une glycolyse aérobie est une autre modification drastique du fonctionnement des cellules épithéliales rénales au cours du sepsis avec des conséquences directes sur la fonction rénale. Ce switch vers la glycolyse aérobie reflète les altérations des mécanismes de préservation du capital mitochondrial (mitophagie et biogenèse) qui sont indispensables à la phosphorylation oxydative.



### I-5-1 Atteinte de la microcirculation

La septicémie provoque des altérations profondes de la microcirculation dans le cortex ou la médullaire rénale qui sont caractérisées par une diminution de la résistance vasculaire périphérique et une mauvaise distribution du flux sanguin (De backer *et al.*, 2002, Spronk *et al.*, 2002). L'IRA induite par le sepsis est caractérisée par une diminution de nombre de capillaires présentant un flux sanguin de débit suffisant et continu (Fig 21) (Post *et al.*, 2017, Martensson *et al.*, 2015). Cette perturbation de la microcirculation joue un rôle clé dans la défaillance rénale, coupant l'acheminement de l'oxygène et des nutriments aux tissus (Seely *et al.*, 2010, Tiwary *et al.*, 2005). Cette atteinte est indépendante de l'hypoperfusion rénale (liée à la macrocirculation) qui est fréquente mais pas systématiquement observée (Prowle *et al.*, 2009). Cela pourrait expliquer pourquoi lors des études autopsiques, seules des lésions de NTA de distribution hétérogène et de faible intensité sont retrouvées et non des lésions sévères et diffuses comme c'est le cas dans les modèles animaux induisant une ischémie (Sato *et al.*, 1978). La physiopathologie de l'atteinte de la microcirculation au cours du sepsis fait intervenir de nombreux mécanismes dont la dysfonction des cellules endothéliales, les lésions du glycocalyx, le recrutement des leucocytes, l'activation de la coagulation (Gomez *et al.*, 2016) (Fig 21). Nous reviendrons sur deux de ces mécanismes qui ont été bien caractérisés :

- **La dysfonction des cellules endothéliales** : Les cellules endothéliales, qui bordent la lumière des vaisseaux, sont des déterminants importants du maintien du tonus vasculaire, de la perfusion microcirculatoire et du recrutement des leucocytes (Sprague *et al.*, 2009). En condition physiologique, l'endothélium contrôle le tonus artériel pour maintenir la perfusion tissulaire et assurer les besoins énergétiques des cellules. En cas de lésions, les cellules endothéliales perdent leur capacité à répondre aux vasodilatateurs, en particulier au monoxyde d'azote (NO), ce qui entraîne une moins bonne redistribution du flux sanguin localement. De plus, les lésions endothéliales induisent une perméabilité vasculaire accrue à l'origine de la constitution d'un œdème interstitiel. Cet œdème va contribuer à accroître l'hypoxie locale (Hollenberg *et al.*, 2004) (Fig 21). Par ailleurs, l'activation des cellules endothéliales par les cytokines pro-inflammatoires conduit à un état pro-coagulant et à un recrutement accru de cellules inflammatoires *via* la surexpression des molécules d'adhésion ELAM-1 et ICAM-1 (Powell *et al.*, 2014) (Fig 21). La déformabilité des globules rouges est également modifiée par l'inflammation ce qui conduit à une plus grande viscosité locale (Fig 21). L'association de tous ces phénomènes conduit à la formation de zones très localisées d'obstruction du flux circulatoire et donc à la création de zones focales d'ischémie tissulaire.

- **Une dérégulation de la production de NO** : Le NO est le produit métabolique de la L-arginine pouvant être produit par trois isoformes majeures de l'enzyme NO synthase (NOS) qui existe sous 3 formes exprimées par différents types cellulaires: la forme neuronale (nNOS), la forme induite (iNOS), et la forme endothéliale (eNOS) (Förstermann *et al.*, 2012). Dans le rein, eNOS est exprimé de manière constitutive dans les cellules endothéliales et joue un rôle central dans la relaxation vasculaire, l'inhibition de l'adhésion des leucocytes et l'agrégation plaquettaire. L'enzyme iNOS est exprimée dans la plupart des cellules épithéliales tubulaires mais ne participe pas ou très peu à la synthèse de NO en condition physiologique (Mount *et al.*, 2006). Au cours du sepsis, il a été décrit une augmentation globale de la production de NO par les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  qui régulent à la hausse l'expression d'iNOS (Cunha *et al.*, 1994). L'augmentation d'iNOS provoque une auto-inhibition d'eNOS au niveau des cellules endothéliales ce qui provoque une altération de la capacité vasodilatatrice et un risque accru de shunt et d'hypoxie malgré un excès global de NO (Chauhan *et al.*, 2003). Par ailleurs, une concentration élevée en NO est aussi délétère en raison de l'interaction entre le NO et les ROS. Cette interaction favorise notamment la formation de peroxy-nitrite qui a un effet cytotoxique sur les cellules endothéliales *via* une inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'induction de dommages à l'ADN (Seija *et al.*, 2012). L'inhibition sélective d'iNOS a d'ailleurs montré des effets néphroprotecteurs dans des modèles animaux (Tiwari *et al.*, 2005).

### I-5-2 Désordres du métabolisme énergétique

La relative pauvreté de l'apoptose au cours de l'IRA induite par le sepsis a fait suspecter l'existence d'une réponse adaptative spécifique où la survie cellulaire est priorisée par rapport à la fonction. Un des exemples de cette réponse adaptative est la capacité des cellules épithéliales tubulaires à diminuer, dans les heures suivant une injection de LPS, l'expression des transporteurs d'ions à la membrane (Schmidt *et al.*, 2007) alors que ces transporteurs représentent près de 70% de la consommation d'ATP en condition physiologique (Mandel *et al.*, 1981) (Fig 21).

Un des mécanismes lésionnels qui apparaît déterminant dans l'IRA septique est l'activation anormale de la glycolyse aérobie, appelée aussi effet Warburg, par rapport à la phosphorylation oxydative (Gomez *et al.*, 2017) (Fig 21). L'activation de la glycolyse aérobie aboutit à la conversion du pyruvate cytoplasmique en lactate et à une réorganisation du métabolisme énergétique des cellules dont les conséquences sont délétères au cours du

sepsis. Ainsi, l'inhibition de la glycolyse aérobie au profit d'une l'induction de phosphorylation oxydative au niveau des monocytes (Yang *et al.*, 2014) ou des cellules épithéliales tubulaires (Waltz *et al.*, 2016) permet d'améliorer la survie et prévient le développement de l'atteinte rénale. Les raisons exactes de cette reprogrammation du métabolisme énergétique ne sont pas parfaitement comprises mais il semble que les mitochondries occupent une place centrale. En effet, le sepsis génère des lésions mitochondriales qui découlent notamment de la génération de ROS (Arulkumaran *et al.*, 2016). Or les mitochondries sont indispensables pour que les cellules puissent reposer sur la phosphorylation oxydative pour générer leur ATP. En condition pathologique, deux mécanismes principaux permettent normalement aux cellules de sauvegarder leur pool de mitochondries : la mitophagie qui est le processus par lequel les mitochondries endommagées sont éliminées par autophagie et la biogenèse par lequel de nouvelles mitochondries saines sont générées. Au cours du sepsis, des signes de mitophagie apparaissent très précocement (Hsiao *et al.*, 2012) et il a été montré qu'une stimulation de la mitophagie avait des effets protecteurs sur la fonction rénale (Gunst *et al.*, 2013) alors qu'une activation insuffisante est un signe de mauvais pronostic (Hsiao *et al.*, 2012). De même, l'équipe de MacGarvey *et coll.* ont montré qu'une augmentation de la biogenèse au cours du sepsis avait des effets bénéfiques (MacGarvey *et al.*, 2012) (Fig 21).

La régulation du cycle cellulaire est un autre mécanisme d'épargne énergétique utilisé par les cellules épithéliales tubulaires (Fig 21). En cas de réserves énergétiques insuffisantes, les cellules entrent dans une phase d'arrêt du cycle cellulaire. Pendant les phases précoces, ce processus permet de limiter les dépenses énergétiques liées à la réplication et à la duplication de l'ADN et a donc un rôle protecteur. En revanche s'il est maintenu trop longtemps, cela limite les capacités de régénération des épithéliums tubulaires (Kellum *et al.*, 2016). Chez l'homme, il a été mis en évidence que l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-2 (TIMP-2) et la protéine de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline 7 (IGFBP7) étaient les deux marqueurs les plus prédictifs du diagnostic précoce de l'IRA au cours du sepsis (Cuartero *et al.*, 2017). Ces deux protéines sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire soulignant l'importance de ce mécanisme dans l'apparition des lésions rénales (Fig 21).

### **I-5-3 Inflammation**

Par définition, le sepsis correspond à une réaction inflammatoire incontrôlée et excessive. En effet, si la réponse inflammatoire initiale est indispensable pour assurer la défense de l'organisme face à un agent pathogène, elle peut s'avérer délétère si elle est trop amplifiée et maintenue dans le temps (Angus *et al.*, 2013). Il existe ainsi une forte association entre les taux de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6, et le développement de l'IRA induite

par la septicémie (Payen *et al.*, 2012, Murugan *et al.*, 2010). Les cytokines pro-inflammatoires pourraient avoir un effet direct toxique sur les cellules épithéliales tubulaires (Dellepiane *et al.*, 2016). En effet, les cellules épithéliales tubulaires rénales expriment les TLR 2 et 4 à leur membrane (Kruger *et al.*, 2009) et l'exposition à des Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) génèrent un stress oxydatif (Kalakeche *et al.*, 2011), des altérations mitochondriales et la libération de ROS (Hotchkiss *et al.*, 2003).

Dans la réponse au sepsis, les cellules de l'immunité innée sont en première ligne parce qu'elles portent une série de récepteurs qui permettent la reconnaissance des agents pathogènes, les PRR (Pattern Recognition Receptors) (Akira *et al.*, 2006). Ces récepteurs, reconnaissent des motifs appelés PAMP à la surface des micro-organismes et absents des cellules de l'hôte. Les PRR sécrétés se lient aux agents pathogènes et favorisent leur opsonisation par les cellules phagocytaires (exemple : le système du complément, les molécules de la famille des pentraxines dont la CRP est la plus connue) (Garlanda *et al.*, 2005). Les PRR membranaires permettent l'internalisation des micro-organismes ou l'activation de cytokines pro-inflammatoires après reconnaissance des pathogènes à la membrane. Dans cette famille, on distingue les TLRs (Takeda *et al.*, 2003), les récepteurs Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD) (Girardin *et al.*, 2003) et les RIG-I-Like RNA Helicase (RLR) (Yoneyama *et al.*, 2005) et les lectines de type C. Les mêmes récepteurs peuvent également détecter des molécules endogènes libérées par des cellules blessées, les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP) tels que l'ADN, l'ARN, les histones, les protéines HMGPB1 et S100 (Chan *et al.*, 2012).

A la suite de l'engagement de ces récepteurs au niveau des cellules dendritiques et des macrophages, la libération des cytokines pro-inflammatoires entraîne une activation des cellules endothéliales dans le rein. Ces dernières surexpriment alors des molécules d'adhésion comme ELAM-1 et ICAM-1 qui vont favoriser le recrutement de leucocytes et en particulier des polynucléaires neutrophiles (Cunningham *et al.*, 2004). Les neutrophiles libèrent localement des ROS ainsi que des enzymes protéolytiques (protéases, élastases et myéloperoxidases) qui vont avoir un effet toxique à la fois sur les cellules épithéliales tubulaires et sur les cellules endothéliales (Brown *et al.*, 2006). Ces lésions favorisent les anomalies de la microcirculation, augmentent le recrutement local de cellules inflammatoires et libèrent des DAMP qui vont amplifier la production de cytokines pro-inflammatoires. S'instaure alors un véritable cercle vicieux amplifiant la réponse inflammatoire.

Après activation des macrophages et cellules dendritiques résiduels, il y a un recrutement de macrophages à partir de monocytes circulants (Aslan *et al.*, 2018). On distingue

classiquement les macrophages pro-inflammatoires ou M1 des macrophages M2 qui jouent un rôle plutôt anti-inflammatoire. Le rôle des différents types de macrophages au cours de l'IRA septique a été peu étudié. Dans des modèles de ponction ligature caecale, il a été montré que l'infiltration de macrophages M1 a lieu dans les 24 premières heures suivant la chirurgie et précède celle de macrophages M2, à l'instar de ce qui est observé dans d'autres modèles d'IRA (Xing *et al.*, 2017 ; Xing *et al.*, 2018). L'origine des macrophages M2 est double résultant à la fois du recrutement et de la différenciation de monocytes circulants mais aussi de la transition des macrophages M1 vers un phénotype M2 (Baek 2019). En se basant sur ce qui a été décrit dans les modèles d'IRA ischémique, il est souvent admis que le recrutement de macrophages M1 au cours du sepsis favoriserait la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la libération locale de ROS et jouerait donc un rôle délétère. Au contraire, les macrophages M2 seraient plutôt bénéfiques dans les phases de réparation *via* la sécrétion de cytokines d'IL-10, l'activation de la prolifération des cellules épithéliales tubulaires et le remodelage de la matrice-extracellulaire (Baek, 2019). En faveur de cette hypothèse, l'équipe de Xing *et al.* a montré qu'une déplétion de macrophages M2 par l'injection de clodronate liposomale dans les 72h après une chirurgie de ponction ligature caecale avait un effet délétère sur la fonction rénale (Xing *et al.*, 2017). Très récemment, il a également été montré que l'injection de colony stimulating factor 2 (CSF2) permettait de favoriser *in vivo* la transition du phénotype M1 vers M2 ce qui s'accompagnait d'une meilleure réponse rénale au sepsis (Li *et al.*, 2020).

Enfin, les lymphocytes semblent aussi jouer un rôle dans l'IRA septique. Après injection de LPS, il a été montré que l'absence de CD28, nécessaire à la coactivation des lymphocytes T, protégeait la fonction rénale et inhibait le recrutement de polynucléaires neutrophiles. L'effet protecteur était perdu en cas d'injection de lymphocytes T CD3+ avant l'injection de LPS (Singbartl *et al.*, 2015). Le LPS est capable d'activer les lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* (Tough *et al.*, 1997) et son effet délétère au cours de l'IRA septique pourrait être médié par une voie dépendante de l'IL18 récepteur sur les lymphocytes T CD4+ (Nozaki *et al.*, 2017). Si les lymphocytes B réagissent à la stimulation au LPS *via* TLR4 *in vitro* (Hebeis *et al.*, 2005), leur rôle dans l'IRA septique reste à définir.

## **II- Toll-like recepteurs et sepsis**

### **II-1 Présentation de la famille des récepteurs TLRs**

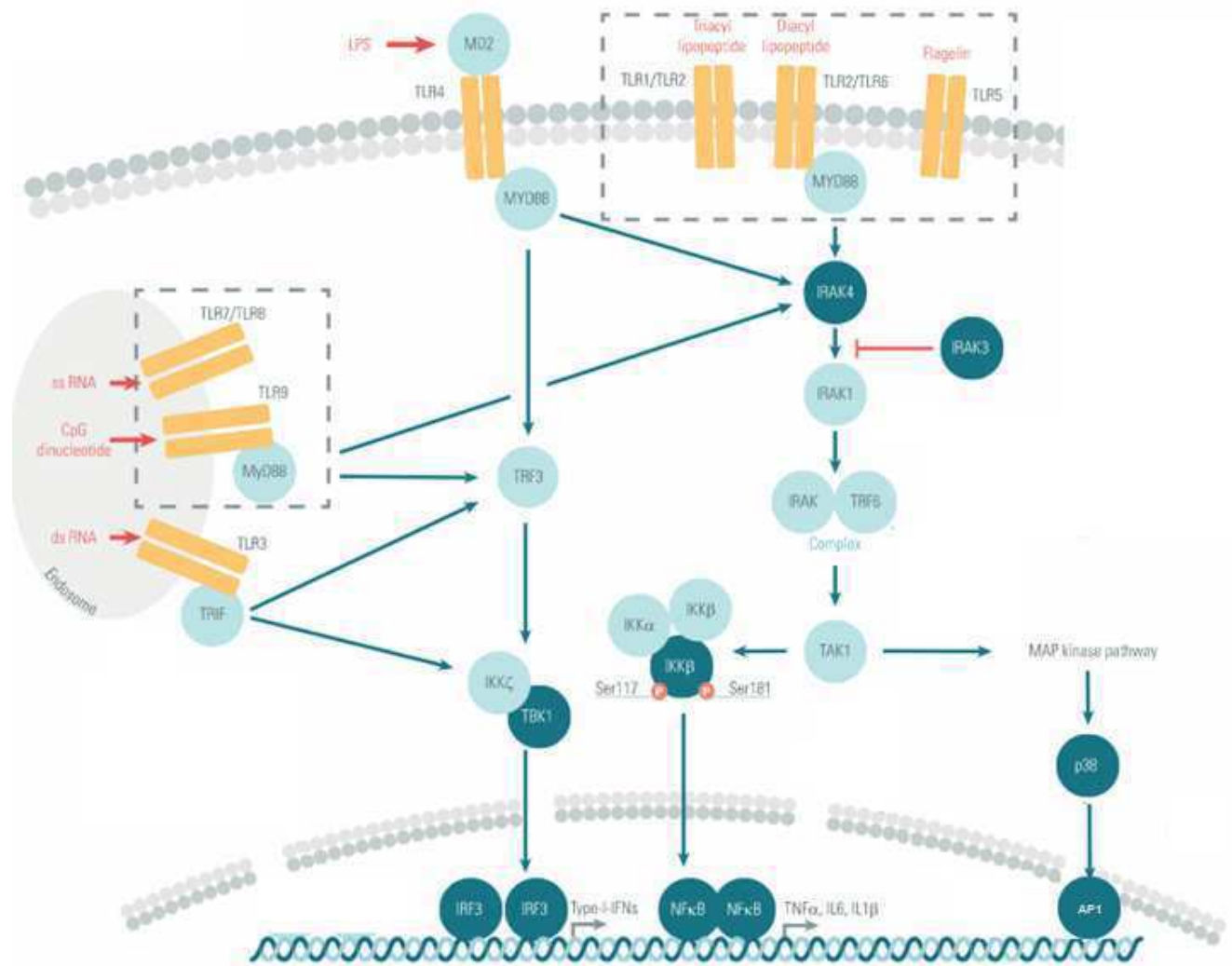
#### **II-1-1 Généralités**

Le récepteur membranaire « Toll » a été identifié chez la drosophile pour son implication dans l'établissement de la polarité de l'axe dorso-ventral de l'embryon (Hashimoto *et al.*, 1988) . Les drosophiles déficientes en Toll présentaient également une susceptibilité accrue aux infections fongiques suggérant un rôle de cette molécule dans l'immunité (Lemaitre *et al.*, 1996). Une recherche de molécules similaires à Toll chez les mammifères a permis d'identifier une famille de molécules apparentées, appelées Toll-like recepteurs (TLRs). Depuis cette découverte majeure, 13 TLRs ont été identifiés chez les mammifères. Les TLRs 1 à 10 sont exprimés chez l'homme alors que TLR11-13 ne sont exprimés que chez la souris. Ces récepteurs sont de type transmembranaire. Ils possèdent un domaine extracellulaire composé d'un motif répété riche en leucines, une courte portion transmembranaire et un domaine intracellulaire qu'ils partagent avec les membres de la famille des récepteurs de l'interleukine 1 (domaine TIR) (West *et al.*, 2006). On distingue habituellement deux catégories de TLRs : Les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 qui sont situés à la surface de la cellule et les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 qui sont situés dans la paroi des endosomes/lysosomes. Ces récepteurs sont exprimés principalement par les cellules de l'immunité (macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques, lymphocytes B, T et natural killer) mais aussi par certaines cellules épithéliales et les fibroblastes (Takeda et Akira, 2007).

#### **II-1-2 Voies de signalisation des TLRs**

La liaison avec un PAMP ou un DAMP s'effectue au niveau du domaine extracellulaire qui varie d'un TLR à l'autre. Elle induit la dimérisation du récepteur soit sous forme d'homodimère ou bien d'hétérodimère avec un autre TLR. Sous forme dimérisée, il y a recrutement d'une molécule adaptatrice et activation des voies de signal intracytoplasmiques (Akira *et al.*, 2004). A l'exception du TLR3, tous les TLRs sont capables de recruter l'adaptateur cytoplasmique MYD88 qui induit le recrutement et l'activation des kinases IRAK1 et 4 (Wesche et al., 1997) (Fig 22). Ces dernières, une fois phosphorylées, recrutent TRAF6 qui active TAK1 ce qui conduit à la phosphorylation d'IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\gamma$ . Celles-ci forment alors un complexe qui va à son tour phosphoryler I $\kappa$ B et ainsi permettre la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (Akira *et al.*, 2004). Par ailleurs, TAK1 phosphoryle également la voie des MAPK aboutissant à l'activation du facteur de transcription AP-1

(Walsh *et al.*, 2015). TLR3 exprimé dans les endosomes, est capable de recruter par interaction directe la molécule cytoplasmique TRIF qui active le facteur de transcription IRF3 ce qui induit la production d'interféron (Fig 22). TLR4 est le seul TLR capable d'activer ces deux voies de signalisation, on parle alors de voie MYD88 indépendante pour qualifier la voie médiée par le recrutement de TRIF. Ce recrutement (Fig 23) n'est pas direct comme pour TLR3 mais indirect *via* la molécule coadaptatrice TRAM (Brown *et al.*, 2011).



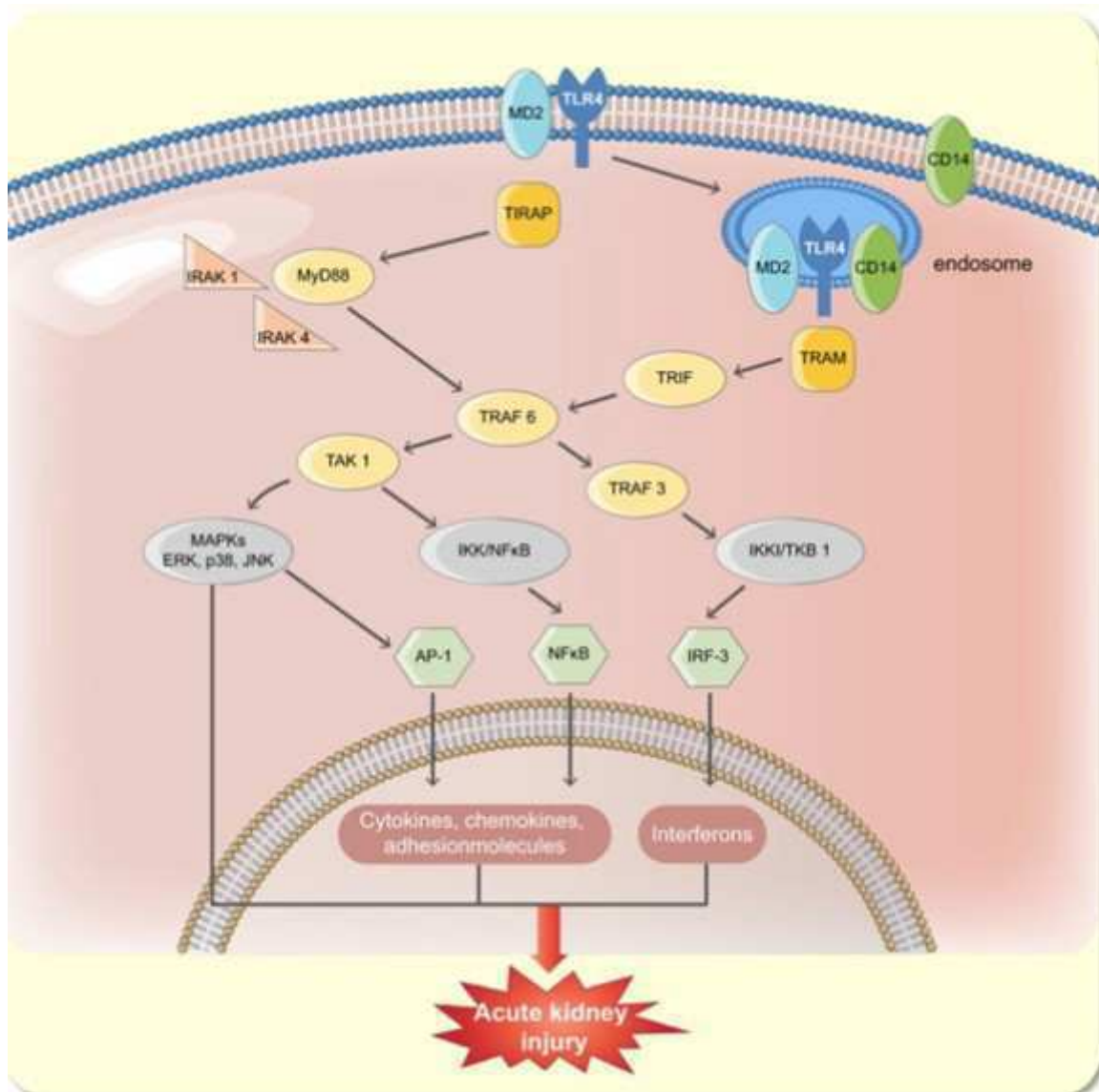
**Figure 22 : Voies de signalisation des TLRs (Figure librement adaptée du site internet <https://fr.cisbio.eu/dd/by-universe/immuno-oncology>).** L'activation des TLR déclenche une cascade de signalisation *via* le recrutement de plusieurs adaptateurs de signalisation intracellulaires notamment MyD88, IRAK et TRAF6. La signalisation TLR conduit à l'activation des voies de signalisation MAP kinase, IKK, TBK1 et à l'activation des facteurs de transcription NF-κB, IRF3 et AP1. Ceux-ci médient l'inflammation par la production de cytokines inflammatoires,

## II-2 Le récepteur TLR4

Intiialement, TLR4 a été caractérisé comme le récepteur impliqué dans la reconnaissance du LPS. Il a été montré qu'une mutation dans le gène *Tlr4* était retrouvée chez les souris C3H / HeJ qui sont connues pour être résistantes au modèle de sepsis par injection de LPS. (Poltorak *et al.*, 1998). Le même phénotype était retrouvé chez les souris C57BL / 10ScCr, qui présentent un défaut chromosomique entraînant la perte de l'ensemble du gène *Tlr4* (Qureshi 1999). Des expériences complémentaires sur des souris déficientes pour le gène *Tlr4* ont montré un phénotype similaire confirmant que le TLR4 est le principal récepteur du LPS (Hoshino *et al.*, 1999). Si elle est indispensable, TLR4 n'est pas la seule protéine impliquée dans la reconnaissance du LPS. La première molécule co-adaptatrice qui a été identifiée est le CD14 (Fig 23). Il a été montré que les souris déficientes en CD14 étaient également protégées dans le modèle d'injection de LPS (Knuefermann *et al.*, 2002). En utilisant des cellules HEK293 transfectées avec un vecteur d'expression du TLR4 et stimulées avec du LPS seul ou avec des complexes LPS/CD14, il a été montré que la présence de TLR4 et CD14 était nécessaire pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par le LPS (Chow *et al.*, 1999). Depuis, il a été confirmé que CD14 est une protéine ancrée sur la partie externe de la membrane cytoplasmique et dépourvue de domaine cytosolique et qu'elle permettait la reconnaissance du LPS en s'associant avec la partie extracellulaire du TLR4. Une deuxième molécule co-adaptatrice a par la suite été découverte il s'agit de la protéine 2 de différenciation myéloïde (MD2) (Fig 23). Sa découverte a été plus tardive car son absence n'abolit pas la réponse des cellules au LPS mais la réduit seulement. MD2 forme un complexe avec le TLR4 ce qui modifie la conformation structurale du domaine extracellulaire de TLR4 et le rend plus affiné pour le LPS (Akashi *et al.*, 2000, Schromm *et al.*, 2001). Il faut noter que dans les lymphocytes B, il semble que le complexe le RP105–MD-1 joue un rôle similaire et plus important que MD2 (Ogata *et al.*, 2000).

En dehors du LPS, de nombreux autres ligands du TLR4 ont été décrits. Il s'agit principalement de DAMP endogènes, libérés en cas de souffrance cellulaire, ce qui explique que le TLR4 soit impliqué dans un grand nombre de pathologies. Parmi ces DAMP, les principaux sont l'HMGB1 qui est libéré lors de la mort par nécrose des cellules épithéliales (Yang & Tracey, 2010), certaines protéines du choc HSP60 et HSP70 (Vabulas *et al.*, 2001, 2002) et les composants de la matrice extracellulaire comme le domaine A de la fibronectine, les héparanes sulfates, les oligosaccharides portés par l'acide hyaluronique (Takeda *et al.*, 2003). Toutefois contrairement au LPS, ces ligands induisent une activation du TLR4 à une concentration importante et sont également capables de stimuler d'autres TLR (Vandewalle *et al.*, 2008).





**Figure 23 : Voie de signalisation du TLR4.** (Figure librement adaptée à partir adaptée de Anderberg *et al.*, 2017). La liaison du LPS au domaine extracellulaire de TLR4 et MD2 est facilitée par le CD14 et entraîne l'activation des voies dépendantes de MYD88 et de TRIF. Dans les cellules épithéliales tubulaires, la liaison du TLR4 et du LPS entraîne l'endocytose du complexe TLR4 / MD2 / CD14. Après activation des voies de signalisation dépendante et indépendante de MYD88, les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, AP-1 et IRF-3 entraînent la transcription de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et les molécules d'adhésion.

### II-3 Rôle du TLR4 dans l'IRA secondaire au sepsis

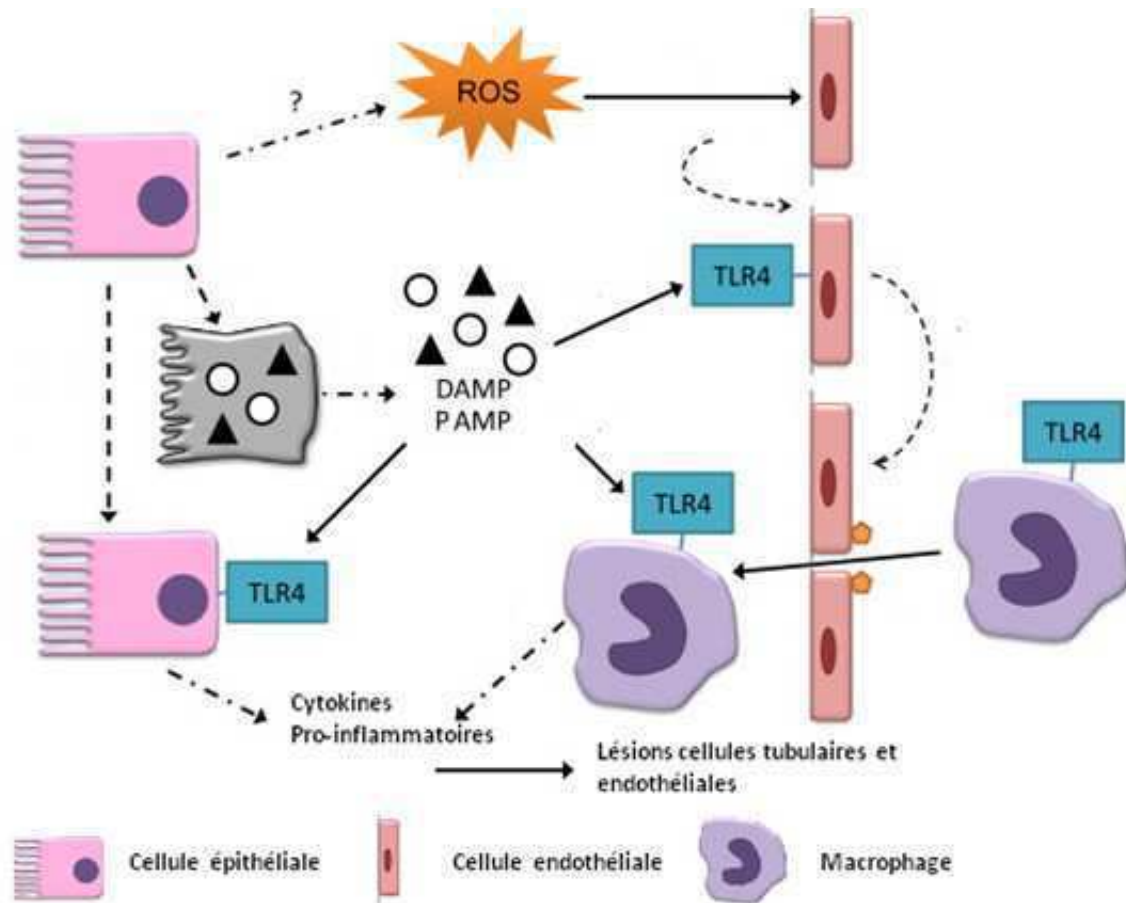
L'équipe de Cunningham *et coll.* a montré que les souris déficientes en TLR4 étaient protégées de l'IRA induite par l'injection intra-péritonéale de LPS (Cunningham *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 2015). Ce résultat a été reproduit dans d'autres modèles de sepsis polymicrobiens (Castoldi *et al.* 2012). L'inhibition du TLR4 a également montré des effets protecteurs dans le sepsis dans d'autres espèces que la souris (Fenhammar *et al.*, 2011). TLR4 est exprimé à plusieurs niveaux dans le rein : Au niveau du pôle apical des cellules épithéliales tubulaires dans le cortex et la médullaire (Kruger *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2011, Kalakeche *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2014), au niveau des cellules mésangiales et podocytaires, des cellules de l'immunité (en particulier macrophages et cellules dendritiques) et également au niveau des cellules endothéliales (Wolfs *et al.*, 2002, Brown *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2012).

Pour clarifier la part fonctionnelle des compartiments épithéliales et immunitaires, Cunningham *et coll.* ont réalisé des transplantations de reins *Tlr-/-* à des souris WT et inversement. Ils ont ainsi montré que les souris globalement déficientes pour le *Tlr4* étaient protégées indépendamment du statut génétique de leur rein (Cunningham *et al.*, 2004). Ce résultat n'était pas en faveur d'un rôle du TLR4 au niveau des cellules rénales mais il est débattu depuis. En particulier, l'équipe de Hato *et al.* a montré, en utilisant des souris chimériques, que les souris *Tlr4-/-* transplantées avec une moelle de souris WT étaient protégées des effets d'une injection de LPS (Hato *et al.*, 2015). Un rôle du TLR4 au niveau des cellules épithéliales tubulaires est d'autant plus possible, qu'il a été mis en évidence une induction de l'expression de TLR4 et de CD14 au niveau de ce type cellulaire au cours du sepsis (El Achkar *et al.*, 2006, 2008) et qu'il a été démontré, en utilisant un traceur radioactif, que les cellules tubulaires pouvaient interagir directement avec le LPS (El Achkar *et al.*, 2008; Musson *et al.*, 1978).

Etant donné l'expression relativement ubiquitaire du TLR4 dans le rein, les mécanismes par lesquels son inhibition est protectrice au cours de l'IRA induite par le sepsis sont probablement multiples (Fig 24). Nous avons vu dans la physiopathologie de l'IRA induite par le sepsis qu'une hypoperfusion rénale survient rapidement après l'injection de LPS. L'équipe de Fenhammar *et coll.* a étudié l'influence du TLR4 sur cette modification hémodynamique et montré que l'inhibition du TLR4 entraînait une disparition de l'hypotension initiale suite à l'injection de LPS chez le porc et le mouton ce qui pourrait expliquer la prévention de l'IRA (Fenhammar *et al.*, 2011). Toutefois, dans ce modèle, la correction de l'hypotension initiale induite par le LPS dans les souris WT ne prévenait pas l'atteinte rénale. De plus dans un modèle de sepsis à *Escherichia coli* chez le mouton, la

même équipe a montré que le rôle bénéfique de l'inhibition du TLR4 était indépendant de la perfusion rénale initiale (Fenhammar *et al.*, 2014) suggérant d'autres voies physiopathologiques.

Les études sur le rôle de TLR4 dans l'IRA secondaire au sepsis suggèrent que TLR4 pourrait être impliqué dans les 3 principaux mécanismes physiopathologiques (inflammation, microcirculation et balance énergétique). Dans l'inflammation tout d'abord, TLR4 est indispensable à la production de cytokines pro-inflammatoires notamment le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  mais aussi des chemokines favorisant le recrutement de leucocytes (Fig23-24) (Tsuboi *et al.*, 2002, Patole *et al.*, 2005). Cet effet est observé dans le rein après injection de LPS en intra-péritonéal (Cunningham *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2012) mais aussi dans des modèles polymicrobiens (Castoldi *et al.*, 2012). Au niveau de la microcirculation le rôle du TLR4 reste encore à définir. En effet, si TLR4 est exprimée au niveau des cellules endothéliales, son absence ne modifie pas la perfusion sanguine dans la médullaire et dans le cortex (Fenhammar *et al.*, 2014) (Fig 24). Enfin, le TLR4 pourrait aussi intervenir dans le maintien de la balance énergétique. Ainsi, il semblerait que l'activation du TLR4 par le LPS puissent générer des lésions mitochondriales (Tran *et al.*, 2011) et entraîne une diminution de PGC-1- $\alpha$  qui régule positivement la biogenèse mitochondriale (Smith *et al.*, 2015) et par une diminution de la mitophagie (Leventhal *et al.*, 2016).



**Figure 24 : Rôle du TLR4 dans la physiopathologie rénale du sepsis** (Figure librement adaptée de l'article Lu *et al.*, 2012). Dans le rein, TL4 est exprimé au niveau des cellules épithéliales tubulaires, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires. Au niveau des cellules épithéliales tubulaires, les conséquences de l'activation du TLR4 sont débattues mais pourraient conduire à une toxicité directe et à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, la mort des cellules épithéliales tubulaires génèrent des signaux de dangers dont certains sont des ligands du TLR4 ce qui amplifie encore l'environnement inflammatoire. L'activation du TLR4 au niveau des cellules immunitaires recrutées localement entraine la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ ) qui ont des effets toxiques sur la fonction rénale. Enfin au niveau des cellules endothéliales, l'activation du TLR4 favorise l'expression de molécules d'adhésion impliquée dans le recrutement des cellules inflammatoires.

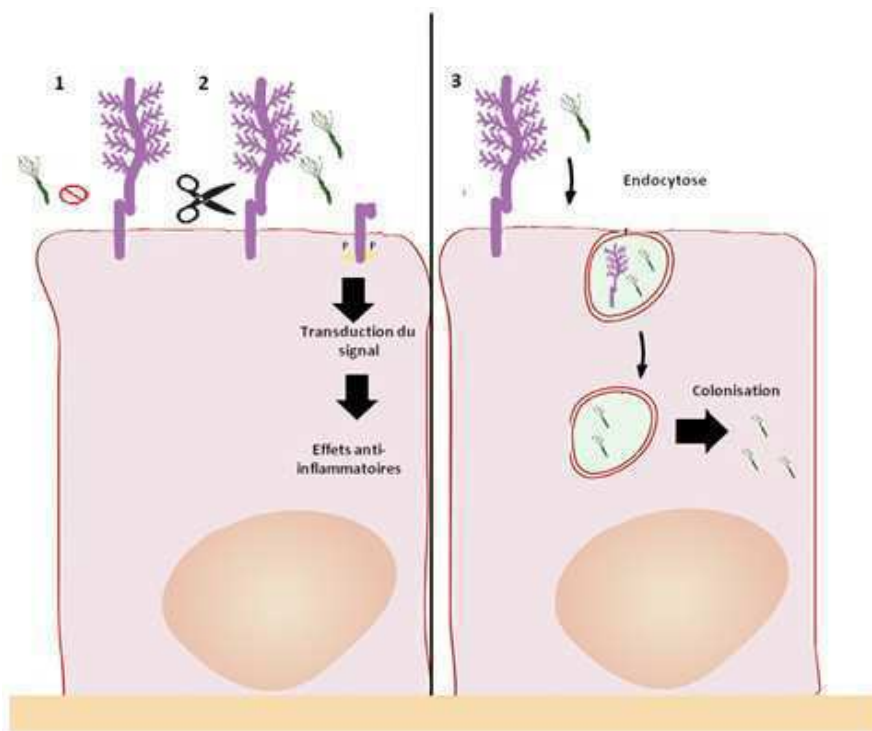
### III MUC1 et sepsis

#### III-1 MUC1 : Un rôle de barrière physique.

Via son domaine extracellulaire volumineux et richement glycosylé qui domine à 200-500 nm au dessus de la surface apicale, MUC1 apparait comme une véritable barrière entre les cellules et les pathogènes (Fig 25). Conformément à cette hypothèse, une susceptibilité accrue aux infections a été observée au niveau oculaire et génital chez les souris déficientes pour Muc1 (Kardon *et al.*, 1999, DeSouza *et al.*, 2001). Par la suite, au niveau du tractus gastro-intestinal, il a été montré que l'expression de MUC1 limitait la colonisation par *Campylobacter jejuni* (McAuley *et al.*, 2007) et par *Helicobacter pylori* (Lindén *et al.*, 2009, McGuckin *et al.*, 2007) à la fois par encombrement stérique limitant l'adhésion des bactéries mais aussi en jouant un rôle dit de « leurre sécrétable ». Ce dernier mécanisme fait référence au fait que certains motifs glycaniques portés par le domaine extracellulaire de MUC1 sont propices à l'adhésion des bactéries qui sont ensuite éliminées par clivage de la partie extracellulaire de MUC1 (Fig 25). Ce phénomène explique pourquoi MUC1 ne favorise pas la colonisation des cellules épithéliales par *Helicobacter pylori* alors qu'elle porte des motifs glycaniques Lewis<sup>b</sup>, sialyl Lewis<sup>a</sup>, and sialyl Lewis<sup>x</sup> qui sont des sites de support pour les adhésines BabA and SabA à la surface d'*Helicobacter pylori* (Lindén *et al.*, 2009). L'importance du domaine extracellulaire dans le rôle de MUC1 dans l'adhésion aux agents pathogènes a été démontrée dans plusieurs études qui ont mis en évidence un lien entre des polymorphismes dans le VNTR et la susceptibilité à la colonisation par *Helicobacter pylori* (Garcia *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2001, 2003; Vinall *et al.*, 2002). Malgré tout, il semble que dans certaines conditions les pathogènes soient capables d'exploiter la liaison avec MUC1 pour adhérer à l'épithélium et le coloniser (Fig 25). Cela a par exemple été observé dans un modèle murin de gastroentérite à *Escherichia coli* (Boll *et al.*, 2017). Dans le poumon, des études ont également montré une adhésion entre MUC1 et certains agents pathogènes : *Pseudomonas aeruginosa* (Lillehoj *et al.*, 2002), *Streptococcus Pneumoniae* (Dhar *et al.*, 2017) et le virus de la grippe A (McAuley *et al.*, 2017). A l'instar des bactéries digestives, l'adhésion s'effectue au niveau de la partie extra-cellulaire de MUC1. Il a ainsi été montré que l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* et *influenza* avec MUC1 est dépendante des résidus acides sialiques portés par la partie extracellulaire de MUC1 (McAuley *et al.*, 2017). Comme dans le tractus gastro-intestinal, les effets sur la colonisation des épithéliums après l'adhésion à MUC1 sont variables en fonction du pathogène. Ainsi dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* il s'en suit une plus grande colonisation de l'épithélium respiratoire contrairement à ce qui est observé avec le virus de la grippe A (McAuley *et al.*, 2017). MUC1 est aussi impliquée dans la régulation des interactions cellules-cellules *via* son

domaine extra-cellulaire et donc dans le recrutement des leucocytes sur les zones d'inflammation. Il a par exemple été montré que MUC1 pouvait se lier par interaction directe avec trois molécules d'adhésion ICAM-1, E-sélectine et galectine-3 (Geng *et al.*, 2012 ; Piyush *et al.*, 2017).

Si les études présentées précédemment ont clairement établi le rôle de MUC1 dans l'adhérence et la colonisation des épithéliums *via* sa partie extracellulaire, certains éléments suggèrent que le rôle anti-inflammatoire de MUC1 est plus complexe et implique d'autres mécanismes. Par exemple, dans le modèle murin d'infection pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa* alors même que les auteurs ont montré que l'absence de MUC1 limite la colonisation par cet agent pathogène, ils rapportent que dans les poumons des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> ils retrouvent des taux de cytokines pro-inflammatoire (notamment TNF- $\alpha$ ) et une infiltration à polynucléaires neutrophiles plus importants que dans les poumons de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (McAuley *et al.*, 2017). Dans les parties suivantes, nous détaillerons les différents mécanismes à l'origine des fonctions anti-inflammatoires de MUC1 qui ont été décrits dans la littérature.



**Figure 25 : Représentation du rôle de MUC1 dans l'adhésion des agents pathogènes à l'épithélium.** Figure librement adaptée à partir de l'article « Adhesion and Invasion of Gastric Mucosa Epithelial Cells by *Helicobacter pylori* » de Huang *et al.*, 2016. *Via* sa large partie extracellulaire, MUC1 peut limiter l'adhésion de certains agents pathogènes à l'épithélium (1). Dans d'autres circonstances, malgré une adhésion des agents pathogènes à MUC1 il a été observé une moindre colonisation de l'épithélium. Cela est lié à la fonction de « leurre sécrétable » de MUC1 c'est-à-dire au clivage de sa partie extracellulaire sur laquelle sont fixés les agents pathogènes (2). Dans

certain cas, ces mécanismes ne s'appliquent pas et l'adhésion des agents pathogènes à MUC1 favorise la colonisation et l'infection des épithéliums (3).

### III-2 MUC1 : inhibiteur de TLRs

#### Au niveau des cellules épithéliales.

Dans les modèles murins d'infections à *Pseudomonas aeruginosa*, le TLR5 est impliqué dans la reconnaissance de la flagelline à la surface de *Pseudomonas aeruginosa* ce qui entraîne l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Kato *et al.*, 2012). Etant donné les résultats observés chez les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> dans le modèle d'infection à *P. Aeruginosa*, les auteurs ont recherché un effet inhibiteur de MUC1 sur TLR5. En utilisant des cellules épithéliales de trachée issues de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> ou *Muc1*<sup>+/+</sup>, ils ont tout d'abord montré que les cellules n'exprimant pas Muc1 avait une sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL8 majorée en réponse à la flagelline. Des résultats similaires étaient observés sur des cultures primaires de cellules bronchiques humaines. Inversement, la surexpression de MUC1 dans des cellules HEK293 entraînait une inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  en réponse à une stimulation avec la flagelline. Pour déterminer à quel niveau de la voie du TLR5 intervient MUC1, les auteurs ont utilisés des cellules HEK293 surexprimant les protéines MYD88, TRAF6 et IRAK1 qui sont recrutées par TLR5 pour la transduction du signal. Dans ce modèle, ils ont montré que quand MYD88 était surexprimée, les effets inhibiteurs de MUC1 sur l'activation de NF- $\kappa$ B étaient abrogés. Ce résultat n'était pas retrouvé en cas de surexpression de TRAF6 ou IRAK1. Enfin, dans une dernière expérience de co-immunoprécipitation, les auteurs ont montré qu'après stimulation avec la flagelline, MUC1 s'associait à TLR5 et se faisant réduisait le recrutement de MYD88 par le TLR5 (Fig 26; Kato *et al.*, 2012). La liaison entre MUC1 et TLR5 est dépendante de la partie intracytoplasmique de MUC1 et est favorisé par la phosphorylation d'un résidu tyrosine au niveau de MUC1-CT (Fig 26)(Kato *et al.*, 2012). Dans une autre série d'expériences, avec de l'acide polyinosinic:polycytidylic (polyI:C) (ligand du TLR3) à la place de la flagelline, la même équipe a montré que MUC1 inhibait également TLR3 en empêchant le recrutement de la molécule adaptatrice TRIF (Fig 26; Kato *et al.*, 2014). A nouveau, c'est la partie intracytoplasmique de MUC1 dont est dépendante cet effet inhibiteur.

En dehors du poumon, le rôle de MUC1 a été moins bien caractérisé même si quelques études suggèrent également un potentiel rôle inhibiteur de différents TLRs. Par exemple dans des lignées de cellules épithéliales d'adénocarcinome gastrique MKN7, l'expression de MUC1 est associée à une moindre sécrétion d'IL-8 en réponse à des stimulations avec des ligands spécifiques de nombreux TLRs : poly I:C, LPS, flagelline, imiquimod (ligand du

TLR7), ssRNA40 (ligand du TLR8), and CpG DNA (ligand du TLR9) et pam3CSK4 (ligand des TLR1/2) (Sheng *et al.*, 2012). A noter que sur des cellules épithéliales pulmonaires, une inhibition des TLR2, 3, 4, 7 avait également été rapporté (Ueno *et al.*, 2008). Dans des études *in vitro* et *in vivo*, l'expression de MUC1 au niveau de la cornée inhibe la réponse inflammatoire en réponse à une exposition à des ligands du TLR2 et TLR5 sans que l'on sache si le mécanisme est similaire à ce qui été décrit dans le poumon (Menon *et al.*, 2015). En étudiant le rôle des différents isoformes de MUC1 dans le syndrome sec, une autre équipe a montré que les isoformes MUC1/A et MUC1/B étaient associés à une réponse différente à une stimulation au TNF- $\alpha$  (Imbert-Fernandez *et al.*, 2011). Bien qu'il n'y ait pas de preuve que ces isoformes régulent différemment les TLRs, ce point mériterait d'être adressé dans d'autres études.

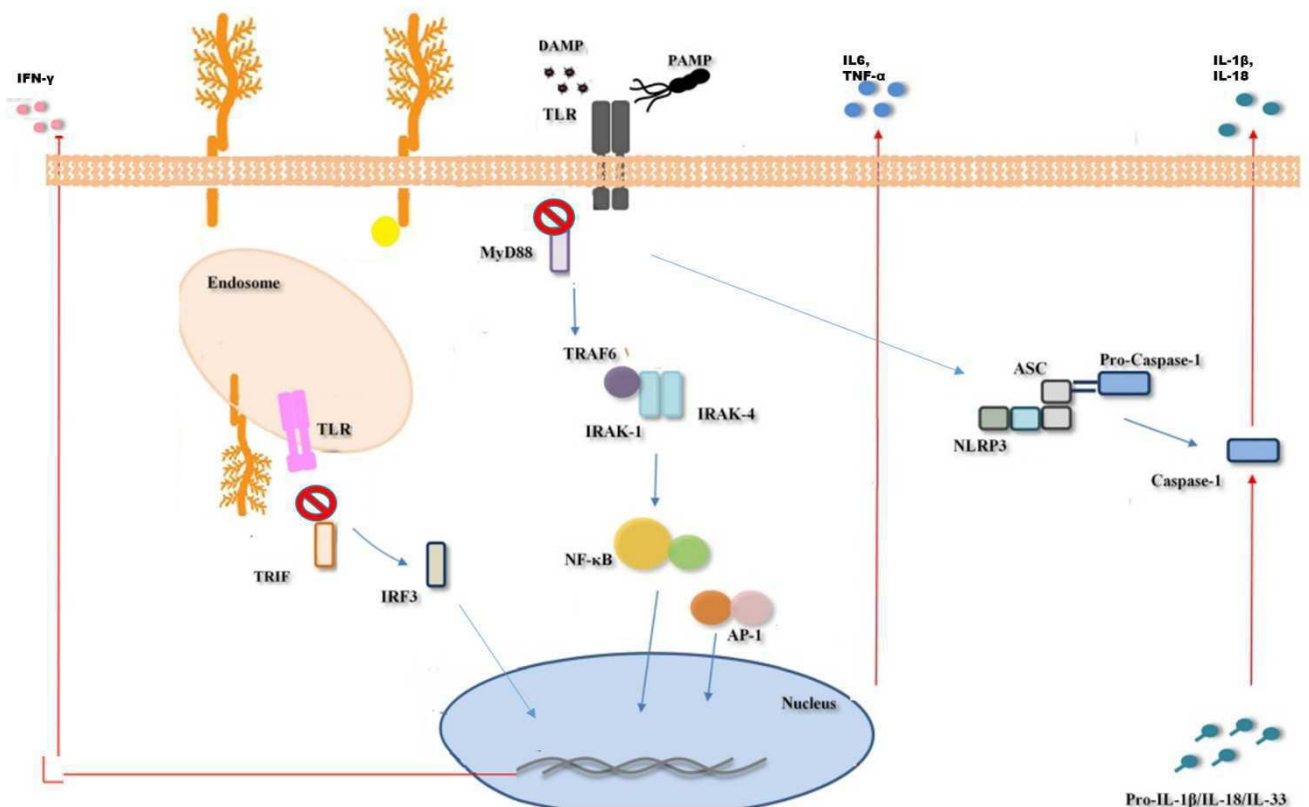
### **Au niveau des cellules immunitaires.**

Au cours de la gastrite à *Helicobacter pylori*, l'équipe de Ng *et coll.* a montré que c'est l'expression de MUC1 au niveau des cellules hématopoïétiques qui permet de limiter le développement des lésions de gastrite (Ng *et al.*, 2016). Cette équipe rapporte une activation excessive de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages et les cellules dendritiques issus de souris *Muc1*<sup>-/-</sup>. En étudiant les différentes voies d'activation de l'inflammasome (dont le fonctionnement est détaillé dans la partie suivante), ils ont montré que MUC1 intervient en atténuant le premier signal d'activation *via* une inhibition de TLR2 (Ng *et al.*, 2016). Le mécanisme exact n'a pas été identifié mais les auteurs ont pu montrer que l'inhibition intervenait au niveau de la phosphorylation d'IRAK4 ou en amont (très tôt après l'activation du TLR). Au vu des résultats dans le poumon, il est donc possible que le mécanisme de cette inhibition soit lié à une diminution du recrutement de MYD88.

Plusieurs autres études ont rapporté un rôle de MUC1 comme inhibiteur des TLRs au niveau des cellules immunitaires. Ainsi, dans une étude de Ueno *et coll.*, MUC1 régule négativement la sécrétion de TNF- $\alpha$  après stimulation avec des ligands spécifiques des TLRs 2, 3, 4, 5, 7 et 9 dans des macrophages péritonéaux, alvéolaires et des lignées macrophagiques RAW264.7. Des études réalisées sur des macrophages différenciés à partir de monocytes issus de moelle de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> ou *Muc1*<sup>-/-</sup> ont mis en évidence des résultats similaires (Kato *et al.*, 2016). Dans cette dernière étude, les auteurs ont également mis en évidence que l'expression de MUC1 dans les macrophages était associée au phénotype pro-inflammatoire (M1) et que MUC1 n'était pas détectable dans les macrophages non stimulés ou de phénotype M2 (Kato *et al.*, 2016). Des expériences sur des cellules dendritiques différenciées à partir de moelle de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> ou *Muc1*<sup>-/-</sup> a



également mis en évidence une sécrétion de  $\text{TNF-}\alpha$  augmentée dans les cellules dendritiques *Muc1*<sup>-/-</sup> après stimulation par la flagelline. En revanche, une diminution de la réponse au LPS n'était pas observée dans les cellules dendritiques issues de progéniteurs médullaires alors qu'elle l'était avec d'autres populations de cellules dendritiques tissulaires (issues du poumon ou de la rate) (Williams *et al.*, 2010). Ce dernier résultat a été confirmé par une autre équipe qui a observé que les cellules dendritiques issus de rate de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> libéreraient davantage de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-12 mais moins d'IL-10 en réponse au LPS (Yen *et al.*, 2013).



**Figure 26 : Mécanismes anti-inflammatoires de MUC1.** Figure librement adaptée de l'article « Pattern-Recognition Receptors and Gastric Cancer » de Castaño-Rodríguez *et al.*, 2014. Le rôle immunomodulateur de MUC1 est lié à sa capacité à inhiber les TLR. Dans les cellules épithéliales pulmonaires, il a été montré que *via* son domaine intracytoplasmique, MUC1 pouvait inhiber le recrutement de la protéine adaptatrice MYD88 par le TLR5 mais aussi de l'adaptateur TRIF par le TLR3 au niveau de la paroi des endosomes. Par ailleurs, l'inhibition de l'activation des TLRs membranaires inhibe le premier signal nécessaire à la constitution du complexe NLRP3. L'inhibition de ces différents voies aboutit *in fine* à la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

### III-3 MUC1 : inhibiteur de NLRP3

Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques composés d'un récepteur NLR, d'une protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like containing a CARD domain) et d'une protéine effectrice de la famille des caspases. Ils s'assemblent pour détecter des PAMP ou des DAMP et leur formation aboutit à l'activation des caspases 1, 4 et 5 chez l'homme. Le recrutement de la caspase 1 permet alors le clivage direct, de pro-cytokines cytosoliques, dont l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 (Fig 26). Les inflammasomes sont impliqués dans la réponse de l'organisme aux agents pathogènes (Swanson *et al.*, 2019). MUC1 intervient spécifiquement dans la régulation de voie de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, en stimulant des macrophages issus de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> avec des ligands spécifiques de différents complexes de l'inflammasome (NLRC4, NLRP3, AIM2, and NLRP1b) il a été montré que l'expression de MUC1 ne modulait la sécrétion de IL-1 $\beta$  qu'en réponse à des ligands de NLRP3 (Ng et Sutton, 2016). Cette inhibition de l'inflammasome NLRP3 explique la diminution du taux de sécrétion de la cytokine IL-1 $\beta$  observée dans les souris WT par rapport aux souris *Muc1*<sup>-/-</sup> après infection par *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus* (Ng *et al.*, 2016). Pour comprendre le mécanisme de l'inhibition de NLRP3 par MUC1 il faut d'abord s'intéresser à la formation de ce complexe qui nécessite deux signaux : 1) une induction de la transcription, dépendante de la voie NF- $\kappa$ B, qui requiert la fixation de ligands de TLR ou de NLR ou des cytokines inflammatoires (2) une activation par un ligand (adjuvant de l'aluminium, nigerine, ATP) qui permet l'oligomérisation des récepteurs NLRP3. Si MUC1 intervient spécifiquement sur l'inhibition de l'inflammasome NLRP3, c'est que contrairement aux autres complexes de l'inflammasome, NLRP3 n'est pas exprimé de façon constitutive dans les macrophages et les cellules dendritiques mais seulement après activation du signal 1 *via* le TLR. De ce fait, c'est par son rôle inhibiteur sur la voie des TLRs que MUC1 inhibe également la voie de NLRP3 (Fig 26).

### III-4 MUC1 et la voie $\beta$ -caténine dans l'inflammation

*Helicobacter pylori* est connu pour favoriser la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine en se liant *via* son domaine CagA à la protéine p120-caténine et en déstabilisant le complexe E-cadhérine /  $\beta$ -caténine dans les cellules gastriques infectées. Il en résulte une sécrétion accrue de la cytokine inflammatoire IL-8. Etant donné le rôle joué par MUC1 dans la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine dans les cellules cancéreuses, des auteurs ont regardé si la présence de MUC1 influençait la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine en réponse à *Helicobacter pylori*. Ils ont mis en évidence que MUC1 pouvait adhérer à la fois à la  $\beta$ -caténine et à CagA sur *Helicobacter pylori* et qu'en cas de surexpression de MUC1 il y avait une diminution du complexe CagA /  $\beta$ -caténine ce qui était corrélé à une moindre production d'IL-8. Ces résultats suggèrent que MUC1 peut moduler la réponse inflammatoire

à *Helicobacter pylori* au niveau des cellules épithéliales en évitant la déstabilisation du complexe complexe E-cadhérine /  $\beta$ -caténine par le domaine CagA de *Helicobacter pylori* (Guang *et al.*, 2012 ; Lillehoj *et al.*, 2012)

### III-5 MUC1 et inflammation : Boucle de régulation

Dans les cellules épithéliales du sein, des voies respiratoires, de la prostate et de l'utérus, il a été rapporté une induction de MUC1 en réponse au TNF- $\alpha$  (Dhar *et al.*, 2019). Dans la partie sur la régulation transcriptionnelle de MUC1, nous avons vu que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  peuvent induire une forte induction de MUC1 par les actions indépendantes de NF- $\kappa$ B p65 et STAT1 $\alpha$  sur la région située entre -589 et -495 du promoteur de *MUC1* (Lagow *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'équipe de Koga *et coll.* a montré par une série d'expériences que le TNF- $\alpha$  peut également induire l'expression de MUC1 *via* la voie TNFR  $\rightarrow$  MEK1/2  $\rightarrow$  ERK1  $\rightarrow$  Sp1 (Koga *et al.*, 2007). Lors d'une stimulation par le TNF- $\alpha$ , ils ont confirmé l'augmentation de l'activité du promoteur de MUC1 dans des cellules épithéliales pulmonaires. Cette induction de MUC1 était supprimée en cas de traitement avec des inhibiteurs de MAPK et de MEK1/2 et ERK1 (mais pas ERK2). Enfin, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine après transfection avec un plasmide de MUC1 portant des modifications des nucléotides au niveau des positions -97 et -96 (un des sites de fixation de Sp1), ont permis de confirmer que Sp1 est le facteur de transcription impliqué dans l'induction de MUC1 en réponse au TNF- $\alpha$ . L'importance de ce mécanisme *in vivo* a été démontré par l'absence d'induction de l'expression de MUC1 dans des souris Tnfr-/- et infectées avec *Pseudomonas aeruginosa* (Choi *et al.*, 2011). Une induction de MUC1 en réponse aux cytokines IL-1b, IFN- $\gamma$ , IL-22 et IL-17 a également été rapportée dans la littérature (Reddy *et al.*, 1990, Clark *et al.*, 1994, Dharmaraj *et al.*, 2010, Sugimoto *et al.*, 2008). Dans les lymphocytes T, une induction de MUC1 après stimulation par l'IL-7 a aussi été caractérisée (Vasir *et al.*, 2005).

Certaines bactéries peuvent également directement réguler l'expression de MUC1 à la hausse. Un des mécanismes derrière cette induction de MUC1 est la production d'élastase par les polynucléaires neutrophiles qui va activer la voie PLC- $\gamma$   $\rightarrow$  Duox1  $\rightarrow$  ROS  $\rightarrow$  TACE  $\rightarrow$  TNF- $\alpha$   $\rightarrow$  TNFR1  $\rightarrow$  ERK1/2  $\rightarrow$  Sp1 pathway (Kuwahara *et al.*, 2007). Enfin le récepteur nucléaire PPAR- $\gamma$ , qui joue aussi un rôle anti-inflammatoire important au cours du sepsis, a un site de fixation au niveau du promoteur de MUC1 et peut moduler son expression. De manière intéressante, l'équipe de Park *et coll.* a montré que les effets anti-inflammatoires de PPAR étaient dépendants de la présence de MUC1 suggérant que les deux protéines agissent de manière synergique en réponse à l'inflammation (Park *et al.*, 2012).

Au total, MUC1 est donc au centre d'une boucle de régulation de l'inflammation : Au cours du sepsis, il est rapidement induit par l'intermédiaire des voies sus-citées et permet de

réguler la production de cytokines inflammatoires par son rôle sur les récepteurs de l'immunité innée notamment.

## **OBJECTIFS**

**Les objectifs des travaux de thèse étaient :**

- **D'étudier, au niveau des cellules épithéliales tubulaires proximales, l'expression et le rôle éventuel de MUC1 en réponse à l'hypoxie (Partie 1)**
  - Sur biopsies rénales humaines
  - Dans le modèle murin d'ischémie-reperfusion
  - Dans un modèle de culture cellulaire
- **De rechercher un rôle éventuel de MUC1 dans la régulation de l'inflammation rénale (Partie 2)**
  - Dans un modèle murin d'IRA septique par injection de LPS
  - Sur des cultures primaires de macrophages en culture
  - Tester l'hypothèse d'une interaction de MUC1 avec la voie du TLR4

## **RESULTATS**

## Partie 1

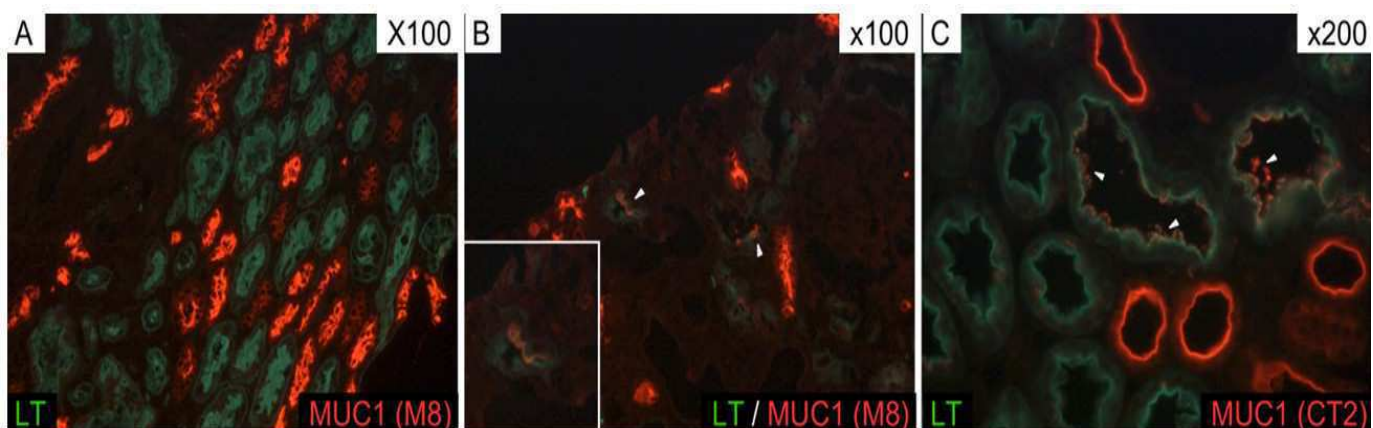
### 1- Etude de l'expression de MUC1 sur biopsies rénales humaines

#### 1-1 MUC1 est exprimée au niveau des tubules proximaux en souffrance

Au cours des résultats préliminaires sur le modèle murin d'IR (présentés en introduction du manuscrit), une induction de l'expression de MUC1 avait été observée à la fois sur le plan transcriptionnelle et par Western Blot sur des extraits de reins totaux. Les études immunohistochimiques avaient montrées la persistance de l'expression de MUC1 au niveau des tubes collecteurs et distaux mais également une expression plus focale au niveau de certaines cellules des tubes en souffrance. Une expression similaire avait été observée sur les biopsies de greffon humaines.

Nous avons donc émis l'hypothèse que MUC1 pouvait être induit dans les cellules tubulaires proximales secondairement à une agression ischémique. Pour tester cette hypothèse, nous avons sélectionnés des ponctions biopsies rénales humaines présentant des lésions de NTA et réalisés des expériences de double marquage avec MUC1 et une lectine marquant spécifiquement les tubes contournés proximaux (TCP) : la Lotus Tetragonolobus (LT). Des ponctions biopsies de reins dépourvues de lésions de NTA étaient utilisées comme contrôle.

Sur les reins contrôles, on confirmait l'expression de MUC1 au niveau des tubes distaux (TD) et des tubes collecteurs et le marquage entre MUC1 et LT était donc parfaitement distinct (Fig 27-A). En revanche, sur les reins présentant des lésions de NTA, on observait une expression apicale de MUC1 au niveau de certains TCP (Fig 27-B).



**Figure 27 : Expression de la mucine MUC1 et du marqueur proximal LT au cours de la NTA.** (A) Dans un rein contrôle les TD sont marqués par MUC1 et les TCP par la LT ; (B et C) Dans un rein présentant des lésions de NTA, on observe une expression segmentaire de MUC1 (clone M8, B) et (clone CT2, C) au sein de certains TCP (pointes de flèches blanches)

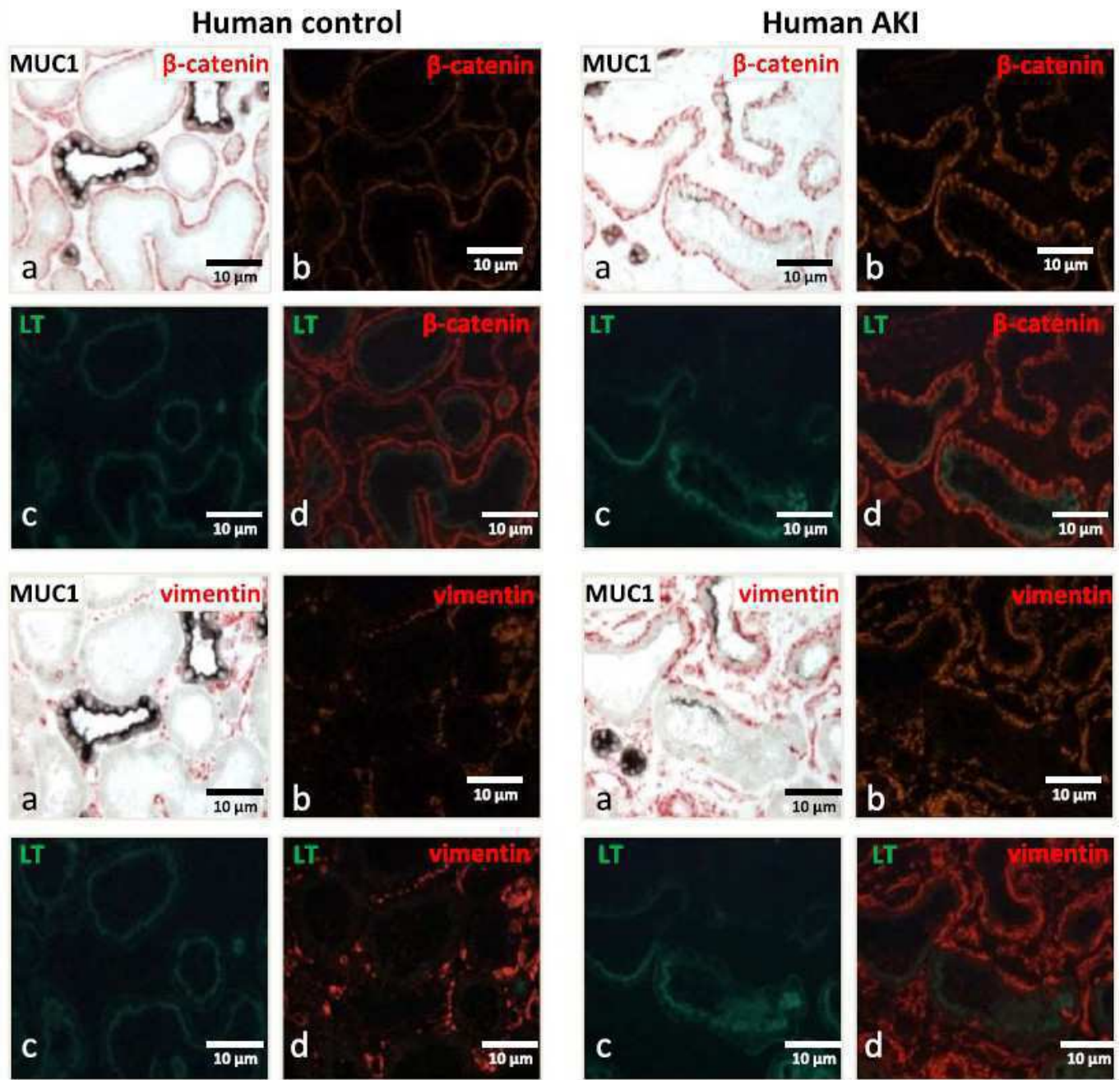


## **1-2 L'induction de MUC1 survient dans les cellules proximales «dédifférenciées»**

Les cellules épithéliales tubulaires sont responsables de la régénération des épithéliums tubulaires. Au cours des phases de réparation, dans une partie des cellules tubulaires proximales survivantes à l'agression ischémique initiale, on observe des changements phénotypiques caractérisés par une induction de certains marqueurs mésenchymateux, une baisse d'expression des marqueurs épithéliaux et une néoexpression de marqueurs de cellules progénitrices ou de marqueurs de souffrance.

Sur les biopsies de greffon (cf résultats préliminaires dans l'introduction), les résultats antérieurs de notre équipe avaient rapporté que l'augmentation de l'expression de MUC1 au cours de la NTA était associée au processus de « transition épithélio-mésenchymateuse partielle » en raison de l'apparition de marqueurs mésenchymateux dans les tubes en souffrance. Pour tester l'hypothèse que MUC1 est induit dans ces cellules épithéliales tubulaires proximales présentant un état dédifférencié, nous avons réalisé une technique de triple marquage avec le marqueur MUC1, le marqueur de tube proximal LT et un marqueur mésenchymateux (la vimentine ou la  $\beta$ -caténine).

Avec cette technique, nous avons pu confirmer que l'induction de MUC1 avait lieu dans des tubes proximaux et dans des cellules épithéliales qui présentent une surexpression de la vimentine et une délocalisation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine (Fig 28).



**Figure 28 : L'induction de MUC1 est observée dans des cellules épithéliales tubulaires proximales en transition épithélio-mésenchymateuse partielle.** En haut à gauche : En condition contrôle, on observe un marquage de la  $\beta$ -caténine (en rouge) qui est limité au niveau des basales des tubes proximaux et dans une moindre mesure au niveau des tubes distaux. En haut à droite : Sur des reins de NTA, on observe une induction et une délocalisation cytoplasmique de l'expression de la  $\beta$ -caténine dans certains tubes proximaux. Lorsque l'on observe le marquage de MUC1 (en noir), on visualise un léger marquage apical dans certaines cellules tubulaires proximales ayant une expression délocalisée de la  $\beta$ -caténine. Des constatations similaires ont été faites avec un autre marqueur mésenchymateux : la vimentine. A noter qu'à la différence de la  $\beta$ -caténine, la vimentine est quasiment absente des reins controles (en bas à gauche).

En plus des marqueurs mésenchymateux, nous avons également recherché une coexpression de MUC1 avec un marqueur associé aux cellules souches rénales humaines : le CD133 et également avec le marqueur de souffrance rénale KIM-1. Dans les deux cas, nous avons pu mettre en évidence une colocalisation au niveau de certaines cellules épithéliales tubulaires (Fig 29).

De manière intéressante, sur des reins contrôles, nous n'avons jamais observé de co-marquage de MUC1 et du CD133 ce qui suggère que MUC1 est un marqueur de cellules « dédifférenciées » mais pas un marqueur du pool de cellules progénitrices comme décrites par le groupe du Pr Romagnani (Lazzeri *et al.*, 2018)

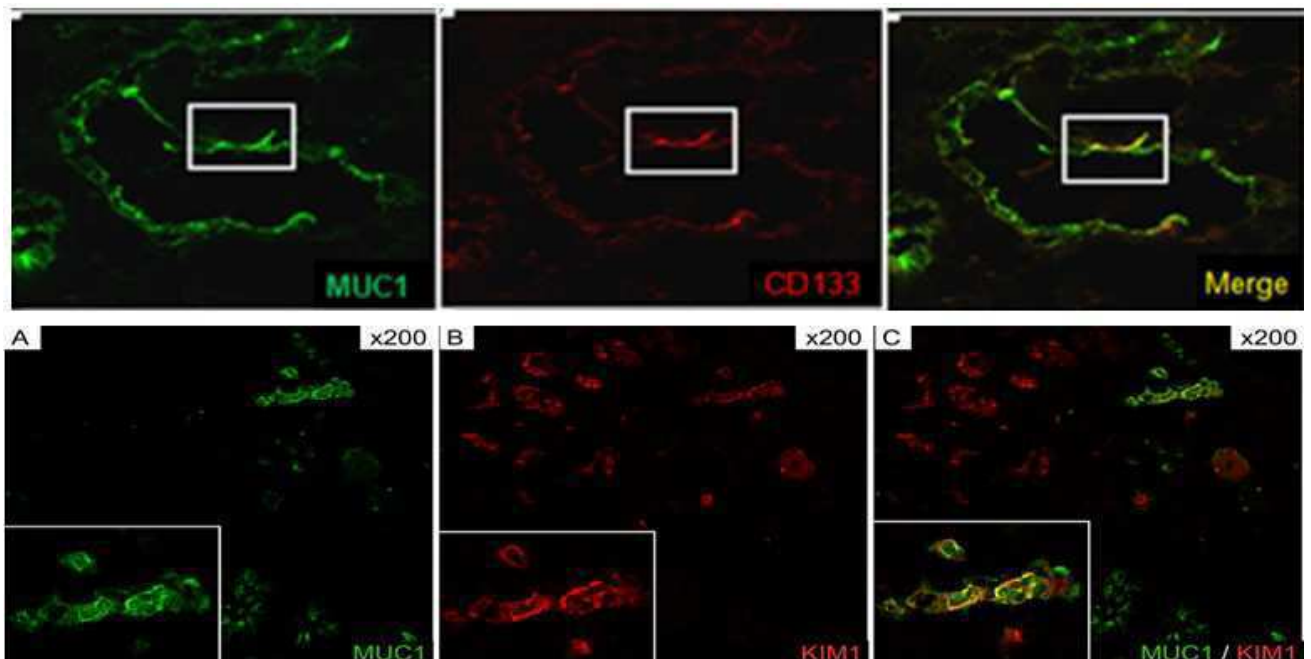


Figure 29 : Coexpression de MUC1 et du marqueur de cellules progénitrices CD133 (rangée du haut) et du marqueur de souffrance rénale KIM-1 (rangée du bas) au niveau de cellules épithéliales tubulaires.

## 2- Expression et rôle de MUC1 au cours des expériences d'hypoxie

### 2-1 Induction de MUC1

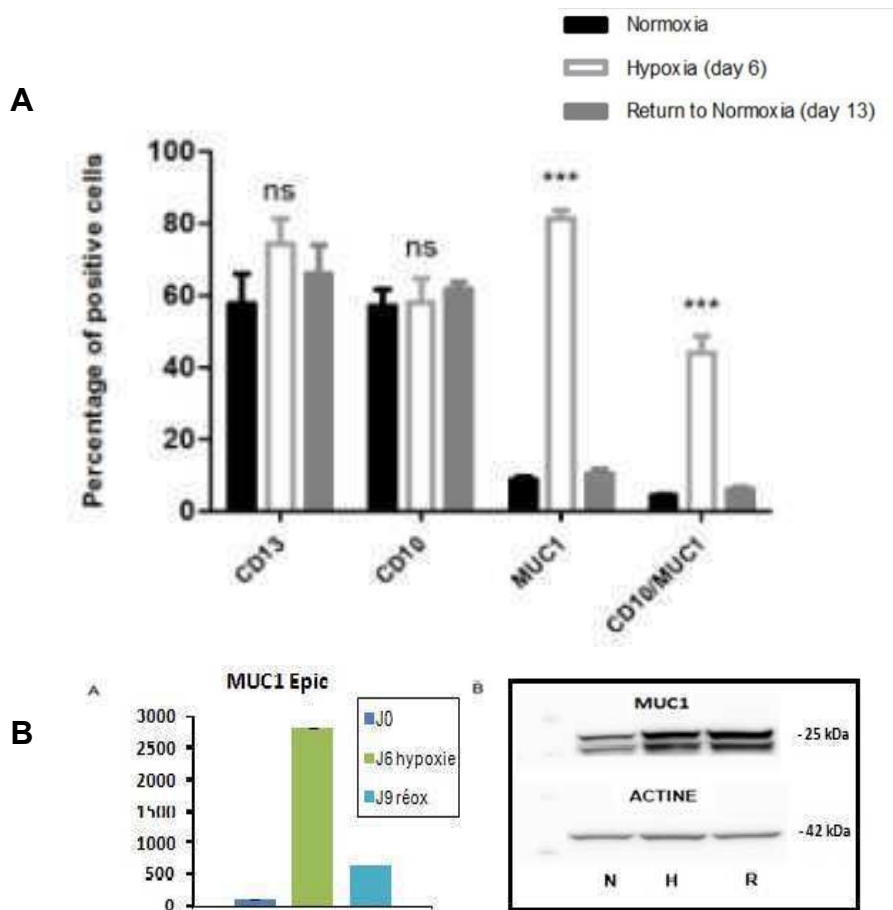
Pour reproduire *in vitro* les résultats observés chez l'homme, nous avons soumis des cellules épithéliales tubulaires à une période de 6 jours d'hypoxie (1% d'O<sub>2</sub> avec 5% de CO<sub>2</sub> et 94% de N<sub>2</sub>) avant de les cultiver à nouveau en conditions standards.

Nous avons tout d'abord caractérisé nos cellules par cytométrie de flux afin de vérifier la nature proximale de la majorité des cellules. Pour se faire, nous avons contrôlé l'expression des marqueurs proximaux CD10 et CD13 (Van der Hauwaert *et al.*, 2013) et de MUC1 dans

notre population. L'étude des marqueurs proximaux retrouvait 57% de cellules monomarquées avec le CD13 et 58% avec le CD10 (Fig30-A). Le pourcentage de cellules CD10+/CD13+ était d'environ 54%. L'expression de MUC1 était faible avec seulement 9% de cellules monomarquées et seules 4,5% des cellules exprimaient à la fois MUC1 et un des deux marqueurs proximaux (Fig30-A). Ces résultats confirment que les cellules PTEpiC sont majoritairement une population de cellules proximales tubulaires bien que cette population soit assez hétérogène.

Ensuite nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus sur les cellules après 6 jours d'hypoxie et après 7 jours de réoxygénation. Dans les cellules en condition hypoxique, alors que les pourcentages de cellules marquées par le CD10 et le CD13 étaient stables, nous avons constaté une augmentation significative du nombre de cellules monomarquées par MUC1 par rapport aux conditions normoxiques (Fig30-A). Après 7 jours de réoxygénation, l'expression de MUC1 était presque revenue à son niveau basal avec 13% de cellules marquées (Fig30-A). L'augmentation de l'expression de MUC1 en condition hypoxique était également contrôlée sur le plan transcriptionnel et par Western Blot (Fig30-A).

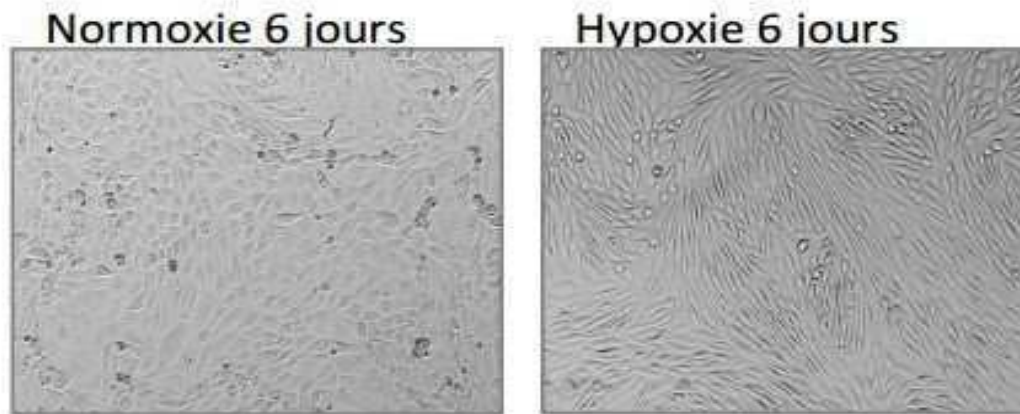
Afin de vérifier que l'expression de MUC1 augmentait des les cellules épithéliales proximales au cours de l'ischémie, nous avons contrôlé le pourcentage de cellules doublement marquées MUC1/CD10. Nous avons retrouvé 44% de cellules doublement marquées en condition ischémique contre 4.5% en condition normoxique (Fig30-B).



**Figure 30 : Evolution de l'expression de MUC1 dans les cellules épithéliales tubulaires proximales soumises à une expérience d'hypoxie / réoxygénation.** (A) Histogramme récapitulant les résultats de cytométrie de flux sur l'expression des marqueurs proximaux (CD10 et CD13) et de MUC1. On observe une induction de MUC1 en condition hypoxique secondaire à une augmentation du nombre de cellules comarquées CD10+/MUC1+ avec un retour à la normale après 7 jours de réoxygénation. (B) Les analyses par RT-qPCR et Western Blot confirment l'induction de MUC1 (3 jours et non 7 de réoxygénation).

## 2-2 Expression des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux

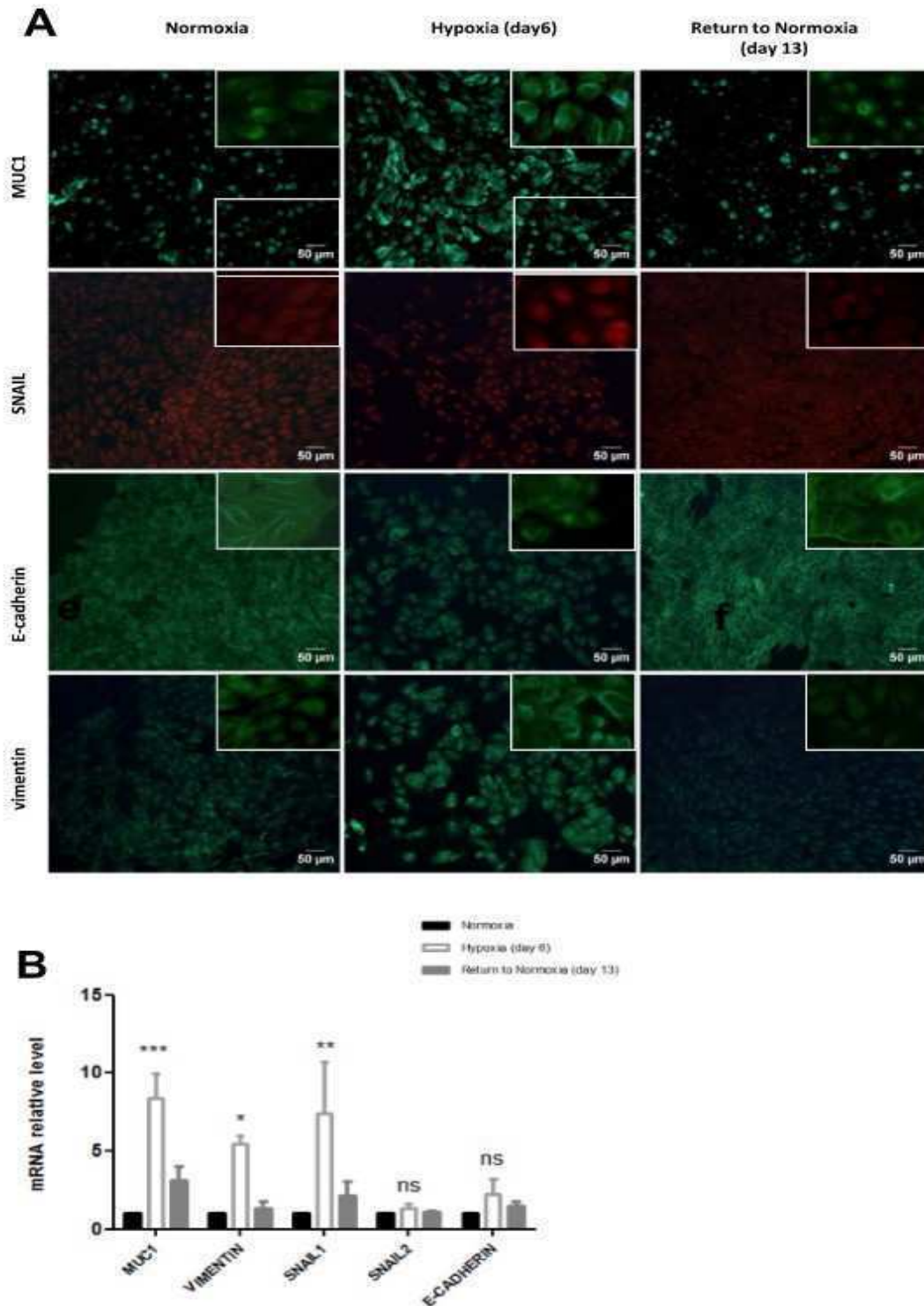
Après 6 jours d'hypoxie, on constate des modifications de la morphologie des cellules. En effet, lorsqu'elles sont cultivées en condition de normoxie, les cellules sont polygonales et cohésives, alors qu'en hypoxie, elles adoptent un phénotype mésenchymateux caractérisé par un allongement des cellules (Fig 31).



**Figure 31 : Analyse morphologique des cellules après 6 jours de culture en condition normoxique versus hypoxique.** On observe un passage d'une morphologie plus épithéliale en normoxie (cellules polygonales) vers une morphologie mésenchymateuse (allongement des cellules)

Afin d'étudier si ce changement de morphologie se traduit par des modifications de l'expression des marqueurs mésenchymateux que nous avons observés sur ponction biopsies rénales humaines, nous avons monitoré l'expression de ces marqueurs par immunofluorescence et par RT-qPCR.

En immunofluorescence, nous avons observé une augmentation de l'expression des marqueurs SNAIL et Vimentine en condition hypoxique (Fig 32-A). Cette induction des marqueurs mésenchymateux était accompagnée par une perte de l'expression membranaire du marqueur épithélial E-Cadhérine (Fig 32-A) et par une augmentation de l'expression de MUC1 (Fig 32-A). Après 7 jours de réoxygénation, l'expression de l'ensemble des marqueurs était similaire aux conditions normoxiques (Fig 32-A). L'évolution de l'expression relative de ces marqueurs par RT-qPCR était concordante avec nos observations sauf pour l'E-cadhérine pour laquelle nous n'observons pas de diminution d'expression après hypoxie (Fig32-B).



**Figure 32 : Etude de l'expression des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux dans les cellules proximales soumis à l'hypoxie / réoxygénation.** (A) Par immunofluorescence, on met en évidence une induction des marqueurs mésenchymateux SNAIL, Vimentine et une baisse de l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine dans les cellules épithéliales tubulaires cultivées en condition hypoxique. Ce changement de phénotype s'accompagne d'une néoexpression de MUC1. Après une période de 7 jours de réoxygénation, l'expression de l'ensemble des marqueurs redevient similaire à ce qui est observé en culture normoxie. (B) Par

RT-qPCR, on met en évidence une augmentation de l'expression relative des gènes *Muc1*, *Snail* et *Vimentine* en condition hypoxique.

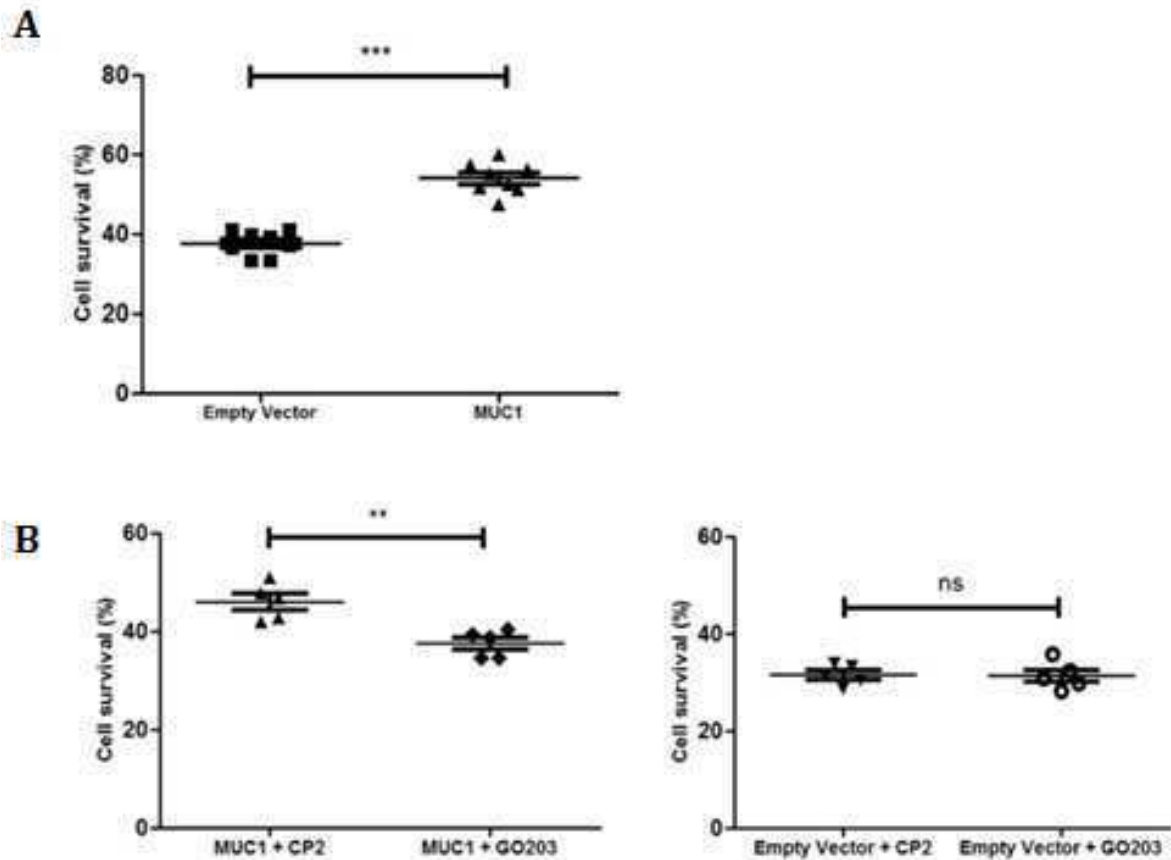
### **3- MUC1 et anoïkis**

Le mécanisme predominant de mort cellulaire au cours de l'agression ischémique est l'apoptose (Havasi *et al.*, 2011). Nous avons vu qu'une partie des cellules épithéliales tubulaires ont une plasticité épithéliale plus importante liée à l'expression de certains marqueurs mésenchymateux. Une autre caractéristique de ces cellules est leur capacité à résister à la mort par apoptose. L'anoïkis est une forme de mort cellulaire provoquée par le détachement des cellules épithéliales à la membrane basale. Elle partage les mêmes mécanismes intrinsèques de l'apoptose (Reginato *et al.*, 2003).

Nous avons fait l'hypothèse que MUC1 pouvait être impliqué dans cette résistance à l'anoïkis. Pour tester notre hypothèse, nous avons utilisé des cellules HEK-293 transfectées avec un vecteur d'expression codant pour MUC1 ou un vecteur vide. L'anoïkis était induite en cultivant les cellules sur un milieu ne permettant pas l'adhérence des cellules. Le pourcentage de survie cellulaire était établie en cytométrie de flux avec un kit Annexin V / IP.

Nous avons observé que les cellules transfectées avec un vecteur d'expression codant pour MUC1 résistaient mieux à l'anoïkis comparativement aux cellules transfectées avec un vecteur vide (Fig 33-A). Pour vérifier le rôle de MUC1 dans ces résultats, les cellules ont été traitées avec du GO-203 et le peptide contrôle CP2. Le GO-203 permet d'inhiber la dimérisation de MUC1 à la membrane et donc la transduction du signal. En traitant les cellules avec du GO-203, on observait une perte de la protection conférée par l'expression de MUC1 alors que le traitement était sans effet sur les cellules transfectées avec le vecteur vide (Fig 33-B).





**Figure 33 : Influence de MUC1 sur la survie cellulaire à l'anoïkis.** (A) Lorsque les cellules HEK-293 sont transfectées avec un vecteur d'expression de MUC1 elles présentent une résistance accrue à la mort par anoïkis comparativement aux cellules transfectées avec un vecteur vide. (B) Le traitement des cellules HEK-293 exprimant MUC1 avec le GO-203, un composé empêchant la dimérisation de MUC1 et la transmission du signal dans la cellule, diminue la survie à l'anoïkis comparativement à un traitement avec le peptide contrôle CP2. Sur les cellules n'exprimant pas MUC1, on ne met pas en évidence de différence entre les groupes traités par GO-203 ou CP2.

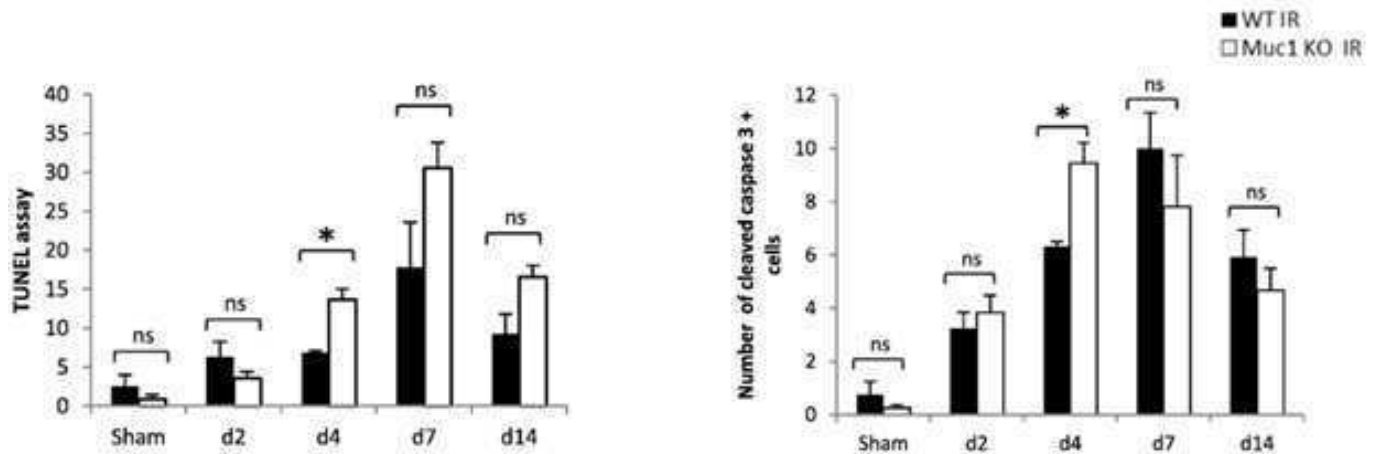
#### 4- Modèle murin d'IR

##### 4-1 Expression de MUC1 et mort cellulaire

Nos résultats *in vitro* suggérant un rôle protecteur de l'expression de MUC1 vis-à-vis de la mort par apoptose, nous avons étudié l'apoptose sur les tissus murins dans le modèle d'IR à l'aide d'une technique TUNEL et par technique immunohistochimique avec un anticorps anti-caspase 3 clivée.

Nous avons pu montrer qu'à J4 après l'IR, on retrouvait un nombre de cellules tubulaires en apoptose plus important dans les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> comparativement aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup> avec les deux techniques (Fig 34). Aux autres temps, il n'y avait pas de différence statistiquement

significative bien qu'une tendance similaire se dégagait à J7 avec la technique TUNEL (Fig 34).



**Figure 34 : Rôle de Muc1 sur la mort cellulaire dans le modèle murin d'IR.** En marquant les cellules en apoptose à l'aide d'un essai TUNEL ou bien d'une immunohistochimie avec un anticorps dirigé contre la caspase 3 clivée, on observe significativement plus de cellules en apoptose à J4 après IR dans le groupe KO *Muc1* comparativement aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup>.

#### 4-2 Expression des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux au cours de l'IR

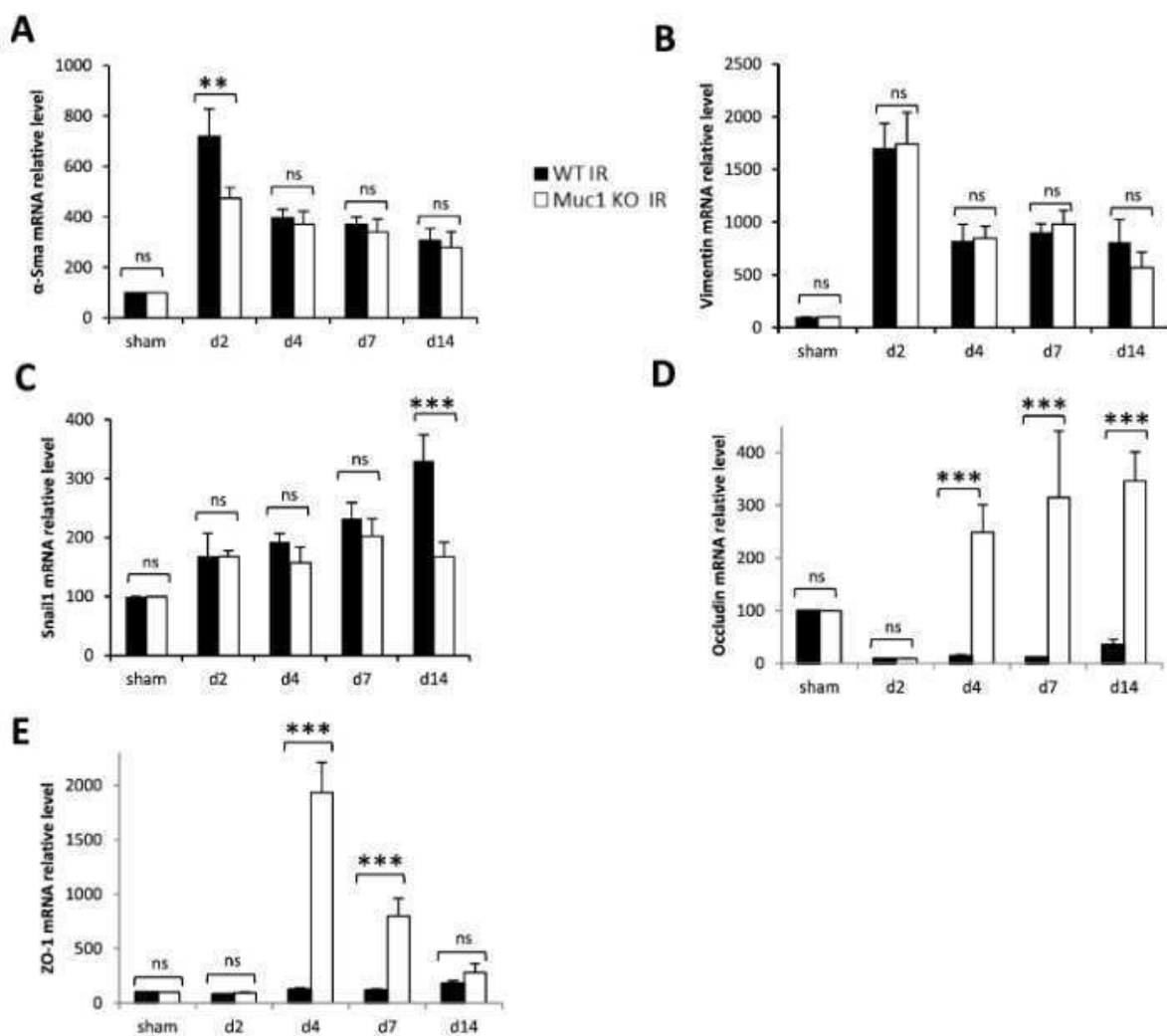
A la fois sur les biopsies rénales de patients et sur les cellules en culture, nous avons pu observer une induction concomitante des marqueurs mésenchymateux et de MUC1 dans les cellules épithéliales proximales soumises à une agression hypoxique ou ischémique. Pour déterminer si MUC1 a une influence sur le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, nous avons comparé l'expression des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux par RT-qPCR entre les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 35 A à E).

##### 4-2-1 Au cours des temps précoces (7 premiers jours après l'agression)

Après l'IR, l'expression relative des marqueurs épithéliaux Occludine et ZO-1 est significativement plus importante dans le groupe des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> comparativement aux souris WT sacrifiées aux 4<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours après l'agression (Fig 35 D et E). Concernant l'expression des marqueurs mésenchymateux, seule l'actine muscle lisse est significativement augmentée dans les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> à J2 après IR (Fig 35 A).

#### 4-2-2 Au cours des temps tardifs (J14 après l'agression)

A J14, on observe une augmentation significative de l'expression de Snail1 dans le groupe des souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et un maintien de l'expression accrue de l'Occludine dans les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> (Fig 35 C et D).



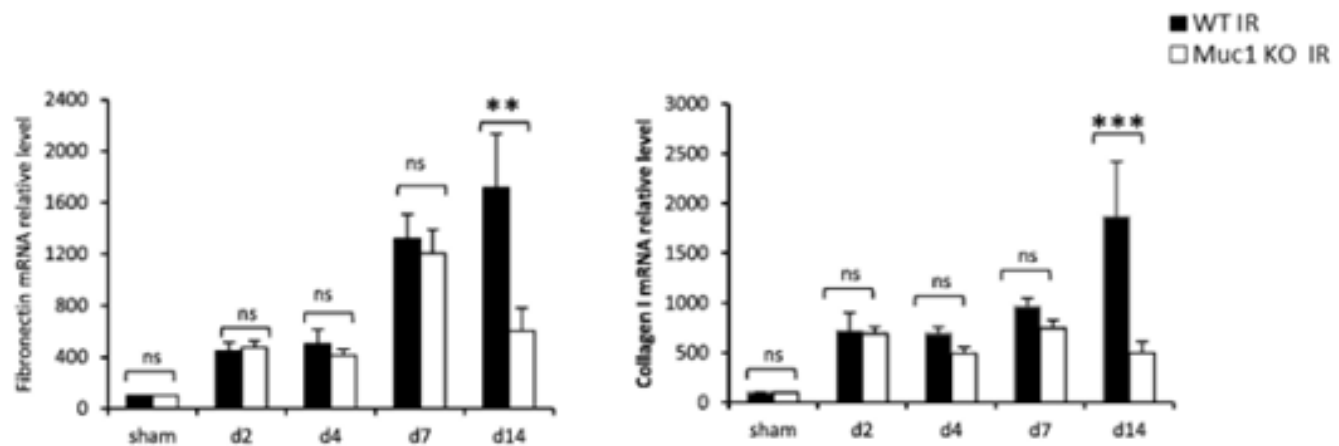
**Figure 35 : Etude des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux dans le modèle murin d'IR.** Au cours des temps précoces après IR, on observe une augmentation de l'expression relative par RT-qPCR de l'actine muscle lisse (A) puis d'une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux : occludine (D) et Zo-1 (E) dans les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> comparativement aux souris *Muc1*<sup>-/-</sup>. A un temps plus tardif (J14), il persiste une expression relative de Snail plus importante des souris *Muc1*<sup>+/+</sup> associée à une plus faible expression de l'occludine. Aucune différence significative n'est observée avec la sonde Vimentine aux différents temps.

#### 4-3 MUC1 et fibrose

Les travaux antérieurs de notre équipe ont montré le rôle néphroprotecteur de l'expression de MUC1 dans le modèle murin d'IR au cours des temps précoces. En se basant sur

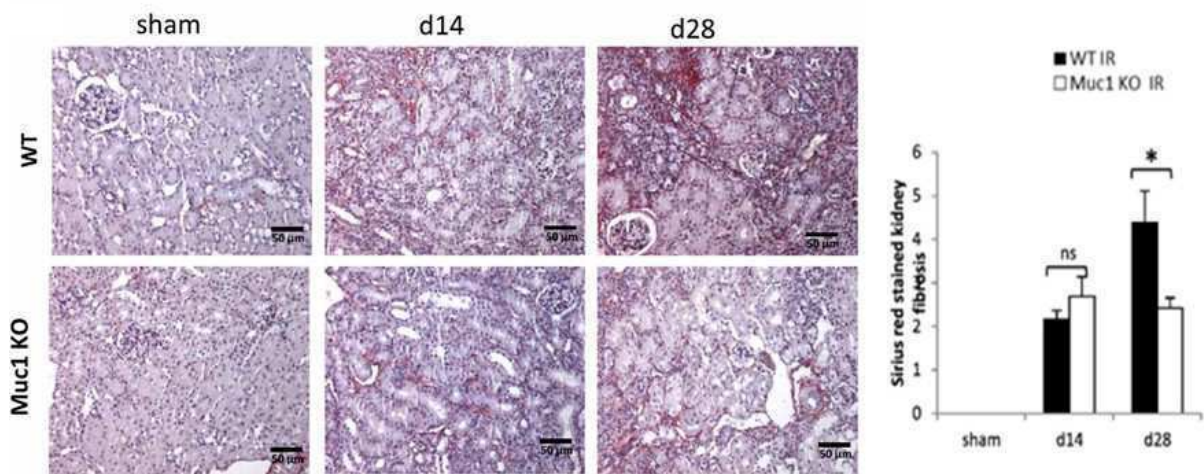
l'hypothèse que la régénération rénale et le développement de la fibrose partagent des mécanismes physiopathologiques communs et étant donné la persistance des modifications de l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux aux temps tardifs, nous avons comparé l'évolution vers la chronicité de nos deux groupes de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>.

Nous avons tout d'abord observé par RT-qPCR l'expression relative de deux gènes impliqués dans le développement de la fibrose : la fibronectine et le collagène I. Nous avons montré que le groupe de souris WT avait une expression significativement plus importante de ces deux marqueurs par rapport aux souris *Muc1*<sup>-/-</sup> à J14 après l'IR (Fig 36).



**Figure 36 : Etude de l'expression relative des marqueurs de fibrose dans le modèle murin d'IR.** Aux temps tardifs après l'IR, on met en évidence une expression relative significativement augmentée de la fibronectine et du collagène I dans les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> comparativement aux souris *Muc1*<sup>-/-</sup>.

Par la suite, en quantifiant la fibrose sur une coloration du rouge Sirius à l'aide du logiciel d'analyse d'images Mercator, nous avons montré que ces changements transcriptionnels s'accompagnaient effectivement d'une fibrose plus sévère à J28 après l'IR dans le parenchyme rénal des souris *Muc1*<sup>+/+</sup> par rapport aux souris *Muc1*<sup>-/-</sup> (Fig 37)



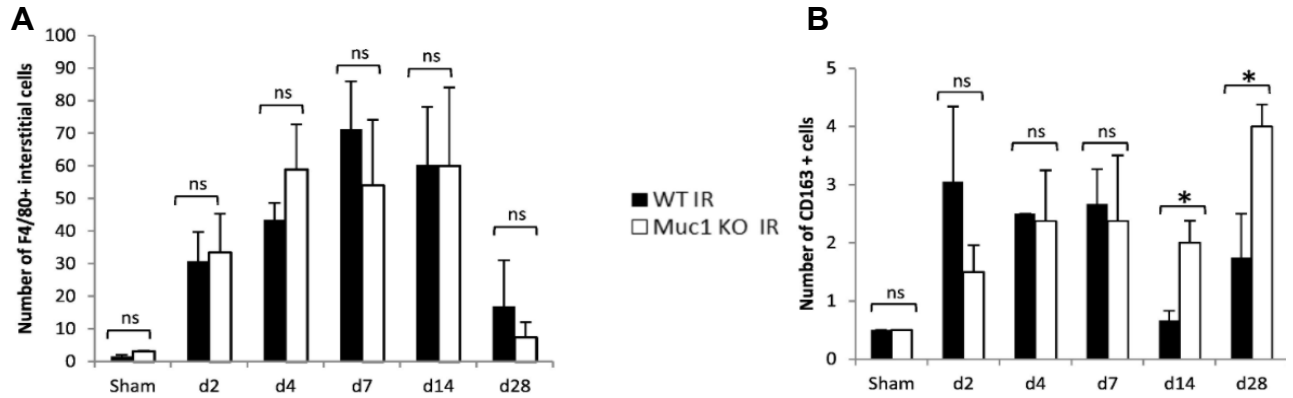
**Figure 37 : Quantification de la fibrose dans le modèle murin d'IR.** En utilisant la coloration du rouge Sirius pour marquer la fibrose et le logiciel Mercator pour quantifier le signal, on observe l'installation d'une fibrose significativement plus importante dans les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> comparativement aux souris *Muc1*<sup>-/-</sup>.

#### 4-4 Rôle de MUC1 dans l'inflammation chronique

Un des mécanismes majeur dans la transition d'une agression aiguë vers la fibrose est la persistance d'un environnement inflammatoire. A ce titre, l'implication des macrophages a été bien démontrée dans la littérature (Lee *et al.*, 2011).

Dans notre modèle, nous avons donc quantifié l'expression immunohistochimique du marqueur pan-macrophagique F4/80 entre nos deux groupes de souris. Que ce soit pendant les temps précoces ou tardifs post-IR, nous n'avons pas observé de différence significative du nombre total de macrophages entre les deux groupes (Fig 38-A).

En revanche, en utilisant un anticorps anti-CD163 qui cible plus spécifiquement les macrophages de type M2, nous avons pu observer à J14 et à J28 une infiltration significativement plus importante de ce type cellulaire dans les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 38-B).



**Figure 38 : Etude immunohistochimique des marqueurs macrophagiques F4/80 et CD163 dans le modèle murin d'IR.** (A) L'analyse de l'expression du marqueur pan-macrophagique F4/80 dans le cortex rénal ne met pas en évidence de différence entre les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>. Comparativement aux souris sham, on met en évidence un afflux de macrophages dès J2 et qui se poursuit jusqu'aux temps tardifs. (B) Lorsque l'on étudie le marqueur CD163, plus spécifique des macrophages anti-inflammatoires (ou M2), on met en évidence une plus forte représentation de ce type de macrophages à J28 après IR dans les souris *Muc1*<sup>-/-</sup>.

## Partie 2

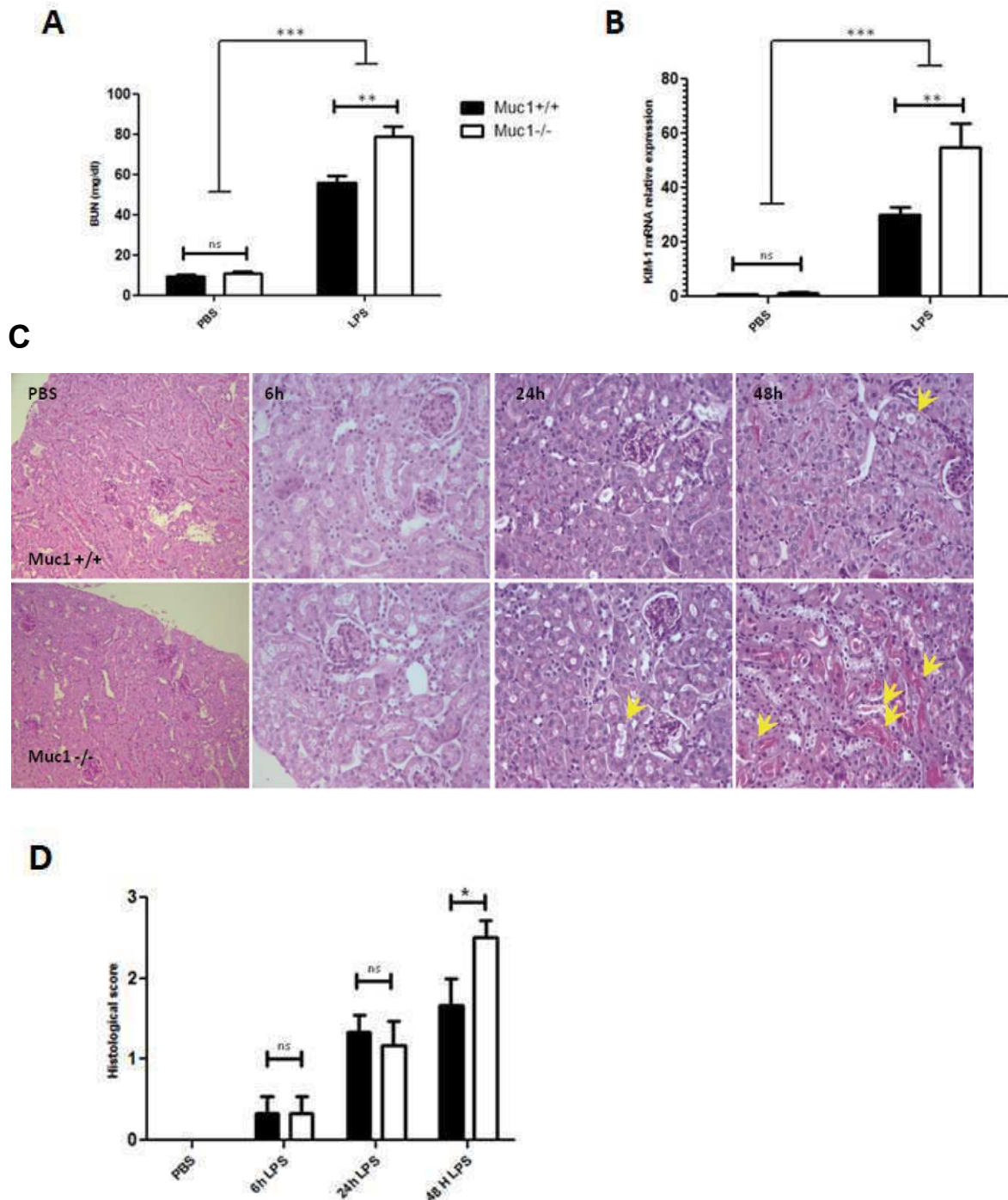
### 1- Rôle néphroprotecteur de MUC1 dans le modèle d'injection de LPS

Des souris C57BL/6 WT *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> ont été soumises au protocole d'injection intrapéritonéale de LPS ultrapure d'*Escherichia coli* de serotype 0111:B4 à la dose de 10 mg/kg. Les souris étaient mises à mort à différents temps (6h, 24h, 48h) afin de caractériser les lésions histologiques. Par ailleurs à 24h après l'injection, un prélèvement sanguin était réalisé pour évaluer la réponse fonctionnelle rénale. Une injection de PBS stérile était utilisée pour le groupe contrôle.

Comme rapportée dans la littérature (Copeland *et al.*, 2015), notre modèle induit un état septique caractérisé par des frissons, une sudation importante, une respiration accélérée et une baisse de l'activité pendant environ 24h après l'injection chez les souris. Aucune différence de comportement ou de mortalité n'a été observée entre les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>. Aux doses utilisés, les souris ne présentent plus d'altération d'état ni de comportement entre la 36 et 48h après l'injection.

La mesure de l'urée plasmatique (BUN) montre que notre modèle induit une insuffisance rénale aiguë (Fig 39-A). Lorsque l'on compare les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>, le taux plasmatique de BUN dans les groupes contrôles sont superposables. En revanche à 24h après l'injection de LPS, les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> présentent une altération rénale fonctionnelle significativement plus importante que les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 39-A). En faveur de ce résultat, l'expression relative du facteur de souffrance rénale *Kim-1* était augmenté dans les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 39-B).

Malgré ces différences fonctionnelles, l'analyse histologique des reins récupérés à 24h de l'injection ne permettait pas d'observer de différence significative entre les deux groupes traités. Les dommages tubulaires étaient très discrets avec seulement de rares images d'altération focale de la bordure en brosse au niveau des tubes proximaux (Fig 39-C). Afin de mieux caractériser la cinétique des lésions histologiques rénales dans ce modèle, nous avons également étudié les reins de souris sacrifiées à 6h et 48h. A 6h, les reins étaient totalement dépourvus de lésions dans les deux groupes traités. En revanche à 48h, des altérations tubulaires un peu plus importantes étaient visualisées dans les deux groupes. Elles étaient caractérisées par la présence de cylindres intra-tubulaires, d'une diminution de la hauteur épithéliale et par une desquamation de la partie apicale des cellules. La comparaison des scores histologiques a permis de confirmer que les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> présentaient significativement plus de lésions que les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 39-C).



**Figure 39 : Comparaison de la réponse rénale entre les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup> dans le modèle d'IRA septique par injection de LPS (A) L'injection de LPS induit une augmentation du taux plasmatique de l'urée (BUN). Par ailleurs, les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> ont une atteinte rénale plus sévère que les souris *Muc1*<sup>+/+</sup>. (B) L'expression de Kim-1 déterminée par sonde Taqman en RT-qPCR était également significativement plus augmentée dans les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> que *Muc1*<sup>+/+</sup> à 24h de l'injection. (C) Photographies représentatives des altérations morphologiques tubulaires au cours de l'IRA septique à 6h, 24h et 48h (Grandissement: x100). Les lésions de nécrose tubulaire aiguë sont discrètes et visibles à partir de la 24h, elles consistent en une desquamation apicale des cellules épithéliales tubulaires, une vacuolisation cytoplasmique, une diminution de la**



hauteur épithéliale et l'apparition de cylindres intra-tubulaires (D) A 48h, les lésions de souffrance tubulaire étaient significativement plus importantes dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup>. ns : non significatif, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

L'activation de la voie NF-κB dans les cellules épithéliales tubulaires est associée au degré de souffrance rénale dans de nombreux modèles d'IRA (Markó *et al.*, 2016). Afin d'étudier ce mécanisme dans le modèle d'IRA induite par le sepsis, nous avons comptabilisé l'expression nucléaire de la p65 phosphorylée (faisant partie du complexe NF-κB) au sein des cellules épithéliales tubulaires. Contrairement aux lésions histologiques, nous avons pu observer que la translocation nucléaire de p65 était un événement précoce et précédait la mise en place des lésions histologiques. A 6h après l'injection, nos résultats montrent que les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> présentent une expression nucléaire tubulaire significativement plus importante de p65 en accord avec la constitution de dommages tubulaires plus importants à 48h (Fig 40).

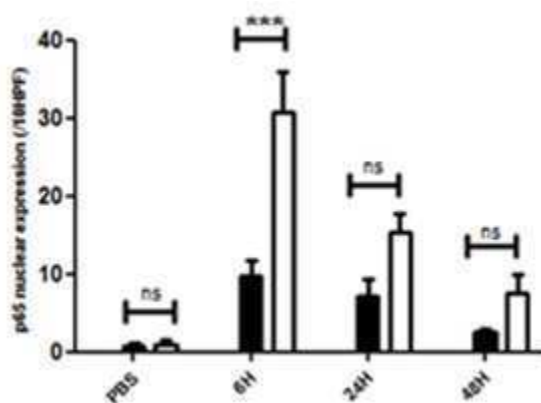
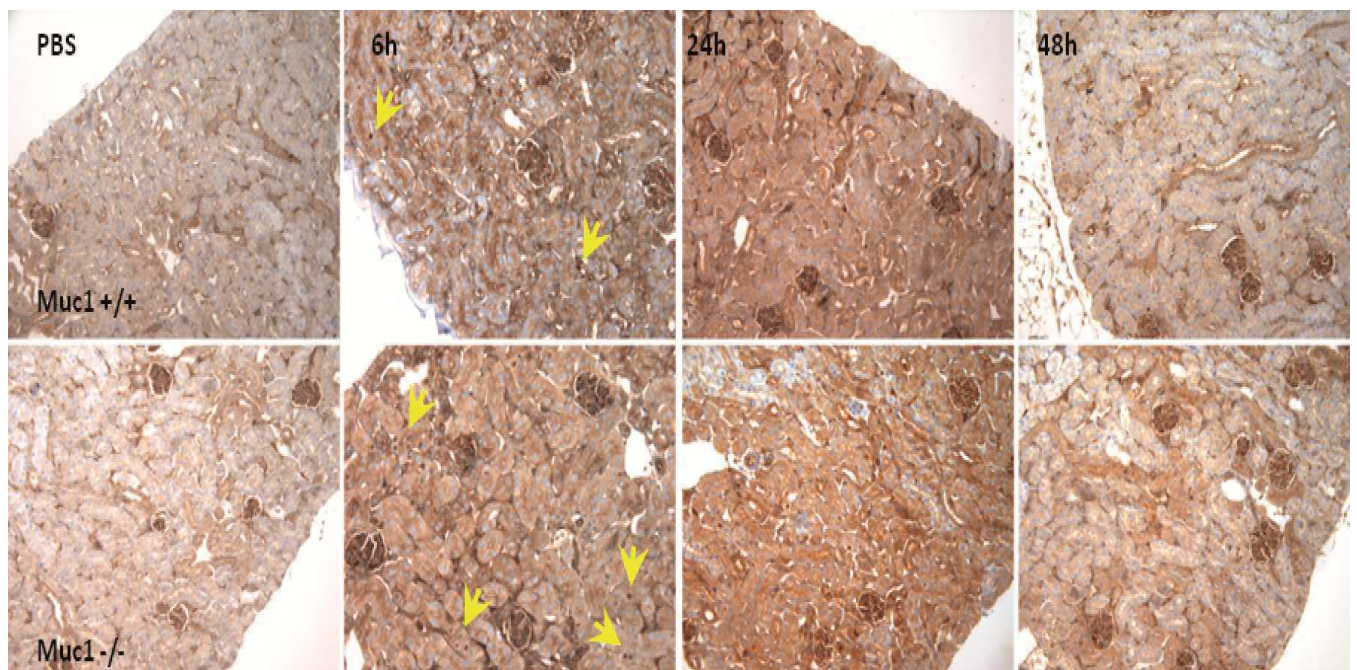
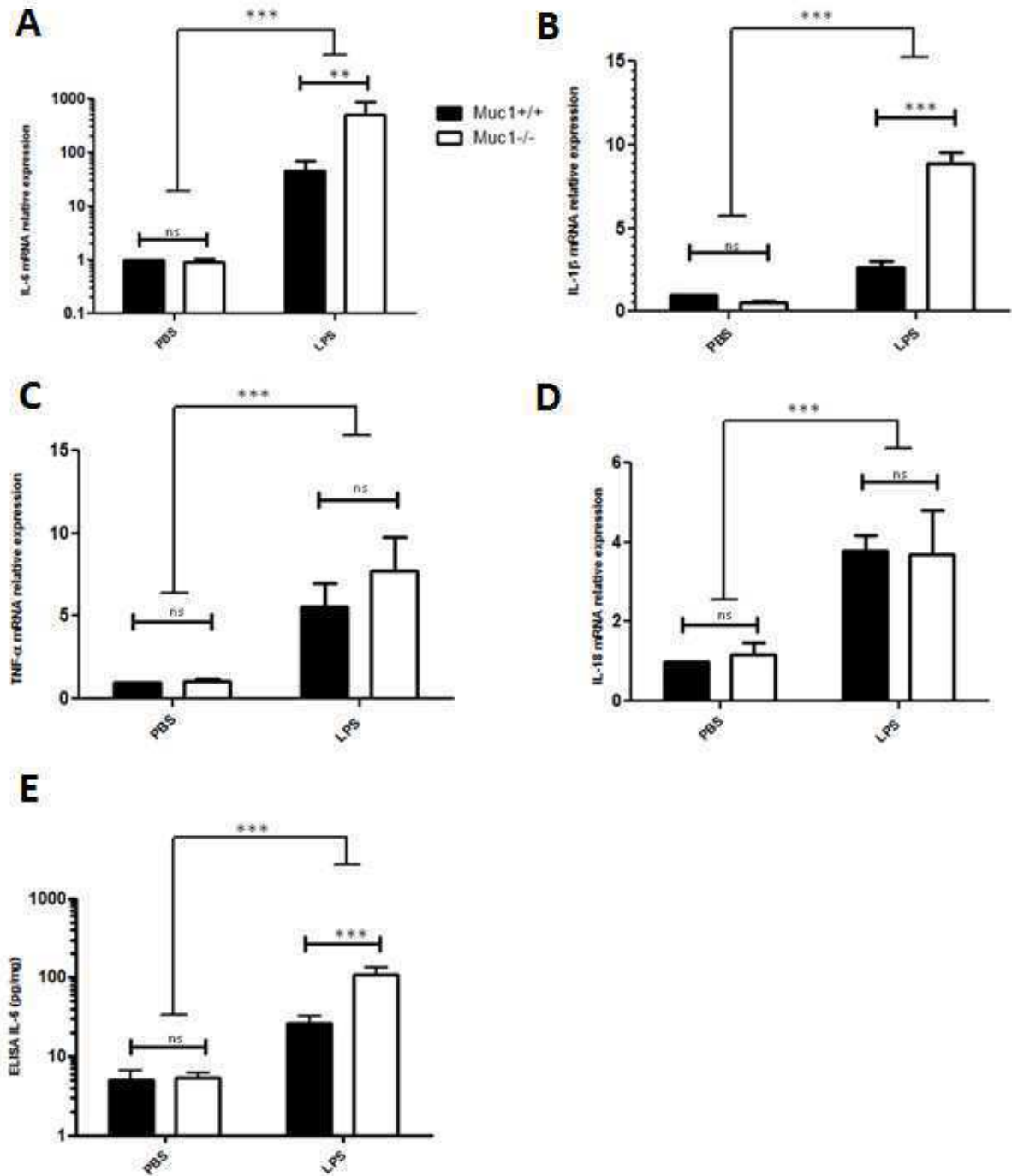


Figure 40 : Comparaison de la l'expression de la forme phosphorylée de la sous-unité p65 dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>. Photographies représentatives de l'étude immunohistochimique avec un

anticorps anti-p65 (phosphorylé) à 6h, 24h et 48h après injection de LPS (Grandissement: x100). Le score immunohistochimique dépendait du nombre de noyaux de cellules épithéliales tubulaires marqués. A 6h, la translocation nucléaire de la forme phosphorylée de p65 étaient significativement plus importantes dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> suggérant une activation plus marquée de la voie Nf-kB dans ces souris. ns : non significatif, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

## **2- Rôle anti-inflammatoire de MUC1 dans le modèle d'injection de LPS**

L'IRA septique se caractérise par un état pro-inflammatoire en réponse à l'activation de la voie du TLR4 par le LPS. Nous avons étudié par RT-qPCR l'expression de diverses cytokines pro-inflammatoires (Il-6, Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il18) dans notre modèle. Comme attendu, à 24h de l'injection de LPS, les souris traitées expriment de manière significativement plus importante les cytokines pro-inflammatoires que les souris contrôles (Fig 41- A,B,C,D). Par ailleurs, lorsque l'on compare les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>, on met en évidence une expression plus importante des cytokines *Il-6* et *Il-1 $\beta$*  dans les souris KO *Muc1* (Fig 41- A,B,C,D). Ce résultat est en faveur d'un rôle de *Muc1* dans la régulation de la réponse inflammatoire en réponse au sepsis. Afin de confirmer ce résultat au plan protéique, nous avons réalisé un ELISA sur les reins récupérés à 24h et montré que le taux de cytokines était plus élevé dans les reins des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 41- E).

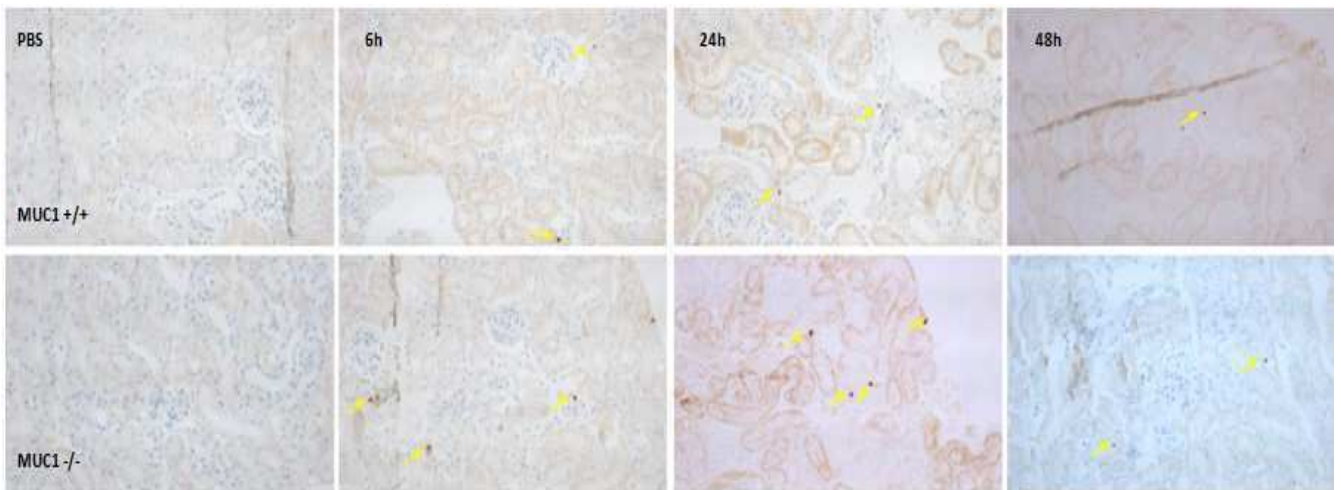


**Figure 41 : Comparaison de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>.** A partir des reins totaux, l'expression relative des cytokines *Il-6*, *Tnf- $\alpha$* , *Il-18* et *Il-1 $\beta$*  a été déterminée par sonde Taqman en RT-qPCR à 24 h de l'injection de LPS (A à D). Ces résultats confirment la présence d'une réponse inflammatoire marquée au LPS. La comparaison entre les deux groupes de souris traitées montre une expression significativement plus importantes des cytokines IL-6 et IL-1 $\beta$  dans les souris *Muc1*<sup>-/-</sup>. La sécrétion plus marquée d'IL-6 était également retrouvée par technique ELISA sur extraits de reins \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

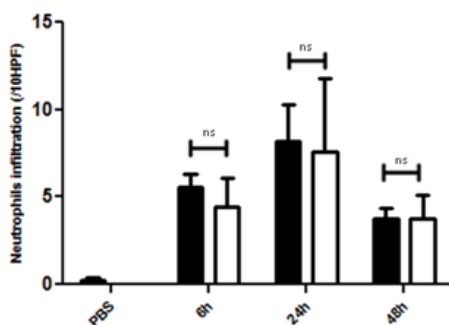
### 3- Etude des populations inflammatoires dans le modèle d'injection de LPS

L'activation de la voie du TLR4 au niveau des cellules endothéliales induit l'expression de protéines favorisant le recrutement tissulaire rénal de leucocytes. En particulier, ICAM-1 est important dans le recrutement de polynucléaires neutrophiles qui survient dans les 48h premières heures après l'injection de LPS. Nous avons donc voulu rechercher et quantifier l'infiltrat tissulaire de polynucléaires neutrophiles dans les reins de souris *Muc1+/+* et *Muc1-/-* après injection de LPS. Pour se faire, nous avons utilisé le marqueur immunohistochimique NIMP-R14 qui marque de manière spécifique les polynucléaires neutrophiles. Nous avons pu observer un très discret recrutement de polynucléaires neutrophiles dans les capillaires péri-tubulaires et dans les anses capillaires des glomérules après injection de LPS (Fig 42- A). Le plus fort degré d'infiltration était observé à 24h après injection de LPS. Toutefois, en comparant les deux groupes traités, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative. Afin de vérifier que ce résultat était concordant avec l'expression d'ICAM-1, nous avons comparé l'expression relative de ce gène entre les souris *Muc1-/-* et *Muc1+/+* et confirmé l'absence de différence entre les deux groupes traités (Fig 42- B).

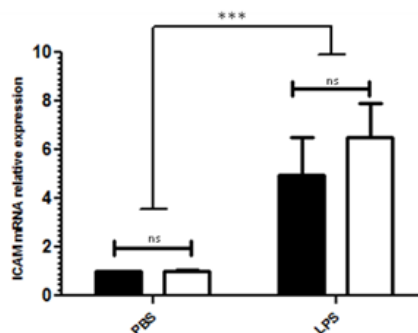
**A**



**B**



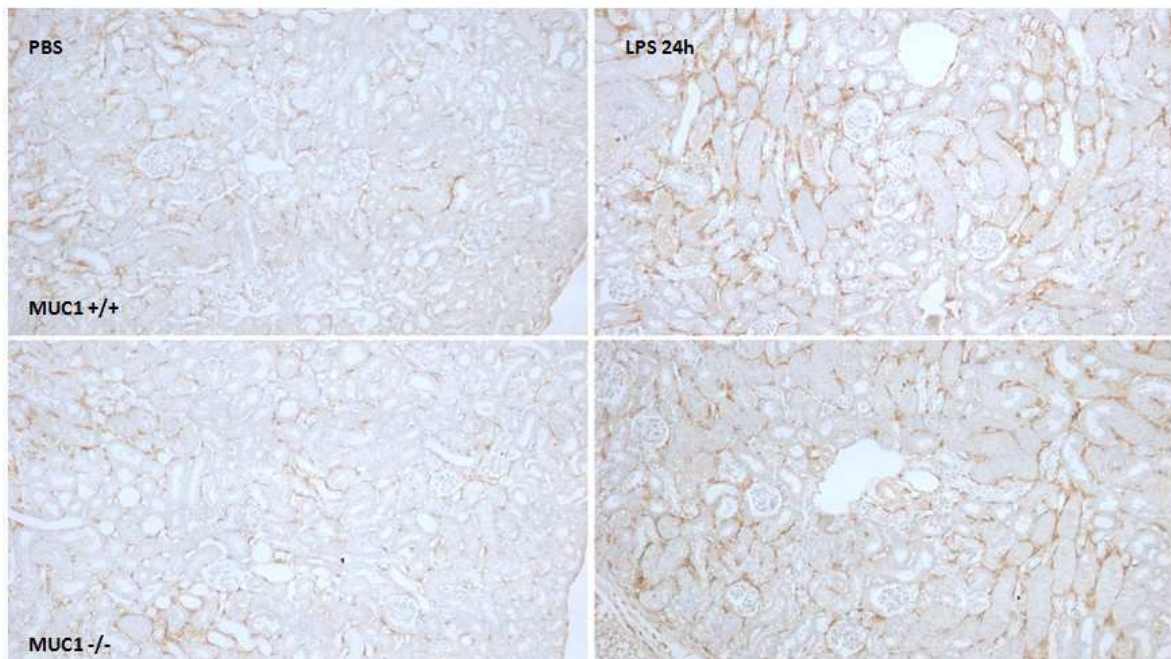
**C**

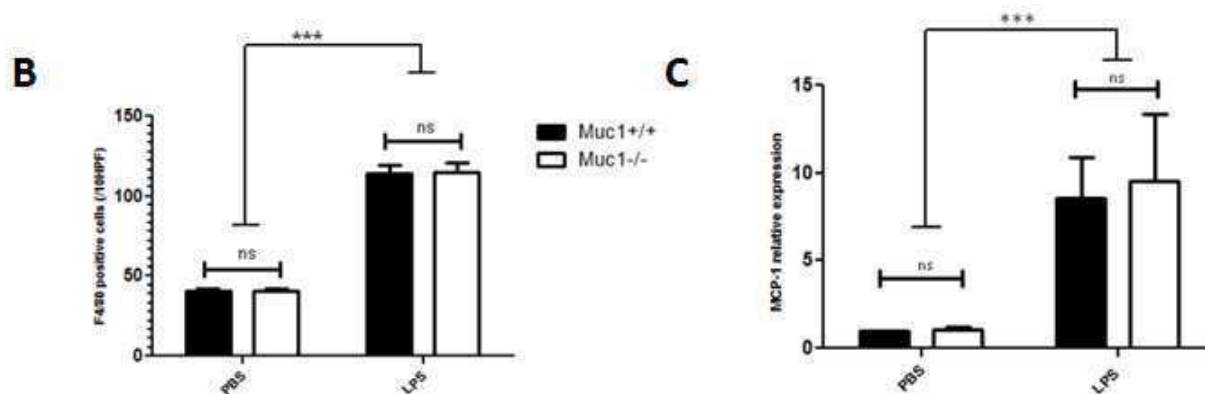


**Figure 42 : Etude de l'infiltration de polynucléaires neutrophiles dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>.** (A) Photographies représentatives de l'étude immunohistochimique avec un anticorps anti-NIMP-R14, marqueur de polynucléaires neutrophiles murins à 6h, 24h et 48h après injection de LPS (Grandissement: x200). De rares cellules marquées sont visibles dans les capillaires péri-tubulaires et dans les anses glomérulaires dès la 6<sup>ème</sup> heure. Il n'est pas mis en évidence de différence entre les deux groupes de souris traitées aux différents temps (B). Par ailleurs, l'étude de l'expression relative du gène ICAM1 par RT-qPCR à 24h de l'injection de LPS ne permettait pas d'observer de différence significative entre souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> (C). ns : non significatif, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

Les macrophages jouent un rôle prépondérant dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires dans le modèle d'IRA septique par injection de LPS. Afin de visualiser l'infiltration de cellules macrophagiques dans le parenchyme rénal, nous avons utilisé un anticorps anti-F4/80. Nous avons observé qu'à 24h suivant l'injection, une importante population macrophagique était présente dans le cortex comparativement aux souris contrôles (Fig 43- A). La comparaison des souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux groupes traitées par LPS (Fig 42- B). Le recrutement des macrophages étant principalement médié par la sécrétion de la chémokine MCP-1 par les cellules épithéliales tubulaires (Viedt *et al.*, 2002), nous avons étudié l'expression relative du gène *Mcp-1*. Malgré une induction nette à 24h de l'injection de LPS, aucune différence significative n'était observée entre les deux groupes traités (Fig 43- C).

**A**





**Figure 43 : Etude de l'infiltration de macrophages dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>.** (A) Photographies représentatives de l'étude immunohistochimique avec un anticorps anti-F4/80, marqueur de macrophages murins 24h après injection de LPS (Grandissement: x200). L'injection de LPS induit un recrutement important de macrophages au sein du cortex rénal. Un score immunohistochimique n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les deux groupes de souris traitées (B). Par ailleurs, l'étude de l'expression relative de la chémokine MCP-1/CCL2 par RT-qPCR à 24h de l'injection de LPS ne permettait pas d'observer de différence significative entre souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> (C). ns : non significatif, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

#### 4- MUC1 et polarisation des macrophages

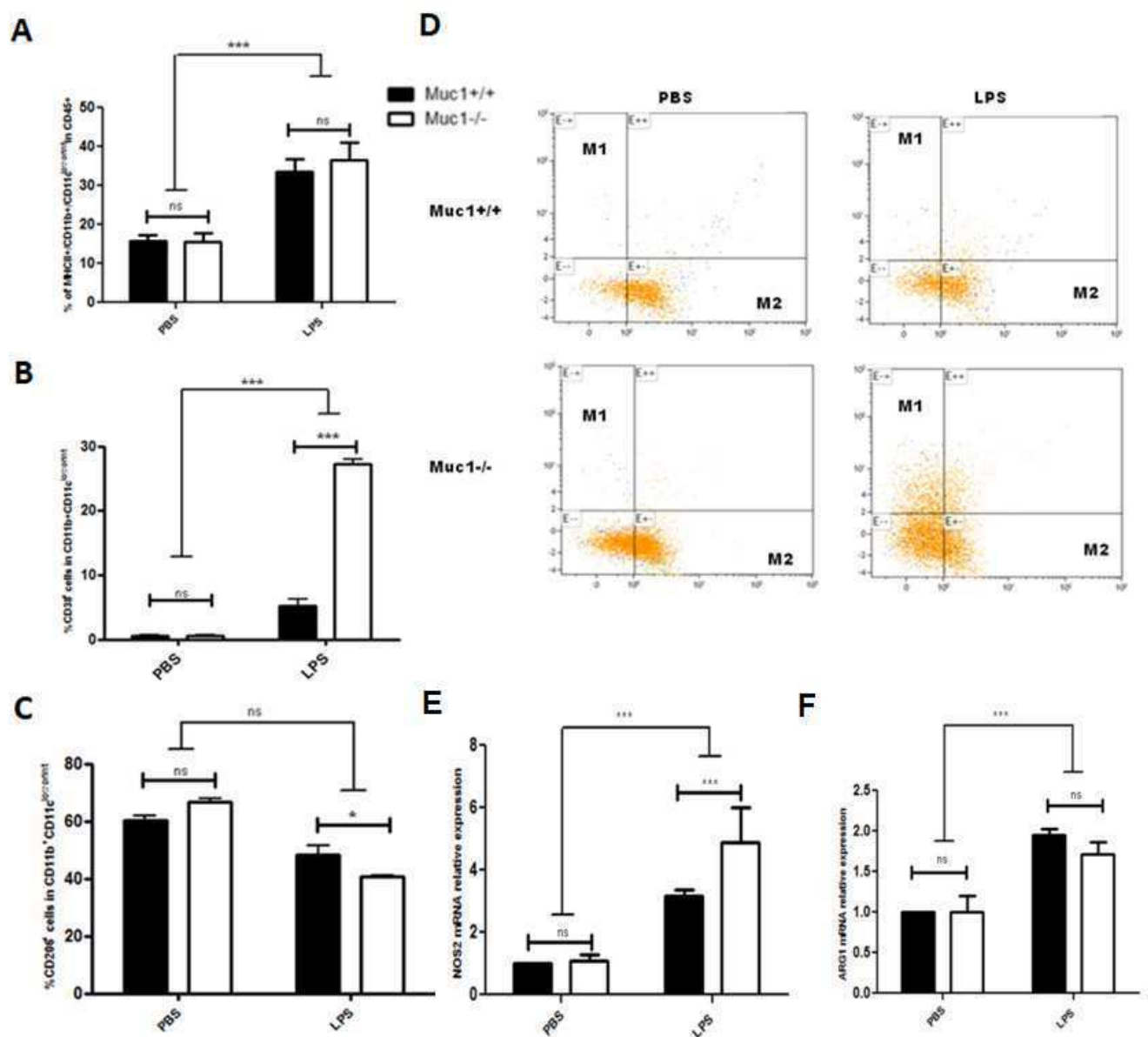
Afin de mieux caractériser le phénotype des cellules macrophagiques au sein du parenchyme rénal, nous avons construit un panel en cytométrie de flux pour isoler les macrophages et étudier l'expression des marqueurs membranaires CD38 et CD206 qui sont respectivement spécifiques des macrophages pro-inflammatoires M1 et des macrophages anti-inflammatoires M2 (Jablonski *et al.*, 2015).

Dans le rein, il est difficile de discriminer les populations de cellules macrophagiques et de cellules dendritiques qui expriment en commun de nombreux marqueurs (Rogers *et al.*, 2014). L'équipe de Kawakami *et coll.* a montré que 5 principales populations de cellules présentatrices d'antigènes dans le rein pouvaient être discriminées à partir des niveaux d'expression du CD11b et du CD11c (Kawakami *et al.*, 2013). Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier les cellules exprimant CD11b avec des niveaux faibles ou intermédiaires de CD11c (une expression forte du CD11c étant plutôt caractéristique des cellules dendritiques) afin d'avoir une large représentativité des populations macrophagiques (Kawakami *et al.*, 2013).

Nous avons observé, à 24h de l'injection de LPS, un recrutement de macrophages exprimant le marqueur M1 CD38 dans les deux groupes de souris traitées par LPS comparativement au contrôle (Fig 44- A, B, D). Par ailleurs, le pourcentage de macrophages CD38<sup>+</sup> était significativement plus important dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> que dans les reins de souris

*Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 44- B). Le pourcentage de macrophages CD206<sup>+</sup> suivait une tendance inverse après l'injection de LPS et était significativement plus important dans les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 44-C).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié par RT-qPCR, dans le rein total, l'expression relative des gènes *Nos2* et *Arg1* qui sont respectivement associés au phénotype M1 et M2 des macrophages (Fig 44- E, F). En accord avec les résultats de cytométrie, nous avons retrouvé une expression plus importante du gène *Nos2* dans les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> alors qu'il n'y avait pas de différence significative de l'expression relative du gène ARG1 dans les deux groupes traités (Fig 44-E, F).



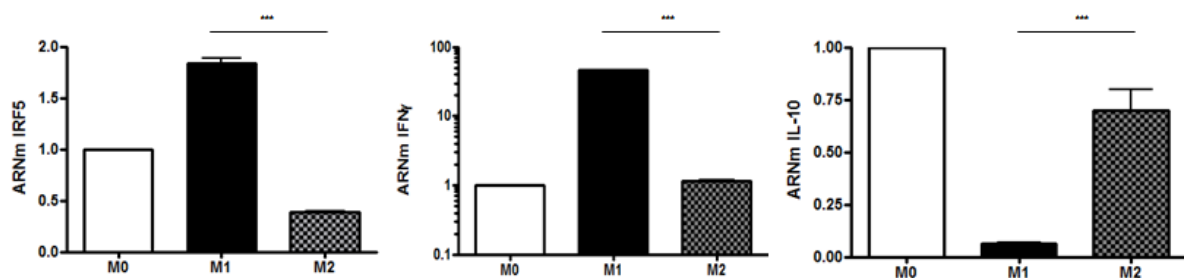
**Figure 44 : Caractérisation du phénotype des macrophages dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup> à 24h d'une injection de LPS.** (A) Une étude en cytométrie en flux était réalisée afin d'isoler les cellules macrophagiques présentant un phénotype CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>low/inter</sup> (cf partie méthodes : stratégie d'analyse en

cytométrie de flux). L'étude des marqueurs CD38 et CD206 (respectivement des marqueurs de macrophages M1 et M2) permettait d'observer un afflux de macrophages pro-inflammatoires M1 après l'injection de LPS (B,D). De plus, dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup>, on observait significativement plus de macrophages de phénotype M1 quand les reins de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (B). Inversement le pourcentage de macrophages exprimant CD206 était légèrement moins important dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> (C). Expression relative des gènes *Nos2* et *Arg1* par RT-qPCR dans les deux populations de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>. ns : non significatif, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

## 5- Etude de l'expression de MUC1 dans les macrophages humains et murins

### 5-1 Macrophages humains

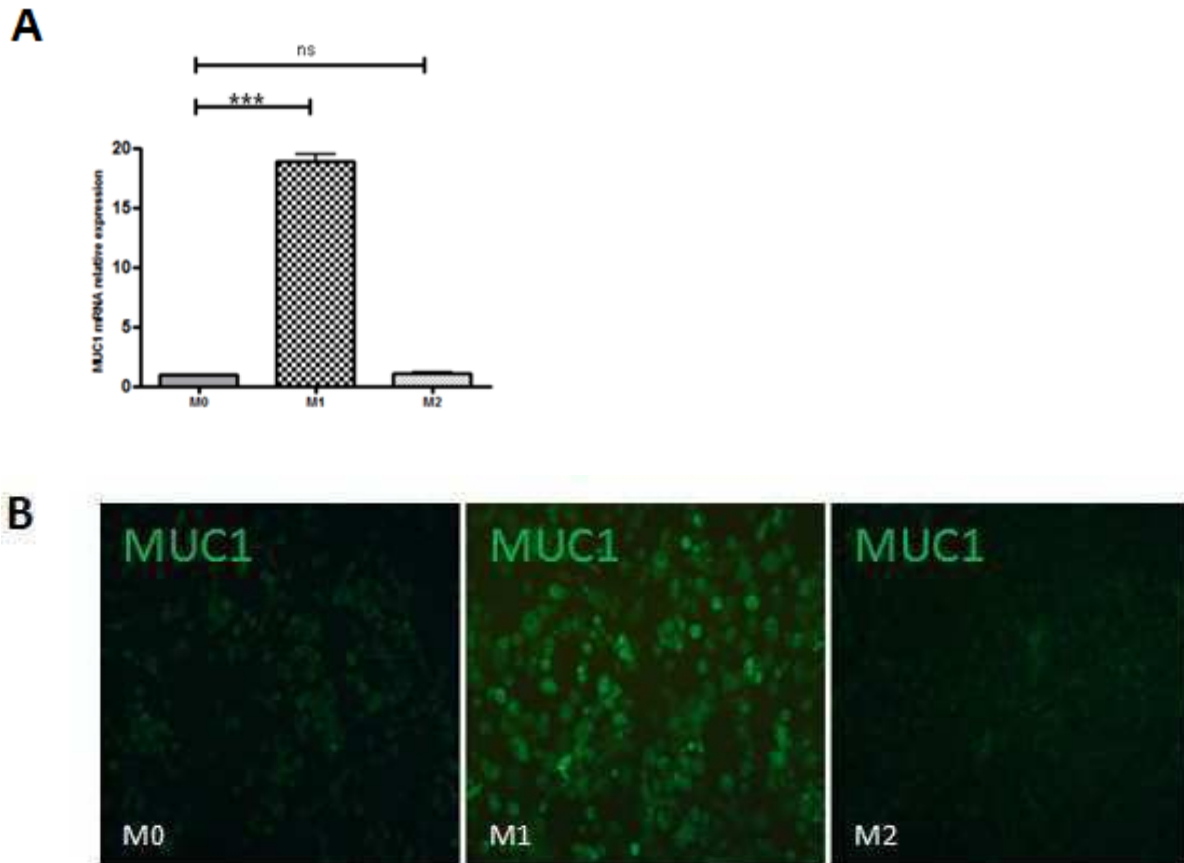
Afin d'étudier l'expression de MUC1 dans les différentes populations de macrophages, nous avons différencié en macrophages des monocytes obtenus par élutriation de cellules mononuclées du sang périphérique à l'aide de M-CSF ou de GM-CSF. Les macrophages ainsi obtenus ont ensuite été polarisés *in vitro* vers un phénotype M1 en présence de LPS et d'IFN- $\gamma$  ou vers un phénotype M2 en présence d'IL-4 et d'IL-13. Des macrophages non stimulés (M0) étaient utilisés comme contrôle. Un contrôle de la polarisation était effectué par RT-qPCR en étudiant l'expression de gènes associés au phénotype M1 (*IRF5*, *IFN*) ou M2 (*IRF4*, *IL10*) dans la littérature (Fig 45) (Murray *et al.*, 2017).



**Figure 45 : Contrôle de la polarisation *in vitro* des macrophages humains.** Afin d'induire un phénotype M1 les cellules macrophagiques ont été stimulés par de l'IFN- $\gamma$  et du LPS ultrapure alors que le phénotype M2 était obtenu en stimulant les cellules avec de l'IL-4 et de l'IL-13. La bonne polarisation des cellules étaient contrôlées par RT-qPCR avec les sondes Taqman dirigées contre les gènes *IRF5* et *IFN* $\gamma$  (marqueurs de macrophages M1) et contre le gène *IL10* (marqueur de macrophages M2)

Nous avons ensuite recherché une expression de MUC1 dans les différents types de macrophages par RT-qPCR et également par immunofluorescence avec un anticorps spécifique de la queue intra-cytoplasmique de MUC1. Conformément aux données de la littérature (Kato *et al.*, 2016), nous avons observé une induction au niveau transcriptionnel et protéique au niveau des macrophages M1 mais pas des macrophages M0 ou M2 (Fig 46-A ,B).



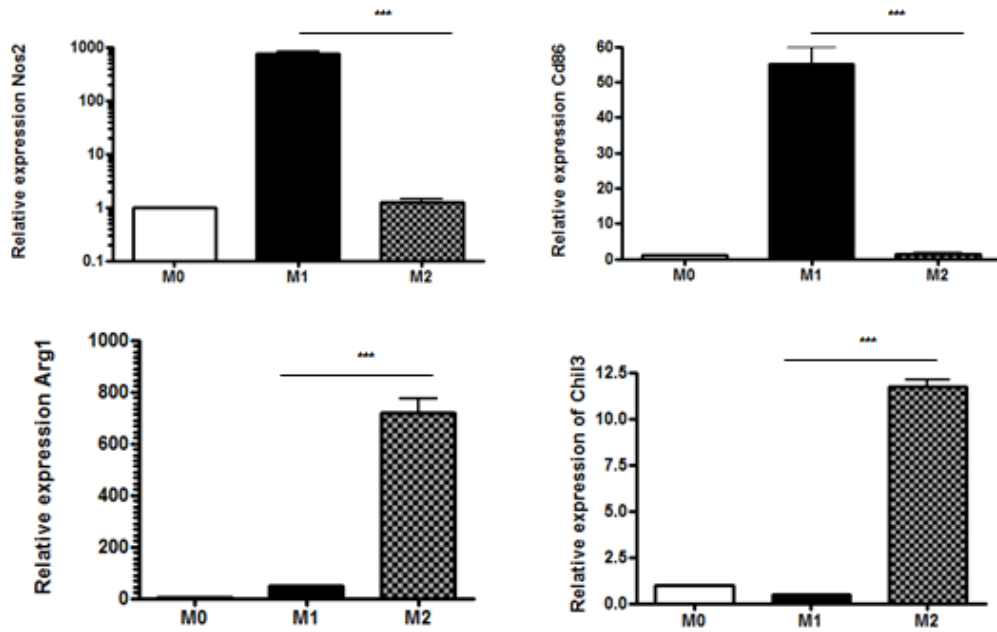


**Figure 46 : Etude de l'expression de MUC1 dans les macrophages humains.** (A) L'étude de l'expression de MUC1 par RT-qPCR met en évidence expression transcriptionnelle accrue dans les macrophages M1 comparativement aux macrophages M2 ou non stimulés (M0). (B) En immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la queue cytoplasmique de MUC1, on confirme l'induction de MUC1 dans les macrophages ayant été stimulés vers un phénotype M1. ns : non significatif, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

## 5-2 Macrophages murins

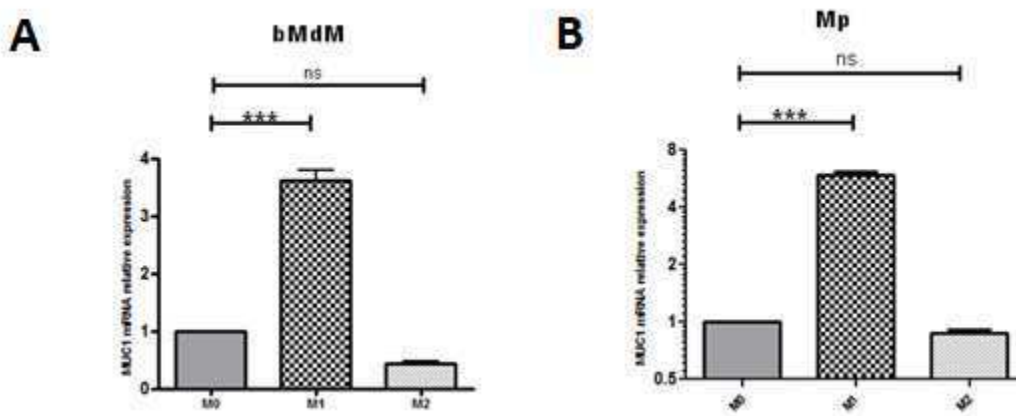
Afin de confirmer ces résultats chez la souris, nous avons recueillis des macrophages à partir de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> selon deux modalités différentes : 1) Des macrophages différenciés à partir de précurseurs hématopoïétiques médullaires (à l'aide de M-CSF murin) 2) Des macrophages péritonéaux récupérés 3 jours après une injection intra-péritonéale de thioglycollate (un irritant qui induit une augmentation locale du nombre de macrophages).

Nous avons polarisés *in vitro* les macrophages ainsi obtenus vers un phénotype M1 ou M2. Comme pour les macrophages humains, nous avons réalisé un contrôle de polarisation par RT-qPCR en étudiant l'expression transcriptionnelle de marqueurs M1 (*Cd86*, *Nos2*) ou M2 (*Arg1*, *Chil3*) (Fig 47).



**Figure 47 : Contrôle de la polarisation *in vitro* des macrophages murins.** Afin d'induire un phénotype M1 les cellules macrophagiques ont été stimulés par de l'IFN- $\gamma$  et du LPS ultrapure alors que le phénotype M2 était obtenu en stimulant les cellules avec de l'IL-4 et de l'IL-13. La bonne polarisation des cellules étaient contrôlés par RT-qPCR avec les sondes Taqman dirigées contre les gènes *Nos2* et *Cd86* (marqueurs de macrophages M1) et contre les gènes *Chil3* et *Arg1* (marqueurs de macrophages M2)

Nous avons également étudié l'expression relative de *Muc1* dans ces populations macrophagiques par RT-qPCR et confirmé l'induction de *Muc1* dans les macrophages M1 issus de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> (Fig 48- A, B).

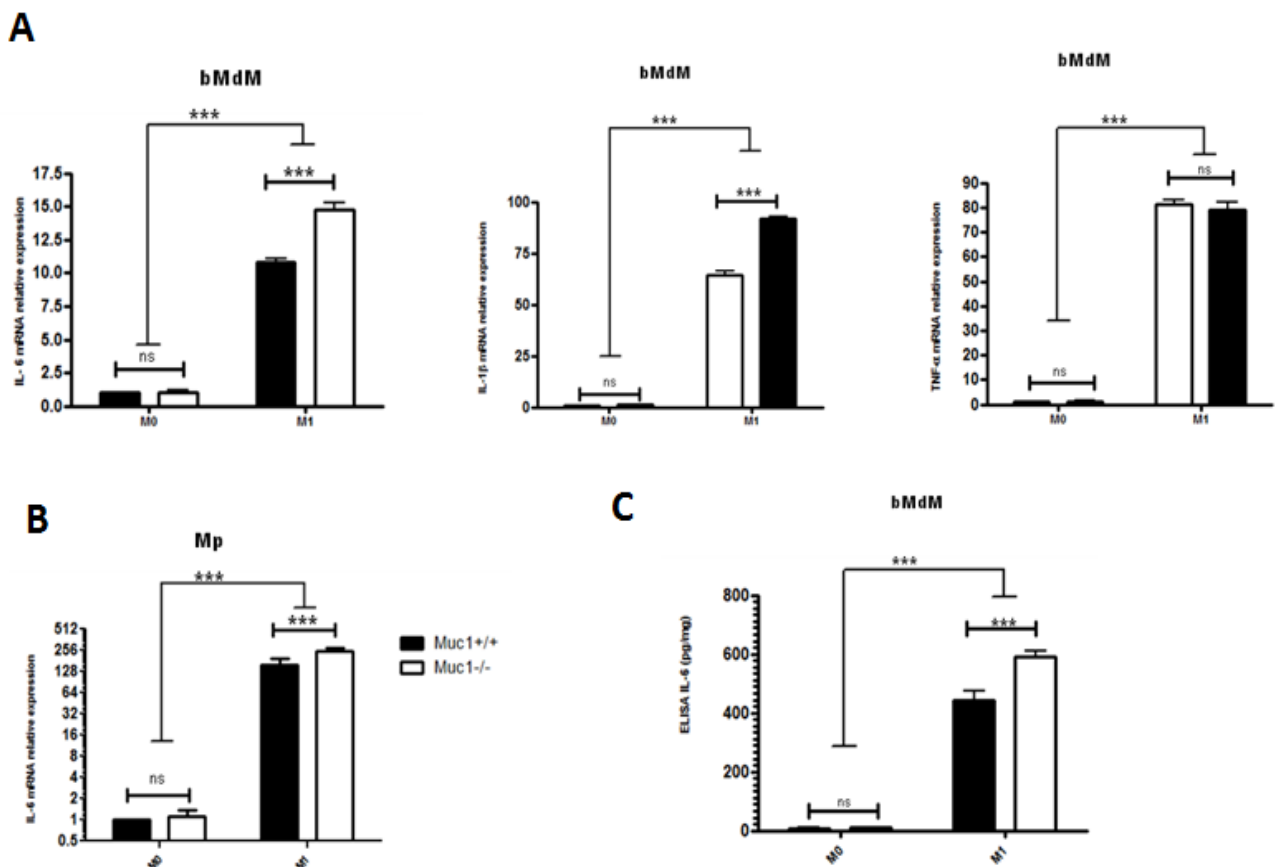


**Figure 48 : Etude de l'expression de *Muc1* dans les macrophages murins.** L'étude de l'expression de *Muc1* par RT-qPCR confirme la présence de *Muc1* dans les populations de macrophages M1 différenciés à partir de progéniteurs médullaires (A) ou à partir de macrophages péritonéaux (B). ns : non significatif, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

## 6- Rôle anti-inflammatoire de MUC1 dans les macrophages M1

Afin d'étudier le rôle de Muc1 dans les macrophages M1 issus de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>, nous avons comparé l'expression relative des cytokines pro-inflammatoires *Il-6*, *Il-1β* et *Tnf-α* dans les populations de macrophages péritonéaux et issus de précurseurs médullaires. Nous avons observé une expression significativement plus importante de l'*Il-6* et de *Il-1β* dans les macrophages *Muc1*<sup>-/-</sup> alors que l'expression relative du *Tnf-α* n'était pas différente (Fig 49- A, B).

Un ELISA réalisé sur le surnageant des macrophages *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> dérivés de la moelle osseuse a confirmé la sécrétion accrue d'IL-6 en l'absence d'expression de Muc1 (Fig 49- C).

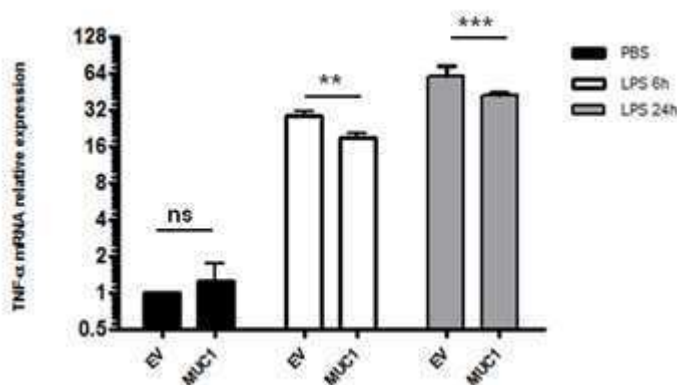


**Figure 49 : Comparaison de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages murins issus de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>.** (A) Par RT-qPCR, une expression significativement plus élevée de l'*Il-6* et de l'*Il-1β* était observée dans les populations de macrophages M1 différenciés et polarisés à partir de moëlle de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> (B) Un résultat similaire était observé pour l'IL-6 dans les macrophages M1 polarisés à partir de macrophages péritoneaux. (C) Par ELISA, une sécrétion accrue d'IL-6 était retrouvée dans le surnageant de macrophages issus de précurseurs médullaires *Muc1*<sup>-/-</sup>. ns : non significatif, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001.

## 7- MUC1 inhibe l'activation de la voie du TLR4

Nos données *in vivo* et *in vitro* suggèrent que MUC1 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires en bloquant l'activation du TLR4 par son ligand spécifique le LPS. Les données de la littérature, dans les cellules épithéliales et dans les cellules immunitaires, suggèrent que l'effet inhibiteur de MUC1 sur les TLR est dépendant de sa queue intracytoplasmique MUC1-CT (Ueno *et al.*, 2008). Afin de vérifier cette hypothèse pour le TLR4 nous avons choisi d'utiliser des cellules HEK293-TLR4-MD2-CD14 qui n'expriment pas constitutivement MUC1 et qui étaient déjà stablement transfectées pour le TLR4 et les autres protéines nécessaires à la reconnaissance du LPS (MD2, CD14).

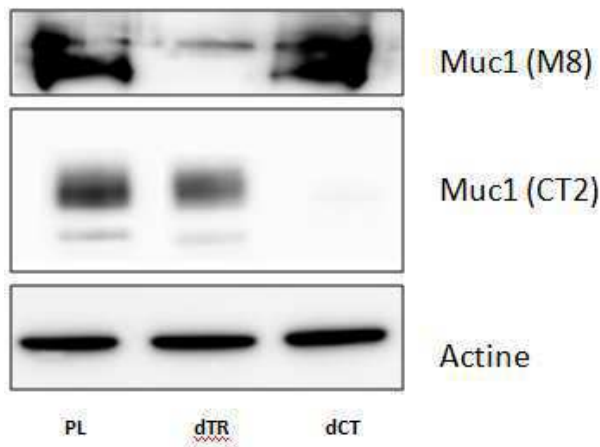
Nous avons d'abord transfecté ces cellules avec un vecteur d'expression codant pour la forme complète de MUC1 humaine et étudié l'expression relative de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  après stimulation par le LPS. Nous avons observé que ces cellules étaient capables de répondre au LPS et que l'expression de MUC1 induisait une inhibition de cette réponse (Fig 50).



**Figure 50 : Mesure de l'expression relative du TNF- $\alpha$  dans les cellules HEK293 transfectées avec un vecteur d'expression codant pour MUC1 ou un vecteur vide.** A 6h et à 24h de l'injection, les cellules HEK293 sont capables de répondre à une stimulation par le LPS en augmentant l'expression du TNF- $\alpha$ . Cette réponse est significativement inhibée lorsque les cellules sont transfectées pour MUC1. ns : non significatif, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

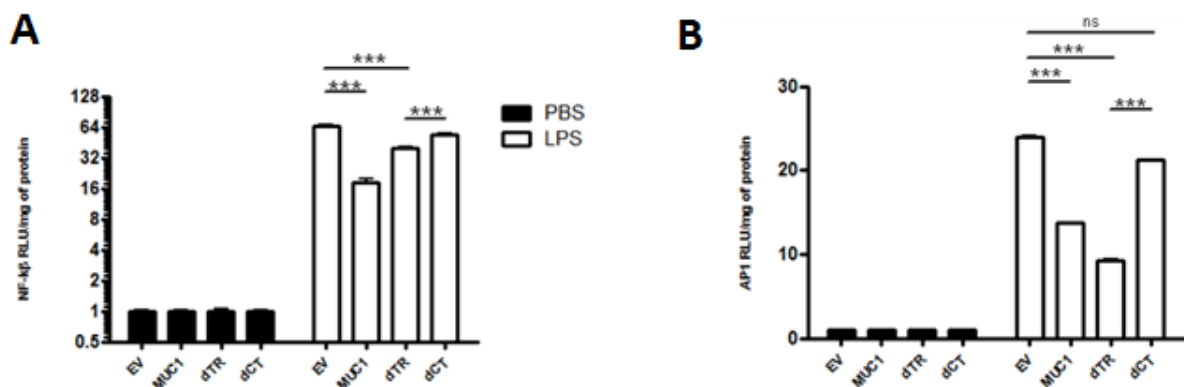
Pour déterminer les effets respectifs de la partie extracellulaire et intracellulaire de MUC1 dans cette inhibition, nous avons choisi d'étudier l'activation des voies NF- $\kappa$ B et AP1 (dont l'activation est en aval de celle du TLR4) en réponse au LPS, à l'aide d'un essai luciférase, après transfection avec différents types de vecteur de MUC1 : un vecteur MUC1 pleine longueur, un vecteur codant pour une forme de MUC1 dépourvue du tandem repeat (dTR) et un vecteur d'expression codant pour une forme de MUC1 dépourvue de sa queue intracytoplasmique (dCT). Un contrôle de transfection a été réalisé par Western Blot avec des

anticorps de MUC1 dirigés contre le tandem repeat (MUC1 M8) ou contre la queue cytoplasmique (MUC1 CT2) (Fig 51).



**Figure 51 : Contrôle de transfection par Western Blot des cellules HEK293 avec les différents construits de MUC1.** Un anticorps dirigé contre le TR de MUC1 (MUC1 M8) et contre la queue cytoplasmique de MUC1 (MUC1 CT2) ont été utilisés. Lorsque les cellules sont transfectées avec la forme complète de MUC1 (PL), une bande est observée à la fois avec l'anticorps M8 et avec le CT2. En revanche dans la forme tronquée d'une partie du TR (dTR) seule la bande reconnue par le CT2 est visible et inversement pour la forme tronquée de la queue cytoplasmique (dCT).

Nos résultats montrent que, lorsque les cellules ont été co-transfectées avec le vecteur exprimant MUC1 pleine longueur (MUC1), MUC1 délétée de son domaine de répétition en tandem (dTR) ou MUC1 délétée de sa queue cytoplasmique (dCT), l'activité transcriptionnelle médiée par NF- $\kappa$ B est significativement diminuée (Fig 52-A). De manière intéressante, l'expression de MUC1 et MUC1dTR diminuent de manière significative l'activité transcriptionnelle médiée par AP1 par rapport au contrôle EV, mais pas celle de MUC1dCT (figure 52C) suggérant que le domaine MUC1 CT est impliqué pour l'effet anti-inflammatoire de MUC1 contre l'activation de TLR4.



**Figure 52 : Essais NF- $\kappa$ B et AP1 luciférase après transfection par différents construits de MUC1 : MUC1 pleine longueur, MUC1 tronquée d'une partie de son TR (dTR) et MUC1 tronquée de sa queue**

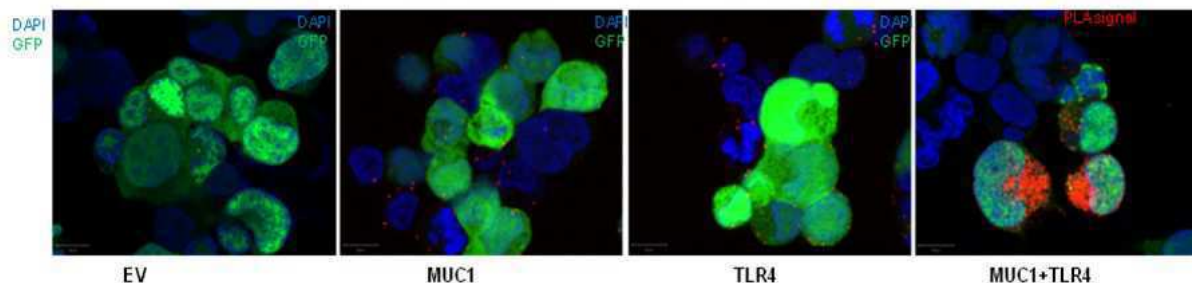
**cytoplasmique (dCT)**. L'activité luciférase de NF- $\kappa$ B et AP1 a été mesurée dans des cellules HEK293 stimulées avec du LPS. Lorsque les cellules sont transfectées avec une forme pleine longueur de MUC1, la réponse est significativement réduite. Cet effet semble majoritairement dépendant de la partie intra-cytoplasmique même si il persiste un effet inhibiteur en cas de transfection avec la forme tronquée pour ce domaine (dCT) . ns : non significatif, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

## 8- Etude du mécanisme d'inhibition de la voie TLR4 par MUC1.

Dans le poumon il a été rapporté une interaction directe entre TLR5 et MUC1 limitant le recrutement de la molécule adaptatrice MYD88 et donc la cascade de signalisation en aval (Kato *et al.*, 2012). Afin de déterminer si MUC1 pouvait inhiber TLR4 par un mécanisme similaire dans le rein, nous avons d'abord étudié la proximité des deux protéines au sein de cellules HEK293.

En l'absence d'anticorps anti-TLR4 ayant une spécificité et une sensibilité suffisante, nous avons fait le choix d'utiliser un vecteur d'expression commercial codant pour une protéine TLR4 couplée à un tag HA au niveau sa partie intracellulaire. Nous avons transfecté les cellules HEK293 exprimant déjà TLR4-MD2-CD14 afin qu'elles puissent être activées par le LPS. Afin de pouvoir visualiser les cellules ayant incorporées le vecteur codant pour TLR4-HA un rapporteur GFP était utilisé.

Ces cellules ont été transfectées avec un vecteur codant pour MUC1 pleine longueur (ou un vecteur vide) puis exposées pendant 6h au LPS. Une étude par ligature de proximité avec des anticorps dirigés contre la queue cytoplasmique de MUC1 et la protéine HA a ensuite été réalisée. Nous avons pu observer la présence de points fluorescents rouges dans les cellules présentant par ailleurs une fluorescence verte (témoin de transfection). Ce signal spécifique, lié à la proximité des deux anticorps primaires, était largement absent dans les cellules ayant été transfectées par un vecteur vide à la place de TLR-HA ou de MUC1 (Fig 53). Ce résultat confirme donc que MUC1 et TLR4 sont proches dans les cellules.

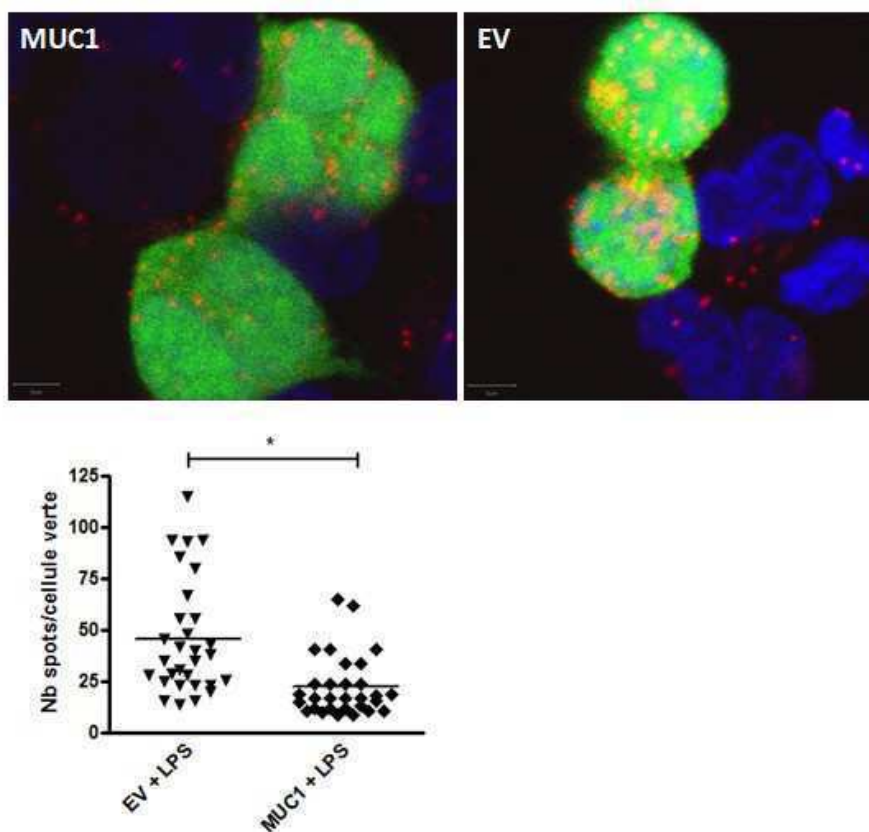


**Figure 53 : Résultats du test de ligature de proximité (PLA) dans les cellules HEK293-TLR4-MD2-CD14 transfectées pour TLR4-HA (rapporteur GFP) et MUC1.** L'expérience de PLA a été réalisée avec des anticorps dirigés contre la protéine HA et contre la queue cytoplasmique de MUC1. Les cellules ayant incorporées le vecteur d'expression codant pour TLR4-HA sont marquées en vert par la GFP. On peut observer qu'un signal

spécifique produit par la proximité des deux sondes (couplées aux anticorps anti-HA et anti-CT2) est principalement présent dans les cellules GFP+. La présence de de quelques spots non spécifiques dans les cellules non GFP est principalement liée à la superposition cellulaire.

Pour tester l'hypothèse que MUC1 intervient au niveau du recrutement de MYD88, nous avons ensuite réalisé une expérience de ligature de proximité avec un anticorps dirigé contre le HA-TLR4 et un anticorps dirigé contre MYD88. Avec cette technique, nous avons pu quantifier à l'aide du logiciel Qupath le nombre de spots dans les cellules avec une fluorescence cytoplasmique verte (témoin de transfection) lorsqu'elles étaient co-transfectées avec un vecteur d'expression de MUC1 ou un vecteur vide (Fig 54).

Après injection de LPS, nous avons observé une diminution significative du nombre de spots dans les cellules transfectées avec MUC1, confirmant un recrutement moindre de l'adaptateur MYD88 (Fig 54-A, B). Des contrôles étaient réalisés sur des cellules non transfectées avec TLR4-HA ou sans anticorps primaires afin de vérifier la spécificité du signal.



**Figure 54 : Inhibition du recrutement de MYD88 par TLR4 en présence de MUC1.** La quantification du nombre de spots (témoins d'un recrutement de l'adaptateur MYD88 par la protéine TLR4) dans les cellules était significativement réduite après transfection avec MUC1 comparativement à la condition contrôle. A : Image représentative des différentes conditions ; B : résultat de l'analyse quantitative avec le logiciel Qupath.

## **DISCUSSION**



## Partie 1

### 1- MUC1 : Expression dans les cellules épithéliales tubulaires proximales

#### 1-1 Expression de MUC1 au cours de la nécrose tubulaire aiguë chez l'homme.

L'expression de MUC1 est détectée précocément au cours du développement embryonnaire au niveau du blastème métanéphrique et du bourgeon urétéral. Par immunohistochimie et par hybridation *in situ*, dès la 30<sup>ème</sup> semaine du développement, son expression est limitée au niveau des tubes collecteurs et des tubes distaux (Leroy et al., 2003). Cette distribution de l'expression de MUC1 dans le rein mature a récemment été confirmée par analyse RNA-seq après microdissection des différentes portions tubulaires (Lee et al., 2015). Toutefois, dès 1986, l'équipe de Howie *et coll.* avait identifié, dans des reins présentant des lésions de NTA, une expression de MUC1 dans les cellules épithéliales tubulaires qui présentaient des modifications morphologiques caractérisées notamment par une diminution de la hauteur épithéliale (Howie *et al.*, 1986). Dans les travaux précédents de l'équipe, nous avons rapporté des résultats similaires dans le modèle murin d'IR. Dans ce modèle, la modification de l'expression de Muc1 était associée à une induction globale de son expression par Western Blot et par RT-qPCR sur les extraits totaux de rein dès J4 après IR. Dans un modèle d'IR légèrement différent (clampage unilatéral du pédicule rénal de 19 minutes), l'équipe de Rebecca P Hughey *et coll.* a rapporté des résultats similaires. Ils ont observé une induction globale de Muc1 par immunohistochimie, RT-qPCR et Western Blot dès 4h qui augmentait à 24 puis à 72h post-IR (Pastor Soler *et al.*, 2015). En se basant sur l'analyse morphologique pour la distinction des tubes proximaux et distaux, ils suggéraient l'apparition d'une expression nucléaire faible de MUC1 (détectée avec l'anticorps anti-CT2, dirigé contre la queue cytoplasmique) au niveau des cellules épithéliales proximales (Pastor Soler *et al.*, 2015). Ce dernier résultat contrastait avec nos observations et celle de Howie *et coll.*, dans lesquelles il était visualisé une expression apicale faible (et non nucléaire) de MUC1 dans les tubes en souffrance.

Afin d'étudier spécifiquement l'expression de MUC1 au niveau des tubes proximaux, nous avons réalisé des expériences de co-marquage avec MUC1 et la lectine Lotus Tetragonolobus qui reconnaît spécifiquement des sucres de la bordure en brosse des tubes proximaux (Holthöfer *et al.*, 1981), sur des biopsies rénales de patients présentant des lésions histologiques de NTA. Nos résultats d'immunofluorescence sont en faveur d'une néoexpression de MUC1 au niveau de certaines cellules épithéliales tubulaires proximales. De manière intéressante, nous avons observé que les cellules proximales qui expriment MUC1 sont souvent aplaties et ont le plus souvent une expression diminuée voir absente de

la LT, ce qui confirme qu'elles sont sujettes à des modifications liées à une souffrance épithéliale. D'ailleurs, en réalisant des expériences de co-marquages entre MUC1 et le marqueur de souffrance épithéliale KIM-1, nous avons observé une colocalisation des ces deux marqueurs au niveau de cellules épithéliales tubulaires présentant des caractéristiques similaires.

Contrairement aux résultats de Pastor Soler *et coll.*, nous n'avons pas observé de signal au niveau nucléaire avec un anticorps anti-MUC1 CT2 dans les cellules épithéliales tubulaires proximales. Cette différence pourrait être secondaire à notre méthode de détection par immunofluorescence où l'amplification du signal est plus faible qu'en immunohistochimie. Depuis nos travaux, l'expression apicale de MUC1 au niveau de certaines cellules épithéliales proximales a été rapportée par l'équipe de Rebecca P Hughey qui a utilisé un système de comarquage avec un anticorps dirigé contre MUC1 et contre OAT-1 (organic ion transporter 1) qui est un marqueur basolatéral spécifique des tubes proximaux et qui présente l'avantage de ne pas être perdu au cours des lésions de NTA (Al-bataineh *et al.*, 2017).

### **1-2 Expériences in vitro (modèle hypoxique)**

Des résultats précédents de notre équipe ont mis en évidence que l'induction de MUC1 était associée à l'augmentation d'expression de HIF-1 $\alpha$  au niveau tubulaire après IR chez le rat (Aubert *et al.*, 2009). Au cours de l'hypoxie, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  sensible à l'oxygène s'associe à la sous-unité HIF-1 $\beta$  exprimée de manière constitutive, formant HIF-1, qui augmente la transcription de ses gènes cibles dans le noyau en se liant aux éléments sensibles à l'hypoxie dans les promoteurs des gènes. Sur la lignée de cellules épithéliales proximales humaines HK-2, il avait été mis en évidence que MUC1 était un gène cible de HIF-1 (Leonard *et al.*, 2003). Ce résultat a été confirmé par notre équipe qui a rapporté la présence d'un site HRE dans le promoteur du gène MUC1 (Aubert *et al.*, 2009).

Afin de confirmer que l'induction de MUC1 au niveau des cellules épithéliales tubulaires proximales est secondaire à un mécanisme dépendant de l'hypoxie, nous avons utilisé une lignée de cellules proximales RPTEC. Par rapport à la lignée de cellules HK-2 qui a été immortalisée par transformation virale, cette lignée présente l'avantage d'avoir été immortalisée par introduction de la sous-unité catalytique de la télomérase et donc sans altération chromosomique (Simon *et al.*, 2014). La durée (6 jours) et les réglages de la chambre à hypoxie ont été sélectionnés sur la base d'expériences précédentes sur des cellules épithéliales rénales (Higgins *et al.*, 2007).

Nous avons utilisé les marqueurs membranaires CD10 et CD13 pour confirmer la nature proximale des cellules. Dans un précédent travail, nous avons montré que ces marqueurs permettent d'isoler une population de cellules épithéliales proximales au phénotype stable en culture (Van der Hauwaert *et al.*, 2013). Malgré une pureté moyenne des cellules RPTEC en base, avec seulement 55% de cellules exprimant les deux marqueurs proximaux, nous avons confirmé qu'il n'y avait pas de modifications phénotypiques de cette population après plusieurs passages mais aussi en condition hypoxique. En étudiant MUC1 par cytométrie de flux dans cette population, nous avons confirmé que l'hypoxie était associée à une induction de MUC1 dans cette population de cellules proximales (Gibier *et al.*, 2017).

## **2- MUC1 favorise une transition épithélio-mésenchymateuse partielle des cellules épithéliales proximales**

Notre hypothèse de départ était que l'expression de MUC1 était néphroprotectrice dans les suites de l'IR car elle favorisait la plasticité épithéliale en entraînant notamment un phénotype de TEM partielle. En effet, si la TEM est un mécanisme physiopathologique impliqué dans le développement de la fibrose (Lovisa *et al.*, 2015), elle participe également à la réparation tubulaire dès les phases aiguës d'une agression. Par exemple, en transplantation humaine, l'expression augmentée de marqueurs mésenchymateux au niveau des certaines sections tubulaires a été rapportée sur des biopsies protocolaires à 1 et 3 mois seulement après la transplantation (Vitalone *et al.*, 2008 ; Hertig *et al.*, 2006). Cette augmentation était en particulier associée à la présence de lésions de NTA (Vitalone *et al.*, 2008). Dans un autre modèle de néphrotoxicité par injection de cyclosporine chez le rat, l'apparition précoce des marqueurs mésenchymateux au niveau des tubes en souffrance a également été observée (Galichon *et al.*, 2011). Au cours de l'IR, les résultats de notre équipe ont montré que l'induction de marqueurs mésenchymateux (Vimentine, Snail et actine muscle lisse) avait lieu dès les premiers jours après l'IR. Ces résultats étaient en accord avec ceux de la littérature (Vanstherthem *et al.*, 2010 ; Zhou et al 2013). Par ailleurs, en comparant l'expression relative des marqueurs épithéliaux et mesenchymateux entre les souris *Muc1+/+* et *Muc1+/-*, nous avons mis en évidence une expression plus importante de l'actine muscle lisse et plus faible des marqueurs épithéliaux (ZO-1 et occludine) sur les extraits de reins de souris *Muc1+/+* au cours des temps précoces suivant l'IR. Ces résultats suggérant une implication de MUC1 dans ce phénomène de TEM partielle.

Afin d'étudier ce mécanisme chez l'homme au niveau des cellules épithéliales tubulaires proximales présentant une néoexpression de MUC1, nous avons étudié l'expression conjointe de MUC1 et des marqueurs épithéliaux/mésenchymateux sur deux modèles

différents : 1) sur les biopsies rénales de patients présentant des lésions de NTA 2) dans notre modèle hypoxique de culture de cellules épithéliales tubulaires proximales humaines.

Sur les biopsies de reins avec NTA, nous avons confirmé l'expression conjointe de MUC1 et des marqueurs mésenchymateux (Vimentine et  $\beta$ -caténine) au niveau de cellules épithéliales proximales (marquées par la Lotus tétragonolobus) au niveau des tubes en souffrance. Bien que ces résultats relèvent de la simple observation et ne permettent pas d'affirmer l'implication directe de MUC1 dans le phénomène de TEM, étant donné nos résultats dans le modèle murin d'ischémie-reperfusion, ils suggèrent que MUC1 joue un rôle actif.

Une des explications possibles reliant l'expression de MUC1 avec l'induction de la TEM est la voie HIF-1. En effet, HIF-1 en plus d'induire l'expression de MUC1 par les HRE est également connu pour induire l'expression d'une TEM au niveau des cellules épithéliales tubulaires rénales (Higgins *et al.*, 2007). D'ailleurs, dans nos expériences *in vitro* en condition hypoxique, nous avons rapporté une induction des marqueurs mésenchymateux (Snail, Vimentine et  $\beta$ -caténine) ainsi qu'une diminution de l'expression protéique des marqueurs épithéliaux. Après un retour en condition normoxique, ces changements phénotypiques disparaissent progressivement confirmant la nature transitoire de ce phénomène. Dans les cellules tumorales pancréatiques, il a été montré que MUC1 stabilise le facteur HIF-1 $\alpha$  (Shukla *et al.*, 2007). Au cours de l'IR, MUC1 semble avoir une fonction similaire au niveau des cellules épithéliales rénales. En effet, l'équipe de Rebecca P Hughey a rapporté une expression accrue de HIF-1 $\alpha$  au niveau des reins de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> comparativement aux souris KO *Muc1*. Cela s'associait à une augmentation de la transcription des gènes cibles de la voie HIF (Pastor Soler *et al.*, 2015). Au cours de l'IR, il existe donc potentiellement une boucle entre MUC1 qui est induit par HIF puis qui stabilise HIF-1 $\alpha$  favorisant ainsi une TEM partielle. Un autre effet bénéfique de la stabilisation de HIF au cours de l'IR, est la régulation du métabolisme énergétique ce qui peut expliquer en partie l'effet néphroprotecteur de MUC1.

Si nous avons principalement étudié l'expression conjointe de MUC1 avec des marqueurs mésenchymateux et épithéliaux, il est possible que seul un pool restreint de cellules épithéliales tubulaires proximales soit capable d'induire l'expression de MUC1 et de s'engager dans le processus de TEM partielle. En effet, qu'ils s'agissent de cellules progénitrices ou de cellules épithéliales différenciées, il est clairement établi qu'au cours des phases aiguës d'une agression rénale, on peut observer une population de cellules d'origine proximale présentant des changements morphologiques et phénotypiques qui sont à l'origine de la réparation tubulaire (Smeets *et al.*, 2013). Ces cellules présentent notamment une réexpression de certains marqueurs du développement embryonnaire rénal

(comme WT1 ou PAX2) (Wagner *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2012) et aussi des marqueurs de cellules souches (comme CD24 et CD133) (Humphreys *et al.*, 2011). Dans leur travail, l'équipe de R.Hughey *et coll.* a rapporté, à J3 après l'IR, la réduction du nombre de cellules présentant les caractéristiques morphologiques évocatrices de cellules dédifférenciées dans les tubes proximaux des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> (Pastor Soler *et al.*, 2015). Pour tester l'hypothèse que MUC1 est exprimée dans cette population cellulaire dédifférenciée, nous avons utilisé une technique de comarquage pour rechercher une colocalisation entre MUC1 et le marqueur CD133. Nous avons mis en évidence quelques images de comarquage de MUC1 et de CD133 sur des tubes avec des lésions de NTA (Gibier *et al.*, 2017). Toutefois il s'agissait d'un évènement rare et à ce stade, il est donc difficile d'établir un lien entre l'expression de *Muc1* et cette population de cellules dédifférenciées ou progénitrices.

### 3- MUC1, voie Wnt / $\beta$ -caténine et mort cellulaire

Par immunohistochimie, nous avons démontré l'existence d'une délocalisation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine dans les tubules en souffrance exprimant MUC1. Dans les cellules cancéreuses, MUC1 stabilise la  $\beta$ -caténine et induit l'activation de la voie Wnt /  $\beta$ -caténine (Hattrup *et al.*, 2008). Notre hypothèse est donc que MUC1 interviendrait de manière similaire en pathologie non tumorale d'autant que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine joue un rôle clé dans l'IR. Ainsi l'équipe de Zhou *et coll.* a montré qu'une délétion ciblée de la  $\beta$ -caténine dans les tubules rénaux était associée à des lésions rénales plus sévères *via* notamment une moindre résistance des cellules épithéliales tubulaires à l'apoptose (Zhou *et al.*, 2012). Le rôle de MUC1 dans l'activation de la voie Wnt /  $\beta$ -caténine dans le modèle murin d'IR a été étudié par l'équipe du Dr Rebecca Hughey *et coll.* qui a montré plusieurs points importants (Al-bataineh *et al.*, 2016) :

- L'expression tubulaire de la  $\beta$ -caténine au niveau tubulaire est favorisée par la présence de MUC1 qui inhibe la protéase GSK3 $\beta$ .
- L'activation des gènes cibles de la voie Wnt /  $\beta$ -caténine et la translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine sont réduites, au niveau tubulaire, dans les souris KO *Muc1*. Ce qui conduit notamment à une moindre prolifération cellulaire et à une résistance diminuée à l'apoptose.

Dans nos travaux préliminaires sur le modèle d'IR, nous avons déjà observé une moindre prolifération des cellules épithéliales tubulaires des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> comparativement aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup> à l'aide d'une immunohistochimie anti-Ki67. Par ailleurs, nos données sur la présence d'une mort cellulaire par apoptose plus importante au niveau des cellules épithéliales tubulaires de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> visualisée avec une technique TUNEL et d'une

immunohistochimie avec un anticorps ciblant la caspase 3 clivée semblent confirmer les données du groupe Rebecca P Hughey *et coll.*

Lors de nos expériences *in vitro* sur les cellules épithéliales tubulaires, nous avons également confirmé le rôle de MUC1 dans la résistance à une forme de mort cellulaire proche de l'apoptose, l'anoïkis. Il est intéressant de noter que l'expression de la  $\beta$ -caténine a été identifiée comme un acteur majeur de résistance à cette mort cellulaire dans la littérature (Orford *et al.*, 1999).

#### **4- Rôle de MUC1 dans la transition vers l'insuffisance rénale chronique**

Le modèle d'IR unilatérale sans néphrectomie controlatérale présente l'avantage d'être un excellent modèle d'étude des mécanismes impliqués dans la transition vers l'IRC (Le Clef *et al.*, 2016). Etant donné le rôle néphroprotecteur que nous avons rapporté au cours des phases initiales de l'IR de MUC1, nous avons voulu savoir si MUC1 avait également une influence sur le développement plus tardif de la fibrose.

Lors des temps tardifs (J14, J28) après IR, nous avons observé une expression anormale de Muc1 dans les tubules atrophiques de souris. Cette expression était associée à un degré de fibrose rénale significativement plus élevé dans les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> que les souris KO *Muc1* ainsi qu'à une expression transcriptionnelle augmentée de gènes impliqués dans la fibrose (Collagène I, Fibronectine). Ce résultat suggère que MUC1 a donc un rôle double au cours de l'IR : d'abord protecteur puis pro-fibrosant en cas de persistance anormale de son expression. De manière intéressante, il ne s'agit pas d'un cas isolé car d'autres protéines ont des effets similaires au cours de l'IR, en particulier KIM-1 dont la délétion précoce entraîne des lésions plus sévères (Ismail *et al.*, 2015) mais dont la persistance est pro-inflammatoire et pro-fibrosante (Humphreys *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent qu'une partie des mécanismes de la régénération rénale sont également impliqués dans le développement plus tardif de la fibrose lorsqu'ils persistent de manière anormale. Cette idée a été bien illustrée dans une étude récente de Liu *et coll.*. Dans cette dernière, les auteurs ont procédé à une caractérisation précise des voies moléculaires activées précocément après IR mais aussi plus tardivement lors du développement de la fibrose (Liu *et al.*, 2017). Ils ont montré que bien que les mécanismes de réparation tubulaire et de mise en place de la fibrose avaient chacun des gènes qui leur étaient propres, une partie des gènes qui étaient activés précocément après l'IR persistaient en cas d'évolution vers la fibrose (Liu *et al.*, 2017).

Etant donné le rôle de MUC1 dans la TEM partielle au cours de la réparation, notre postulat était que son expression anormale lors des temps tardifs est associée à une persistance de

l'expression des marqueurs mésenchymateux. En effet, la TEM partielle a été identifiée dans la littérature comme un mécanisme clé de la transition vers l'IRC (Lovisa *et al.*, 2015 ; Grande *et al.*, 2015). Par RT-qPCR, nous avons pu confirmer cette hypothèse en montrant que dans les reins de souris *Muc1+/+*, il y a une expression relative augmentée du marqueur mésenchymateux SNAIL associée à une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux (ZO-1, Occludine). Ces résultats sont en accord avec ceux du modèle de transplantation rénale humaine (Gibier *et al.*, 2017). Lorsque l'on comparait l'expression de MUC1 à 1 mois et à 3 mois post-transplantation, on observait que plus les patients avaient une expression maintenue de MUC1 à M3 (alors que les lésions tubulaires aiguës n'étaient plus présentes) plus ils développaient de fibrose et une dysfonction rénale sévère à M12. Une corrélation similaire entre l'expression tubulaire des marqueurs mésenchymateux et le développement de la fibrose a été rapportée par d'autres (Dubois *et al.*, 2014). L'ensemble de ces résultats montrent que MUC1 est un acteur de la transition de la NTA vers le développement de la fibrose.

La persistance d'une inflammation chronique est un autre mécanisme important dans la transition vers le développement de la fibrose (Huen *et al.*, 2015). Afin d'étudier le rôle de MUC1 (dont les effets immunomodulateurs ont été décrits dans d'autres organes (Dhar *et al.*, 2019) sur l'inflammation rénale, nous avons quantifié le nombre de macrophages dans le cortex des souris *Muc1+/+* et *Muc1-/-* lors des différents temps après l'IR. En utilisant le marqueur pan-macrophagique F4/80, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les deux groupes traités. En revanche, en étudiant le marqueur de macrophages M2 CD163, nous avons observé une plus forte infiltration de ce type de macrophages aux temps tardifs dans les souris *Muc1-/-* (Gibier *et al.*, 2017). Dans la littérature, il a été décrit un rôle protecteur des macrophages M2 dans les temps précoces au cours de l'IR (Huen *et al.*, 2015). En revanche, leur persistance lors des temps tardifs est plutôt associée au développement d'une fibrose plus sévère (Kim *et al.*, 2015). Si ce résultat suggère potentiellement un effet de MUC1 sur la polarisation des macrophages cela ne va donc pas dans le sens de ce que nous avons observé au niveau de la fibrose. Une hypothèse possible pour expliquer cette discordance est que l'étude immunohistochimique seule ne permet de caractériser avec précision les différentes populations macrophagiques. En effet, le marqueur CD163 ne reconnaît qu'une sous-population de macrophages M2 (Barros *et al.*, 2013) dont le rôle dans la fibrose n'est pas bien caractérisée.

## Partie 2

### 1- MUC1 rôle néphroprotecteur et anti-inflammatoire dans l'IRA septique

Pour la première fois nous rapportons un rôle néphroprotecteur de MUC1 dans l'IRA septique à la fois au niveau fonctionnel et sur le plan histologique. Ces résultats viennent compléter les descriptions de la fonction protectrice de MUC1 dans plusieurs modèles d'infection au niveau du tube digestif et du poumon (Dhar *et al.*, 2019). Dans le rein, il n'existait jusqu'à présent aucune donnée en faveur d'un rôle de MUC1 dans le sepsis ou en réponse aux infections. Nos résultats suggèrent que l'effet protecteur de MUC1 est lié, ou tout du moins associé, à une réduction de l'état inflammatoire. En effet, nous avons observé une sécrétion moindre de cytokines pro-inflammatoires dans les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> par rapport aux souris *Muc1*<sup>-/-</sup>. Ces résultats sont concordants avec la description du rôle immunomodulateur de MUC1 dans le tractus respiratoire et digestif (Dhar *et al.*, 2019). Dans le rein, l'activation du TLR4 est un phénomène central dans la physiopathologie de l'IRA, c'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser un modèle de LPS qui active spécifiquement cette voie. Nos résultats montrent que MUC1 intervient en régulant négativement le TLR4 afin d'éviter une activation délétère de la réponse inflammatoire.

### 2- MUC1 et recrutement de cellules immunitaires en réponse au LPS

#### 2.1- Neutrophiles

Après l'injection de LPS, nous avons observé un afflux discret de polynucléaires neutrophiles dans les capillaires péri-tubulaires et dans les glomérules. Cela est en accord avec les données concernant la réponse rénale du rein à une agression qui est caractérisée par la sécrétion de chimiokines (CXCR1 et CXCR2) par les cellules de l'immunité innée résidentes ainsi que la surexpression de molécules d'adhésion (ICAM-1 et la P-sélectine) au niveau des cellules endothéliales qui aboutissent au recrutement tissulaire de polynucléaires neutrophiles (Rabb *et al.*, 2016). Dans notre modèle, nous n'avons pas mis en évidence de différence quantitative de l'infiltrat à polynucléaires neutrophiles entre les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>. Dans la caractérisation du modèle d'injection de LPS, l'équipe de Cunningham *et coll.* a observé que l'afflux de polynucléaires neutrophiles est principalement dépendant du TLR4 (Cunningham *et al.*, 2004). Un léger afflux de neutrophiles a été rapporté dans les souris C3H/HeJ (qui ont pourtant une mutation inactivatrice de TLR4) mais ce résultat est potentiellement lié à la présence d'impureté dans le LPS utilisé notamment par contamination avec des ligands du TLR2 dont l'activation favorise également le recrutement de neutrophiles (Leemans *et al.*, 2005). Dans une étude ayant utilisé des souris chimères



pour le TLR4 après irradiation médullaire, les auteurs ont montré que la présence de cellules MPO+ dans le parenchyme rénal après injection de LPS était dépendante de l'expression de TLR4 au niveau du parenchyme rénal (Juskewitch *et al.*, 2012). Toutefois, comme cela l'a été montré dans le poumon (Andonegui *et al.*, 2009), c'est *via* son expression au niveau des cellules endothéliales que l'expression du TLR4 favorise le recrutement de polynucléaires neutrophiles en induisant l'expression d'ICAM (Chen *et al.*, 2011). Comme MUC1 n'est pas exprimée au niveau des cellules endothéliales rénales, il n'y a pas donc pas d'inhibition de la voie du TLR4 à ce niveau dans notre modèle ce qui peut expliquer nos résultats. En faveur de cette hypothèse, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative concernant l'expression relative d'ICAM1 entre souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>.

## 2.2- Monocytes/Macrophages

Le recrutement de monocytes circulants au niveau du parenchyme rénal lésé est un mécanisme commun à la majorité des modèles d'agression rénale (Han *et al.*, 2019). Dans le modèle d'injection de LPS nous l'avons observé par immunohistochimie avec un anticorps anti-F4/80 reconnaissant les macrophages/monocytes à 24h après l'injection de LPS. Plusieurs études rapportent des résultats similaires dans les modèles d'IRA septique, le plus souvent par immunohistochimie (Xing *et al.*, 2018) ou cytométrie de flux (Nozaki *et al.*, 2017). A notre connaissance, il n'existe pas de données permettant de corréler l'importance de cet infiltrat à la sévérité de l'atteinte rénale dans le modèle d'IRA septique. Dans d'autres modèles, des expériences de déplétion des monocytes par injection de clodronate liposomale ou de toxines diphtériques ont été réalisées avant ou après l'agression rénale pour déterminer le rôle des macrophages dans les phases précoces et tardives (Lu *et al.*, 2012 ; Belliere *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2015 ; Han *et al.*, 2019). Dans le modèle d'IRA septique, ces résultats sont manquants. En utilisant une injection intrapéritonéale de clodronate liposomale 24h avant l'injection de LPS nous avons, dans une expérience préliminaire, observé une mortalité des 2/3 des populations de souris dans les 12 premières heures de l'injection du LPS (indépendamment du statut du gène *Muc1*) sans excès de mortalité dans les populations traitées avec des liposomes vides. Ce premier résultat inattendu et devant être confirmé sur un plus grand nombre de souris suggère qu'au niveau systémique la déplétion de monocytes aurait un effet sur la susceptibilité au LPS des souris par possible défaut de phagocytose des débris cellulaires et persistance des signaux pro-inflammatoires. Par ailleurs, le rôle de l'expression de TLR4 dans le recrutement tissulaire des macrophages dans le modèle d'IRA septique n'est pas clairement établi. Certaines données suggèrent qu'il pourrait être, au moins en partie, indépendant du TLR4 et faire intervenir la voie du récepteur de l'IL-18 (Nozaki *et al.*, 2017). De ce fait, l'absence de

différence sur l'évaluation semi-quantitative du nombre de macrophages entre souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup> est difficile à interpréter.

Afin de ne pas méconnaître un effet de l'expression de *Muc1* sur la synthèse de progéniteurs médullaires monocytaires en réponse au LPS, nous avons collaboré avec l'équipe du Dr Lionel Poulin (CNRS UMR 8204 - INSERM U 1019) qui possède une expertise dans l'analyse de ces populations par cytométrie de flux. Dans un modèle d'injection de LPS par voie rétro-orbitaire, il n'avait pas été observé de différence quantitative, entre souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>, au niveau des différents progéniteurs monocytaires et dendritiques dans la moelle et dans la rate. Avec nos propres observations au niveau rénal, l'ensemble de ces résultats suggère que les différences *in vivo* de l'état inflammatoire entre souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup> ne sont pas associées à des modifications quantitatives des lignées monocytaires.

### **3- MUC1 : Un rôle clé dans les macrophages M1**

#### **3.1 MUC1 influence la polarisation des macrophages *in vivo***

Un des résultats les plus importants de notre étude est la mise en évidence par cytométrie de flux d'un plus grand nombre de macrophages de phénotype pro-inflammatoire, macrophages M1, dans le rein des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> par rapport au souris *Muc1*<sup>+/+</sup> au dépend, en partie, de la population de macrophages M2. Ces deux populations macrophagiques jouent toutes deux des rôles distincts mais importants dans la réponse immunitaire. Les macrophages M1 exacerbent les dommages rénaux en produisant des cytokines pro-inflammatoires (Kinsey *et al.*, 2008) et en sécrètent du NO et des ROS, qui peuvent tous deux induire des dommages mitochondriaux et la mort par apoptose (Gottlieb *et al.*, 2011). Au contraire, les macrophages M2 régulent négativement la production de protéines inflammatoires et favorisent le remodelage de la matrice extracellulaire dans les phases de réparation (Nourshargh *et al.*, 2014). Même s'il s'agit d'un modèle simplifié qui ne rend pas compte de la grande complexité de l'évolution des populations macrophagiques et de leur origine (recrutés ou cellules résidentes), cette distinction M1 / M2 a montré qu'elle était pertinente dans le modèle d'IRA septique par injection de LPS. L'équipe de Li *et al.* a par exemple récemment montré que la sécrétion de Colony stimulating factor 2 (CSF2) par les cellules épithéliales tubulaires favorise le passage des macrophages d'un phénotype M1 vers un phénotype M2 ce qui est corrélé à une moindre souffrance rénale et à une baisse de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Li *et al.*, 2020). Dans une autre étude, il a été montré que MNCLE, une protéine induite à la surface des macrophages après activation de la voie du TLR4, jouait un rôle dans le maintien du phénotype M1 et que sa présence favorise la sécrétion des cytokines IL-6, TNF- $\alpha$  et MCP-1 en réponse à une stimulation au LPS (Lv *et al.*, 2017). Ces résultats montrent que le ratio de macrophages M1/M2 est crucial

dans le contrôle de la production de cytokines pro-inflammatoires et à terme sur la fonction rénale dans l'IRA septique. L'augmentation du ratio M1/M2 que nous avons noté dans les reins des souris *Muc1*<sup>-/-</sup> permet donc d'expliquer en partie nos résultats précédents sur son rôle néphroprotecteur et anti-inflammatoire. Toutefois, nos résultats ne permettent pas à ce stade de déterminer si MUC1 influence cette polarisation en modifiant la signalisation entre les cellules épithéliales tubulaires et les cellules macrophagiques en modulant par exemple la sécrétion de CSF2 par les cellules épithéliales tubulaires (Li *et al.*, 2020)

Nous avons choisi d'étudier l'expression des marqueurs M1 et M2 dans les cellules phagocytaires MHCII+CD11b+CD11c<sup>low/int</sup> qui correspondent aux principales populations résidentes dans le rein et recrutés suite à l'injection de LPS (Kawakami *et al.*, 2013). Toutefois, dans le rein, les populations dendritiques et macrophagiques sont très intriquées et certaines sous-populations macrophagiques expriment fortement le CD11c à la membrane (Puranik *et al.*, 2018) et n'ont donc pas été incluses dans notre analyse. Concernant le choix des marqueurs M1 et M2, il est à noter que nous avons sélectionnés le marqueur membranaire CD38 comme marqueur M1, qui est de description plus récente (Jablonski *et al.*, 2015 ; Amici *et al.*, 2018) que d'autres marqueurs M1 comme le CD80 ou le CD86, et plus discriminant (Jablonski *et al.*, 2015).

Nos résultats de RT-qPCR ont confortés nos données de cytométrie en confirmant la présence d'une signature moléculaire en faveur d'un profil pro-inflammatoire des macrophages dans les reins de souris *Muc1*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup>.

### **3.2 MUC1 : marqueur de macrophages M1**

Avant nos travaux, l'expression de MUC1 dans la lignée macrophagique humaine THP-1 après stimulation avec du LPS et de l'IFN- $\gamma$  avait déjà été décrite dans la littérature (Xu *et al.*, 2014). En revanche, dans les macrophages humains, les données étaient plus limitées (Kato *et al.*, 2016). Dans leur étude, Kato *et coll.* montrent l'induction de l'expression de MUC1 par RT-qPCR et par western blot dans les macrophages de phénotype M1 alors qu'elle est absente des macrophages M2 ou M0. Cependant, ils fournissent peu de détails sur les conditions d'obtention des monocytes alors que cette étape est déterminante car elle influence à la fois le degré de pureté des cellules isolées mais aussi l'analyse phénotypique des macrophages obtenus après différenciation de ces monocytes (Nielsen *et al.*, 2020). Pour notre étude, nous avons fait le choix d'utiliser des monocytes sélectionnés à partir de PBMC par techniques d'élutriation à contre courant fournis par la Plate-forme Développement et transfert à la clinique du CHU de Nantes qui est soumise à la norme de qualité des laboratoires iso 9001:2008 afin d'assurer une bonne reproductibilité de nos résultats. Après différenciation en macrophages et polarisation *in vitro* selon des modalités

standards, nous avons confirmé que l'expression de MUC1 est retrouvée dans les macrophages M1 mais non dans les macrophages M2 ou M0. Dans ces expériences de polarisation, les effets d'une exposition isolée au LPS sur l'expression de MUC1 dans les macrophages ne sont pas connus. Les données de la littérature suggèrent que c'est plutôt l'IFN- $\gamma$  (qui est classiquement utilisé pour induire un phénotype M1) qui est à l'origine de l'augmentation de l'expression de MUC1. En effet, plusieurs études sur des cellules épithéliales ne rapportent pas d'effet du LPS sur l'expression de MUC1 (Li *et al.*, 2003 ; Zen *et al.*, 2002) alors que cela a été montré pour l'IFN- $\gamma$  dans des lignées de cellules tumorales (Gaemers *et al.*, 2001 ; Reddy *et al.*, 2003). Une autre explication possible est que l'IFN- $\gamma$  exerce une action synergique nécessaire à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par le LPS comme cela a été montré dans des cellules épithéliales mammaires (Lagow *et al.*, 2002).

Dans les macrophages murins, nous avons trouvé des résultats concordants avec ce que nous avons observé chez l'homme et également avec ce qui a été rapporté par d'autres équipes (Kato *et al.*, 2016). Nous avons choisi de disposer de deux populations de macrophages : 1) par extraction de progéniteurs hématopoïétiques médullaires et différenciation en macrophages *in vitro* 2) par lavage de la cavité péritonéale après exposition à un produit irritant le thioglycolate. Ces deux populations de macrophages peuvent toutes deux être polarisées *in vitro*, mais elles expriment des marqueurs M1 et M2 différents à la fois avant et après stimulation (Zhao *et al.*, 2017 ; Bisgaard *et al.*, 2016). Par RT-qPCR, nous avons observé une expression de MUC1 dans les deux types de macrophages, uniquement après polarisation de type M1. Sachant qu'un résultat similaire a également été rapporté dans une population de macrophages alvéolaires pulmonaires (Kato *et al.*, 2016), cela montre que l'induction de MUC1 en réponse à une stimulation par LPS et de l'IFN- $\gamma$  est un mécanisme conservé dans ce type cellulaire.

#### **4- Inhibition de TLR4 par MUC1 et régulation de l'inflammation**

Etant donné nos résultats *in vivo* sur le rôle de MUC1 sur la polarisation des macrophages, nous avons voulu déterminer si l'induction de MUC1 au niveau des macrophages M1 était associée à des modifications fonctionnelles de ces macrophages. Nous avons notamment comparé l'expression relative des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires Il-6 et Il-1b dans les populations de macrophages M1 issus de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>. Nous avons ainsi pu montrer que les macrophages M1 n'exprimant pas *Muc1* sécrètent plus de cytokines pro-inflammatoires que leur équivalent *Muc1*<sup>+/+</sup>. Ces résultats sont concordants avec les travaux de la littérature sur les macrophages péritonéaux dans lesquels une stimulation par du LPS entraîne une sécrétion accrue de TNF- $\alpha$  (Ueno *et al.*, 2008) et

également d'IL-1 $\beta$  (Ng *et al.*, 2016) des macrophages *Muc1*<sup>-/-</sup> par rapport aux macrophages *Muc1*<sup>+/+</sup>.

La sécrétion de cytokines en réponse à une stimulation au LPS étant dépendante de l'activation de la voie du TLR4 nous avons voulu rechercher les mécanismes de l'inhibition de MUC1 sur cette voie. Dans la littérature, il apparaît nettement que la queue cytoplasmique de MUC1 est essentielle à l'inhibition de différents TLRs dont le TLR4 (Ueno *et al.*, 2008). En utilisant différents construits de MUC1, nous avons pu reproduire ces résultats mais aussi montrer un effet préalablement non rapporté de la partie extracellulaire de MUC1 dans la réponse au LPS. Cette différence avec l'étude de Ueno, qui a pourtant utilisé des construits de MUC1 similaires, s'explique potentiellement par le fait que nous avons étudié la réponse précoce des cellules *via* un essai NF- $\kappa$ B et AP1 luciférase et non la sécrétion plus tardive de TNF- $\alpha$ . On peut ainsi envisager que la partie extracellulaire de MUC1 perturbe transitoirement la liaison du LPS au TLR4 par encombrement stéréotaxique mais que cela a un effet mineur à long terme.

Dans le poumon, il a été montré que MUC1 inhibait les TLR3 et 5 en bloquant le recrutement des molécules adaptatrices TRIF et MYD88 par l'intermédiaire de sa queue cytoplasmique (Kato *et al.*, 2014). Dans l'estomac, si le mécanisme exact de l'inhibition du TLR2 par MUC1 n'est pas connu, les auteurs ont montré que MUC1 agissait en amont de l'activation d'IRAK4 (Ng *et al.*, 2016). Nous avons donc fait l'hypothèse que l'inhibition du TLR4 par MUC1 se situe également au niveau des premières étapes de la voie et en particulier au niveau du recrutement de MYD88. Avec nos expériences de ligature de proximité, nous avons pu confirmer que MUC1 et TLR4 étaient effectivement en étroite proximité dans les cellules et que l'expression de MUC1 limitait le recrutement de MYD88 après exposition au LPS. Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'inhibition du TLR4 par MUC1 est similaire à celui décrit pour le TLR5. MUC1 étant capable, *in vitro*, d'inhiber tous les TLRs (Ueno *et al.*, 2008) c'est potentiellement un mécanisme partagé avec tous les TLRs. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les motifs dont dépend l'interaction entre MUC1 et les TLRs afin de préciser ce mécanisme. Une limite de notre étude est de ne pas avoir regardé si la présence de MUC1 entraine également en compétition avec le recrutement de TRIF qui peut également être recrutée par TLR4 suite à une stimulation par le LPS (voie dite MYD88 indépendante). En 2008, l'équipe de Shen *et al.* a montré que la sécrétion d'IL6 et de TNF- $\alpha$  en réponse au LPS était dépendante à la fois de la voie dépendante et indépendante de MYD88 (Shen *et al.*, 2008). Dans l'état actuel, il n'est donc pas possible de dire si nos résultats sur le modèle *in vivo* sont plutôt dépendants d'une activation de la voie dépendante ou indépendante de MYD88.

## 5- Discussion sur le rôle respectif de compartiments épithélial et immunitaire dans le modèle d'AKI par injection de LPS.

Contrairement à d'autres modèles d'agression rénale comme l'IRA ou l'injection de cisplatine, les lésions histologiques tubulaires sont légères au cours de l'IRA septique (Takatsu *et al.*, 2013) comme nous l'avons observé dans notre étude. De même, la mort des cellules épithéliales tubulaires est un événement relativement rare au cours de l'IRA septique (Takatsu *et al.*, 2013). Ces constatations ont initialement fait écarter l'hypothèse d'une toxicité directe du LPS sur les cellules épithéliales tubulaires comme mécanisme à l'origine de la dysfonction rénale dans ce modèle. En 2004, l'équipe de Cunningham *et coll.*, a émis l'hypothèse que l'atteinte fonctionnelle rénale était plutôt secondaire à l'action du TNF- $\alpha$ , sécrétée par les cellules immunitaires notamment, sur son récepteur TNFR exprimé au niveau des tubules rénaux (Cunningham *et al.*, 2004). Afin de tester cette hypothèse, ils ont utilisé des souches de souris C3H/HeOuJ et C3H/HeJ (résistantes au LPS) et pratiqué des expériences de transplantation rénale entre ces différentes souches avant d'induire une IRA par injection de LPS. Ils ont ainsi montré que les souris C3H/HeJ transplantées avec un rein de souris C3H/HeOuJ présentaient une augmentation rapide de l'urée plasmatique dans les 12h suivant l'injection avant de revenir à leur base à 24h alors que les souris C3H/HeOuJ transplantées avec un rein de souris C3H/HeJ n'étaient pas du tout protégées de l'IRA induite par le LPS et présentaient des lésions histologiques à 24h. A partir de ces résultats, les auteurs ont conclu que l'expression de TLR4 au niveau des cellules épithéliales jouait un rôle mineur (responsable seulement d'une élévation transitoire de l'urée dans les 12 premières heures) dans le modèle d'IRA septique par injection de LPS. Toutefois cette conclusion est depuis remise en question suite aux expériences menées par Hato *et al.*, en 2015. En utilisant des souris C57BL/6J *Tlr4*<sup>+/+</sup> et *Tlr4*<sup>-/-</sup> pour générer des souris chimériques après irradiation médullaire, ils ont montré que les souris qui expriment TLR4 dans la moelle mais pas dans le rein génèrent plus de signaux pro-inflammatoires mais en revanche ne présentaient pas de souffrance rénale (exprimée en expression relative des sondes KIM-1 et NGAL par RT-qPCR) (Hato *et al.*, 2015). Dans un autre travail, la même équipe a montré que le LPS était directement internalisé par les cellules épithéliales proximales des segments S1 par un mécanisme de capture dépendant de la présence de CD14 et TLR4 (Kalakeche *et al.*, 2011) et indépendant de la présence de cellules immunitaires TLR4+. L'effet de cette internalisation du LPS sur les cellules épithéliales tubulaires n'était pas connu mais récemment une équipe a montré que les souris présentant un KO *Tlr4* sélectif au niveau des cellules épithéliales tubulaires proximales et exposées au LPS présentaient une fuite de liquide dans le compartiment interstitiel secondairement à des perturbations des jonctions intercellulaires entre les cellules épithéliales tubulaires proximales (Nakano *et al.*, 2020). Ce

mécanisme serait en partie responsable de l'oligurie observée après injection de LPS et expliquerait la résistance partielle de ce modèle aux traitements par remplissage. Les souris présentant un KO *Tlr4* sélectif au niveau des cellules épithéliales tubulaires proximales ont des taux d'urée et une expression de KIM-1 diminués par rapport aux souris *Tlr4*<sup>+/+</sup> ce qui suggèrent que ce mécanisme de capture du LPS par les cellules proximales est délétère pour les cellules (Nakano *et al.*, 2020). Au total, sur la base de ces expériences, il est difficile de tirer une conclusion sur le rôle respectif des compartiments épithéliaux et immunitaires dans l'IRA induite par l'injection de LPS à cause de l'hétérogénéité des modèles notamment du point de vue de la cinétique et des modes d'évaluation de la souffrance rénale utilisés. Toutefois, il semble clair que l'action du LPS *via* le TLR4 porté par les cellules épithéliales intervient dans la physiopathologie de l'IRA septique et qu'il a un impact sur la dysfonction rénale. D'autres études seront nécessaires pour déterminer à quel point il est potentialisé par la libération de signaux inflammatoires par les cellules immunitaires.

A la vue de ces données, on peut interroger nos résultats sur le rôle respectif de MUC1 dans son action au niveau des cellules épithéliales tubulaires et au niveau des cellules immunitaires. Nos résultats montrent que l'expression de MUC1 influence l'expression rénale des cytokines pro-inflammatoires dont la production est dépendante des cellules immunitaires dans ce modèle comme l'a confirmé les expériences sur les souris chimériques *Tlr4* (Hato *et al.*, 2015). Cependant, concernant le rôle néphroprotecteur de MUC1 dans ce modèle, il est plus difficile de déterminer s'il résulte de son action anti-inflammatoire ou bien de son expression au niveau des cellules épithéliales tubulaires. En effet, dans le modèle d'IR, nous avons montré que MUC1 était induit au niveau des cellules épithéliales proximales et que MUC1 jouait un rôle néphroprotecteur en favorisant la plasticité des cellules épithéliales tubulaires à travers un mécanisme de TEM partielle (Gibier *et al.*, 2017). Dans le modèle d'IRA septique, on ne peut donc pas exclure que l'expression de MUC1 au niveau des cellules épithéliales joue un rôle 1) direct par inhibition de la voie du TLR4 porté par les cellules épithéliales tubulaires et aussi 2) indirect par son action anti-apoptotique, sur la plasticité épithéliale et sur la régulation du métabolisme énergétique.

**PERSPECTIVES**



## Partie 1

### 1- MUC1 marqueur de cellules souches et/ou de cellules dédifférenciées.

Dans nos expériences, nous avons montré que MUC1 peut être induit dans les cellules épithéliales tubulaires proximales et qu'il existe une coexpression avec des marqueurs de souffrance rénale et des marqueurs de cellules souches comme CD133. Toutefois, il a été montré que ces marqueurs étaient induits de manière stochastique au niveau des cellules épithéliales tubulaires en souffrance et qu'ils ne permettent pas de définir une population de cellules souches à part entière (Humphreys *et al.*, 2013). De ce fait, nous avons considéré que MUC1, comme de nombreux autres marqueurs, était réexprimée au niveau de ces cellules tubulaires dites « dédifférenciées ». Toutefois, bien qu'il persiste une controverse dans la littérature, les derniers travaux de l'équipe du Pr Romagnani semblent montrer qu'il existe effectivement une population de cellules souches tubulaire à l'origine de la régénération cellulaire (Lazzeri *et al.*, 2018). Dans différents types de carcinomes, l'expression de MUC1 a été associée à l'acquisition de caractéristiques de cellules souches (Li *et al.*, 2020). Une hypothèse à explorer serait que MUC1 est exprimée par ces cellules progénitrices. Une expérience préliminaire serait de réaliser un comarquage Pax2/Muc1/Lotus sur plusieurs reins de souris pour quantifier le pourcentage de colocalisation des trois marqueurs. En effet, sur un rein n'ayant pas subi d'agression, les expériences de Lazzeri *et coll.* suggèrent que les cellules épithéliales LT/PAX2 reflète majoritairement les cellules souches (bien que PAX2 soit également un facteur inductible en cas d'agression) (Lazzeri *et al.*, 2018). De ce fait, si le pourcentage de colocalisation entre MUC1 et LT/PAX2 est très faible nous pourrions donc écarter notre hypothèse alors que si le pourcentage de colocalisation est très élevé cela constituera un argument en faveur de celle-ci. Pour le confirmer, il faudra réaliser des études de traçage cellulaire à l'aide du même rapporteur Pax2.*rtTA*;TetO.*Cre*;R26.*Confetti* (Pax2/Confetti) qui a été utilisé dans l'étude de Lazzeri *et coll.* (Lazzeri *et al.*, 2018).

### 2- Explorer le rôle de MUC1 au cours de la phase d'inflammation stérile

Comme nous l'avons discuté précédemment le modèle d'IR est également un modèle dans lequel l'inflammation joue un rôle clé dans la physiopathologie. En effet, suite à la souffrance et à la mort des cellules épithéliales tubulaires au cours de l'ischémie il y a libération de signaux de danger (notamment HMGB1) qui activent les TLRs 2 et 4 et entraînent la libération d'IL-1 $\beta$ , -6, and -8, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , et MCP-1 au cours d'une phase dite d'inflammation stérile (Leemans *et al.*, 2005 ; Patschan *et al.*, 2012). Nos travaux sur le modèle d'IRA septique par injection de LPS ont montré que MUC1 joue un rôle dans

l'inhibition de la voie du TLR4 ce qui se traduit par une diminution de inflammation. Dans l'IR, nous nous étions principalement concentrés sur le rôle de MUC1 dans la plasticité épithéliale pour expliquer son rôle néphroprotecteur dans les temps précoces. Pour comparer l'inflammation entre les souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup> dans le modèle d'IR, nous avons prévu de réaliser des expériences de RT-qPCR avec des sondes dirigées contre les cytokines pro-inflammatoires *Il6*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf- $\alpha$* , *Il-18* et également contre la chémokine *Mcp-1*. Nous réaliserons également des ELISA sur des extraits de reins totaux pour confirmer nos résultats. Concernant les expériences *in vitro*, nous souhaiterions étudier l'action du principal DAMP libéré lors de l'IR : HMGB1. Nous étudierons son influence sur 1) l'expression de MUC1 dans des cultures primaires de macrophages issus de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> 2) la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages issus de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> et *Muc1*<sup>-/-</sup>. Si nous observons des différences sur les niveaux d'inflammation entre les deux groupes de souris traitées, nous pourrions par la suite utiliser une injection de TAK-242, un antagoniste du TLR4, pour comparer ses effets sur la réponse à l'IR. Comme l'injection de TAK-242 par voie intrapéritonéale quelques heures avant l'IR atténue les lésions rénales de l'IR (Mohammad *et al.*, 2018), nous faisons l'hypothèse que son injection aura un effet protecteur plus marqué dans le groupe *Muc1*<sup>-/-</sup> comparativement aux souris *Muc1*<sup>+/+</sup>.

### **3- Etudier l'influence de MUC1 sur les différentes populations macrophagiques**

Pour compléter les expériences précédentes, nous avons prévu de comparer la polarisation des macrophages par cytométrie de flux comme nous l'avons fait dans le modèle d'injection de LPS. Dans ce modèle, le rôle des différentes populations macrophagiques a été plus étudié que dans le modèle d'IRA septique. Il apparaît que la persistance de macrophages M1 est un des facteurs prédictif d'une dysfonction rénale plus sévère (Huen *et al.*, 2015). Etant donné les résultats obtenus sur le modèle d'injection de LPS, nous voudrions tester l'hypothèse que l'absence d'expression de MUC1 est associée à une infiltration plus importante de macrophages M1 au cours des temps précoces suivant l'IR.

Par ailleurs, le modèle d'IR permet également d'étudier les mécanismes à l'origine de la transition des lésions tubulaires aiguës vers la mise en place d'une fibrose rénale. Pour l'instant, nous avons quantifié par immunohistochimie l'infiltration rénale avec un marqueur pan-macrophagique (F4/80) et un marqueur plutôt orienté macrophages M2 (CD163). Nous avons mis en évidence de plus nombreux macrophages M2 dans les souris KO *Muc1* comparativement aux souris WT. Ce résultat est intrigant car les macrophages M2 sont connus pour jouer un rôle pro-fibrosant (Ming-Kuen Tang *et al.*, 2019) alors que nous avons observé que les souris KO *Muc1* développaient une fibrose moins sévère. Afin d'explorer ce résultat, nous souhaitons utiliser notre panel de cytométrie afin de tester l'expression

d'autres marqueurs M2 et M1. En fonction des résultats, nous nous proposons également d'étudier par immunohistochimie les populations de cellules lymphocytaires en particulier des T reg (à l'aide des marqueurs CD4 et FOXP3) dont la présence est étroitement associée aux macrophages M2a et M2c (Lu *et al.*, 2013)

## Partie 2

### 1- Rôle des macrophages dans le modèle d'injection ip. de LPS

La contribution exacte des macrophages au cours du sepsis induit par injection de LPS est méconnue. Dans la littérature, les injections de clodronate ont été utilisées par dépleter les macrophages dans plusieurs modèles d'IRA (Belliere *et al.*, 2015, Lu *et al.*, 2002). Dans le sepsis, ces expériences ont donné des résultats contradictoires. Ainsi, l'injection de clodronate par voie intraveineuse et intratrachéale semble être associée à une inflammation moins sévère au niveau pulmonaire (Koay *et al.*, 2002) alors que dans un autre modèle de sepsis par injection de LPS une autre équipe rapporte une mortalité de 100% des souris ayant été déplétées en macrophages comparativement à 25% des souris non déplétées (Zhang *et al.*, 2018). Dans cette dernière expérience, les auteurs ont montré que l'infusion de macrophages (prélevés au niveau du péritoine) dans les souris ayant subi une déplétion par clodronate permettait de diminuer significativement la mortalité (Zhang *et al.*, 2018). Comme nous l'avons discuté précédemment, nos résultats préliminaires sont également en faveur d'un rôle protecteur des macrophages dans ce modèle murin de sepsis. Dans la suite de nos expériences, nous prévoyons de refaire des expériences d'injection de LPS après injection de clodronate liposomale en utilisant des doses croissantes de LPS. L'efficacité de la déplétion sera contrôlée par cytométrie de flux sur la rate et sur les reins à l'aide du panel utilisé dans notre étude sur le modèle de LPS. Des expériences de sauvetage par infusion de macrophages polarisés *in vitro* vers un phénotype M1 ou M2 sont également prévues afin d'apprécier le rôle de ces deux populations macrophagiques dans la réponse au sepsis. D'autres modèles murins pourront également être utilisés pour confirmer l'importance des macrophages dans ce modèle comme par exemple l'utilisation de souris transgéniques ayant une expression du récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur du gène CD11b qui ont déjà été utilisées dans la littérature (Cailhier *et al.*, 2005; Heppner *et al.*, 2005).

### 2- Distinguer le rôle respectif de MUC1 dans le compartiment épithélial et immunitaire

Afin de faire le lien avec nos travaux sur le rôle de Muc1 dans l'IR et nos travaux sur le sepsis, nous prévoyons de comparer l'expression des marqueurs de TEM et des marqueurs de cellules souches entre souris *Muc1+/+* et *Muc1-/-* dans le modèle d'injection de LPS. Nous voulons déterminer si l'expression de MUC1 a également un rôle sur la plasticité épithéliale dans ce modèle où les lésions histologiques sont nettement moins sévères qu'au cours de l'IR. Nous prévoyons également de quantifier la mort cellulaire au niveau des cellules épithéliales par technique TUNEL et par immunohistochimie avec un anticorps

dirigé contre la caspase 3 clivée afin de comparer les souris *Muc1*<sup>-/-</sup> et *Muc1*<sup>+/+</sup>. Si ces expériences sont nécessaires, elles ne permettront pas d'apporter une réponse définitive sur le rôle respectif de l'expression de Muc1 au niveau des cellules épithéliales et des cellules immunitaires (en particulier les macrophages). Afin d'apporter des premiers éléments de réponse, nous prévoyons de réaliser des expériences d'irradiation médullaire suivie d'une injection par voie intraveineuse de cellules de moelle osseuse. Nous pourrons ainsi générer des souris *Muc1*<sup>(+/-)/mMuc1</sup><sup>(-/-)</sup> et *Muc1*<sup>(-/-)/mMuc1</sup><sup>(+/-)</sup> et comparer les résultats des expériences présentées dans ce manuscrit. Cette méthodologie sera utilisée à la fois dans le modèle de sepsis mais également dans notre modèle d'IR.

### **3- Etudier l'influence des cellules épithéliales tubulaires sur la polarisation macrophagique**

Un résultat important de notre manuscrit est la mise en évidence d'un rôle de MUC1 sur la polarisation macrophagique dans le modèle murin d'injection de LPS. Toutefois, à ce stade, nous ne savons pas si MUC1 influence cette polarisation en modifiant la signalisation entre les cellules épithéliales tubulaires et les cellules macrophagiques. Pour essayer de répondre à cette question, nous prévoyons d'utiliser des expériences de co-culture entre cellules épithéliales et cellules macrophagiques issues de souris *Muc1*<sup>+/+</sup> ou *Muc1*<sup>-/-</sup>. Les macrophages M0 (non polarisés) (issus de la moelle ou du péritoine) seront cultivés sur des inserts Transwell au dessus de culture primaire de cellules tubulaires rénales stimulées avec du LPS ou du PBS (condition contrôle). Les cellules épithéliales tubulaires rénales seront obtenues par centrifugation de broyat de reins totaux dans un gradient de Percoll comme cela a été décrit dans la littérature (Qi *et al.*, 2007). Avec ces expériences, nous pourrons comparer par cytométrie de flux et par RT-qPCR l'expression des marqueurs de macrophages M1 et M2 après 48h de co-culture (Li *et al.*, 2020) et étudier le rôle respectif de l'expression de MUC1 au niveau des cellules épithéliales tubulaires et macrophagique dans la polarisation des macrophages.

### **4- Etudier le rôle de MUC1 sur la voie du TLR4 indépendante de MYD88**

Dans notre travail, nous n'avons pas étudié spécifiquement l'interaction entre MUC1 et la voie du TLR4 indépendante de MYD88. Cette voie passe notamment par le recrutement de la protéine adaptatrice TRIF. Dans le poumon, il a été montré que MUC1 était capable d'inhiber le recrutement de TRIF par le TLR3 (Kato *et al.*, 2014). Etant donné le rôle potentiellement important de la voie TLR4 indépendante de MYD88 dans le sepsis induit par le LPS (Kawai *et al.*, 2001), nous souhaitons approfondir ce point. Pour ce faire, nous prévoyons de refaire des expériences de quantification par PLA sur des cellules HEK293 cotransfectées avec MUC1 et TLR4 mais cette fois ci avec un anticorps anti-TRIF. Nous

essayerons également de réaliser des expériences de co-précipitations et nous étudierons par Western Blot l'expression des autres protéines recrutées en aval du recrutement de TRIF.

## **METHODES**

## **PARTIE 1**

### **1- Modèles**

#### **1-1 Biopsies de greffon rénal**

Les prélèvements de tissus humains proviennent du Centre de Biologie Pathologie (CBP) du CHRU de Lille. Les échantillons étudiés ont été sélectionnés grâce à la base de données DIAMIC du service d'Anatomopathologie (Pr E. Leteurtre). Une recherche a été conduite avec le code « nécrose tubulaire aiguë » dans la codification ADICAP afin de sélectionner les prélèvements d'intérêt. Un consentement éclairé écrit a été obtenu par le clinicien de référence au moment de la réalisation des biopsies pour l'utilisation des données cliniques et histologiques à visée de recherche.

Les ponctions biopsies rénales (PBR) ont été traitées au CBP du CHRU de Lille. Pour chaque prélèvement, une carotte biopsique était conservée congelé dans du Tissue-Tek® O.C.T™ et une carotte était fixée dans un mélange d'Alcool-Formol-Acétique avant d'être incluse en paraffine selon les protocoles établis.

#### **1-2 Modèles cellulaires**

La lignée cellulaire suivante a été obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection) :

- **HEK-293** : lignée embryonnaire rénale humaine immortalisée (Graham *et al.*, 1977).

Les expériences sur les cellules épithéliales tubulaires ont été réalisées avec une lignée commerciale **HRPTEpiC** (ScienCell™)

##### **1-2-1 Conditions de culture**

La culture cellulaire était réalisée sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. Les lignées étaient cultivées sur support plastique, dans un flacon de culture de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (T25 ou T75 Falcon®) à bouchon ventilé et incubées dans un incubateur à 37°C en atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'air. Les expériences étaient réalisées à un taux de confluence de 70-80 %. L'appréciation de la confluence était réalisée par contrôle visuel au microscope inversé.



## 1-2-2 Milieux de culture

### HRPTEpiC

Milieu EpiCM® (ScienCell™) enrichi avec 2% de sérum de veau fœtal, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de facteur de croissance (EpiCGS, ScienCell™).

### HEK-293

DMEM (Gibco™) enrichi avec 10% de Sérum de Veau Fœtal, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline + Streptomycine, 100 µg/mL de Normocine®, 10 µg/mL de Blastidicine® et 50 µg/mL d'Hygromycine B Gold®.

## 1-2-3 Transfection

Les expériences de transfection ont toutes été effectuées sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. Les transfusions transitoires d'ADN plasmidiques étaient réalisées sur des cellules à 70 % de en suivant les recommandations du kit « Lipofectamine LTX & Plus Reagent » (Invitrogen™). En plaque 24 puits, les conditions suivantes ont été suivies :

	Volume final	Volume dilution	Quantité de plasmide	Volume de PLUS Reagent	Volume de Lipofectamine + LTX
24 puits	250 µL	50µL	0,25 µg	1 µL	0,75 µL

**Tableau 1 : Liste des vecteurs utilisés**

Nom	Origine
MUC1-pcDNA3.1	don de S.J. Gendler (Mayo Clinic, USA)
Empty Vector -pcDNA3.1	don de S.J. Gendler (Mayo Clinic, USA)

## 1-3 Modèle animal d'ischémie / reperfusion

Le modèle animal d'ischémie/reperfusion mis au point par notre équipe a été utilisé :

Brièvement, la chirurgie d'ischémie/reperfusion rénale a été réalisée chez des souris mâles âgées de 6 semaines après incision latéralo-abdominale. L'anesthésie a été induite par inhalation d'isoflurane. Pour induire une ischémie, le pédicule rénal gauche a été clampé pendant 25 min avec des clips microvasculaires non traumatiques. L'ischémie du rein gauche a été vérifiée par un changement de couleur rénale. Après le retrait du clamp, la

restauration du flux sanguin a été contrôlée visuellement. Les reins ont été prélevés aux jours 2, 4, 7, 14 et 28 de la reperfusion. Les souris contrôles « sham » ont subi les mêmes interventions chirurgicales mais sans clamage vasculaire. Les tissus rénaux ont été divisés pour congélation ou fixation dans 4% de formaldéhyde avant l'inclusion de paraffine.

## 2- Expériences d'hypoxie / réoxygénation

Les expériences d'hypoxie étaient réalisées dans un incubateur CO<sub>2</sub> / O<sub>2</sub> BINDER®. Les cellulesensemencées dans des flacons de culture à bouchon ventilé, étaient maintenues constamment à 1% d'O<sub>2</sub> avec 5% de CO<sub>2</sub> et 94% de N<sub>2</sub> en atmosphère humidifiée à une température contrôlée de 37 °C.

## 3- Cytométrie de Flux

Les acquisitions ont été effectuées sur la plateforme de cytométrie et de tri cellulaire Insem IFR-114 avec un cytomètre cinq lasers, 18 couleurs (BD LSRFortessa™ X-20). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Kaluza® (Beckman Coulter™).

Pour chaque anticorps, une gamme a été réalisée afin de sélectionner la concentration optimale. Les cellules étaient détachées avec de la trypsine, centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes puis comptées sur cellule de Malassez. L'incubation de l'anticorps (Tableau 2) était effectuée dans des tubes Eppendorf® contenant 250 000 cellules remises en solution dans 100 µl de milieu selon les conditions indiquées dans le tableau ci-dessous. Lors de chaque analyse, les réglages du cytomètre étaient effectués grâce à un tube d'auto-fluorescence et un tube isotype contrôle couplé au même fluorochrome que l'anticorps étudié.

**Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie de flux avec leur fluorochrome**

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Fluorochrome</b>
MUC1	VU4H5	Santa Cruz	PE
CD10	CB-CALLA	e-bioscience	APC
CD13	WM15	e-bioscience	PE

## 4- Expériences d'anoïkis

Les cellules HEK-293, transfectées de manière stable avec un vecteur exprimant MUC1 (don de SJ Gendler, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA) ou un vecteur vide (EV), ont été cultivées dans des plaques 96 puits coatées avec 50 µL de PolyHema (12 mg/mL; Sigma Aldrich, France) afin d'inhiber l'adhérence des cellules. Des plaques de 96 puits non coatées étaient utilisées comme condition contrôle.

Pour tester l'impact de MUC1, les cellules HEK-293 ont été traitées avec 5  $\mu$ M GO-203 (GenScript™), qui inhibe la dimérisation du peptide MUC1 ou avec le peptide contrôle CP2 (GenScript™).

La survie cellulaire était étudiée, en cytométrie de flux, à l'aide d'un kit Annexin V/IP selon les instructions du fabricant (Santa Cruz Biotechnology™). La survie était quantifiée en considérant uniquement le pourcentage de cellules n'exprimant aucun des deux marqueurs.

## 5- Analyse histologique

### 5-1 Procédures d'immunofluorescence

Avant utilisation, les prélèvements sont remis à température à l'air libre pendant 15 minutes puis pendant 15 minutes (minimum) dans du PBS 1x. La saturation des sites antigéniques était réalisée en incubant les tissus dans du sérum albumine bovine (BSA) à 0,1% pendant une heure. La perméabilisation, si nécessaire, était réalisée par l'ajout d'une solution à 0,1% Triton X100 pendant 1 heure. Puis 100  $\mu$ l de l'anticorps primaire (Tableau 3), dilué dans du PBS 1x contenant de la BSA à 0,1%, était déposé sur la coupe. L'incubation se faisait sur la nuit à +4°C. Le lendemain, l'anticorps secondaire était déposé pendant 1 heure à température ambiante. Les lames étaient montées avec le milieu Fluoprep de BioMerieux®.

**Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence avec leur dilution**

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution</b>
Muc1	CT-2	ThermoFischer	1:200
Muc1	M8	Cell Signaling	1:50
Lotus			
Tetragonolobus		Vector Labs	1:200
CD133/2	293C3	Miltenyi Biotech	1:10
KIM-1		R&D systems	1:10

### 5-2 Procédures d'immunohistochimie

Les coupes histologiques étaient déparaffinées dans du xylène, réhydratées par des bains d'alcool de pureté décroissante puis faisaient l'objet d'un démasquage antigénique si nécessaire (Tableau 4). Les coupes étaient immergées dans de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% pendant 15 min pour bloquer les peroxydases endogènes. Le blocage de l'avidine et de la biotine endogène était réalisé avec le kit Dako™ Cytomation Biotin blocking system. Les coupes étaient ensuite incubées avec l'anticorps primaire (Tableau 4) sur la nuit à +4°C. L'anticorps secondaire biotinylé était déposé pendant 1 heure à température ambiante. La détection se

faisait grâce au Vectastain Elite ABC kit (Vector Labs™) selon le protocole fourni par le fournisseur. La révélation était réalisée en déposant 100 µl/coupe de SIGMAFAST® 3,3'-Diaminobenzidine.

**Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie avec leur dilution**

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Pré-traitement</b>	<b>Dilution</b>
<b>Homme</b>				
Muc1	CT-2	ThermoFischer	CC1 (automate)	1:200
β-caténine	610153	Cell Signaling	CC1 (automate)	1:500
Vimentine	V9	Dako	CC1 (automate)	1:300
<b>Souris</b>				
Caspase 3 clivée	9664	Cell Signaling	CC1 (automate)	1:50
F4/80	14-4801	e-Bioscience	Protéinase K	1:10
CD163	NBP1-30148	Novus Biological	CC1 (automate)	1:100

### **5-2-1 Essai TUNEL**

La détection des cellules en apoptose a été réalisée à l'aide d'un kit ApopTag®Plus Peroxidase In Situ Apoptosis (MerckMillipore™, S7101) selon les instructions de fabricant. Le principe du test repose sur l'incubation du tissu avec de la TdT transférase qui ajoutera un dUTP biotinylé en cas de dommage à l'ADN. Une révélation classique d'immunohistochimie permet d'observer le signal. Les cellules positives pour TUNEL ont été comptées dans 10 champs à fort grossissement (× 400) choisis au hasard au niveau du cortex rénal.

### **5-2-2 Marquage combiné d'immunofluorescence et d'immunohistochimie**

Pour déterminer la triple expression de MUC1; la vimentine ou la β-caténine; et de la lectine Lotus Tétragonolobus, un processus de marquage en trois étapes a été réalisé. Les deux premières étapes de l'immunohistochimie ont été réalisées sur l'automate Ventana Benchmark XT (Roche, Ventana™). Après déparaffinage et démasquage antigénique, les tissus ont été incubés avec l'anticorps anti-MUC1 (LICR-LON-M8) et révélés en utilisant le kit de détection universel DAB UltraView (Roche, Ventana™). Ensuite, un deuxième marquage a été réalisé avec un anticorps anti-β-caténine (BD TransductionLaboratories™, 610153) ou anti-vimentine (Dako™, IS63030-2) et révélée en utilisant le kit de détection rouge ultraView Universal Alkaline Phosphatase (Roche, Ventana™). Dans l'étape finale, les lames ont été

incubées pendant deux heures à température ambiante avec de la lotus tétragonolobus couplée à la fluorescéine (Vector Labs™ ; FL-1321) avant d'être montées avec le milieu Fluoprep (Biomerieux™).

### **5-3 Marquage et quantification de la fibrose**

Les coupes de reins ont été acquises au grossissement de x 200 en microscopie optique. Des analyses histomorphométriques ont été réalisées avec un logiciel d'analyse d'images (logiciel Mercator-Explora Nova, La Rochelle, France) à l'aide du personnel de la plateforme d'imagerie Bio Imaging Center de Lille (responsable M.Tardivel).

### **5-4 Analyse des coupes**

La lecture et les photos des coupes histologiques ont été effectuées sur un microscope optique Leica DM 4000 B équipé d'une lampe spectrale Ebq 100 ou en microscopie confocale sur un LSM 710 de Zeiss.

## **6- Analyse en RT-qPCR**

### **6-1 Extraction des ARN totaux**

Les ARN totaux étaient extraits à l'aide du kit miRNeasy® (Qiagen™). Brièvement, le tapis cellulaire était gratté dans 700 µl de Qiazol Lysis Reagent puis conservé à -80°C. La phase aqueuse contenant les ARN totaux était ensuite récupérée dans un tube Eppendorf® auquel on rajoutait 140 µl d'isopropanol. Une centrifugation à 10 000g à +4 °C pendant 15 minutes permettait de récupérer le surnageant qui était repris dans de l'éthanol. Les ARN totaux ont été extraits à partir des cultures cellulaires, au moyen du kit «RNeasy Mini Kit» de Qiagen™ selon les instructions du constructeur. Au final, les ARN étaient conservés à -80 °C. Avant utilisation, la quantité et la pureté des ARNs étaient déterminées par mesure des densités sur le spectromètre Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific).

## 6-2 Obtention des ADNc

Les ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcriptase » (Invitrogen™) sur un thermocycleur « MJ Mini Thermal Cycler » (Biorad™) en utilisant le programme suivant :

- 25 °C : 10min
- 37°C : 120min
- 85°C : 5min
- 4°C : Infini

Le mélange réactionnel était constitué des ARN totaux et de 10X RT Buffer, 25X dNTP Mix, 10X RT Random primer, Multiscribe™ Reverse Transcriptase.

## 6-3 qRT PCR par technique Taqman®

Un mélange pour PCR constitué d'ADNc, de MasterMix (Applied Biosystem™), d'eau stérile et de sondes TaqMan spécifiques des gènes d'intérêt était analysé sur l'appareil CFX96 Touch System (BioRad™) à l'aide du programme suivant :

- 50 °C : 12min
  - 95 °C : 10min
- 40 cycles constitués :
- 95 °C : 15sec
  - 60 °C : 1 min
  - 4°C : Infini

Les résultats étaient analysés à l'aide du logiciel CFX Manager™. L'expression relative des ARN a été calculée par la formule  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  en prenant pour contrôle le gène Ppia. L'expression relative des différents gènes était comparée à celle des souris *Muc1*<sup>+/+</sup> ayant reçu du PBS.

**Tableau 5 : Liste des sondes utilisées**

<b>Gène</b>	<b>Référence</b>
<b>Homme</b>	
Snail 1	Hs00195591_m1
Snail2	Hs00161904_m1
Vimentine	Hs00418522_m1
E-Cadhérine	Hs01023895_m1
Muc1	Hs00159357_m1
<b>Souris</b>	
Actine muscle lisse	Mm00808218_g1
Occludine	Mm00500912_m1
ZO-1	Mm01320638_m1
Fibronectine	Mm01256744_m1
Collagène 1	Mm00801666_g1

## **7- Analyse protéique**

### **7-1 Extraction protéique**

Après aspiration du milieu, les cellules étaient lavées avec du PBS stérile 1X puis grattées manuellement à deux reprises. Elles étaient ensuite récupérées et centrifugées à 1200 tours / minute pendant 5 minutes. Le surnageant était aspiré et le culot repris avec 400 µL de tampon de lyse RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay, 25 mM Tris-HCL pH 7,6 ; 150 mM NaCl ; 1% NP40 ; 1% Sodium deoxycholate ; 0,1% SDS) auquel a été ajouté des inhibiteurs de protéases (Complete Minitablet, Roche™). Les cellules étaient transférées dans des tubes Eppendorf® préalablement refroidis sur la glace. Les cellules faisaient ensuite l'objet d'une sonication (5 pulses) pendant 1 minute puis laissées en rotation pendant une heure à 4°C. Après une dernière centrifugation de 20 minutes à 14 000 tours / minutes à la température de 4 °C, les surnageants (extraits cellulaires totaux) étaient conservés à -80 °C.

### **7-2 Dosage protéique**

Le dosage de protéines était réalisé par la méthode du BCA (acide bicinchoninique) avec utilisation du kit « BCA Protein Assay® » (Pierce™). Une gamme étalon était réalisée avec la BSA et les prélèvements déposés en double. 2 µl de chaque extrait était déposé et complétée de 200 µl de BCA. La plaque était incubée 1 heure à 37 °C sous agitation. La

densité optique était lue à 570 nm sur un Photomètre pour microplaques Multiskan™ FC (Thermo Scientific). Les concentrations de protéines étaient alors déterminées en rapportant les DO des échantillons à la gamme étalon.

### 7-3 Western Blot

10 µg de protéines totales étaient mélangées à un tampon de charge dénaturant contenant 5 µl de Lithium Dodecyl Sulfate (LDS), 2 µl d'agent réducteur et de l'eau pour un volume final de 20 µl. Le mélange était dénaturé pendant 5 minutes à 96 °C. Les protéines étaient déposées dans un microgel d'agarose fixé dans une cuve d'électrophorèse Xcell surelock™ Mini cell. L'électrophorèse était effectuée à l'aide d'un tampon MOPS (NuPAGE Invitrogen™). Après migration (60 min à 200 V), les protéines étaient transférées (70 min à 30 V) sur une membrane de nitrocellulose (Hybond™, GE Amersham). L'efficacité du transfert était contrôlée par une coloration au rouge Ponceau (0,2 % de rouge, 3 % d'acide trichloracétique dans de l'eau distillée). Après une nuit à +4 °C dans une solution de blocage (5% lait écrémé dilué dans du tampon TBST contenant 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl et 0.05% Tween 20) sous agitation, les membranes étaient rincées 3 x 5 min avec 10 ml de TBST avant d'être incubées avec les anticorps d'intérêt (Tableau 6) dilués dans du TBST sous agitation à température ambiante pendant 2 heures. Les membranes étaient rincées 3 x 5 minutes avec 10 ml de TBST puis l'anticorps secondaire spécifique couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) était appliqué pendant 1 heure. Les bandes immunoréactives étaient visualisées par chimioluminescence à l'aide du kit Super Signal System (Pierce) et du LAS 4000 (Fujifilm™).

**Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot avec leur dilution**

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution</b>
MUC1	CT2	ThermoFischer	1:3000
β actine	A5441	Sigma Aldrich	1:5000



## **PARTIE 2**

### **1 - Modèles cellulaires**

#### **1-1 Lignées cellulaires**

##### **1-1.1 Lignées**

La lignée cellulaire suivante a été obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection) :

- **HEK-293** : lignée embryonnaire rénale humaine immortalisée (Graham et al, 1977).

La lignée cellulaire suivante a été achetée chez Invivogen :

- **HEK-293 –TLR4 –MD2 –CD14** : lignée embryonnaire rénale humaine immortalisée avec co-transfection stable avec les plasmides pUNO-hTLR4 et pDUO2-hMD2-hCD14.

##### **1-1.2 Milieux utilisés**

###### **HEK-293**

DMEM (Gibco™) enrichi avec 10% de Sérum de Veau Fœtal, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline + Streptomycine, 100 µg/mL de Normocine®, 10 µg/mL de Blastidicine® et 50 µg/mL d'Hygromycine B Gold®.

##### **1-1.3 Conditions de culture**

La culture cellulaire était réalisée sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. Les lignées étaient cultivées sur support plastique, dans un flacon de culture de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (T25 ou T75 Falcon®) à bouchon ventilé et incubées dans un incubateur à 37 °C en atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'air. Les expériences étaient réalisées à un taux de confluence de 70-80 %. L'appréciation de la confluence était réalisée par contrôle visuel au microscope inversé.

## **1-2 Cultures primaires**

Les cellules ont été recueillies à partir de souris de fond génétique C57BL/6J *Muc1*<sup>+/+</sup> ou *Muc1*<sup>-/-</sup> âgées de 6 à 10 semaines. (Obtenues auprès du Dr Sandra Gendler, Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona, USA).

### **1-2.1 Cultures primaires de macrophages murins**

#### **1-2-1.1 Extraction des cellules hématopoïétiques médullaires**

Après sacrifice des souris par dislocation cervicale, la surface externe de la souris est lavée avec de l'éthanol à 70%. La peau est retirée avec des ciseaux et une pince stérile puis la peau et les muscles sont détachés des os. Le tibia est séparé du fémur au niveau de l'articulation à l'aide des ciseaux. Les os sont transférés dans des Falcon contenant 5 mL de PBS stérile et glacé. La suite des manipulations est réalisée sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. Les deux extrémités des tibias et des fémurs sont coupées à l'aide des ciseaux. Puis à l'aide d'une seringue contenant 10 mL de PBS stérile et d'une aiguille de 25G, la moëlle est extraite au dessus d'un tube Falcon de 50 mL. Cette étape est répétée jusqu'à extraction de la totalité de la moëlle (contrôle visuel). Le contenu du tube est ensuite filtré avec un filtre de 70 µm pour éliminer les débris osseux. Les cellules sont alors centrifugées à 300g pendant 5 minutes à 4 °C. Les érythrocytes sont lysés à l'aide d'une solution hypotonique de chlorure d'ammonium NH<sub>4</sub>Cl à 0,15M pendant 1 minute.

#### **1-2-1.2 Différenciation en macrophages**

Après réalisation d'un compte cellulaire au bleu trypan, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 2 x 10<sup>6</sup> cellules par puit. Elles sont cultivées pendant 7 jours dans un milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco™) additionné de 1% de pénicilline-streptomycine, de 5% de sérum de veau foetal (SVF) et de 25ng/mL de rmM-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor murine recombinante) (ImmunoTools™). Le milieu est changé tous les deux jours.

#### **1-2-1.3 Extraction des macrophages péritonéaux**

Pour générer une irritation péritonéale et augmenter le nombre de macrophages, les souris ont été injectées avec 1 mL de thioglycollate medium brewer (BD Bioscience™) à 4% 3 jours avant la date du recueil. Le thioglycollate a été préparé puis passé à l'autoclave au moins 1

mois avant son utilisation. Le jour du recueil, les souris sont euthanasiées au CO<sub>2</sub>. Les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. L'abdomen est lavé avec de l'éthanol à 70% puis une incision centrale est réalisée. À l'aide d'une pince, la peau abdominale est écartée pour exposer la peau péritonéale transparente. À l'aide d'une seringue de 5 ml fixée à une aiguille de 20 G, on injecte 5 ml de PBS stérile et glacé. En laissant l'aiguille en place, on exécute un massage délicat de la paroi distendue. Puis à l'aide d'une seringue neuve, on aspire le liquide en déplaçant très délicatement l'aiguille à l'intérieur de la cavité péritonéale. En cas de brèche sanguine ou de perforation d'un organe, le prélèvement est détruit. On centrifuge pendant 10 min à 400g dans une centrifugeuse à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans du milieu RPMI contenant du SVF 5% et 25ng/mL de rmM-CSF et mis en culture à une densité de 5 x 10<sup>5</sup> cellules par puits de plaque 12 puits.

#### **1-2-1.4 Polarisation des macrophages**

Les macrophages adhérents ont été différenciés en macrophages de phénotype M1 ou M2 par l'addition de :

- 100 ng / ml de LPS (*E. coli* O111: B4, Sigma Aldrich™) plus 20 ng / ml d'IFN-γ murin (Peprotech®) afin d'obtenir un phénotype M1

ou

- 20 ng / ml d'IL-4 murine plus 20 ng / ml d'IL-13 murine (Peprotech®). afin d'obtenir un phénotype M2

Les contrôles de polarisation étaient réalisées par RT-qPCR en étudiant l'expression de gènes associés au phénotype M1 (CD86 et *Nos2*) et M2 (*Chil3* et *Arg1*). Des macrophages non engagés (macrophages M0) qui n'ont reçu que du milieu de culture et du rmM-CSF ont été utilisés comme témoins.

#### **1-2-2 Cultures primaires de macrophages humains**

##### **1-2-2.1 Obtention des monocytes humains**

Des monocytes humains isolés par élutriation à contre-courant à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique ont été achetés auprès de la Plateforme DTC-CICBT0503, Institut de Biologie, CHU Hôtel Dieu de Nantes.

### 1-2-2.2 Macrophages humains

Pour induire la différenciation des monocytes en macrophages, les monocytes ont été mis en culture pendant 5 jours à la densité de  $1 \times 10^6$  dans un milieu RPMI contenant 5% de SVF, 1% de pénicilline-streptomycine et

- 25 ng / ml de facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages humains (rhGM-CSF) (Peptotech®) en vue d'une future polarisation vers un phénotype M1

ou

- 100 ng / ml de facteur de stimulation des colonies de macrophages humains (rhM-CSF) (Peptotech®) en vue d'une future polarisation vers un phénotype M2.

Le milieu était changé tous les deux jours.

### 1-2-2.3 Polarisation des macrophages

Les macrophages adhérents ont ensuite été polarisés vers un phénotype M1 ou M2 par l'addition de :

- 50 ng / ml de LPS (*E. coli* O111: B4, Sigma Aldrich) plus 20 ng / ml d'IFN- $\gamma$  humain (Peptotech®) afin d'obtenir un phénotype M1

ou

- 20 ng / ml d'IL-4 humain plus 20 ng / ml d'IL-13 humain (Peptotech®). afin d'obtenir un phénotype M2

Les contrôles de polarisation étaient réalisées par RT-qPCR en étudiant l'expression de gènes associés au phénotype M1 (IRF5 et IFN- $\gamma$ ) et M2 (IRF4 et IL-10). Des macrophages non engagés (macrophages M0) qui n'ont reçu que du milieu de culture et du rhM-CSF ont été utilisés comme témoins.

## 2 – Modèle murin d'injection intra péritonéal de LPS

### 2-1 Obtention des souris

Des souris de fond génétique C57BL/6J déficientes pour *Muc1* (KO *Muc1*) ont été obtenues auprès du Dr Sandra Gendler (Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona, USA). Des souris

hétérozygotes mâles et femelles (*Muc1*<sup>-/+</sup>) étaient croisées pour donner des souris sauvages « WT » (*Muc1*<sup>+/+</sup>) et des souris déficientes pour *Muc1* (*Muc1*<sup>-/-</sup>).

Le génotypage des souris KO *Muc1* était déterminé par PCR en utilisant les amorces=*Muc1/LacZ* dont les séquences étaient :

- sens : 5'-CCTCACACACGGAGCGCCAGC-3'

- anti-sens-LACZ : 5'-TTCTGGTG-CCGGAACCCAGGC-3'.

L'amplicon obtenu était de 300 pb. Le statut de souris sauvages (WT) était confirmé en utilisant la même amorce sens et l'amorce anti-sens suivante : 5'-TCCCCCTGGCACATACTG-GG-3'.

L'amplicon obtenu était également de 300 pb. La réaction de PCR était amplifiée pendant 40 cycles de 30s à 95 °C, 30s à 61 °C, and 30s à 72 °C (Pochampalli *et al.*, 2007a).

## **2-2 Protocole expérimental**

Les souris ont été hébergées en animalerie Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) dans des cages standard à température constante (24 ° C), avec un cycle lumière-obscurité de 12/12h. Des souris femelles de 6-8 semaines ont été utilisées pour cette expérimentation. Elles ont été nourries avec un régime standard et ont eu libre accès à l'eau. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique du Nord-pas-de-Calais (CEEA n°2016081119216614). Les injections intrapéritonéales (IP) ont été réalisées avec du LPS Ultrapure (InvivoGen™) à la concentration de 10 mg/kg. Le contrôle a été réalisé par injection d'un volume identique de PBS stérile.

Les souris étaient mises à mort au bout de 6h, 24h ou 48h. Les reins étaient recueillis immédiatement après le décès. La paroi abdominale était désinfectée à l'éthanol 70% puis une incision centrale était réalisée. Les reins étaient récupérés et immédiatement décapsulés par frottement entre la pulpe de deux doigts. Chaque rein était alors tranché en deux. Une moitié était fixée par le formol tamponné à 10% pendant 12 heures puis incluse en paraffine. L'autre moitié était congelée dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour les extractions d'ARNm et de protéines.

## **2-3 Dosage de l'urée sanguine (BUN).**

A 24 h après l'injection de LPS ou de PBS, une incision au niveau de la veine de la queue était réalisée après avoir induit une vasodilatation à l'aide d'une lampe chauffante. Le sang était récupéré dans des tubes héparinés de type Microvette 300.

La concentration d'urée sanguine (BUN) était déterminée sur automate AU480 Chemistry Analyzer (Beckman Coulter™, Brea, CA, USA).

## **2-4 Analyse anatomopathologiques des tissus**

### **2-4.1 Traitement des tissus**

Les reins ont été inclus en paraffine au niveau du service d'Histologie de la faculté de médecine de Lille (dirigé par le Pr CA Maurage). Une coloration HES et PAS étaient réalisées sur des coupes de 3-4 µm.

### **2-4.2 Analyse morphologique**

Les lésions de souffrance tubulaire aiguë étaient définies par la présence d'un des signes suivants : une perte de la bordure en brosse des tubes proximaux, un gonflement ou une vacuolisation des cellules épithéliales, la présence de cylindres protéiques intratubulaires et une diminution de la hauteur épithéliale. Un seul de ces signes était suffisant pour considérer une section tubulaire entière comme pathologique. Un score histologique de lésions tubulaires a été établi, prenant en compte le pourcentage de sections tubulaires atteintes au niveau de la surface corticale : score 1 < 10%, score 2 = 10%–25%; score 3 = 26%–50%; score 4 = 51%–75%; score 5 > 75%,

### **2-4.3 Analyse immunohistochimique**

Pour les techniques manuelles, les tissus étaient tout d'abord déparaffinés dans le xylène avant d'être immergés dans des bains d'alcool de pureté décroissante. Un blocage des peroxydases endogènes était effectué en déposant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3% pendant 15 minutes sur les tissus. Après lavage au PBS, un blocage des biotines et avidines endogènes était réalisé à l'aide du kit Dako™ Cytomation Biotin blocking system. L'incubation de l'anticorps primaire était effectuée en chambre humide, sur la nuit, à 4 °C. Un anticorps secondaire adapté à l'espèce de l'anticorps primaire et couplé à la biotine était ensuite utilisé. La détection se faisait grâce au Vectastain Elite ABC kit (VectorLabs™) et la révélation à l'aide de 3,3'-Diaminobenzidine (SIGMAFAST®, Sigma Aldrich™)

Pour les techniques automatisées, les marquages étaient réalisés sur l'automate Ventana BenchMark GX en utilisant des lames Dako™ Flex.

**Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie**

Nom	Marque / Clone	Espèce	Technique	Concentration	Prétraitement
MUC1	Clone MH1 (CT2)	Hamster Arménien	Automate	"1/500"	CC1 32'
NIMP-R14	Santa Cruz, sc-59338	Rat	Automate	"1/50"	CC1 60'
F4/80	Bio-Rad, Cl:A3-1	Rat	Manuelle	"1/10"	Protéinase K
p65 (phospho S536)	Abcam, ab86299	Lapin	Automate	"1/100"	CC1 32'

Pour la quantification des marquages immunohistochimiques avec les anticorps anti-F4/80 et NIMP-R14, le nombre de cellules marquées sur 10 champs, représentatifs du cortex rénal, au plus fort grossissement ont été considérés.

Pour la quantification des marquages immunohistochimiques avec l'anticorps anti-p65, le nombre de cellules épithéliales tubulaires marquées sur 10 champs, représentatifs du cortex rénal, au plus fort grossissement ont été considérés.

#### 2-4.4 Immunofluorescence

L'obtention d'une couche simple de cellules était réalisée à l'institut de Pathologie de Lille (Chef de Service : E. Leteurtre). Les cellules étaient détachées, centrifugées et reprises dans 500µL de PBS. La préparation cellulaire en couche mince était réalisée sur une cytocentrifugeuse Thermo Scientific™ Cytospin™ 4. Les coupes étaient fixées à l'acétone. La saturation des sites antigéniques était réalisée en incubant les tissus dans du sérum albumine bovine (BSA) à 0,1% pendant une heure. L'incubation avec l'anticorps primaire se faisait sur la nuit à +4°C. Le lendemain, l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome FITC était déposé pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires étaient dilués dans l'Antibody Diluent (Roche™, Ventana). Les lames étaient montées avec le milieu Fluorescence Mounting Medium de Dako® et examinées sur un microscope à fluorescence Leica™ DM2000. L'acquisition des images a été réalisée grâce au logiciel Leica™ Application Suite.

#### Anticorps utilisé :

Nom	Clone	Provenance	Concentration
MUC1	M8	Don du Dr Swallow	"1:50"

## 2-5 Analyse en RT-qPCR

### 2-5.1 Extraction des ARNs totaux

Un quart de rein cryoconservé était utilisé pour les analyses en RT-qPCR. Une dissociation mécanique du prélèvement sur l'appareil GentleMACS Dissociator (Miltenyi™) était effectuée avec un tube gentleMACS M contenant 750 µl de Qiazol Lysis Reagent suivant le programme « ARN\_02 ». Les échantillons étaient centrifugés à 10 000g pendant 5 minutes puis congelés à -80°C. Les ARN totaux ont été extraits à partir des, au moyen du kit «RNeasy Mini Kit» de Qiagen™ selon les instructions du constructeur. Au final, les ARN étaient conservés à -80 °C. Avant utilisation, la quantité et la pureté des ARNs étaient déterminées par mesure des densités sur le spectromètre Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific™).

### 2-5.2 Obtention des ADNc et RT-qPCR par technique Taqman®

Les techniques ont été réalisées conformément aux modalités décrites dans les sous sections 2-5.2 et 2-5.3

**Tableau 8: Liste des sondes utilisées**

Gène	Référence
Nos2	Mm00440502
Arg1	Mm00475988
Kim-1	Mm00506686
IL-6	Mm00446190
TNF	Mm00443258
IL1B	Mm00434228
ICAM1	Mm00516023
Tlr4	Mm00445273
Muc1	Mm00449604
Ccl2	Mm00441242
Ppia	Mm02342430
Chil3	Mm00657889
Cd86	Mm00444543



## **2-6 Analyse protéique**

### **2-6.1 Extraction protéique**

Un quart de rein cryoconservé était utilisé pour les analyses protéiques. Une dissociation mécanique du prélèvement sur l'appareil GentleMACS Dissociator (Miltenyi™) était effectuée avec un tube gentleMACS M contenant 1 mL de PBS supplémenté en inhibiteurs de protéases (Complete Minitablet, Roche™) et suivant le programme « Protein\_01 ». Les échantillons étaient centrifugés à 10 000g pendant 5 minutes puis congelés à -80°C.

### **2-6.2 Dosage des protéines et techniques ELISA**

Les techniques ont été réalisées conformément aux modalités décrites dans les sous sections 2-4.2 et 2-4.3.

## **2.7 Cytométrie en flux**

### **2-7.1 Préparation d'une suspension cellulaire**

Les reins sont récupérés, décapsulés puis homogénéisés en utilisant un le dissociateur gentle MACS™ (Miltenyi Biotec™). Pour se faire, les reins sont mis dans des tubes gentleMACS C Tubes et dissocié selon les instructions du fabricant (programme D). Ensuite le broyat obtenu est transféré à l'étuve sur un portoir rotatif dans une solution de 6 mL de DMEM complet (milieu modifié de Eagle de Dulbecco) / F12 1:1 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) contenant 2 mg / mL de collagénase IV (activité enzymatique: 200 U / mL) (Invitrogen) et 20% de dispase (Becton Dickinson™, Le Pont de Claix, France). La suspension obtenue est alors filtrée à travers des filtres avec un maillage de 70 µm. Cette étape est répétée pendant 3 cycles de 30 min à 37°C. Après les étapes de digestion, la suspension cellulaire est lavée deux fois dans du PBS et centrifugée pendant 5 minutes à 300 g. Les érythrocytes ont été lysés en utilisant un tampon de lyse RBC (eBioscience™) et la suspension cellulaire est utilisée immédiatement pour les étapes suivantes.

### **2-7.2 Réalisation des marquages**

Un traitement de la suspension cellulaire était systématiquement réalisé avec un mélange Fc Block (Biosciences) afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques. L'ensemble des

dilutions étaient effectuées avec un tampon de réaction contenant 2% de BSA. La concentration spécifique de chaque anticorps était déterminée à partir des recommandations du produit et après un test de réalisation d'une gamme de concentrations.

En l'absence d'anticorps cytoplasmique, aucune étape de perméabilisation n'était requise. L'incubation des anticorps primaire et secondaire s'effectuait à l'obscurité, sur glace, pendant 30 minutes.

### 2-7.3 Anticorps, isotypes et compensation

Le tableau récapitule la liste des marqueurs et des fluorochromes utilisés. L'ensemble des réactifs a été acheté chez BD Biosciences.

**Tableau 9 : Liste des anticorps et fluorochromes utilisés**

Nom	Clone	Espèce	Fluorochrome
Fixable Viability Stains			BV510
CD45	30-F11	Rat (IgG2b,k)	BUV395
Ly6G	1A8	Rat (IgG2a,k)	PE CF594
MHC class II	M5/114	Rat (IgG2b,k)	BV786
CD11b	M1 / 70	Rat (IgG2b,k)	AF488
CD11c	N418	Hamster Arménien (IgG2)	BV605
CD38	90 / CD38	Rat (IgG2a,k)	BV421
CD206	C068C2	Rat (IgG2a,k)	PE Cy7

Du fait du recouvrement spectral (détection du signal d'un fluorochrome par plus d'un détecteur de cytomètre), un calcul de la compensation a été effectué et une matrice de compensation a été générée par Nathalie Jouy (responsable de la plateforme de cytométrie à l'IRCL). Cette matrice a par la suite été utilisée dans toutes les étapes d'analyse.

Des contrôles isotypiques ont été utilisés pour chaque anticorps afin d'établir les seuils de positivité des différentes « gates » du panel.

### 2-7.4 Acquisition des résultats et stratégie de fenêtrage

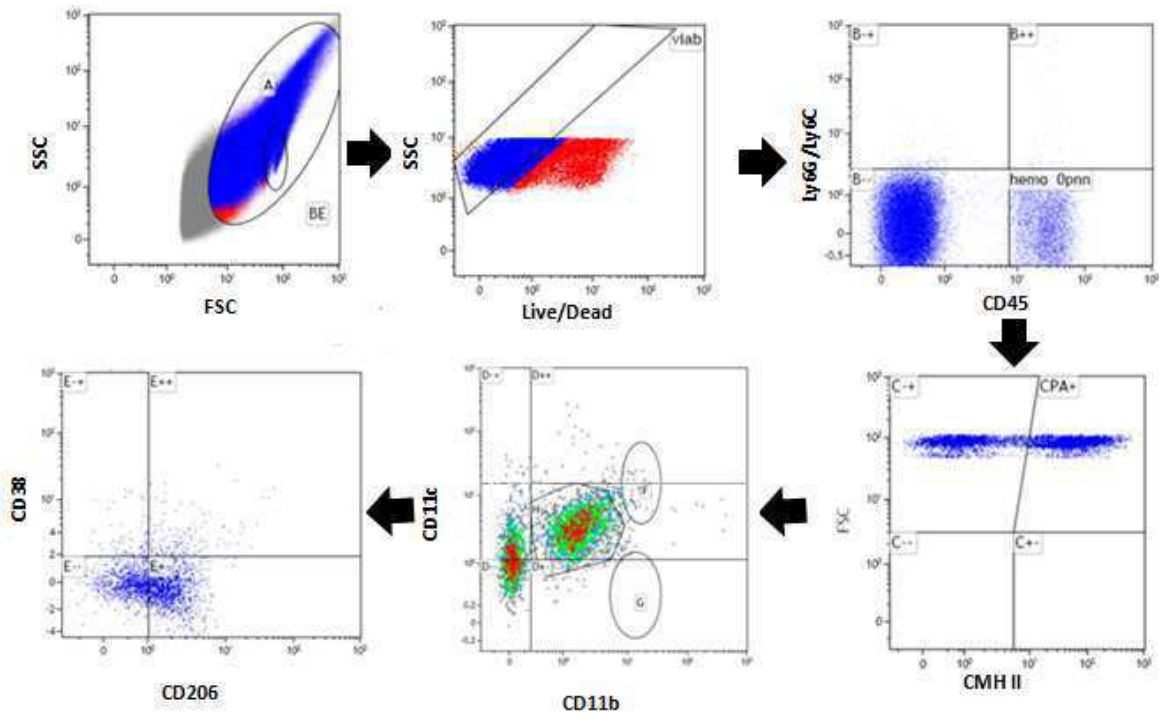
L'ensemble des acquisitions a été effectué sur le cytomètre BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences™) sur le plateau de cytométrie (responsable technique Nathalie Jouy). Cette

plateforme commune est membre du Bio Imaging Center Lille – Nord de France (BICeL) labellisé au niveau national par le GIS IBISA.

L'interprétation et l'analyse des résultats ont été réalisées avec le logiciel Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter™).

La stratégie d'analyse était la suivante :

- 1) La première fenêtre représente la structure (SS) en ordonnée et la taille (FS) en abscisse. Elle permet d'exclure les débris cellulaires.
- 2) La deuxième fenêtre représente la structure (SS) en ordonnée et l'expression du marqueur FVS en abscisse. Elle permet de gater les cellules *viabiles* (n'ayant pas internalisées le marqueur de mort cellulaire).
- 3) La troisième fenêtre représente l'expression de Ly6G en ordonnée et l'expression du marqueur CD45 en abscisse. Elle permet d'éliminer les cellules non hématopoïétiques et les neutrophiles qui expriment fortement Ly6G.
- 4) La quatrième fenêtre représente la taille en ordonnée et l'expression du marqueur CMH de classe II en abscisse. Elle permet de sélectionner les cellules présentatrices d'antigènes (CMHII fortement exprimé)
- 5) La cinquième fenêtre représente l'expression du CD11c en ordonnée et l'expression du CD11b en abscisse. Elle permet de sélectionner les macrophages qui expriment fortement le CD11b et qui expriment faiblement ou modérément le CD11c. Une expression intense du CD11c est plutôt en faveur de cellule dendritique.
- 6) La sixième fenêtre représente l'expression du marqueur de macrophages M1 (CD38) en ordonnée et l'expression du marqueur de macrophages M2 (CD206) en abscisse.



### 3 - Expériences *in vitro*

#### 3-1 Transfections cellulaires

Les expériences de transfection ont toutes été effectuées sous hotte à flux laminaire en conditions stériles. Les transfactions transitoires d'ADN plasmidiques étaient réalisées sur des cellules à 70 % de en suivant les recommandations du kit « Lipofectamine LTX & Plus Reagent » (Invitrogen™). En plaque 24 puits, les conditions suivantes ont été suivies

	Volume final	Volume dilution	Quantité de plasmide	Volume de PLUS Reagent	Volume de Lipofectamine + LTX
24 puits	250 µL	50µL	0,25 µg	1 µL	0,75 µL

**Tableau 10 : Liste des vecteurs utilisés**

Nom	Origine
MUC1-pcDNA3.1	don de S.J. Gendler (Mayo Clinic, USA)
MUC1 $\Delta$ TR -pcDNA3.1	don de S.J. Gendler (Mayo Clinic, USA)
MUC1 $\Delta$ CT -pcDNA3.1	don de S.J. Gendler (Mayo Clinic, USA)
Empty vector - pcDNA3.1	don de S.J. Gendler (Mayo Clinic, USA)
pGL2-AP1-luc	Promega Corp.
p3NF- $\kappa$ B-luc	Promega Corp.
pUNO1-hTLR04a-HA3x	Invivogen

### 3-2 Essais luciférase

Après 48h de transfection, les cellules étaient lysées par ajout de 100 $\mu$ L de Passive Lysis Buffer (Promega) par puits et les plaques étaient ensuite placées 20 minutes sous agitation à 4°C avant la récupération des protéines par grattage des tapis cellulaires. Le lysat était ensuite centrifugé à 14 000 g pendant 5 minutes. Les surnageants étaient récupérés puis 20  $\mu$  de surnageant par puit était déposé dans une plaque 96 puits opaque. Suite à l'ajout de 100  $\mu$ L/puits de luciférine (Promega), l'activité luciférase était mesurée par spectrophotométrie après 3 secondes d'incubation sur le luminomètre Mithras LB 904 (Berthold Technologies) (IFR114, Université de Lille 2). Les valeurs d'activité luciférase entre les différentes conditions étaient interprétées après normalisation des valeurs obtenues par la quantité totale de protéines des échantillons obtenue par un dosage BCA.

### 3-3 Test de ligature de proximité

Le test de ligature de proximité ou proximity ligation assay (PLA) a été réalisé en utilisant les réactifs de détection *in situ* Duolink™ In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) selon les recommandations du fournisseur. La conjugaison des anticorps a été effectuée selon les instructions de Duolink® In situ Probemaker (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO): l'anticorps primaire anti-MUC1 (ThermoFisher, MA5-11202) a été conjugué avec la sonde PLA PLUS et l'anticorps primaire anti-HA (Santa Cruz, F7, sc-7392) avec la sonde PLA MINUS.

Brièvement, les coupes ont été incubées avec 0,15% de TritonX-100 et 1% de BSA dans du PBS pendant 15 min. Ensuite, une solution de blocage Duolink a été ajoutée aux coupes et incubée à 37 ° C pendant 30 minutes dans une chambre humide. La solution de blocage a été retirée et l'anticorps primaire, dilué dans le diluant Duolink, a été appliqué aux cellules

pendant la nuit à 4 ° C dans une chambre humide. Le lendemain, les coupes ont été lavées trois fois dans du tampon de lavage PLA-A avant l'addition de la sonde PLA pendant une heure à 37 °C dans une chambre humide. Les coupes ont été lavées deux fois avec du tampon de lavage PLA-A avant l'addition de ligase pendant trente minutes à 37 °C dans une chambre humide. Les coupes ont été lavées à nouveau deux fois avec le PLA-A avant l'addition d'une solution de polymérase pendant 100 minutes à 37 ° C dans une chambre humide. Les coupes étaient lavées deux fois dans du tampon de lavage PLA-B et une fois dans du tampon de lavage PLA-B à 0,01X. Les lamelles ont ensuite été montées dans du Vectashield avec Dapi (VectorLabs). La microscopie confocale a été réalisée sur un microscope Zeiss® LSM 710 Live à 63x.

### **3-3-1 Quantification sur Qupath**

Le logiciel Qupath (Bankhead *et al.*, 2017) est un logiciel gratuit qui permet d'effectuer de multiples procédures d'analyse d'images.

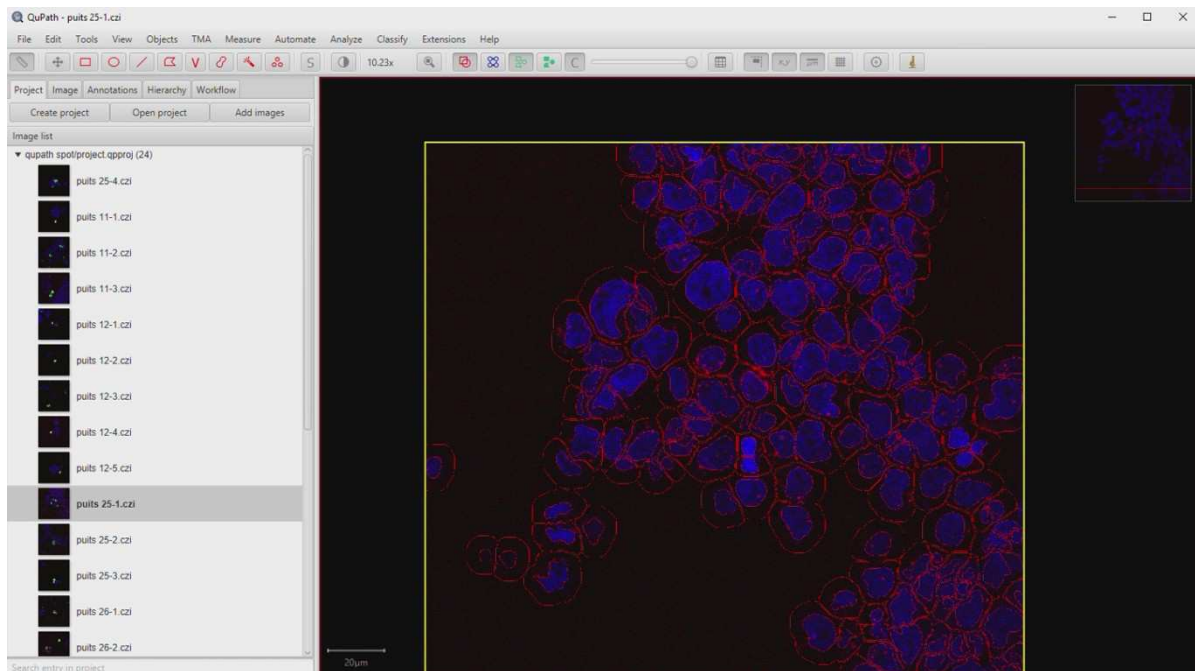
#### **Stratégie utilisée pour la quantification des spots :**

La détection des cellules étaient réalisées avec les réglages par défaut du logiciel sur le DAPI, en fixant un seuil d'intensité à 1000. Les éventuelles erreurs étaient appréciées visuellement en s'assurant qu'elles n'impactaient pas la délimitation des cellules exprimant la GFP.

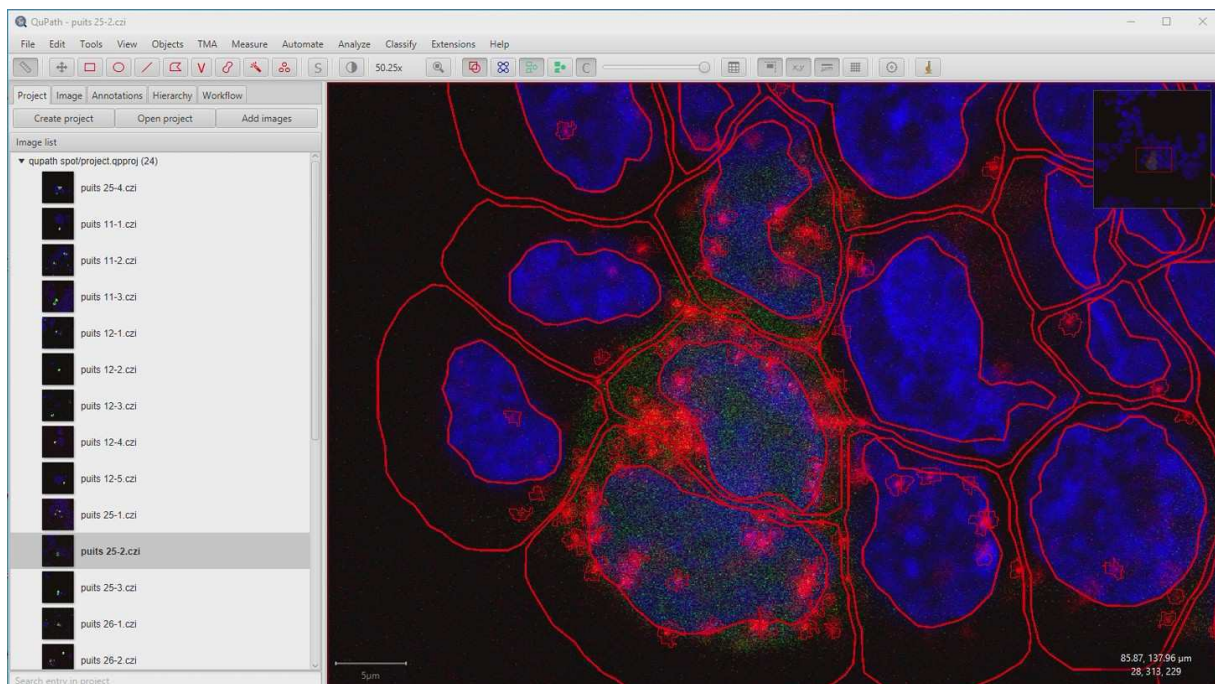
Les contours cytoplasmiques des cellules étaient extrapolés à partir de la forme et de la taille du noyau selon les réglages par défaut du logiciel. Là encore un contrôle visuel était effectué afin d'appliquer une éventuelle correction.

La délimitation puis le compte de spots étaient réalisés grâce à une fonction dédiée du logiciel en utilisant comme réglage un seuil de 5 sur la fluorescence rouge.

## Exemple : Délimitation des contours nucléaires et cytoplasmiques sur le DAPI



## Exemple : Détection des spots dans les cellules



### 3-4 Analyse protéique

#### 3-4.1 Extraction protéique

Les modalités sont similaires à celles décrites dans la partie 1, section 7-1

#### 3-4.2 Dosage protéique

Les modalités sont similaires à celles décrites dans la partie 1, section 7-2

#### 3-4.3 ELISA

Le kit « eBioScience Ready-Set-Go ! ® » (eBioscience®) a été utilisé pour la réalisation de l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) IL-6 selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, la plaque 96 puits est incubée une nuit avec l'anticorps de capture. Après des étapes de lavage, les extraits protéiques ainsi que les standards du fournisseur sont ajoutés à la plaque 96 puits. Chaque mesure est réalisée en double. Après lavage, un anticorps secondaire lié à une peroxydase est ensuite ajouté. Après lavage, du TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine), substrat de l'enzyme HRP (Horseradish Peroxydase), a été ajouté pendant 15 minutes pour débiter la révélation colorimétrique. La réaction a été arrêtée par l'ajout d'une solution stop et la plaque a été analysée avec le photomètre Multiskan™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) avec une longueur d'onde à 450 nm. Une courbe standard est générée à partir de la gamme étalon fournie par le fournisseur et les valeurs des échantillons déterminées à partir de la courbe. Les résultats sont exprimés en pg/mg de protéines totales.

#### 3-4.4 Western blot

Les modalités sont similaires à celles décrites dans la partie 1, section 7-3

**Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot**

Anticorps	Clone	Fournisseur	Dilution
MUC1	CT2	ThermoFischer	1:3000
MUC1	M8	Cell Signaling	1:500
β actine	A5441	Sigma Aldrich	1:5000



### 3-5 Analyse en RT-qPCR

#### 3-5.1 Extraction des ARNs totaux

Les modalités sont similaires à celles décrites dans la partie 1, section 6-1

#### 3-5.2 Obtention des ADNc

Les modalités sont similaires à celles décrites dans la partie 1, section 6-1

#### 3-5.3 RT-qPCR par technique Taqman®

Les modalités sont similaires à celles décrites dans la partie 1, section 6-3

#### Tableau 12:

##### Liste des sondes utilisées chez l'homme

Gène	Référence
IFNG	Hs00989291
IRF5	Hs00158114
IRF4	Hs00180031
IL10	Hs00961622
TNF	Hs00174128

##### Liste des sondes utilisées chez la souris

Gène	Référence
Nos2	Mm00440502
Arg1	Mm00475988
IL-6	Mm00446190
TNF	Mm00443258
IL1B	Mm00434228
Muc1	Mm00449604
Ppia	Mm02342430
Cd86	Mm00444543

#### **4- Analyse statistique**

L'analyse statistique était effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4.0 ® software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Les résultats étaient présentés sous forme de valeurs moyenne et les variations par rapport à la moyenne arithmétique étaient exprimées en SEM (standard error mean). Les différences entre plusieurs groupes ont été évaluées par une analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie du test de comparaison multiple de Bonferroni. Les différences statistiques entre chacun des deux groupes ont été déterminées par le test t de Student. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ .

## **REFERENCES**

-A-

- Abba MC, Nunez MI, Colussi AG, Croce MV, Segal-Eiras A, Aldaz CM. GATA3 protein as a MUC1 transcriptional regulator in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2006;8(6):R64. doi:10.1186/bcr1617
- Ahmad R, Raina D, Joshi MD, et al. MUC1-C oncoprotein functions as a direct activator of the nuclear factor-kappaB p65 transcription factor. *Cancer Res.* 2009;69(17):7013-7021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0523
- Akashi S., Nagai Y., Ogata H., Oikawa M., Fukase K., Kusumoto S., et al. (2001). Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int. Immunol.* 13, 1595–1599. doi:10.1093/intimm/13.12.1595
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511. doi:10.1038/nri1391
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
- Al-Bataineh MM, Kinlough CL, Poland PA, Pastor-Soler NM, Sutton TA, Mang HE, Bastacky SI, Gendler SJ, Madsen CS, Singh S, Monga SP, Hughey RP. Muc1 enhances the  $\beta$ -catenin protective pathway during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016 Mar 15;310(6):F569-79. doi: 10.1152/ajprenal.00520.2015. Epub 2016 Jan 6.
- Al-Bataineh MM, Sutton TA, Hughey RP. Novel roles for mucin 1 in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2017 Sep;26(5):384-391. doi: 10.1097/MNH.0000000000000350.
- Albrecht H, Carraway KL 3rd. MUC1 and MUC4: switching the emphasis from large to small. *Cancer Biother Radiopharm.* 2011;26(3):261-271. doi:10.1089/cbr.2011.1017
- Altschuler Y, et al. Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol Biol Cell.* 2000;11:819–831.
- Amici SA, Young NA, Narvaez-Miranda J, et al. CD38 Is Robustly Induced in Human Macrophages and Monocytes in Inflammatory Conditions. *Front Immunol.* 2018;9:1593. Published 2018 Jul 10. doi:10.3389/fimmu.2018.01593
- Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219(3):573-588. doi:10.1111/apha.12798
- Andonegui G, Zhou H, Bullard D, et al. Mice that exclusively express TLR4 on endothelial cells can efficiently clear a lethal systemic Gram-negative bacterial infection. *J Clin Invest.* 2009;119(7):1921-1930. doi:10.1172/jci36411
- Andreasen AS, et al. Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Current Medicinal Chemistry.* 2008;15(17):1697–1705.
- Andrianova NV, Buyan MI, Zorova LD, et al. Kidney Cells Regeneration: Dedifferentiation of Tubular Epithelium, Resident Stem Cells and Possible Niches for Renal Progenitors. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6326. Published 2019 Dec 15. doi:10.3390/ijms20246326
- Angelotti M.L., Ronconi E., Ballerini L., Peired A., Mazzinghi B., Sagrinati C., Parente E., Gacci M., Carini M., Rotondi M., et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells.* 2012;30:1714–1725. doi: 10.1002/stem.1130.
- Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine.* 2013;369:840–51.
- Arulkumaran N, Deutschman CS, Pinsky mr, et al. mitochondrial function in sepsis. *Shock.* 2016;45(3):271-281. doi:10.1097/shk.0000000000000463
- Aslan A, van den Heuvel MC, Stegeman CA, et al. Kidney histopathology in lethal human sepsis. *Crit Care.* 2018;22(1):359. Published 2018 Dec 27. doi:10.1186/s13054-018-2287-3
- Aubert S, Fauquette V, Hémon B, Lepoivre R, Briez N, Bernard D, Van Seuningen I, Leroy X, Perrais M. MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Res.* 2009;69(14):5707-15.
- Awad AS, et al. Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int.* 2009;75(7):689–698.

-B-

- Baek JH. The Impact of Versatile Macrophage Functions on Acute Kidney Injury and Its Outcomes. *Front Physiol.* 2019;10:1016. Published 2019 Aug 6. doi:10.3389/fphys.2019.01016
- Bagshaw SM, George C, Bellomo R. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1569—74.
- Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, et al. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(3):431-439. doi:10.2215/CJN.03681106

- Baker, C. C., Chaudry, I. H., Gaines, H. O. & Baue, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 94, 331–335 (1983).
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7, 16878 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Barros MH, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One*. 2013;8(11):e80908. Published 2013 Nov 15. doi:10.1371/journal.pone.0080908
- Baruch A, *et al.* Preferential expression of novel MUC1 tumor antigen isoforms in human epithelial tumors and their tumor-potentiating function. *Int J Cancer*. 1997;71:741–749.
- Baruch A, *et al.* The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Cancer Res*. 1999;59:1552–1561.
- Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Muller CA, Kalluri R, Zeisberg M: Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* 2010;16:544-550.
- Belliere J, Casemayou A, Ducasse L, *et al.* Specific macrophage subtypes influence the progression of rhabdomyolysis-induced kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(6):1363-1377. doi:10.1681/ASN.2014040320 \*
- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P; Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004;8(4):R204-R212. doi:10.1186/cc2872
- Berger K, Bangen JM, Hammerich L *et al.* Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 1533–1538
- Bisgaard LS, Mogensen CK, Rosendahl A, *et al.* Bone marrow-derived and peritoneal macrophages have different inflammatory response to oxLDL and M1/M2 marker expression - implications for atherosclerosis research. *Sci Rep*. 2016;6:35234. Published 2016 Oct 13. doi:10.1038/srep35234 Bochud PY, Glauser MP, Calandra T; International Sepsis Forum. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med*. 2001;27 Suppl 1:S33-S48. doi:10.1007/pl00003796
- Black LM, Lever JM, Traylor AM, Chen B, Yang Z, Esman SK, *et al.* Divergent effects of AKI to CKD models on inflammation and fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;315(4):F1107–18
- Bochud PY, Moser F, Erard Ph, *et al.* Community acquired pneumonia : A prospective outpatient study. *Medicine*. March 2001
- Boll, E. J., Ayala-Lujan, J., Szabady, R. L., Louissaint, C., Smith, R. Z., Krogfelt, K. A., *et al.* (2017). Enteroaggregative *Escherichia coli* adherence fimbriae drive inflammatory cell recruitment via interactions with epithelial MUC1. *mBio* 8 e00717–17. doi: 10.1128/mBio.00717-17
- Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int*. 2004;66:480–485
- Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4210-4221. doi:10.1172/JCI45161
- Bouillez A, Gnemmi V, Gaudelot K, *et al.* MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget*. 2014;5(3):754-763. doi:10.18632/oncotarget.1768
- Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:4. Published 2004 Jan 7. doi:10.1186/1477-7827-2-4
- Brossa A., Papadimitriou E., Collino F., Incarnato D., Oliviero S., Camussi G., Bussolati B. Role of CD133 Molecule in Wnt Response and Renal Repair. *Stem Cells Transl. Med*. 2018;7:283–294. doi: 10.1002/sctm.17-0158
- Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res*. 2011;90(4):417-427. doi:10.1177/0022034510381264
- Brown, H.J. , Lock, H.R. , Wolfs, T.G. , Buurman, W.A. , Sacks, S.H. & Robson, M.G. 2007. Toll- like receptor 4 ligation on intrinsic renal cells contributes to the induction of antibody- mediated glomerulonephritis via CXCL1 and CXCL2. *J Am Soc Nephrol* 18, 1732–1739.
- Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006;368(9530):157-169. doi:10.1016/S0140-6736(06)69005-3
- Buscaglia C. A., Campo V. A., Frasc A. C., Di Noia J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol*. 4, 229–236. 10.1038/nrmicro1351
- Bussolati B., Bruno S., Grange C., Buttiglieri S., Deregibus M.C., Cantino D., Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am. J. Pathol*. 2005;166:545–555.

- Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, et al. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol*. 2005;174(4):2336-2342. doi:10.4049/jimmunol.174.4.2336
- Carney EF. Study of ADTKD-MUC1 identifies a new lead for the treatment of toxic proteinopathies. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(10):593. doi:10.1038/s41581-019-0194-8
- Castañero-Rodríguez N, Kaakoush NO, Mitchell HM. Pattern-recognition receptors and gastric cancer. *Front Immunol*. 2014;5:336. Published 2014 Jul 22. doi:10.3389/fimmu.2014.00336
- Castoldi, A., Braga, T.T., Correa- Costa, M., Aguiar, C.F., Bassi, E.J., Correa- Silva, R., Elias, R.M., Salvador, F., Moraes- Vieira, P.M., Cenedeze, M.A., Reis, M.A., Hiyane, M.I., Pacheco- Silva, A., Goncalves, G.M. & Saraiva Camara, N.O. 2012. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PLoS One* 7, e37584
- Chaika NV, Gebregiorgis T, Lewallen ME, Purohit V, Radhakrishnan P, Liu X, Zhang B, Mehla K, Brown RB, Caffrey T, et al. MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia- inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:13787–13792.
- Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2711-2719. doi:10.1172/JCI62423
- Chang JF, et al. The epithelial mucin, MUC1, is expressed on resting T lymphocytes and can function as a negative regulator of T cell activation. *Cell Immunol*. 2000;201:83–88.
- Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, et al. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB J*. 2003;17(6):773-775. doi:10.1096/fj.02-0668fje.
- Chen Y, Zhao YH, Kalaslavadi TB, et al. Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30(2):155-165. doi:10.1165/rcmb.2003-0103OC
- Chen, J., Hartono, J.R., John, R., Bennett, M., Zhou, X.J., Wang, Y., Wu, Q., Winterberg, P.D., Nagami, G.T. & Lu, C.Y. 2011. Early interleukin 6 production by leukocytes during ischemic acute kidney injury is regulated by TLR4. *Kidney Int* 80, 504–515.
- Chen P, Stanojic M, Jeschke MG. Differences between murine and human sepsis. *Surg Clin North Am* 2014;94:1135–1149
- Cheng SY, Chou YH, Liao FL, Lin CC, Chang FC, Liu CH, et al. Losartan reduces ensuing chronic kidney disease and mortality after acute kidney injury. *Sci Rep*. 2016;6:34265
- Choi S, Park YS, Koga T, Treloar A, Kim KC. TNF- $\alpha$  is a key regulator of MUC1, an anti-inflammatory molecule, during airway *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):255-260. doi:10.1165/rcmb.2009-0323OC
- Chow J. C., Young D. W., Golenbock D. T., Christ W. J., Gusovsky F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem*. 274, 10689–10692. doi:10.1074/jbc.274.53.37551
- Clark S, McGuckin MA, Hurst T, Ward BG 1994 Effect of interferon- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on MUC1 mucin expression in ovarian carcinoma cell lines. *Dis Markers* 12:43–50
- Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;53(6):961–73.
- Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int*. 2012;81(5):442–8.
- Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D; Inflammation and the Host Response to Injury Investigators. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(1):60-67. doi:10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005
- Correa I, Plunkett T, Vlad A, et al. Form and pattern of MUC1 expression on T cells activated in vivo or in vitro suggests a function in T-cell migration. *Immunology*. 2003;108(1):32-41. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01562.x
- Cruz DN, Bolgan I, Perazella MA, Bonello M, de Cal M, Corradi V, et al. North East Italian Prospective Hospital Renal Outcome Survey on Acute Kidney Injury (NEIPHROS-AKI): targeting the problem with the RIFLE Criteria. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:418—25.
- Cuartero M, Ballús J, Sabater J, et al. Cell-cycle arrest biomarkers in urine to predict acute kidney injury in septic and non-septic critically ill patients. *Ann Intensive Care*. 2017;7(1):92. Published 2017 Sep 7. doi:10.1186/s13613-017-0317-y
- Cullen PJ. Post-translational regulation of signaling mucins. *Curr Opin Struct Biol*. 2011;21(5):590-6.

Cullen PJ. Post-translational regulation of signaling mucins. *Curr Opin Struct Biol.* 2011;21(5):590-596. doi:10.1016/j.sbi.2011.08.007

Cunha FQ, Assreuy J, Moss DW, et al. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF-alpha and IL-1-beta. *Immunology.* 1994;81(2):211-215.

Cunningham PN, Wang Y, Guo R, He G, Quigg RJ. Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. *J Immunol.* 2004;172(4):2629-2635. doi:10.4049/jimmunol.172.4.2629

-D-

Dear, J.W., et al. 2006. Sepsis-induced organ failure is mediated by different pathways in the kidney and liver: acute renal failure is dependent on MyD88 but not renal cell apoptosis. *Kidney Int.* 69:832-836.

De Backer D, Creteur J, Preiser J-C, et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(1):98-104

Deckers JG, De Haij S, van der Woude FJ, van der Kooij SW, Daha MR, van Kooten C. IL-4 and IL-13 augment cytokine- and CD40-induced RANTES production by human renal tubular epithelial cells in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(7):1187-1193.

Deitch, E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 9, 1-11 (1998).

Dekker J, Rossen JW, Büller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(3):126-131. doi:10.1016/s0968-0004(01)02052-7

Dellepiane S, Marengo M, Cantaluppi V. Detrimental cross-talk between sepsis and acute kidney injury: new pathogenic mechanisms, early biomarkers and targeted therapies. *Crit Care.* 2016;20:61. Published 2016 Mar 15. doi:10.1186/s13054-016-1219-3

Desseyn JL, Aubert JP, Porchet N, Laine A. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol Biol Evol.* 2000;17(8):1175-1184. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026400

Desseyn JL, Buisine MP, Porchet N, Aubert JP, Degand P, Laine A. Evolutionary history of the 11p15 human mucin gene family. *J Mol Evol.* 1998;46(1):102-106. doi:10.1007/pl00006276

Desseyn JL, Tetaert D, Gouyer V. Architecture of the large membrane-bound mucins. *Gene.* 2008;410(2):215-222. doi:10.1016/j.gene.2007.12.014

De Souza MM, Surveyor GA, Price RE, Julian J, Kardon R, Zhou X, Gendler S, Hilkens J, Carson DD. MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol.* 1999;45(2):127-58.

Devuyst O, Olinger E, Weber S, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):60. Published 2019 Sep 5. doi:10.1038/s41572-019-0109-9

Dharmaraj N, Wang P, Carson DD. Cytokine and progesterone receptor interplay in the regulation of MUC1 gene expression. *Mol Endocrinol.* 2010;24(12):2253-2266. doi:10.1210/me.2009-0448

Dhar, P., Ng, G. Z., Dunne, E. M., and Sutton, P. (2017). Mucin 1 protects against severe Streptococcus pneumoniae infection. *Virulence* 8, 1631-1642. doi: 10.1080/21505594.2017.1341021

Dhar P, McAuley J. The Role of the Cell Surface Mucin MUC1 as a Barrier to Infection and Regulator of Inflammation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:117. Published 2019 Apr 24. doi:10.3389/fcimb.2019.00117

Diaz de Leon M, Moreno SA, Gonzalez Diaz DJ, Briones GJ (2006) Severe sepsis as a cause of acute renal failure. *Nefrologia* 26:439-444

Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest.* 2009;119(10):2868-2878. doi:10.1172/JCI39421

Dubois YC, Galichon P, Brocheriou I, Baugey E, Morichon R, Jouanneau C, Ouali N, Rondeau E, Hertig A. Expression of the transcriptional regulator snail1 in kidney transplants displaying epithelial-to-mesenchymal transition features. *Nephrol Dial Transplant.* 2014 Nov;29(11):2136-44. doi: 10.1093/ndt/gft279. Epub 2013 Sep 15.

Duperray C, Klein B, Durie BG, et al. Phenotypic analysis of human myeloma cell lines. *Blood.* 1989;73(2):566-572.

Dvela-Levitt M, Kost-Alimova M, Emani M, et al. Small Molecule Targets TMED9 and Promotes Lysosomal Degradation to Reverse Proteinopathy. *Cell.* 2019;178(3):521-535.e23. doi:10.1016/j.cell.2019.07.002

-E-

El-Achkar, T.M. , Huang, X. , Plotkin, Z. , Sandoval, R.M. , Rhodes, G.J. & Dagher, P.C. 2006. Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll- like receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F1034-F1043.

El-Achkar, T.M. , Plotkin, Z. , Marcic, B. & Dagher, P.C. 2007. Sepsis induces an increase in thick ascending limb Cox- 2 that is TLR4 dependent. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1187–F1196.

-F-

Fenhammar, J. , Rundgren, M. , Forestier, J. , Kalman, S. , Eriksson, S. & Frithiof, R. 2011. Toll- like receptor 4 inhibitor TAK-242 attenuates acute kidney injury in endotoxemic sheep. *Anesthesiology* 114, 1130–1137.

Fenhammar, J. , Rundgren, M. , Hultenby, K. , Forestier, J. , Taavo, M. , Kenne, E. , Weitzberg, E. , Eriksson, S. , Ozenci, V. , Wernerson, A. & Frithiof, R. 2014. Renal effects of treatment with a TLR4 inhibitor in conscious septic sheep. *Crit Care* 18, 488.

Fink MP. Animal models of sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):143-153. doi:10.4161/viru.26083

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304

-G-

Gaemers, I. C., H. L. Vos, H. H. Volders, S. W. van der Valk and J. Hilkens (2001). "A stat-responsive element in the promoter of the episialin/MUC1 gene is involved in its overexpression in carcinoma cells." *J Biol Chem* 276(9): 6191-6199.

Gandolfo MT, et al. Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. 2009;76(7):717–729.

Galichon P, Vittoz N, Xu-Dubois YC, Cornaire E, Vandermeersch S, Mesnard L, Hertig A, Rondeau E. Epithelial phenotypic changes detect cyclosporine in vivo nephrotoxicity at a reversible stage. *Transplantation*. 2011 Nov 15;92(9):993-8. doi: 10.1097/TP.0b013e31822fa495. PMID: 21909056.

Garcia E., Carvalho F., Amorim A., David L. (1997). MUC6 gene polymorphism in healthy individuals and in gastric cancer patients from northern Portugal. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent*. 6, 1071–1074.

Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005; 23 : 337–66.

Garofalo AM, Lorente-Ros M, Goncalvez G, et al. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med Exp*. 2019;7(Suppl 1):45. Published 2019 Jul 25. doi:10.1186/s40635-019-0236-3Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001;6:339–353.

Gendler, S.J., Lancaster, C.A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E. and Wilson, D. (1990) Molecular cloning and expression of the human tumor-associated polymorphic epithelial mucin PEM. *J. Biol. Chem.*, 265, 15286–15293.

Geng H, Lan R, Wang G, Siddiqi AR, Naski MC, Brooks AI, et al. Inhibition of autoregulated TGFbeta signaling simultaneously enhances proliferation and differentiation of kidney epithelium and promotes repair following renal ischemia. *Am J Pathol*. 2009;174(4):1291–308.

Geng Y, Yeh K, Takatani T, King MR. Three to Tango: MUC1 as a Ligand for Both E-Selectin and ICAM-1 in the Breast Cancer Metastatic Cascade. *Front Oncol*. 2012;2:76. Published 2012 Jul 27. doi:10.3389/fonc.2012.00076

Gewin LS. Renal Tubule Repair: Is Wnt/β-Catenin a Friend or Foe?. *Genes (Basel)*. 2018;9(2):58. Published 2018 Jan 24. doi:10.3390/genes9020058

Gibier JB, Hémon B, Fanchon M, et al. Dual role of MUC1 mucin in kidney ischemia-reperfusion injury: Nephroprotector in early phase, but pro-fibrotic in late phase. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(6):1336-1349. doi:10.1016/j.bbadis.2017.03.023

Gill N, Nally JV Jr, Fatica RA: Renal failure secondary to acute tubular necrosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Chest* 2005;128:2847-2863.

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003; 300 : 1584–7.

Gómez H, Kellum JA. Sepsis-induced acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22(6):546-553. doi:10.1097/MCC.0000000000000356

Gómez H, Kellum JA, Ronco C. Metabolic reprogramming and tolerance during sepsis-induced AKI. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(3):143-151. doi:10.1038/nrneph.2016.186

Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16(3-4):233-238. doi:10.1177/1074248411409581



Gnemmi V, Bouillez A, Gaudelot K, et al. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett*. 2014;346(2):225-236. doi:10.1016/j.canlet.2013.12.029

Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M, Rowe RG, Weiss SJ, López-Novoa JM, Nieto MA. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med*. 2015 Sep;21(9):989-97. doi: 10.1038/nm.3901. Epub 2015 Aug 3. Erratum in: *Nat Med*. 2016 Feb;22(2):217.

Guang W, Twaddell WS, Lillehoj EP (2012) Molecular Interactions between MUC1 Epithelial Mucin, beta-Catenin, and CagA Proteins. *Front Immunol* 3: 105.

Gunst J, Derese I, Aertgeerts A, et al. Insufficient autophagy contributes to mitochondrial dysfunction, organ failure, and adverse outcome in an animal model of critical illness. *Crit Care Med*. 2013;41:182–194.

-H-

Han, M. , Li, Y. , Liu, M. , Li, Y. & Cong, B. 2012. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide- induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol* 13, 25.

Han HI, Skvarca LB, Espiritu EB, Davidson AJ, Hukriede NA. The role of macrophages during acute kidney injury: destruction and repair. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(4):561-569. doi:10.1007/s00467-017-3883-1

Hanif MO, Bali A, Ramphul K. Acute Renal Tubular Necrosis. 2020 Jul 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan–. PMID: 29939592.

Hanisch FG, Müller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000;10(5):439-449. doi:10.1093/glycob/10.5.439

Hashimoto, C., Hudson, K. L. & Anderson, K. V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal–ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein

Hato T, Winfree S, Kalakeche R, Dube S, Kumar R, Yoshimoto M, Plotkin Z, Dagher PC. The macrophage mediates the renoprotective effects of endotoxin preconditioning. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jun;26(6):1347-62. doi: 10.1681/ASN.2014060561. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25398784; PMCID: PMC4446880.

Hato T, Zollman A, Plotkin Z, et al. Endotoxin Preconditioning Reprograms S1 Tubules and Macrophages to Protect the Kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(1):104-117. doi:10.1681/ASN.2017060624

Hatrup, C. L. and S. J. Gendler (2008). "Structure and function of the cell surface (tethered) mucins." *Annu Rev Physiol* 70: 431-457.

Hatrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:431–457

Havasi A, Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int*. 2011;80(1):29-40. doi:10.1038/ki.2011.120

Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care* 2006;10:R73

Hebeis B, Vigorito E, Kovetski D, Turner M. Vav proteins are required for B-lymphocyte responses to LPS. *Blood*. 2005;106(2):635-640. doi:10.1182/blood-2004-10-3919

Heemskerk S, Masereeuw R, Russel FGM, et al. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5(11):629-640. doi:10.1038/nrneph.2009.155.

Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 408:740–745.

Hertig A, Verine J, Mougnot B, Jouanneau C, Ouali N, Sebe P, Glotz D, Ancel PY, Rondeau E, Xu-Dubois YC. Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am J Transplant*. 2006 Dec;6(12):2937-46. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01559.x. PMID: 17061992.

Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3810-3820. doi:10.1172/JCI30487

Hilkens J, Buijs F. Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1988;263(9):4215-4222.

Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, et al. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Crit Care Med*. 2004;32(9):1928-1948.

Holthöfer H, Virtanen I, Pettersson E, Törnroth T, Alfthan O, Linder E, Miettinen A. Lectins as fluorescence microscopic markers for saccharides in the human kidney. *Lab Invest.* 1981 Nov;45(5):391-9. PMID: 6895394.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999;162:3749-3752.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-150. doi:10.1056/NEJMra021333

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE (1999) Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27:1230-1251

Howie AJ. Epithelial membrane antigen in normal and proteinuric glomeruli and in damaged proximal tubules. *J Pathol.* 1986 Jan;148(1):55-60. doi: 10.1002/path.1711480109. PMID: 3511201.

Hsiao H-W, Tsai K-L, Wang L-F, et al. The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis. *Shock.* 2012;37:289-296.

Huang Y, Wang QL, Cheng DD, Xu WT, Lu NH. Adhesion and Invasion of Gastric Mucosa Epithelial Cells by *Helicobacter pylori*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:159. Published 2016 Nov 22. doi:10.3389/fcimb.2016.00159

Huang B, Pi L, Chen C, Yuan F, Zhou Q, Teng J, Jiang T. WT1 and Pax2 re-expression is required for epithelial-mesenchymal transition in 5/6 nephrectomized rats and cultured kidney tubular epithelial cells. *Cells Tissues Organs (Print)* 2012, 195, 296-312.

Huen SC, Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(2):199-209. doi:10.1007/s00467-013-2726-y

Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 284-291

Humphreys BD, Czerniak S, DiRocco DP et al. Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 9226-9231

Humphreys BD, Xu F, Sabbiseti V, Grgic I, Movahedi Naini S, Wang N, Chen G, Xiao S, Patel D, Henderson JM, Ichimura T, Mou S, Soeung S, McMahon AP, Kuchroo VK, Bonventre JV: Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J Clin Invest* 2013;123:4023-4035.

Huang Y, Wang QL, Cheng DD, Xu WT, Lu NH. Adhesion and Invasion of Gastric Mucosa Epithelial Cells by *Helicobacter pylori*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:159. Published 2016 Nov 22. doi:10.3389/fcimb.2016.00159

-I-

Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Yamada T, Imai N, Narita I, Kawachi H, Polkinghorne KR, Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M: Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. *Histopathology* 2011;58:198-210.

Imbert-Fernandez Y, Radde BN, Teng Y, Young WW Jr, Hu C, Klinge CM. MUC1/A and MUC1/B splice variants differentially regulate inflammatory cytokine expression. *Exp Eye Res.* 2011;93(5):649-657. doi:10.1016/j.exer.2011.08.004

Ismail OZ, Zhang X, Wei J, Haig A, Denker BM, Suri RS, Sener A, Gunaratnam L. Kidney injury molecule-1 protects against Gα12 activation and tissue damage in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2015 May;185(5):1207-15. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.02.003. Epub 2015 Mar 7.

Itoh Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, et al. Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology.* 2008;18(1):74-83. doi:10.1093/glycob/cwm118

-J-

Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado Jde D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, Guerau-de-Arellano M. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One.* 2015 Dec 23;10(12):e0145342. doi: 10.1371/journal.pone.0145342. PMID: 26699615; PMCID: PMC4689374.

Jennings rb, Sommers hm, Smyth ga, Flack ha, Linn h. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960 Jul;70:68-78. PMID: 14407094.

Jo SK et al. (2006) Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 21: 1231-1239

Joannidis M, Metnitz PG. Epidemiology and natural history of acute renal failure in the ICU. *Crit Care Clin.* 2005;21(2):239-249. doi:10.1016/j.ccc.2004.12.005

Joannidis M, Metnitz B, Bauer P, Schusterschitz N, Moreno R, Druml W, et al. Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database. *Intensive Care Med* 2009;35:1692—702

Johansson ME. Tubular regeneration: when can the kidney regenerate from injury and what turns failure into success? *Nephron Exp Nephrol.* 2014;126(2):76. doi: 10.1159/000360671. Epub 2014 May 19. PMID: 24854645.

Julian J, Dharmaraj N, Carson DD. MUC1 is a substrate for gamma-secretase. *J Cell Biochem.* 2009;108(4):802-815. doi:10.1002/jcb.22292

Juskewitch JE, Knudsen BE, Platt JL, et al. LPS-induced murine systemic inflammation is driven by parenchymal cell activation and exclusively predicted by early MCP-1 plasma levels. *Am J Pathol.* 2012;180(1):32-40. doi:10.1016/j.ajpath.2011.10.001

## -K-

Kalakeche R, Hato T, Rhodes G, et al. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* 2011;22:1505–16.

Kardon R, Price RE, Julian J, et al. Bacterial conjunctivitis in Muc1 null mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(7):1328-1335.

Kato, K., Lillehoj, E. P., and Kim, K. C. (2014). MUC1 regulates epithelial inflammation and apoptosis by PolyI:C through inhibition of Toll/IL-1 receptor-domain-containing adapter-inducing IFN-beta (TRIF) recruitment to Toll-like receptor 3. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 51, 446–454. doi: 10.1165/rcmb.2014-0018OC

Kato, K., Lillehoj, E. P., Park, Y. S., Umehara, T., Hoffman, N. E., Madesh, M., et al. (2012). Membrane-tethered MUC1 mucin is phosphorylated by EGFR in airway epithelial cells and associates with TLR5 to inhibit recruitment of MyD88. *J. Immunol.* 188, 2014–2022. doi: 10.4049/jimmunol.1102405

Kato, K., Lu, W., Kai, H., and Kim, K. C. (2007). Phosphoinositide 3-kinase is activated by MUC1 but not responsible for MUC1-induced suppression of Toll-like receptor 5 signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L686–692. doi: 10.1152/ajplung.00423.2006

Kato, K., Uchino, R., Lillehoj, E. P., Knox, K., Lin, Y., and Kim, K. C. (2016). Membrane-tethered MUC1 mucin counter-regulates the phagocytic activity of macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 54, 515–523. doi: 10.1165/rcmb.2015-0177OC

Kato M, Kako KJ. Effects of N-(2-mercaptopropionyl)glycine on ischemic-reperfused dog kidney in vivo and membrane preparation in vitro. *Mol Cell Biochem.* 1987 Dec;78(2):151-9. doi: 10.1007/BF00229689. PMID: 2831450.

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol.* 2001;167(10):5887-5894. doi:10.4049/jimmunol.167.10.5887

Kawakami T, Lichtneker J, Thompson LJ, et al. Resident renal mononuclear phagocytes comprise five discrete populations with distinct phenotypes and functions. *J Immunol.* 2013;191(6):3358-3372. doi:10.4049/jimmunol.1300342

Kellum JA, Chawla LS. Cell-cycle arrest and acute kidney injury: the light and the dark sides. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(1):16-22. doi:10.1093/ndt/gfv130

Kelly KJ, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficient mice are protected against renal ischemia. *J Clin Invest.* 1996;97(4):1056–1063.

Kim, K. C., and Lillehoj, E. P. (2008). MUC1 mucin: a peacemaker in the lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 39, 644–647. doi: 10.1165/rcmb.2008-0169TR

Kim MG, Kim SC, Ko YS, Lee HY, Jo SK, Cho W. The Role of M2 Macrophages in the Progression of Chronic Kidney Disease following Acute Kidney Injury. *PLoS One.* 2015 Dec 2;10(12):e0143961. doi: 10.1371/journal.pone.0143961.

Kinlough, C. L., R. J. McMahan, P. A. Poland, J. B. Bruns, K. L. Harkleroad, R. J. Stremple, O. B. Kashlan, K. M. Weixel, O. A. Weisz and R. P. Hughey (2006). "Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation." *J Biol Chem* 281(17): 12112- 12122.

Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol.* 2008;109(4):e102-e107. doi:10.1159/000142934

Kinsey GR. Macrophage dynamics in AKI to CKD progression. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(2):209-211. doi:10.1681/ASN.2013101110

Kirby A, Gnirke A, Jaffe DB, et al. Mutations causing medullary cystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1 missed by massively parallel sequencing. *Nat Genet.* 2013;45(3):299-303. doi:10.1038/ng.2543

- Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, et al. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2002;106(20):2608-2615. doi:10.1161/01.cir.0000038110.69369.4c
- Koay MA, Gao X, Washington MK, et al. Macrophages are necessary for maximal nuclear factor-kappa B activation in response to endotoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(5):572-578. doi:10.1165/ajrcmb.26.5.4748
- Koga, T., I. Kuwahara, E. P. Lillehoj, W. Lu, T. Miyata, Y. Isohama and K. C. Kim (2007). "TNF-alpha induces MUC1 gene transcription in lung epithelial cells: its signaling pathway and biological implication." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293(3): L693-701.
- Kosaka J, Lankadeva YR, May CN, Bellomo R (2016) Histopathology of septic Acute kidney injury: a systematic review of experimental data. *Crit Care Med* 44:e897–e903
- Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10):3279-88. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.10.004. PMID: 19100373.
- Kovarik A, Lu PJ, Peat N, Morris J, Taylor-Papadimitriou J. Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. *J Biol Chem*. 1996;271(30):18140-7.
- Kovarik A, Peat N, Wilson D, Gendler SJ, Taylor-Papadimitriou J. Analysis of the tissuespecific promoter of the MUC1 gene. *J Biol Chem*. 1993;268(13):9917-2
- Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, et al. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2002;106(20):2608-2615. doi:10.1161/01.cir.0000038110.69369.4c
- Kramann R, Tanaka M, Humphreys BD: Fluorescence microangiography for quantitative assessment of peritubular capillary changes after AKI in mice. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:1924-1931.
- Kruger B, Krick S, Dhillon N, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106:3390–5.
- Kufe D. W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 9, 874–885. 10.1038/nrc276
- Kumar P, Lindberg L, Thirkill TL, Ji JW, Martsching L, Douglas GC. The MUC1 extracellular domain subunit is found in nuclear speckles and associates with spliceosomes [published correction appears in *PLoS One*. 2012;7(10). doi:10.1371/annotation/bb4082f7-5f88-4d64-8cab-f2e9c89b86eb. Kumar, Priyadarsina [corrected to Kumar, Priyadarsini]]. *PLoS One*. 2012;7(8):e42712. doi:10.1371/journal.pone.0042712
- Kusaba T, Lalli M, Kramann R et al. Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 1527–1532
- Kuwahara I, Lillehoj EP, Koga T, Isohama Y, Miyata T, Kim KC. The signaling pathway involved in neutrophil elastase stimulated MUC1 transcription. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(6):691-698. doi:10.1165/rcmb.2007-0072OC
- L-
- Lagow, E., M. M. DeSouza and D. D. Carson (1999). "Mammalian reproductive tract mucins." *Hum Reprod Update* 5(4): 280-292
- Lagow EL, Carson DD -2002-. Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem* 86:759–772.
- Lan R, Geng H, Polichnowski AJ, Singha PK, Saikumar P, McEwen DG, et al. PTEN loss defines a TGF-beta-induced tubule phenotype of failed differentiation and JNK signaling during renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(9):F1210–23
- Langenberg C, Gobe G, Hood S, May CN, Bellomo R. Renal histopathology during experimental septic acute kidney injury and recovery. *Crit Care Med*. 2014;42(1):e58-e67. doi:10.1097/CCM.0b013e3182a639da
- Langenberg C, Wan L, Egi M, et al. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int*. 2006;69(11):1996-2002. doi:10.1038/sj.ki.5000440. 6.
- Lazzeri E, Angelotti ML, Peired A, et al. Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nat Commun*. 2018;9(1):1344. Published 2018 Apr 9. doi:10.1038/s41467-018-03753-4
- Le Clef N, Verhulst A, D'Haese PC, Vervaet BA. Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152153. Published 2016 Mar 23. doi:10.1371/journal.pone.0152153
- Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(2):317-26.
- Lee JW, Chou CL, Knepper MA. Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Nov;26(11):2669-77. doi: 10.1681/ASN.2014111067. Epub 2015 Mar 27. PMID: 25817355;

- Leemans JC, Stokman G, Claessen N, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2894-2903. doi:10.1172/JCI22832
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973–983 (1996).
- Leng Y, Cao C, Ren J, Huang L, Chen D, Ito M *et al.* (2007). Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62. *J Biol Chem* 282: 19321–19330.
- Leonard MO, Cottell DC, Godson C, Brady HR, Taylor CT. The role of HIF-1  $\alpha$  in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia. *J Biol Chem* 278: 40296–40304, 2003
- Leong CF, Raudhawati O, Cheong SK, Sivagengei K, Noor Hamidah H. Epithelial membrane antigen (EMA) or MUC1 expression in monocytes and monoblasts. *Pathology*. 2003;35(5):422-427. doi:10.1080/00313020310001602576
- Lerolle N, Nochy D, Guérot E et al (2010) Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med* 36:471–478
- Leroy X, Devisme L, Buisine MP, Copin MC, Aubert S, Gosselin B, Aubert JP, Porchet N. Expression of human mucin genes during normal and abnormal renal development. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(4):544-50.
- Leroy X, Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2002b;40(5):450-7.
- Leventhal, J.S. , Ni, J. , Osmond, M. , Lee, K. , Gusella, G.L. , Salem, F. & Ross, M.J. 2016. Autophagy limits endotoxemic acute kidney injury and alters renal tubular epithelial cell cytokine expression. *PLoS One* 11, e0150001
- Levitin F, et al. A novel protein derived from the MUC1 gene by alternative splicing and frameshifting. *J Biol Chem*. 2005;280:10655–10663.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250-1256. doi:10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B
- Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Feb;282(2):C227-41. doi: 10.1152/ajpcell.00112.2001. PMID: 11788333.
- Li H, Nord EP. CD40 ligation stimulates MCP-1 and IL-8 production, TRAF6 recruitment, and MAPK activation in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282(6):F1020–F1033.
- Li, L., Okusa, M. Blocking the immune response in ischemic acute kidney injury: the role of adenosine 2A agonists. *Nat Rev Nephrol* 2, 432–444 (2006). <https://doi.org/10.1038/ncpneph0238>
- Li L, Hartley R, Reiss B, Sun Y, Pu J, Wu D, Lin F, Hoang T, Yamada S, Jiang J, Zhao M. Ecadherin plays an essential role in collective directional migration of large epithelial sheets. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(16):2779-89.
- Li W, Zhang N, Jin C, et al. MUC1-C drives stemness in progression of colitis to colorectal cancer. *JCI Insight*. 2020;5(12):e137112. Published 2020 Jun 18. doi:10.1172/jci.insight.137112
- Li X, Wang L, Nunes DP, Troxler RF, Offner GD. Pro-inflammatory cytokines up-regulate MUC1 gene expression in oral epithelial cells. *J Dent Res*. 2003;82(11):883-887. doi:10.1177/154405910308201107
- Li Y, Bharti A, Chen D, Gong J, Kufe D. Interaction of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol Cell Biol*. 1998;18(12):7216-7224. doi:10.1128/mcb.18.12.7216
- Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D. Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene. *Oncogene*. 2003;22(38):6107-10.
- Li Y, Kuwahara H, Ren J, Wen G, Kufe D. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3  $\beta$  and beta-catenin. *J Biol Chem*. 2001a;276(9):6061-4.
- Li Y, Zhai P, Zheng Y, Zhang J, Kellum JA, Peng Z. Csf2 Attenuated Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Promoting Alternative Macrophage Transition. *Front Immunol*. 2020;11:1415. Published 2020 Jul 7. doi:10.3389/fimmu.2020.01415
- Ligtenberg, M.J., L. Kruijshaar, F. Buijs, M. van Meijer, S. V. Litvinov and J. Hilkens (1992). "Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor." *J Biol Chem* 267(9): 6171-6177
- Ligtenberg MJ, et al. Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem*. 1990;265:5573–5578.
- Lillehoj EP, Kim BT, Kim KC. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Apr;282(4):L751-6. doi: 10.1152/ajplung.00383.2001. PMID: 11880301.
- Lillehoj EP, Lu W, Kiser T, Goldblum SE, Kim KC. MUC1 inhibits cell proliferation by a beta-catenin-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(7):1028-1038. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.04.009

- Lillehoj EP, Hyun SW, Feng C, et al. NEU1 sialidase expressed in human airway epithelia regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) and MUC1 protein signaling. *J Biol Chem*. 2012;287(11):8214-8231. doi:10.1074/jbc.M111.292888
- Lillehoj EP, Kato K, Lu W, Kim KC. Cellular and molecular biology of airway mucins. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;303:139-202.
- Lindén SK, Florin TH, McGuckin MA. Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS One*. 2008;3(12):e3952
- Lindgren D., Boström A.K., Nilsson K., Hansson J., Sjölund J., Möller C., Jirstrom K., Nilsson E., Landberg G., Axelson H., et al. Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *Am. J. Pathol*. 2011;178:828–837. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.10.026.
- Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol*. 2008;173(6):1617–27
- Lin SL, Chang FC, Schrimpf C, Chen YT, Wu CF, Wu VC, et al. Targeting endotheliumpericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am J Pathol*. 2011;178(2):911–23.
- Little MH. Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Sep;17(9):2390-401. doi: 10.1681/ASN.2006030218. Epub 2006 Jul 26. PMID: 16870708.
- Liu, L., Li, Y., Hu, Z., Su, J., Huo, Y., Tan, B., Wang, X. & Liu, Y. 2012. Small interfering RNA targeting Toll- like receptor 9 protects mice against polymicrobial septic acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 122, 51–61.
- Lowry SF. Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. *Shock*. 2005;24(1):94–100
- Liu, P., Li, F., Qiu, M. & He, L. 2014a. Expression and cellular distribution of TLR4, MyD88, and NF- kappaB in diabetic renal tubulointerstitial fibrosis, *in vitro* and *in vivo*. *Diabetes Res Clin Pract* 105, 206–216.
- Liu J, Kumar S, Dolzhenko E, Alvarado GF, Guo J, Lu C, Chen Y, Li M, Dessing MC, Parvez RK, Cippà PE, Krautzberger AM, Saribekyan G, Smith AD, McMahon AP. Molecular characterization of the transition from acute to chronic kidney injury following ischemia/reperfusion. *JCI Insight*. 2017 Sep 21;2(18):e94716. doi: 10.1172/jci.insight.94716.
- Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Oct;27(10):681-695. doi: 10.1016/j.tem.2016.06.004. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27372267.
- Lowry SF. Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. *Shock*. 2005;24 Suppl 1:94-100. doi:10.1097/01.shk.0000191340.23907.a1
- Lu L, Faubel S, He Z, et al. Depletion of macrophages and dendritic cells in ischemic acute kidney injury. *Am J Nephrol*. 2012;35(2):181-190. doi:10.1159/000335582
- Lu J, Cao Q, Zheng D, et al. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013;84(4):745-755. doi:10.1038/ki.2013.135
- Luo W, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget*. 2011;2(7):551-556. doi:10.18632/oncotarget.299
- Lv LL, Tang PM, Li CJ, et al. The pattern recognition receptor, Mincle, is essential for maintaining the M1 macrophage phenotype in acute renal inflammation. *Kidney Int*. 2017;91(3):587-602. doi:10.1016/j.kint.2016.10.020
- M-
- Maarouf OH, Aravamudhan A, Rangarajan D, Kusaba T, Zhang V, Welborn J, Gauvin D, Hou X, Kramann R, Humphreys BD: Paracrine Wnt1 drives interstitial fibrosis without inflammation by tubulointerstitial cross-talk. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:781-790.
- Macao, B., D. G. Johansson, G. C. Hansson and T. Hard (2006). "Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin." *Nat Struct Mol Biol* 13(1): 71-76.
- MacGarvey NC, Suliman HB, Bartz RR, et al. Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:851–861.
- Maier, S. et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 21, 505–511 (2004).
- Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev*. 2016;37(2):85-98.
- Mandel LJ, Balaban RS. Stoichiometry and coupling of active transport to oxidative metabolism in epithelial tissues. *Am J Physiol*. 1981;240:F357–F371
- Markó L, Vigolo E, Hinze C, et al. Tubular Epithelial NF-κB Activity Regulates Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(9):2658-2669. doi:10.1681/ASN.2015070748

- Mårtensson J, Bellomo R. Are all fluids bad for the kidney?. *Curr Opin Crit Care*. 2015;21(4):292-301. doi:10.1097/MCC.0000000000000214
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-1554. doi:10.1056/NEJMoa022139
- Martín S, Seeberger PH, Varón Silva D. Mucins and Pathogenic Mucin-Like Molecules Are Immunomodulators During Infection and Targets for Diagnostics and Vaccines [published correction appears in *Front Chem*. 2019 Dec 05;7:846]. *Front Chem*. 2019;7:710.
- McAuley, J. L., Corcilius, L., Tan, H. X., Payne, R. J., McGuckin, M. A., and Brown, L. E. (2017). The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunol*. 10, 1581–1593. doi: 10.1038/mi.2017.16
- McAuley, J. L., Linden, S. K., Png, C. W., King, R. M., Pennington, H. L., Gendler, S. J., et al. (2007). MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J. Clin. Invest*. 117, 2313–2324. doi: 10.1172/JCI26705
- McGuckin, M. A., Every, A. L., Skene, C. D., Linden, S. K., Chionh, Y. T., Swierczak, A., et al. (2007). Muc1 mucin limits both *Helicobacter pylori* colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis. *Gastroenterology*. 133, 1210–1218. doi: 10.1053/j.gastro.2007.07.003
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11:R31
- Meerzaman D, Shapiro PS, Kim KC. Involvement of the MAP kinase ERK2 in MUC1 mucin signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(1):L86-L91. doi:10.1152/ajplung.2001.281.1.L86
- Meng G, et al. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2–driven lethal shock-like syndromes. *J. Clin. Invest*. 2004;113:1473–1481. doi:10.1172/JCI200420762
- Menon BB, Kaiser-Marko C, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK. Suppression of Toll-like receptor-mediated innate immune responses at the ocular surface by the membrane-associated mucins MUC1 and MUC16. *Mucosal Immunol*. 2015;8(5):1000-1008. doi:10.1038/mi.2014.127
- Mezni I, Galichon P, Bacha MM, Sfar I, Hertig A, Goucha R, Xu-Dubois YC, Abderrahim E, Gorgi Y, Rondeau E, Abdallah TB. La transition épithélio-mésenchymateuse et la fibrose du transplant rénal [The epithelial-mesenchymal transition and fibrosis of the renal transplant]. *Med Sci (Paris)*. 2015 Jan;31(1):68-74. French. doi: 10.1051/medsci/20153101015. Epub 2015 Feb 6.
- Michie HR, et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med*. 1988;318:1481–1486
- Mohammad, B. I., Raheem, A. K., Hadi, N. R., Jamil, D. A., and Al-Aubaidy, H. A. (2018). Reno-protective effects of TAK-242 on acute kidney injury in a rat model. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 503, 304–308. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.020
- Molock KE, Lillehoj EP. Biochemical interactions among intercellular adhesion molecules expressed by airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(2):513-519. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.008
- Moore, T. A., Perry, M. L., Getsoian, A. G., Newstead, M. W. & Standiford, T. J. Divergent role of  $\gamma$ -interferon in a murine model of pulmonary versus systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect. Immun*. 70, 6310–6318 (2002).
- Moniaux N, Escande F, Batra SK, Porchet N, Laine A, Aubert JP. Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associated MUC4 mucins. *Eur J Biochem*. 2000;267(14):4536-4544. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01504.x
- Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2006;187(4):433-446. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01582.x
- Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:541-566. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034339
- Murugan R, Kellum JA. Acute kidney injury: what's the prognosis? *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(4):209-217. doi:10.1038/nrneph.2011.13. 5.
- Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, et al. Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Investigators Acute kidney injury in nonsevere pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int*. 2010;77:527–53
- Murthy D, Attri KS, Singh PK. Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression, Pathogenesis, and Therapeutics. *Front Physiol*. 2018;9:335. Published 2018 Apr 4. doi:10.3389/fphys.2018.00335
- Musson RA, Morrison DC, Ulevitch RJ. Distribution of endotoxin (lipopolysaccharide) in the tissues of lipopolysaccharide-responsive and -unresponsive mice. *Infect Immun*. 1978;21(2):448-457. doi:10.1128/IAI.21.2.448-457.1978
- Mustonen J, Pasternack A, Helin H, Pystynen S, Tuominen T (1984) Renal biopsy in acute renal failure. *Am J Nephrol* 4: 27–31

Nakano D, Kitada K, Wan N, Zhang Y, Wiig H, Wararat K, Yanagita M, Lee S, Jia L, Titze JM, Nishiyama A. Lipopolysaccharide induces filtrate leakage from renal tubular lumina into the interstitial space *via* a proximal tubular Toll-like receptor 4-dependent pathway and limits sensitivity to fluid therapy in mice. *Kidney Int.* 2020 May;97(5):904-912.

Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med.* 2014;20(6):332-342. doi:10.1016/j.molmed.2014.02.007

Nielsen MC, Andersen MN, Møller HJ. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages *in vitro*. *Immunology.* 2020;159(1):63-74. doi:10.1111/imm.13125

Ng, G. Z., and Sutton, P. (2016). The MUC1 mucin specifically inhibits activation of the NLRP3 inflammasome. *Genes Immunity* 17, 203–206. doi: 10.1038/gene.2016.10

Ng GZ, Menheniott TR, Every AL, et al. The MUC1 mucin protects against *Helicobacter pylori* pathogenesis in mice by regulation of the NLRP3 inflammasome. *Gut.* 2016;65(7):1087-1099. doi:10.1136/gutjnl-2014-307175

Nollet S, Moniaux N, Maury J, et al. Human mucin gene MUC4: organization of its 5'-region and polymorphism of its central tandem repeat array. *Biochem J.* 1998;332 ( Pt 3)(Pt 3):739-748. doi:10.1042/bj3320739

Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity.* 2014;41(5):694-707. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.008

Nozaki Y, Hino S, Ri J, et al. Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury Is Dependent on an IL-18 Receptor Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2777. Published 2017 Dec 20. doi:10.3390/ijms18122777

-O-

Obermair A, et al. Novel MUC1 splice variants are expressed in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2001;83:343–347.

Ogata H. , Su I. , Miyake K. et al. The Toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Ex Med* 2000; 192: 23—30.

Oosterkamp HM, et al. Comparison of MUC-1 mucin expression in epithelial and non-epithelial cancer cell lines and demonstration of a new short variant form (MUC-1/Z) *Int J Cancer.* 1997;72:87–94.

Orford K, Orford CC, Byers SW. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *J Cell Biol.* 1999;146(4):855-868. doi:10.1083/jcb.146.4.855

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552-65. doi: 10.1038/nrm1150.

Øvrebø JI, Edgar BA. Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Development.* 2018 Jul 18;145(14):dev156034. doi: 10.1242/dev.156034.

-P-

Palmi-Pallag T, Khodabukus N, Kinarsky L, et al. The role of the SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) module in cleavage of membrane-tethered mucins. *FEBS J.* 2005;272(11):2901-2911. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04711.x

Park YS, Lillehoj EP, Kato K, Park CS, Kim KC. PPAR $\gamma$  inhibits airway epithelial cell inflammatory response through a MUC1-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(7):L679-L687. doi:10.1152/ajplung.00360.2011

Parmar A, Langenberg C, Wan L, May CN, Bellomo R, Bagshaw SM. Epidemiology of septic acute kidney injury. *Curr Drug Targets.* 2009;10(12):1169-1178. doi:10.2174/138945009789753183

Parry S, et al. N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions. *Glycobiology.* 2006;16:623–634

Pastor-Soler NM, Sutton TA, Mang HE, et al. Muc1 is protective during kidney ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;308(12):F1452-F1462. doi:10.1152/ajprenal.00066.2015

Patschan D, Patschan S, Müller GA. Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *J Transplant.* 2012;2012:764154. doi:10.1155/2012/764154

Patole, P.S. , Schubert, S. , Hildinger, K. , Khandoga, S. , Khandoga, A. , Segerer, S. , Henger, A. , Kretzler, M. , Werner, M. , Krombach, F. , Schlondorff, D. & Anders, H.J. 2005. Toll-like receptor-4: renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis. *Kidney Int* 68, 2582–2587.

Payen D, Lukaszewicz AC, Legrand M, et al. A multicentre study of acute kidney injury in severe sepsis and septic shock: association with inflammatory phenotype and HLA genotype. *PloS one.* 2012;7:e35838.

Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, Kellum JA. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int.* 2019;96(5):1083-1099. doi:10.1016/j.kint.2019.05.026



Pentheroudakis G, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, et al. The neutrophil, not the tumor: serum CA 15-3 elevation as a result of granulocyte-colony-stimulating factor-induced neutrophil MUC1 overexpression and neutrophilia in patients with breast carcinoma receiving adjuvant chemotherapy. *Cancer*. 2004;101(8):1767-1775. doi:10.1002/cncr.20581

Perez-Vilar J, Mabolro R. Gel-forming mucins. Notions from in vitro studies. *Histol Histopathol*. 2007;22(4):455-464. doi:10.14670/HH-22.455

Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zoutina S, d'Hooge MC, Laine A, Van-Seuningen I, Degand P, Gum JR, Kim YS, Swallow DM, Aubert JP, Porchet N. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics*. 1996;38(3):340-52.

Piyush T, Chacko AR, Sindrewicz P, Hilken J, Rhodes JM, Yu LG. Interaction of galectin-3 with MUC1 on cell surface promotes EGFR dimerization and activation in human epithelial cancer cells. *Cell Death Differ*. 2017;24(11):1937-1947. doi:10.1038/cdd.2017.119

Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Bamboat ZM, DeMatteo RP. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med*. 2008;205(6):1277-1283. doi:10.1084/jem.20080162

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282:2085-2088.

Porta, F. , Takala, J. , Weikert, C. , Bracht, H. , Kolarova, A. , Lauterburg, B.H. , Borotto, E. & Jakob, S.M. 2006. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit Care* 10, R118.

Post EH, Kellum JA, Bellomo R, Vincent JL. Renal perfusion in sepsis: from macro- to microcirculation. *Kidney Int*. 2017;91(1):45-60. doi:10.1016/j.kint.2016.07.032

Powell TC, Powell SL, Allen BK, Griffin RL, Warnock DG, Wang HE. Association of inflammatory and endothelial cell activation biomarkers with acute kidney injury after sepsis. *Springerplus*. 2014;3:207. Published 2014 Apr 28. doi:10.1186/2193-1801-3-207

Prowle JR, Ishikawa K, May CN, et al. Renal blood flow during acute renal failure in man. *Blood Purif*. 2009;28(3):216-225. doi:10.1159/000230813.

Puranik AS, Leaf IA, Jensen MA, et al. Kidney-resident macrophages promote a proangiogenic environment in the normal and chronically ischemic mouse kidney. *Sci Rep*. 2018;8(1):13948. Published 2018 Sep 17. doi:10.1038/s41598-018-31887-4

#### -Q-

Qi W, Johnson DW, Vesey DA, Pollock CA, Chen X. Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney. *Nephrology (Carlton)*. 2007 Apr;12(2):155-9. doi: 10.1111/j.1440-1797.2007.00779.x. PMID: 17371339.

Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189 1999. 615 625 [Erratum (1999) 189:1518]

#### -R-

Rabb H, Griffin MD, McKay DB, et al. Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(2):371-379. doi:10.1681/ASN.2015030261

Raina D, Ahmad R, Kumar S, Ren J, Yoshida K, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *EMBO J*. 2006;25(16):3774-83.

Raina D, Kharbanda S, Kufe D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004;279(20):20607-12

Reddy PK, Gold DV, Cardillo TM, Goldenberg DM, Li H, Burton JD 2003 Interferon- $\gamma$  upregulates MUC1 expression in haematopoietic and epithelial cancer cell lines, an effect associated with MUC1 mRNA induction. *Eur J Cancer* 39:397-404

Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, et al. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol*. 2003;5(8):733-740. doi:10.1038/ncb1026

Remick, D. G., Bolgos, G., Copeland, S. & Siddiqui, J. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. *Infect. Immun*. 73, 2751-2757 (2005).

Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu WH, Huang L, Raina D, Chen W, Kharbanda S, Kufe D: Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell* 2004;5:163-175.

Ren J, Raina D, Chen W, Li G, Huang L, Kufe D. MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling. *Mol Cancer Res* 2006; 4:873-83.

Ren J, Bharti A, Raina D, Chen W, Ahmad R, Kufe D. MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90. *Oncogene* 2006; 25:20-31

- Ricci Z, Cruz DN, Ronco C. Classification and staging of acute kidney injury: beyond the RIFLE and AKIN criteria. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(4):201-208. doi:10.1038/nrneph.2011.14
- Ridley C, Kouvatso N, Raynal BD, et al. Assembly of the respiratory mucin MUC5B: a new model for a gel-forming mucin. *J Biol Chem.* 2014;289(23):16409-16420. doi:10.1074/jbc.M114.566679
- Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 2007;81:137-143
- Rogers NM, Ferenbach DA, Isenberg JS, Thomson AW, Hughes J. Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(11):625-643. doi:10.1038/nrneph.2014.170
- Romagnani P. Family portrait: Renal progenitor of Bowman's capsule and its tubular brothers. *Am. J. Pathol.* 2011;178:490-493. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.044.
- Romagnani P. Of mice and men: the riddle of tubular regeneration. *J Pathol.* 2013;229(5):641-644. doi:10.1002/path.4162
- Rose MC, Kaufman B, Martin BM. Proteolytic fragmentation and peptide mapping of human carboxyamidomethylated tracheobronchial mucin. *J Biol Chem.* 1989;264(14):8193-8199.
- Rose MC, Voinow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* 2006;86(1):245-278. doi:10.1152/physrev.00010.2005
- Rosen S, Stillman IE. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *J Am Soc Nephrol.* 2008 May;19(5):871-5. doi: 10.1681/ASN.2007080913. Epub 2008 Jan 30. PMID: 18235086.
- S-
- Sadler JE. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;106-112. doi:10.1182/asheducation-2009.1.106
- Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Nov;301(5):H1723-41. doi: 10.1152/ajpheart.00553.2011. Epub 2011 Aug 19. PMID: 21856909.
- Sato, T., Kamiyama, Y., Jones, R.T., Cowley, R.A., Trump, B.F. 1978. Ultrastructural study on kidney cell injury following various types of shock in 26 immediate autopsy patients.
- Sato Y, Mii A, Hamazaki Y, Fujita H, Nakata H, Masuda K, et al. Heterogeneous fibroblasts underlie age-dependent tertiary lymphoid tissues in the kidney. *JCI Insight.* 2016;1(11):e87680
- Schmidt C, Höcherl K, Schweda F, Bucher M. Proinflammatory cytokines cause down-regulation of renal chloride entry pathways during sepsis. *Crit Care Med.* 2007;35:2110-2119
- Schroeder, J. A., M. C. Thompson, M. M. Gardner and S. J. Gendler (2001). "Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland." *J Biol Chem* 276(16): 13057-13064.
- Schroemm A. B., Brandenburg K., Loppnow H., Moran A. P., Koch M. H., Rietschel E. T., et al. (2000). Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* 267, 2008-2013. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01204.x
- Schroemm A. B., Lien E., Henneke P., Chow J. C., Yoshimura A., Heine H., et al. (2001). Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J. Exp. Med.* 194, 79-88. doi:10.1084/jem.194.1.79
- Schut I, et al. MUC1 expression, splice variant and short form transcription (MUC1/Z, MUC1/Y) in prostate cell lines and tissue. *BJU Int.* 2003;91:278-283.
- See EJ, Jayasinghe K, Glassford N, Bailey M, Johnson DW, Polkinghorne KR, et al. Long-term risk of adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis of cohort studies using consensus definitions of exposure. *Kidney Int.* 2019;95(1):160-72.
- Seely KA, Holthoff JH, Burns ST, et al. Hemodynamic changes in the kidney in a pediatric rat model of sepsis-induced acute kidney injury. *AJP. Ren Physiol.* 2011;301(1):F209-F217. doi:10.1152/ajprenal.00687.2010.
- Seija M, Baccino C, Nin N, et al. Role of peroxynitrite in sepsis-induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats. *Shock.* 2012;38(4):403-410. doi:10.1097/SHK.0b013e31826660f2
- Shen H, Tesar BM, Walker WE, Goldstein DR. Dual signaling of MyD88 and TRIF is critical for maximal TLR4-induced dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2008 Aug 1;181(3):1849-58. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.1849.
- Sheng, Y. H., Triyana, S., Wang, R., Das, I., Gerloff, K., Florin, T. H., et al. (2012). MUC1 and MUC13 differentially regulate epithelial inflammation in response to inflammatory and infectious stimuli. *Mucosal Immunol.* 6, 557-568. doi:

Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life Sci.* 2020 Sep 1;256:117860. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117860. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32534037.10.1038/mi.2012.98

Shukla SK, Purohit V, Mehla K, et al. MUC1 and HIF-1 $\alpha$  Signaling Crosstalk Induces Anabolic Glucose Metabolism to Impart Gemcitabine Resistance to Pancreatic Cancer [published correction appears in *Cancer Cell.* 2017 Sep 11;32(3):392]. *Cancer Cell.* 2017;32(1):71-87.e7. doi:10.1016/j.ccell.2017.06.004

Silva, F., Carvalho, F., Peixoto, A., Seixas, M., Almeida, R., Carneiro, F., et al. (2001). MUC1 gene polymorphism in the gastric carcinogenesis pathway. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 548–552. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200677

Silva, F., Carvalho, F., Peixoto, A., Teixeira, A., Almeida, R., Reis, C., et al. (2003). MUC1 polymorphism confers increased risk for intestinal metaplasia in a Colombian population with chronic gastritis. *Eur. J. Hum. Genetics.* 11, 380–384. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200978

Simon BR, Wilson MJ, Wickliffe JK. The RPTC/TERT1 cell line models key renal cell responses to the environmental toxicants, benzo[a]pyrene and cadmium. *Toxicol Rep.* 2014;1:231-242. doi:10.1016/j.toxrep.2014.05.010

Singbartl K, Bockhorn SG, Zarbock A, Schmolke M, Van Aken H. T cells modulate neutrophil-dependent acute renal failure during endotoxemia: critical role for CD28. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(3):720-728. doi:10.1681/ASN.2004050381

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315:801–810.

Singh, P. K. and M. A. Hollingsworth (2006). "Cell surface-associated mucins in signal transduction." *Trends Cell Biol* 16(9): 467-476.

Singh, P. K., Y. Wen, B. J. Swanson, K. Shanmugam, A. Kazlauskas, R. L. Cerny, S. J. Gendler and M. A. Hollingsworth (2007). "Platelet-derived growth factor receptor beta-mediated phosphorylation of MUC1 enhances invasiveness in pancreatic adenocarcinoma cells." *Cancer Res* 67(11): 5201-5210

Singleton, K. D. & Wischmeyer, P. E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur. Surg. Res.* 35, 486–491 (2003).

Smeets B., Boor P., Dijkman H., Sharma S.V., Jirak P., Mooren F., Berger K., Bornemann J., Gelman I.H., Floege J., et al. Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *J. Pathol.* 2013;229:645–659. doi: 10.1002/path.4125.

Smith, J.A. , Stallons, L.J. , Collier, J.B. , Chavin, K.D. & Schnellmann, R.G. 2015. Suppression of mitochondrial biogenesis through toll-like receptor 4- dependent mitogen- activated protein kinase kinase/extracellular signal- regulated kinase signaling in endotoxin-induced acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther* 352, 346–357.

Solez K, Morel-Maroger L, Sraer JD. The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine (Baltimore).* 1979;58(5):362–376.

Sousa AM, Grandgenett PM, David L, Almeida R, Hollingsworth MA, Santos-Silva F. Reflections on MUC1 glycoprotein: the hidden potential of isoforms in carcinogenesis. *APMIS.* 2016;124(11):913-924. doi:10.1111/apm.12587

Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(6):539-552. doi:10.1016/j.bcp.2009.04.029.

Spronk PE, Ince C, Gardien MJ, et al. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet.* 2002; 360(9343):1395-1396.

Stribos EG, van Werkhoven MB, Poppelaars F, et al. Renal expression of Toll-like receptor 2 and 4: dynamics in human allograft injury and comparison to rodents. *Mol Immunol.* 2015;64(1):82-89. doi:10.1016/j.molimm.2014.11.003

Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 2008;118(2):534-544. doi:10.1172/JCI33194

Swallow DM, Gendler S, Griffiths B, Kearney A, Povey S, Sheer D, Palmer RW, TaylorPapadimitriou J. The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24. *Ann Hum Genet.* 1987;51(Pt 4):289-94.

Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(8):477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0

-T-

Takasu O, Gaut JP, Watanabe E et al (2013) Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 187:509–517

Takaori K, Nakamura J, Yamamoto S, Nakata H, Sato Y, Takase M, Nameta M, Yamamoto T, Economides AN, Kohno K, Haga H, Sharma K, Yanagita M. Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Aug;27(8):2393-406. doi: 10.1681/ASN.2015060647. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26701981; PMCID: PMC4978049.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21 : 335–76.

Tanaka S, Tanaka T, Nangaku M: Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014;307:F1187-F1195

Tang PM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(3):144-158. doi:10.1038/s41581-019-0110-2

Thakar CV, Christianson A, Freyberg R, Almenoff P, Render ML. Incidence and outcomes of acute kidney injury in intensive care units: a Veterans Administration study. *Crit Care Med* 2009;37:2552—8

Thathiah A, Carson DD. MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. *Biochem J*. 2004;382(Pt 1):363-73.

Thathiah A, Blobel CP, Carson DD. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *J Biol Chem*. 2003;278(5):3386-94.

Tiwari MM, Brock RW, Megyesi JK, et al. Disruption of renal peritubular blood flow in lipopolysaccharide-induced renal failure: role of nitric oxide and caspases. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(6):F1324-F1332. doi:10.1152/ajprenal.00124.2005.

Torres MP, Chakraborty S, Soucek J, Batra SK. Mucin-based targeted pancreatic cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2012;18(17):2472-81.

Tough DF, Sun S, Sprent J. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med*. 1997;185(12):2089-2094. doi:10.1084/jem.185.12.2089

Tran, M., Tam, D., Bardia, A., Bhasin, M., Rowe, G.C., Kher, A., Zsengeller, Z.K., Akhavan- Sharif, M.R., Khankin, E.V., Saintgeniez, M. et al 2011. PGC-1alpha promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J Clin Invest* 121, 4003–4014.

Tréhoux S, Duchêne B, Jonckheere N, Van Seuning I. The MUC1 oncomucin regulates pancreatic cancer cell biological properties and chemoresistance. Implication of p42-44 MAPK, Akt, Bcl-2 and MMP13 pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;456(3):757-762. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.025

Treon SP, Mollick JA, Urashima M, et al. Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone. *Blood*. 1999;93(4):1287-1298.

Tsuboi, N., Yoshikai, Y., Matsuo, S., Kikuchi, T., Iwami, K., Nagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S. & Matsuguchi, T. 2002. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 169, 2026–2033.

-U-

Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005;294(7):813-818. doi:10.1001/jama.294.7.813

Ueno, K., Koga, T., Kato, K., Golenbock, D. T., Gendler, S. J., Kai, H., et al. (2008). MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38, 263–268. doi: 10.1165/rcmb.2007-0336RC

Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. doi:10.1126/science.1260419

-V-

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem*. 2001;276:31332–31339.

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem*. 2002;277:15107–15112.

Vallance TM, Ravishankar D, Albadawi DAI, et al. Effect of ultrapure lipopolysaccharides derived from diverse bacterial species on the modulation of platelet activation. *Sci Rep*. 2019;9(1):18258. Published 2019 Dec 3. doi:10.1038/s41598-019-54617-w

Vallée, A.. "Activation de la glycolyse aérobie par la voie canonique WNT/β-caténine - Une piste dans la sclérose latérale amyotrophique." *M S-médecine Sciences* 34 (2018): 326-330.

Van der Hauwaert C, Savary G, Gnemmi V, Glowacki F, Pottier N, Bouillez A, Maboudou P, Zini L, Leroy X, Cauffiez C, Perrais M, Aubert S. Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling. *PLoS One*. 2013 Jun 14;8(6):e66750. doi: 10.1371/journal.pone.0066750.

Vandewalle A. Toll-like receptors and renal bacterial infections. *Chang Gung Med J*. 2008;31(6):525-537.

Van Putten JPM, Strijbis K. Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer. *J Innate Immun*. 2017;9(3):281-299. doi:10.1159/000453594

Vanstherem D, Gossiaux A, Declèves AE, Caron N, Nonclercq D, Legrand A, Toubeau G, "Expression of Nestin, Vimentin, and NCAM by Renal Interstitial Cells after Ischemic Tubular Injury", *BioMed Research International*, vol. 2010, Article ID 193259, 10 pages, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/193259>

Vasir B, Avigan D, Wu Z, et al. Dendritic cells induce MUC1 expression and polarization on human T cells by an IL-7-dependent mechanism. *J Immunol*. 2005;174(4):2376-2386. doi:10.4049/jimmunol.174.4.2376

Verma, S. (2016). Laboratory Animal Models to Mimic Human Sepsis: A Review.

Viedt C, Orth SR. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes?. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(12):2043-2047. doi:10.1093/ndt/17.12.2043

Vinall, L. E., King, M., Novelli, M., Green, C. A., Daniels, G., Hilken, J., et al. (2002). Altered expression and allelic association of the hypervariable membrane mucin MUC1 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology*. 123, 41–49. doi: 10.1053/gast.2002.34157

Vitalone MJ, O'Connell PJ, Jimenez-Vera E, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in early transplant tubulointerstitial damage. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(8):1571-1583. doi:10.1681/ASN.2007050580

Vogetseder A, Picard N, Gaspert A et al. Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C22–C28

Vos H. L., De Vries Y., Hilken J. (1991). The mouse episialin (Muc1) gene and its promoter: rapid evolution of the repetitive domain in the protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 181, 121–130. doi:10.1016/S0006-291X(05)81390-7

#### -W-

Wagner KD, Wagner N, Wellmann S, Schley G, Bondke A, Theres H, Scholz H. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J*. 2003 Jul;17(10):1364-6. doi: 10.1096/fj.02-1065fje. Epub 2003 May 8. PMID: 12738801.

Wald R, McArthur E, Adhikari NK, et al. Changing incidence and outcomes following dialysis-requiring acute kidney injury among critically ill adults: a population-based cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2015;65(6):870-877. doi:10.1053/j.ajkd.2014.10.017

Walsh MC, Lee J, Choi Y. Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev*. 2015;266(1):72-92. doi:10.1111/imr.12302

Waltz P, Carchman E, Gomez H, Zuckerbraun B. Sepsis results in an altered renal metabolic and osmolyte profile. *J Surg Res*. 2016;202:8–12.

Wang, H., Lillehoj, E. P., and Kim, K. C. (2003). Identification of four sites of stimulated tyrosine phosphorylation in the MUC1 cytoplasmic tail. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 310, 341–346. doi: 10.1016/j.bbr.2003.09.030

Wang F, Li Q, Ni W, et al. Expression of human full-length MUC1 inhibits the proliferation and migration of a B16 mouse melanoma cell line. *Oncol Rep*. 2013;30(1):260-268. doi:10.3892/or.2013.2440

Wei X, Xu H, Kufe D. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell*. 2005;7(2):167-178. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.008

Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837–847 (1997)

Wesseling J, van der Valk SW, Hilken J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell*. 1996;7(4):565-77.

Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilken J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol*. 1995;129(1):255-65.

West AP, Koblansky AA, Ghosh S (2006) Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 409–437.

Wichterman, K. A., Baue, A. E. & Chaudry, I. H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res*. 29, 189–201 (1980).

Williams MA, Bauer S, Lu W, et al. Deletion of the mucin-like molecule muc1 enhances dendritic cell activation in response to toll-like receptor ligands. *J Innate Immun.* 2010;2(2):123-143. doi:10.1159/000254790

Wolfs, T.G. , Buurman, W.A. , van Schadewijk, A. , de Vries, B. , Daemen, M.A. , Hiemstra, P.S. & van 't Veer, C. 2002. *In vivo* expression of Toll- like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN- gamma and TNF- alpha mediated up- regulation during inflammation. *J Immunol*, 168, 1286–1293.

Wu CF, Chiang WC, Lai CF, Chang FC, Chen YT, Chou YH, et al. Transforming growth factor beta-1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am J Pathol.* 2013;182(1):118–31

Wykes M, MacDonald KP, Tran M, et al. MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2002;72(4):692-701.

**-X-**

Xing L, Zhongqian L, Chunmei S, et al. Activation of M1 macrophages in sepsis-induced acute kidney injury in response to heparin-binding protein. *PLoS One.* 2018;13(5):e0196423. Published 2018 May 3. doi:10.1371/journal.pone.0196423

Xing Li, Mu G, Song C, et al. Role of M2 Macrophages in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Shock.* 2018;50(2):233-239. doi:10.1097/SHK.0000000000001006

Xu X, Padilla MT, Li B, et al. MUC1 in macrophage: contributions to cigarette smoke-induced lung cancer. *Cancer Res.* 2014;74(2):460-470. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1713

**-Y-**

Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Hamada T, Goto M, Higashi M, Nomoto M, Yonezawa S. MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(8):2708-16.

Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799(1-2):149-156. doi:10.1016/j.bbasm.2009.11.019

Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med.* 2010;16(5):535–43, 1p following 143

Yang L, Xie M, Yang M, et al. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nat Commun.* 2014;5:4436.

Yen JH, Xu S, Park YS, Ganea D, Kim KC. Higher susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in Muc1-deficient mice is associated with increased Th1/Th17 responses. *Brain Behav Immun.* 2013;29:70-81. doi:10.1016/j.bbi.2012.12.004

Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005; 175 : 2851–8.

**-Z-**

Zantl, N. et al. Essential role of  $\gamma$ -interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect. Immun.* 66, 2300–2309 (1998)

Zaretsky, J. Z., R. Sarid, Y. Aylon, L. A. Mittelman, D. H. Wreschner and I. Keydar (1999). "Analysis of the promoter of the MUC1 gene overexpressed in breast cancer." *FEBS Lett* 461(3): 189-195.

Zen Y, Harada K, Sasaki M, et al. Lipopolysaccharide induces overexpression of MUC2 and MUC5AC in cultured biliary epithelial cells: possible key phenomenon of hepatolithiasis. *Am J Pathol.* 2002;161(4):1475-1484. doi:10.1016/S0002-9440(10)64423-9

Zhao YL, Tian PX, Han F, et al. Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2017;18(12):1055-1063. doi:10.1631/jzus.B1700003

Zhang S, Tu Y, Sun YM, et al. Swiprosin-1 deficiency impairs macrophage immune response of septic mice. *JCI Insight.* 2018;3(3):e95396. Published 2018 Feb 8. doi:10.1172/jci.insight.95396

Zhou D, Tan RJ, Zhou L, Li Y, Liu Y. Kidney tubular  $\beta$ -catenin signaling controls interstitial fibroblast fate *via* epithelial-mesenchymal communication. *Sci Rep.* 2013;3:1878. doi: 10.1038/srep01878. PMID: 23698793; PMCID: PMC3662012.

Zrihan-Licht S, et al. Characterization and molecular cloning of a novel MUC1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue. *Eur J Biochem.* 1994;224:787–795.

**ANNEXE-PUBLICATIONS**

## Title page

Dual role of MUC1 mucin in kidney ischemia-reperfusion injury: nephroprotector in early phase, but pro-fibrotic in late phase.

## Authors

Jean-Baptiste Gibier<sup>1,2,3</sup>, Brigitte Hémon<sup>1,2</sup>, Mélanie Fanchon<sup>1,2</sup>, Kelly Gaudelot<sup>1,2</sup>, Nicolas Pottier<sup>4,5,6</sup>, Bélinda Ringot<sup>1,2</sup>, Isabelle Van Seuningen<sup>1,2</sup>, François Glowacki<sup>4,5,7</sup>, Christelle Cauffiez<sup>4,5</sup>, David Blum<sup>1,8</sup>, Marie-Christine Copin<sup>3,9</sup>, Michaël Perrais<sup>1,2</sup>, Viviane Gnemmi<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Univ. Lille, UMR-S 1172 - JPARC - Jean-Pierre Aubert Research Center, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Inserm, UMR-S 1172, Team "Mucins, Epithelial Differentiation and Carcinogenesis", F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> CHU Lille, Pathology Institute, Centre de Biologie Pathologie, Rue Oscar Lambret, F-59037 Lille, France

<sup>4</sup> Univ. Lille, EA4483, F-59000 Lille, France

<sup>5</sup> EA4483, Faculté de Médecine, Pôle Recherche, Place de Verdun, F-59000 Lille, France

<sup>6</sup> CHU Lille, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Centre de Biologie Pathologie, Rue Oscar Lambret, F-59037 Lille, France

<sup>7</sup> CHU Lille, Department of Nephrology, Hôpital Huriez, Rue Michel Polonovski, F-59037 Lille, France

<sup>8</sup> Inserm, UMR-S 1172, Team "Alzheimer & Tauopathies", F-59000 Lille, France

<sup>9</sup> Univ. Lille, CNRS UMR 8161, SIRIC ONCOLille, F-59000, Lille, France

## Abbreviations:

AKI, acute kidney injury; ATN, acute tubular necrosis; CD, collecting ducts; CDT, convoluted distal tubule; CKD, chronic kidney disease; DFG, delay graft function; eGFR, estimated glomerular filtration rate; EMT, epithelial-mesenchymal transition; EV, empty vector; HES, hematoxylin-eosin-saffron; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; IR, ischemia-reperfusion; KO, knockout; LT, *Lotus tetragonolobus* lectin; M3, 3 months after transplantation; MET, mesenchymal-epithelial transition; PAS, periodic acid-Schiff; RPTECs, human proximal tubule epithelial cells; Sma, smooth muscle actin; W1, first week; WT, wild-type.



## **Abstract**

Acute kidney injury (AKI) is characterized by acute tubular necrosis (ATN) which involves mainly proximal tubules. Past AKI is associated with higher risk of chronic kidney disease (CKD). The MUC1 mucin is a large glycoprotein responsible for epithelial protection and locates to convoluted distal tubules and collecting ducts. Since MUC1 activates the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in carcinoma cells, we hypothesized that MUC1 could be involved in epithelial tubular cell plasticity, a process that accompanies epithelial repair, but also participates into kidney fibrosis, histological substratum of CKD. In cultured human proximal cells and in human kidney allograft biopsies, we observed MUC1 induction in proximal tubules displaying ATN. Transient MUC1 induction localized with mesenchymal and stem-cell markers and was associated *in vitro* with reduced anoikis. In a mouse ischemia-reperfusion (IR) model, Muc1 expression mitigates severe tubular injury, as WT displayed less ATN than Muc1 KO mice. But, WT mice displayed more severe kidney fibrosis than Muc1 KO 28 days after ischemia. Besides, sustained Muc1 expression in WT was associated with less kidney M2 macrophages. Human kidney biopsies performed within the first week (W1) of transplantation in the context of IR showed MUC1 W1 induction associated with EMT markers. Protocol biopsies performed 3 months after demonstrated sustained abnormal MUC1 induction in atrophic tubules within kidney fibrosis. Altogether these data showed that sustained abnormal MUC1 induction accompanies failing epithelial repair, chronic inflammation and kidney fibrosis. In conclusion, MUC1 exerts opposite effects during kidney response to IR: first protective and then harmful.

**Keywords:** MUC1, acute kidney injury, epithelial-mesenchymal transition, ischemia-reperfusion, fibrosis.

## 1. Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a serious common public health concern with high incidence, mortality, morbidity and economic impact. Morphologically, AKI is characterized by tubule cell damage and cell death mainly through necrosis, apoptosis, and anoikis. Anoikis is a form of apoptosis, activated in tubular epithelial cells in response to loss of cell-to-matrix interactions [1]. The kidney has a noteworthy capacity to recovery, and the mechanisms leading to kidney repair following AKI are well described [2]. Several origins of epithelial repair have been proposed [3,4], and evidence suggests that tubule epithelial cells are the main ones responsible for kidney recovery [5]. During kidney repair, transient dedifferentiation of epithelial cells has been reported, with expression of both mesenchymal markers and embryonic markers such as Pax2 or N-CAM [6,7], followed by redifferentiation to achieve epithelial repair. Kidney repair following AKI might thus involve epithelial plasticity related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the reverse process named mesenchymal-epithelial transition (MET). EMT is thus recognized as a reversal and dynamic process through which epithelial cells lose epithelial characteristics and acquire mesenchymal features, including motility and an elongated shape [8]. EMT is also thought to participate in kidney fibrogenesis [9]. Recently, the paradigm of entire tubular repair following AKI was thought to be out-of-date, since past AKI is now associated with higher risk of chronic kidney disease (CKD) [10], and the long-lasting epithelial dedifferentiation after AKI appears as a leading predictor of progression to CKD [11]. Kidney fibrosis has been proposed to result from signals between epithelial cells displaying failed redifferentiation and resident fibroblasts [12]. Elucidation of the cell mechanisms controlling the plasticity of kidney epithelial cells would be a great breakthrough in preventing kidney fibrosis.

The membrane-bound mucin MUC1 is a large *O*-glycoprotein responsible for epithelial protection. In the adult kidney, it localizes to the apical membrane of convoluted distal tubules (CDTs) and collecting ducts (CDs) [13]. MUC1 expression has also been reported in tubule epithelial cells early in kidney development and in cortical-tubule-derived renal cell carcinomas [14]. In carcinoma cells, MUC1 can activate EMT and transcription of *SNAIL1*, encoding a major EMT transcription factor [15]. Recent work on mice has demonstrated Muc1 induction by ischemia-reperfusion (IR), associated with a better kidney response [16] related to activation of the protective  $\beta$ -catenin pathway [17].

As MUC1 favors cell survival, proliferation, and migration [14,15,18], we hypothesized that it could be involved in renal epithelial plasticity and might exert an initial protective effect followed by a harmful one if the insult persists. We present evidence of MUC1 dual actions, based on studies of human renal tubular cells; of the effects

of IR in wild-type (WT) and Muc1-knockout (KO) mice; and of human kidney biopsies displaying acute tubular necrosis (ATN) after kidney transplantation.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Renal cell line cultures and *in vitro* assays**

Primary cultured human kidney proximal tubule cells (RPTEC/TERT1) and the renal cell line HEK-293 were obtained from the American Type Culture Collection. Exposure to hypoxia was carried out at 37°C in a humidified incubator (H35 hypoxystation, Don Whitley Scientific) with 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 1% O<sub>2</sub>. HEK-293 cells were stably transfected with a *MUC1*-expressing vector (a gift from SJ Gendler, Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA) or an empty vector (EV) and used in a previously described anoikis assay [19]. HEK-293 cells were treated with 5 μM GO-203 (GenScript), which blocks MUC1 peptide dimerization, or with the control peptide CP2 (GenScript), as previously described in [20].

### **2.2 Animals.**

Animal experiments were approved by the Animal Care and Research Committee of Nord Pas-de-Calais (protocol number CEEA 162011). Animals were hosted in standard cages under constant temperature (24°C), with a 12:12-hour light-dark cycle. They were fed a standard diet and had free access to tap water. Germline Muc1 knockout mice, (C57BL/6 background) were generously provided by Dr Sandra Gendler (Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona, USA). Heterozygous males and females (Muc1<sup>+/-</sup>) were mated to produce WT (Muc1<sup>+/+</sup>) and Muc1 homozygous knockout mice (Muc1<sup>-/-</sup>). The genotypes of the mice were determined by PCR to identify male littermates for experiments as previously described [21]. Muc1-knockout mice were maintained as homozygous to compare with WT C57BL/6 mice.

### **2.3 Mouse model of AKI: ischemia-reperfusion**

Warm renal IR was performed in 6-week-old male mice after lateral abdominal incision. Anesthesia was induced with isoflurane inhalation. To induce ischemia, after lateral abdominal incision, a left renal pedicle was clamped for 25 minutes with non-traumatic microvascular clips. Left kidney ischemia was verified by renal color change. After clamp removal, blood flow restoration was checked visually. Kidneys were collected on days 2, 4, 7, 14, and 28 of reperfusion. Sham-operated controls underwent the same surgical procedures but without vascular occlusion. Kidney tissues were divided for freezing or fixation in 4% formaldehyde prior to paraffin embedding.

### **2.4 Human kidney transplant biopsies from an AKI study population.**

Patients provided their written informed consent for biopsies and for the use of clinical data and secondary use of histological material for research. This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by ethic committee (CPP Nord-Ouest IV; protocol number HP 16/84). Between January 2010 and March 2012, 48 kidney transplants were retrospectively retrieved from a language search of the database of the Department of Pathology of the University Hospital of Lille. The selection terms were “AKI” and “kidney graft”. Selection criteria included adult men and women patients ; availability of the paraffin-embedded kidney allograft tissue biopsies performed within the first week of transplantation (W1) in the context of delay graft function (DGF) and 3 months after transplantation (M3) as a part of the protocol. The exclusion criterion was early graft loss due to surgical events. All patients were treated with at least two immunosuppressants: a calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil. Semi-quantitative analysis was performed according to the updated Banff 07 classification [22].

### **2.5 Flow cytometry**

RPTEC cells were detached by trypsinization, followed by centrifugation and resuspension before processed for flow cytometry. Analysis of tubule marker expression in RPTECs focused on the proximal tubule markers CD10 (APC-conjugated antibody; eBioscience, 17-0106-42) and CD13 (PE-conjugated antibody; eBioscience, 12-0138-42) and the distal tubule marker MUC1 (PE-conjugated antibody, Santa Cruz Biotechnology, sc-7313 PE). Apoptosis and cell death were assayed with the Annexin-FITC/PI staining kit according to the manufacturer’s instructions (Santa Cruz Biotechnology). Stained cells were analyzed on a BD LSRFortessa™ X-20 cell analyzer (BD Biosciences). Data were analyzed with Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter).

### **2.6 Histological analyses**

Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were sliced into 4- $\mu$ m-thick sections and stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES), periodic acid-Schiff (PAS), and Sirius red. Slides were evaluated independently by two pathologists (JG, VG) in a blinded manner, and representative images were recorded. Histological scores were established according to the percentage of involved tubules: score 1 <10%, score 2 = 10%-25%; score 3 = 26%-50%; score 4 = 51%-75%; score 5 >75%, as previously described [23].

### **2.7 Interstitial fibrosis quantification by histomorphometric analysis**

With a light microscope (Axio Scan.Z1, Zeiss) at  $\times 200$  magnification, one kidney section was captured for each d14 and each d28 WT or Muc1-KO mouse. Histomorphometric analyses were performed with image analysis software (Mercator-Explora Nova software, La Rochelle, France).

### **2.8 Immunofluorescence staining**

Cryostat sections (4 µm) of kidney tissue or cultured RPTECs plated on Lab-Tek Chamber Slides (Fisher Scientific, Illkirch, France) were incubated overnight at +4°C with Armenian hamster CT2 anti-MUC1 (ThermoFisher, MA5-11202), mouse anti-MUC1 (LICR-LON-M8), *Lotus Tetragonolobus* lectin (Vector Labs, FL-1321), mouse anti-β-catenin (BD Transduction Laboratories™, 610153), mouse anti-vimentin (Dako, IS63030-2), mouse anti-CD133 (MACS Milteny Biotec, 130-090-851), mouse anti-E-cadherin (ThermoFisher, 13-1700), or rabbit anti-Snail (Abcam, ab85931). Incubation with secondary antibodies coupled to Texas Red (Jackson Immunoresearch, Marseille, France) or FITC (Sigma Aldrich) was done at room temperature.

## **2.9 Immunohistochemistry**

Paraffin-embedded renal sections of mouse and human tissues were deparaffinized in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol to water. Endogenous peroxidase activity was quenched on all sections with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mouse anti-MUC1 (LICR-LON-M8), mouse anti-β-catenin (BD Transduction Laboratories™, 610153), mouse anti-vimentin (Dako, IS63030-2), rabbit anti-Snail (Abcam, ab85931), anti-mouse Ki-67 (Dako, IS62630-2), anti-rabbit cleaved caspase 3 (Cell Signaling, 9664), anti-rat F4/80 (e-Bioscience, 14-4801), or anti-rabbit CD163 (Novus Biological, NBP1-30148-) were used as primary antibodies. IHC scores were established according to the percentage of immunostained tubules: score 1 <10%, score 2 = 10%-25%; score 3 = 26%-50%; score 4 = 51%-75%; score 5 >75%. Inflammatory cells having accumulated post-IR in the mouse kidneys were counted in 10 randomly selected high-magnification (x400) fields per kidney.

## **2.10 Combined immunofluorescence and immunohistochemistry stainings**

A three steps process which combined immunohistochemistry and immunofluorescence's techniques was performed on paraffin-embedded renal sections of human tissues to determine the triple-expression of MUC1; vimentin or β-catenin; and *Lotus Tetragonolobus* lectin. The two first steps of immunohistochemistry were performed on Ventana Benchmark XT automate. Briefly, slides were deparaffinized before antigen retrieval was performed. Then, tissues were incubated with primary mouse anti-MUC1 (LICR-LON-M8) antibody and revealed using ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche, Ventana). Next, a second staining was done with anti-β-catenin (BD Transduction Laboratories™, 610153) or anti-vimentin (Dako, IS63030-2) antibody and revealed using ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Roche, Ventana). In the final step, slides were incubated for two hours at room temperature with fluorescein labeled *Lotus Tetragonolobus* lectin (Vector Labs FL-1321) before mounted with Fluoprep (Biomerieux).

## **2.11 Apoptosis detection by TUNEL staining**

Formalin-fixed mouse kidney sections were processed for apoptosis detection by terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL staining), according to the manufacturer's protocol (ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit Merck Millipore, S7101). TUNEL-positive cells were counted in 10 randomly chosen high-magnification (x400) fields per kidney.

### **2.12 RNA extraction and quantification by the reverse-transcription-quantitative polymerase chain reaction technique (RT-qPCR)**

Total RNA extraction and reverse transcription were performed as previously described [19]. The Taqman assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for RT-qPCR with human- and mouse-specific primers. Amplification was done in a C1000 Biorad™ PCR system (Bio-Rad, CA). Peptidylprolyl isomerase A (*Ppia*) mRNA was used as an internal control. Transcript levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Relative expression levels were obtained by normalizing with respect to *Ppia* transcripts. Except for *MUC1* analysis, expression levels of tested markers did not significantly differ between WT sham and KO sham. Relative expressions levels were thus obtained by setting the expression level of sham-operated controls at 100.

### **2.13 Western blot analysis**

Whole-kidney extracts were dissociated with the gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec) and homogenized in cold phosphate-buffered saline with protease inhibitors (aprotinin, leupeptin, pepstatin A). Western blotting was performed with specific primary antibodies: Armenian hamster CT2 anti-MUC1 (ThermoFisher, MA5-11202) and rabbit anti-GAPDH (Santa Cruz, FL-335: sc-25778). For densitometry analysis, the expression level of each protein was carried out using GelAnalyst-GelSmart software (Clara Vision, Paris, France).

### **2.14 Statistical analyses**

Data are presented as means  $\pm$  s.e.m. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA). All statistical comparisons were made using the two-way analysis of variance (ANOVA) and the two-way ANOVA test was followed by Bonferroni's multiple analyses to determine difference between the mice groups (IR-treated, sham-operated WT and KO mice) at the different times of reperfusion (d2, d4, d7, d7, d14 and d28). All the correlations were analyzed with the Spearman test. The two-tailed t-test was used to compare the parametric data relative to MUC1 immunohistochemical expression scores in human kidney biopsies. A *p*-value lower than 0.05 was considered to indicate significant difference among groups.

## **3. Results**

### **3.1 In primary renal proximal tubule cell cultures, MUC1 is induced by hypoxia-mediated EMT and decreases anoikis**

To mimic IR-induced damage to kidney tubules *in vitro*, human proximal tubule epithelial cells (RPTECs) were subjected to hypoxia and then returned to normoxia. Under normoxic conditions (d0), the percentage of cultured cells seeded onto plastic expressing the proximal tubule cell markers CD10 and CD13 were about 57% and 58%, respectively; while about 9% of the cells expressed the distal tubule cell marker MUC1. The percentages of CD10+ and CD13+ cells remained stable under hypoxia (d6) and after re-oxygenation (d13), but the percentage of MUC1+ cells increased to 81% under hypoxia and returned to a basal level after 7 days of re-oxygenation. The percentage of CD10+MUC1+ cells was about 4.5% under normoxia, reaching 44% under hypoxia (Fig. 1A). RPTECs displayed a cohesive epithelial phenotype under normoxia but acquired a mesenchymal phenotype under hypoxia (Fig. S1A). This morphology change was accompanied by an increase in *SNAIL1*, *MUC1*, and *VIMENTIN* transcripts. Levels of these mRNAs normalized after re-oxygenation (Fig. 1B). Under hypoxia, we observed MUC1 cytoplasmic delocalization and overexpression, in association with increased nuclear Snail expression, loss of membranous E-cadherin, and increased cytoplasmic vimentin expression. Re-oxygenation led to normalization of MUC1 and epithelial and mesenchymal marker expressions (Fig. 1C).

Because epithelial cells lose adhesion to the tubular basement membrane during severe ATN, we wondered if MUC1 induction might mitigate anoikis. HEK-293 renal cells were stably transfected with a MUC1 expression vector and displayed MUC1 expression, on contrary to their counterparts transfected with the empty vector (EV) (Fig. S1B). HEK-293 cells stably transfected with MUC1 were more resistant when cultured in non-adherent medium than cells transfected with EV (Fig. 1D). We next challenged HEK-293 cells with GO-203, a peptide blocking MUC1 homodimerization and signaling, or with a control peptide (CP2). GO-203-treated HEK293-MUC1+ cells showed significantly poorer survival than the controls, whereas GO-203- and CP2-treated HEK-293-EV cells showed similar survival (Fig. 1E-F). In conclusion, expression of epithelial proximal tubule cell markers is stable in RPTECs subjected to hypoxia and re-oxygenation, but a majority of these cells can induce the distal tubule cell marker MUC1. Furthermore, MUC1 induction is associated *in vitro* with epithelial plasticity and reduced anoikis.

### **3.2 Muc1 is induced and mitigates acute kidney injury in mouse.**

We next analyzed the effect of IR on Muc1 expression in a mouse model of IR-induced AKI. RT-qPCR performed on whole-kidney from male WT mice revealed a significant higher level of *Muc1* transcripts significantly in IR-treated as compared to sham-operated WT animals ( $p < 0.0001$ , two-way ANOVA-Fig. 2A).

Post hoc analysis by Bonferroni showed a significant increase of *Muc1* transcripts by d4 and by d7 ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively Fig.2A). IR-treated WT mice significantly displayed also higher *Muc1* protein expression compared to sham ( $p < 0.0001$ ; two-way ANOVA-Fig.2B and 2C). Post hoc analysis by Bonferroni revealed a significant increase of *Muc1* expression by d4 and by d7 in IR-treated WT ( $p < 0.001$ ). Immunohistochemistry (IHC) revealed *Muc1* on the apical membrane of CDTs and CDs in WT sham kidneys. Following IR, damaged tubules of WT mice, characterized by dilatation pattern, displayed induction of *Muc1* and relocation of its expression within the cytoplasm of tubule cells (Fig. 2D). In the late phase of reperfusion (14 days after IR), IR-treated WT showed a sustained increase of *Muc1* protein expression (1.23 fold increased), associated with persistent high levels of *Muc1* mRNA transcript (2.63 fold increased) compared to sham non-operated WT kidneys. Furthermore, IHC revealed normalization of *Muc1* expression by d14, except for foci of persistent damaged tubules with simplified tubular epithelium that showed *Muc1* abnormal sustained overexpression (Fig. 2D).

Microscopic analysis of ischemic kidneys of WT and *Muc1*-KO mice revealed that ATN predominated at the cortico-medullary junction (Fig. 3A). IR-treated WT and *Muc1*-KO mice significantly displayed ATN compared to shams ( $p < 0.0001$ ; two-way ANOVA). On d2, the histological ATN score was higher for *Muc1*-KO than for WT mice ( $3.25 \pm 0.37$  vs  $2.31 \pm 0.21$ ;  $p = 0.0257$ ; Bonferroni post-test) (Fig. 3B). From d4 onward, areas showing features of tubular regeneration were observed in both groups of animals. WT and *Muc1* KO IR-treated mice significantly displayed regeneration features compared to shams ( $p < 0.0001$ ; two-way ANOVA). The regeneration score was higher in KO than in WT kidneys by d4 ( $3.14 \pm 0.26$  vs  $1.75 \pm 0.48$ ;  $p = 0.0202$ ; Bonferroni post-test) (Fig. 3C). IR-treated WT and *Muc1*-KO significantly expressed Kidney injury molecule (*Kim-1*) mRNA induction compared to shams ( $p < 0.0001$ ; two-way ANOVA). Relative expression of *Kim-1* transcripts was significantly higher in *Muc1*-KO mice than in WT mice by d4 confirming the greater severity of acute tubular damage in *Muc1*-KO ( $p < 0.0001$ ; Bonferroni post-test (Fig.3D). The tubule epithelial cell proliferation index was significantly higher in IR-treated WT and *Muc1*-KO mice compared to sham ( $p < 0.0001$ ; two-way ANOVA). The proliferation index was initially higher in WT than in *Muc1*-KO mice, confirming the initial better response of the former to injury by d2 ( $p < 0.0001$ ; Bonferroni post-test-Fig. 3E). TUNEL assays and cleaved caspase 3 assays showed significantly higher expression in IR-treated WT and KO mice compared to sham-operated ( $p < 0.0001$ ; two-way ANOVA). Furthermore, TUNEL assays and cleaved caspase 3 determinations revealed more severe tubule epithelial cell apoptosis in KO mice kidneys ( $p < 0.05$ ; Bonferroni post-test- Fig. 3F-G). Although we could not assess kidney dysfunction in our mouse unilateral IR model of AKI



by performing functional renal analysis (e.g. measurement of serum blood urea nitrogen) because of compensatory effect of the right kidney, all histological, RTqPCR and IHC data permit us to confirm the previous work [15] that showed, in mice, that Muc1 expression protects the kidneys from acute ischemic injury, and we observe that this protection may be related to the anti-apoptotic action of Muc1.

### **3.3 Prolonged Muc1 expression leads to kidney fibrosis through sustained dedifferentiation**

Previous work having suggested that EMT and MET processes participate in kidney repair [8], we evaluated mesenchymal and epithelial marker expressions in mice after IR. From d2, both damaged kidneys of animals showed increased levels of transcripts encoding the mesenchymal markers compared with sham (Fig. 2A-E). The transcripts levels of mesenchymal and epithelial markers were significantly higher in IR-treated WT and KO compared to sham mice ( $p < 0.0001$ , two way ANOVA). All tested markers transcripts levels of IR-treated WT mice significantly differ from IR-treated KO mice, except for Vimentin expression. By d2, the *α-smooth muscle actin* (*α-Sma*) transcript level was significantly increased in WT kidney compared to KO ( $p < 0.01$ ; Bonferroni's post-test-Fig.4A). On d14, the *Snail1*, *type I collagen*, and *fibronectin* transcript levels were significantly more abundant in WT than in Muc1-KO mice (Fig. 4F-G). In contrast, levels of transcripts encoding the epithelial markers, Occludin and ZO-1, were much higher, from d7 onward, in Muc1-KO than in WT mice ( $p < 0.0001$ ; Bonferroni's post-test Fig. 4F-G). Immunohistochemical studies revealed in both WT and Muc1-KO mice kidneys an increased proportion of cells expressing mesenchymal markers: interstitial peritubular *α-Sma* (whereas in sham-operated controls, *α-Sma* is only observed in vascular smooth muscle cells); nuclear tubular Snail (sham: present in only 5% of tubule epithelial cells); and cytoplasmic delocated *β-catenin* (sham: *β-catenin* is showed to be restricted to cell membrane in epithelial cells) (data not shown). Thus, both mice displayed transient overexpression of mesenchymal markers, followed by re-expression of epithelial markers, in favor of initial EMT followed by MET process during kidney repair. Muc1 expression in WT mice was associated with lasting mesenchymal markers expressions and less significant re-expression of epithelial markers, suggesting that Muc1 sustained expression was associated with sustained mesenchymal profile.

As it is well established that a severe AKI episode can lead to CKD and as sustained tubular expression of mesenchymal markers is associated with CKD, we investigated in WT and Muc1-KO mice whether IR might lead to kidney fibrosis. Collagen deposition in the kidneys was measured by Sirius red staining (Fig. 5A). On contrary to sham-operated WT and KO Muc1 which did not display any kidney fibrosis, all IR-treated mice developed significantly red-sirius stained interstitial kidney fibrosis on days 14 and 28 post-IR ( $p < 0.0001$ , two-way ANOVA). Fibrosis development tended to be slower in Muc1-KO than in WT mice. On d28, the latter

showed a significantly greater Sirius-red-positive area than the former ( $p < 0.05$ ; Bonferroni post-test), suggesting that in the long term, loss of Muc1 expression may mitigate renal fibrosis (Fig. 5B). This is in agreement with the above observation that on d14, the level of type I collagen mRNAs was significantly higher in WT than in KO mice (Fig. 4D). To determine if the observed kidney fibrosis might be driven by post-ischemic inflammation, we examined the inflammatory cell population in IR-treated WT and Muc1-KO mice kidneys. The level of interstitial inflammation, due mostly to mononuclear cells, was found to increase from d2 to d28 in both IR-treated groups compared to sham. The two mice groups displayed similar percentages of pro-fibrotic F4/80+ macrophages, peaking on d7 and decreasing thereafter (Fig. 5C). On d14 and d28, Muc1-KO mice showed significantly higher percentages of pro-repair CD163+ cells (Fig. 5D), suggesting that at this late stage, the presence of Muc1 might exert a pro-fibrotic effect by hindering repair.

### **3.4 MUC1 induction in proximal tubules during human acute kidney injury is associated with epithelial plasticity.**

We examined MUC1 expression in human kidney allograft biopsies displaying IR-related ATN in the context of delayed graft function (DGF). Although MUC1 is normally a distal tubule marker, it was observed in ATN-affected tubules assumed to be proximal. In normal tissue, immunofluorescence (IF) revealed MUC1 in CDTs and CDs but not in proximal tubules labeled with *Lotus tetragonolobus* lectin (LT). In AKI-affected kidneys, dilated LT-labeled proximal tubules showed segmental MUC1 induction (Fig. 6A), localized in the same tubules with markers involved in kidney repair: (i) the EMT markers:  $\beta$ -catenin cytoplasmic relocation and vimentin induction (Fig. 6B); (ii) the stem-cell marker: CD133 (Fig. 6C); (iii) and the kidney injury marker: KIM-1 (Fig. 6D). These results suggest that MUC1 is involved in the renal tubular epithelial plasticity required for repair.

To study MUC1 and EMT markers in relation to post-IR human kidney plasticity, we used kidney allograft biopsies performed for IR-related DGF during the first week after transplantation (W1) and compared them with same-patient protocol biopsies ( $n=48$ ) performed 3 months after transplantation (M3) (Fig. 7). The W1 biopsies showed diffuse IR-related ATN and tubular dilatation. The M3 biopsies no longer showed ATN and displayed either complete tubular repair ( $n=22$ ) or partial tubular recovery with interstitial fibrosis and tubular atrophy development ( $n=26$ ). In the W1 biopsies, MUC1 expression correlated positively with the extent of ATN ( $r=0.6$ ;  $p < 0.0001$  -Fig. 8A) and with expression of the EMT markers: cytoplasmic relocation of  $\beta$ -catenin ( $r=0.35$ ,  $p=0.043$  -Fig. 8B) and cytoplasmic induction of vimentin ( $r = 0.43$ ;  $p = 0.009$  -Fig. 8C). In M3 biopsies, MUC1 and mesenchymal marker expressions appeared normalized, except within atrophic tubules, where expressions of all markers persisted (Fig. 7). EMT markers correlated positively with the extent of M3 fibrosis ( $\beta$ -catenin:  $r =$

0.52;  $p=0.0016$  and vimentin:  $r=0.51$ ;  $p = 0.001$  -Fig. 8D-E) and inversely with the estimated glomerular filtration rate (eGFR) after 12 months ( $\beta$ -catenin:  $r=-0.43$ ;  $p=0.0084$ ; and vimentin:  $r=-0.42$ ;  $p=0.015$  -Fig. 8F-G). No significant association appeared between M3 MUC1 expression and other histological or clinical criteria, but the W1-minus-M3 difference in MUC1 expression was greater in kidneys with complete repair than in those with a worsened fibrosis score ( $0.9 \pm 1$  vs  $-0.05 \pm 1.3$ ;  $p=0.0176$ ; t test -Fig. 8H), and this difference correlated inversely with the degree of M3 fibrosis ( $r=-0.4$ ;  $p=0.0141$  -Fig. 8I). In conclusion, MUC1 expression was associated with kidney epithelial plasticity. The more diffuse initial MUC1 induction was, the better kidney recovery seemed to be, but sustained MUC1 expression accompanied by sustained EMT activation led to fibrosis.

## 5. Discussion

Muc1, the major mucin expressed in the kidney, was reported to be protective in mouse AKI [16]. Here, for the first time, we report proximal tubule cell MUC1 induction in human kidney biopsies and cultured human cells, demonstrating that transient MUC1 participates in kidney epithelial repair but also that lasting MUC1 induction accompanies failed epithelial redifferentiation through persistent EMT activation.

Our starting hypothesis was that EMT and then MET-related kidney epithelial plasticity are the leading processes of kidney repair and that MUC1 might favor these processes. Previous studies have evidenced partial EMT during kidney repair, with continued expression of epithelial markers and transient induction of mesenchymal and/or stem-cell markers [6, 24]. Our results are consistent with activation of EMT during the stress phase and the activation of the reverse process (MET) during the late phases of repair. The observed localization of MUC1 and EMT markers in the same tubules and the fact that EMT activation was stronger and longer in WT than in Muc1-KO mice support our hypothesis that persistent induction of MUC1 confers a mesenchymal profile. Our observations on human biopsies reveal an association between MUC1 induction in proximal tubules and increased cell plasticity, characterized by transient mesenchymal marker expression and re-expression of the stem-cell marker CD133. In human proximal tubule cells subjected to hypoxia, MUC1 was likewise rapidly and transiently induced, colocalizing with mesenchymal markers.

Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway following MUC1 induction was proposed to explain the initial protective effect of MUC1 during AKI [17]. In the current study, we also observed, in mouse after IR and in human cells after hypoxia, the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation, demonstrated by the  $\beta$ -catenin cytoplasmic delocalization in tubules with ATN in immunohistochemical studies. Also, we previously observed in renal

carcinoma cells that MUC1 is directly induced by hypoxia, and notably by the key transcription factor, Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) [14]. MUC1 activation was also reported to stabilize  $\beta$ -catenin and to induce the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation [18]. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway was recognized to be activated after IR and to lead to nephroprotection, but also to kidney fibrosis in case of severe ischemia [25]. Hypoxia is a strong EMT activator and we have previously observed that MUC1 activates EMT through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [15]. Altogether, these results suggest that Muc1 induction during mouse AKI mitigates acute tubular injury, probably through HIF-1 $\alpha$  and  $\beta$ -catenin stabilization leading to the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation. Here, we additionally demonstrate a relationship between Muc1 expression and reduced apoptosis, as tubular epithelial cells of WT mice displayed a better proliferation rate and less apoptosis than those of Muc1-KO mice. Furthermore, cultured HEK-293 cells expressing MUC1 displayed less anoikis than controls. During AKI, disruption of epithelial cell-matrix interactions leads to induction of anoikis, an apoptotic program, in detached epithelial tubular cells. MUC1 has been shown to have a protective effect toward apoptosis and anoikis in several epithelial cells and also in cancer [19,26]. Interestingly resistance to anoikis is a hallmark of metastatic process during cancer and is thought to be linked to the EMT process [27]. Therefore we assumed that MUC1 overexpression in renal epithelial tubular cells may promote survival by preventing anoikis as its expression is associated with induction of mesenchymal markers.

The main finding of our study is that, after severe ischemic insult, persistent MUC1 expression is damaging. Lasting abnormal MUC1 expression was found in atrophic tubules of mice and patients kidneys. In our mouse model, WT mice displayed significantly more kidney fibrosis than Muc1-KO mice after IR, along with sustained tubular expression of mesenchymal markers. We evidenced in human biopsies a positive correlation between MUC1 expression in atrophic tubules and EMT marker expression, a positive correlation between EMT marker expression and the percentage of interstitial fibrosis, and a negative correlation between EMT marker expression and eGFR at 12 months. In the literature, a correlation between tubular EMT marker expression and decreased human graft function has been described [28]. Our human biopsy data further suggest an association between strong initial MUC1 induction and a better outcome, as the W1-minus-M3 difference appeared to correlate inversely with the development of interstitial fibrosis.

We wondered what might explain the late pro-fibrotic effect of MUC1 post-IR. Sterile inflammation has emerged as a key process in AKI and kidney repair, and sustained post-ischemic inflammation has been found to trigger CKD by promoting a self-sustaining injury state [29]. Furthermore, kidney inflammation and repair have been shown to act through similar damage-associated molecules. MUC1 appears to have both an anti-

inflammatory [30] and a pro-inflammatory action [31], and its deregulation may promote chronic inflammation, fibrosis, and even cancer [32]. It could be that after severe ischemic injury, sustained Muc1 expression in damaged proximal tubules promotes a pro-fibrotic inflammatory state. In our mouse model, Muc1 KO appeared to favor the presence of M2 macrophages (CD163+ cells), believed to promote kidney repair [33]. Although these results do not clearly establish that sustained post-IR tubular Muc1 overexpression promotes fibrogenesis by favoring inflammation, they seem to point in that direction. They support the view that MUC1 exerts, through EMT activation, a dual action after ischemic injury: first protective (and anti-apoptotic), and then harmful (and thus pro-fibrotic). The future directive will be to challenge if MUC1 modulates the immune system during kidney injury through initial pro-inflammatory and then anti-inflammatory actions.

### **Acknowledgments**

Muc1-KO mice and the MUC1 expression vector were gifts from SJ Gendler (Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA). The M8 anti-MUC1 antibody was a gift from D. Swallow (University College London, UK). The authors are grateful to Edmone Dewaeles (EA4483, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Lille), Marc Samyn (Institute of Pathology, CHRU Lille) and Rose-Marie Siminski & Marie-Hélène Gevaert (Department of Histology, Faculté de Médecine, Lille) for their technical help. The authors thank the staff of the High-Technology Animal Facility, Faculté de Médecine Pôle Recherche, Lille. They also thank Dr Nathalie Jouy of the Flow Core Facility of BICeL (campus Hospitalo-universitaire IRCL place de Verdun 59045 Lille).

**Source of fundings:** This work is supported in part by the following grants: Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-JCJC-0002; MP) and the Conseil Régional du Nord Pas de Calais (MP, CC, NP), and the French Pathology Society “Fonds de Recherche de la Société Française de Pathologie” (VG). KG is a recipient of a doctoral fellowship from “Région Nord-Pas-de-Calais” and CHRU de Lille.

**No potential conflicts of interest were disclosed.**

## References:

1. Sancho-Martínez SM, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury. *Clin Kidney J.* 2015;8(5):548-59.
2. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391-401.
3. Morigi M, Benigni A. Mesenchymal stem cells and kidney repair. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(4):788-93.
4. Berger K, Bangen JM, Hammerich L, Liedtke C, Floege J, Smeets B, Moeller MJ. Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(4): 1533-8
5. Duffield JS, Humphreys BD. Origin of new cells in the adult kidney: results from genetic labeling techniques. *Kidney Int.* 2011;79(5):494-501.
6. Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest.* 1994;93(5):2175-88.
7. Terzi F, Maunoury R, Colucci-Guyon E, Babinet C, Federici P, Briand P, Friedlander G.. Normal tubular regeneration and differentiation of the post-ischemic kidney in mice lacking vimentin. *Am J Pathol.* 1997;150(4):1361-71.
8. McCampbell KK, Wingert RA. Renal stem cells: fact or science fiction? *Biochem J.* 2012;444(2):153-68.
9. Kalluri, R., Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;119:1420-1428.
10. Heung M, Steffick DE, Zivin K, Gillespie BW, Banerjee T, Hsu CY, Powe NR, Pavkov ME, Williams DE, Saran R, Shahinian VB; Centers for Disease Control and Prevention CKD Surveillance Team. Acute Kidney Injury Recovery Pattern and Subsequent Risk of CKD: An Analysis of Veterans Health Administration Data. *Am J Kidney Dis.* 2016;67(5):742-52.
11. Chawla LS. Acute kidney injury leading to chronic kidney disease and long-term outcomes of acute kidney injury: the best opportunity to mitigate acute kidney injury? *Contrib Nephrol.* 2011;174:182-90.
12. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK.. Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1765-76.

13. Leroy X, Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2002;40(5):450-7.
14. Aubert S, Fauquette V, Hémon B, Lepoivre R, Briez N, Bernard D, Van Seuningen I, Leroy X, Perrais M. MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Res*. 2009;69(14):5707-15.
15. Gnemmi V, Bouillez A, Gaudelot K, Hémon B, Ringot B, Pottier N, Glowacki F, Butruille C, Cauffiez C, Hamdane M, Sergeant N, Van Seuningen I, Leroy X, Aubert S, Perrais M. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett*. 2014;346(2):225-36.
16. Pastor-Soler NM, Sutton TA, Mang HE, Kinlough CL, Gendler SJ, Madsen CS, Bastacky SI, Ho J, Al-Bataineh MM, Hallows KR, Singh S, Monga SP, Kobayashi H, Haase VH, Hughey RP. Muc1 is protective during kidney ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(12):F1452-62.
17. Al-Bataineh MM, Kinlough CL, Poland PA, Pastor-Soler NM, Sutton TA, Mang HE, Bastacky SI, Gendler SJ, Madsen CS, Singh S, Monga SP, Hughey RP. Muc1 enhances the  $\beta$ -catenin protective pathway during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(6):F569-79.
18. Hattrop CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:431-57.
19. Bouillez A, Gnemmi V, Gaudelot K, Hémon B, Ringot B, Pottier N, Glowacki F, Butruille C, Cauffiez C, Hamdane M, Sergeant N, Van Seuningen I, Leroy X, Aubert S, Perrais M. MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget*. 2014;5(3):754-63.
20. Raina D, Kosugi M, Ahmad R, Panchamoorthy G, Rajabi H, Alam M, Shimamura T, Shapiro GI, Supko J, Kharbanda S, Kufe D. Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(5):806-16.
21. Pochampalli MR, el Bejjani RM, Schroeder JA. MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene*. 2007;26(12):1693-701.
22. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, Castro MC, David DS, David-Neto E, Bagnasco SM, Cendales LC, Cornell LD, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Farris AB 3rd, Gibson IW, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nicleleit V, Randhawa P, Rodriguez ER, Rush D, Smith RN, Tan CD, Wallace WD,



- Mengel M. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014;14(2):272-83.
23. Chaturvedi S, Yuen DA, Bajwa A, Huang YW, Sokollik C, Huang L, Lam GY, Tole S, Liu GY, Pan J, Chan L, Sokolsky Y, Puthia M, Godaly G, John R, Wang C, Lee WL, Brumell JH, Okusa MD, Robinson LA.. Slit2 prevents neutrophil recruitment and renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(8):1274-87.
24. Imgrund M, Gröne E, Gröne HJ, Kretzler M, Holzman L, Schlöndorff D, Rothenpieler UW. Re-expression of the developmental gene Pax-2 during experimental acute tubular necrosis in mice 1. *Kidney Int.* 1999;56(4):1423-31.
25. Zhou D, Tan RJ, Fu H, Liu Y. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in kidney injury and repair: a double-edged sword. *Lab Invest.* 2016;96(2):156-67.
26. Zhao Q, Piyush T, Chen C, Hollingsworth MA, Hilkens J, Rhodes JM, Yu LG. MUC1 extracellular domain confers resistance of epithelial cancer cells to anoikis. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1438.
27. Frisch SM, Schaller M, Cieply B. Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 1):21-9.
28. Xu-Dubois YC, Baugey E, Peltier J, Colombat M, Ouali N, Jouanneau C, Rondeau E, Hertig A. Epithelial phenotypic changes are associated with a tubular active fibrogenic process in human renal grafts. *Hum Pathol.* 2013;44(7):1251-61.
29. Zager RA, Johnson AC, Becker K. Acute unilateral ischemic renal injury induces progressive renal inflammation, lipid accumulation, histone modification, and "end-stage" kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301(6):F1334-45.
30. Kato K, Uchino R, Lillehoj EP, Knox K, Lin Y, Kim KC. Membrane-Tethered MUC1 Mucin Counter-Regulates the Phagocytic Activity of Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(4):515-23.
31. Takahashi H, Jin C, Rajabi H, Pitroda S, Alam M, Ahmad R, Raina D, Hasegawa M, Suzuki Y, Tagde A, Bronson RT, Weichselbaum R, Kufe D. MUC1-C activates the TAK1 inflammatory pathway in colon cancer. *Oncogene.* 2015;34(40):5187-97.
32. Tarang S, Kumar S, Batra SK. Mucins and toll-like receptors: kith and kin in infection and cancer. *Cancer Lett.* 2012;321(2):110-9.
33. Lech M, Gröbmayr R, Ryu M, Lorenz G, Hartter I, Mulay SR, Susanti HE, Kobayashi KS, Flavell RA, Anders HJ.. Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(2):292-304.

### Figure legends:

**Fig. 1: MUC1 is induced by hypoxia in renal primary proximal tubule cells and confers resistance to anoikis.** (A) Mean percentages of RPTECs expressing a proximal tubule marker (CD10 or CD13), MUC1, or CD10 and MUC1. Cells were cultured under 1% O<sub>2</sub> for 6 days and then returned to normoxia (21% O<sub>2</sub>) for 7 days. Flow cytometry revealed increased MUC1 under hypoxia and its co-expression with proximal tubule markers. Cell percentages were expressed with respect to total cells. (B) Levels of *MUC1*, *VIMENTIN*, *E-CADHERIN*, *SNAIL1* and *SNAIL2* transcripts were determined by RT-qPCR. Transcript levels were normalized with respect to *PPIA* transcripts and the values obtained under normoxia were set at 1. (C) Representative images obtained with antibodies against MUC1, vimentin, E-cadherin, or Snail show transient MUC1 and mesenchymal marker overexpression under hypoxia and decreased E-cadherin. Expression of all markers appears normalized after re-oxygenation. (D) Anoikis assay performed on HEK-293 cells harboring a *MUC1*-carrying or an empty expression vector. Cells were seeded on poly-HEMA-coated plates. After 24 hours, apoptotic cell death was assayed with an Annexin /PI staining kit. (E-F) Anoikis assay performed on HEK-293 cells transfected with the *MUC1*-carrying (E) or the empty expression vector (F). Cells were treated with 5 μM GO-203 (GenScript), which blocks MUC1 peptide dimerization, or with the control peptide CP2 (GenScript). After 24 hours, apoptotic cell death was assayed with an Annexin/PI staining kit. The significance of hypoxia-related changes is as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns= non significant, by two way ANOVA.

**Fig. 2: Early induction of Muc1 occurs in a mouse ischemia-reperfusion model.** Mice were subjected to 25 min of ischemia of the left kidney. Kidneys were harvested 2, 4, 7, and 14 days after reperfusion. (A) *Muc1* mRNA levels were determined by RT-qPCR. Results were normalized with respect to *Ppia* transcripts and the level recorded in WT sham-operated animals at d2 was set at 100 (n = 5). The significance of differences between IR-treated and sham non-operated animals was as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , by two way ANOVA followed by Bonferroni post test. (B) Representative western blots analysis with anti-MUC1 (CT2 clone) and anti-GAPDH antibodies from lysates obtained from whole-kidney of WT and *Muc1* KO mice non-operated (sham) and subject to IR (n=2). (C) Graphic presentation of western blotting integrations with anti-MUC1 antibody from IR-treated and non-operated (sham) WT mice. For each mouse, the MUC1 density was normalized with respect to GAPDH (n = 4-7). The significance of differences between IR-treated and sham non-operated WT was as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , by two way ANOVA followed by Bonferroni post test. (D) Immunohistochemistry study performed with anti-MUC1 antibody (CT2). Representative sections

showing increased cytoplasmic tubular Muc1 expression in IR-treated kidneys of WT mice. IR, ischemia-reperfusion; Sham, sham operated; WT, wild type

**Fig. 3: Muc1 mitigates the severity of mouse acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion.** Mice were subjected to 25 min of ischemia of the left kidney. Kidneys were harvested 2, 4, 7, and 14 days after reperfusion. (A) Representative histological kidney sections from sham and IR-treated animals, either WT or Muc1-KO. The sections were stained with PAS and illustrate early ATN lesions followed by partial epithelial regeneration. Acute severe damaged tubules with loss of tubular dilation and cast formation (\*) were significantly more observed in KO animals than in WT mice at d2. Features of regenerative tubules with basophilia (▶) and mitotic figures (→) were also more frequently observed in KO kidneys from d4 than in WT kidneys. (B-C) ATN and regeneration scores in WT and Muc1-KO mice subjected to IR. The values obtained with sham-operated animals were used as control. (n = 5) (D) *Kim-1* mRNA levels were determined by RT-qPCR. The results were normalized with respect to control *Ppia* transcripts and the values obtained with sham-operated animals were set at 100. (n = 5) (E-G) Proliferation index measured by Ki67 immunostaining (E), TUNEL (F) and cleaved caspase 3-positive epithelial cells immunostaining in kidneys from IR-treated WT and Muc1-KO mice (n=5). Immunostained cells were counted in 10 randomly high-magnification (x400) fields per kidneys. The significance of differences between these groups is as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; ns= non significant, by two way ANOVA followed by Bonferroni post test. IR, ischemia-reperfusion; Sham, sham operated; WT, wild type.

**Fig. 4: Muc1 induction is associated with epithelial plasticity in a mouse kidney ischemia-reperfusion model.** Mice were subjected to 25 min of ischemia of the left kidney. Kidneys were harvested 2, 4, 7, and 14 days after reperfusion. (A-E) Levels of mRNAs encoding mesenchymal markers (*Snail1*, vimentin, type I collagen, fibronectin,  $\alpha$ -Sma) and (F-G) epithelial markers (*occludin*, *ZO-1*) were determined by RT-qPCR. Results were normalized with respect to control *Ppia* transcripts and the values obtained for sham-operated animals were set at 100. (n= 5). The significance of differences between WT and Muc1-KO mice is as follows: \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns= non significant, by two way ANOVA followed by Bonferroni post test. IR, ischemia-reperfusion; Sham, sham operated; WT, wild type.

**Fig. 5: Muc1 knockout leads to reduced kidney fibrosis and to increased renal infiltration by pro-repair macrophages after ischemia-reperfusion (IR).** Mice were subjected to 25 min of ischemia of the left kidney. Kidneys were harvested 14 and 28 days after reperfusion. (A) Representative histological kidney sections from sham-operated and IR-treated WT and Muc1-KO mice. The sections were stained with Sirius red and illustrate

early lesions of interstitial fibrosis. **(B)** Interstitial fibrosis was evaluated by histomorphometric analysis (n= 5). **(C-D)** Graphic presentations of immunohistochemistry results showing interstitial infiltrated F4/80-positive macrophages (C) and CD163-positive macrophages (D) in kidneys from WT and Muc1-KO mice. Inflammatory interstitial-positive cells were counted in 4 randomly high-magnification (x400) fields per kidneys (n=4). The significance of differences between WT and KO mice was as follows: \*  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; ns= non significant, by two way ANOVA followed by Bonferroni post test. IR, ischemia-reperfusion; Sham, sham operated; WT, wild-type.

**Fig. 6: MUC1 is induced and co-localizes with mesenchymal and stem cell markers in human proximal tubules affected by acute tubular necrosis during delay graft function.** **(A)** (*left*) In human control kidney, IF revealed MUC1 in convoluted distal tubules and collecting ducts but not in proximal tubules labeled with *Lotus tetragonolobus* lectin (LT). (*right*) During human acute kidney injury (AKI), MUC1 induction was observed in LT-labeled proximal tubules. **(B)** MUC1 was expressed in the same in ATN-affected proximal tubules that displayed cytoplasmic vimentin and cytoplasmic  $\beta$ -catenin induction. Combined immunofluorescence and immunohistochemistry stainings were successively performed to determine the triple-expression of MUC1; EMT markers (vimentin or  $\beta$ -catenin); and *Lotus Tetragonolobus* lectin on deparaffinized slides from renal human tissue in control and AKI conditions. The first picture (a) demonstrates co-immunohistochemistry result under light microscope with MUC1 (DAB Detection Kit-Roche, Ventana) and one EMT marker (Alkaline Phosphatase Red Detection Kit -Roche, Ventana). The 3 following pictures correspond to the immunofluorescence microscopy study with (b) one EMT marker (staining with alkaline phosphatase still appeared red under immuno-fluorescence microscopy); (c) the *Lotus Tetragonolobus* lectin (FITC green fluorescence) and (d) the merge. **(C-D)** MUC1 co-localized with CD133 (C) and KIM-1 (D) in dilated ATN-affected tubules.

**Fig. 7: In the context of acute tubular necrosis (ATN)-related delay graft function (DFG) after human kidney transplantation, transient MUC1 expression in human tubular epithelial cells reflects epithelial plasticity.** Specimens of kidney allografts (n=48) obtained because of ATN-related DGF within the first week (W1) were compared with 3-month (M3) protocol biopsies. Masson' trichrome stain revealed acute tubular necrosis, characterized by dilated tubules (\*) at W1. M3 protocol biopsies showed either complete tubular repair; or scar development with green stained kidney fibrosis area (#). Immunohistochemical studies showed, in W1 specimens, membranous and cytoplasmic MUC1 induction in dilated tubules to be associated with increased nuclear Snail expression (arrows), vimentin cytoplasmic tubular induction, and  $\beta$ -catenin cytoplasmic delocation. In specimens with complete recovery at M3, a normal expression profile was observed with MUC1

expression restricted to convoluted distal tubules, Snail nuclear expression (arrow) in rare tubular cells, vimentin expression limited to foci of interstitium and  $\beta$ -catenin expression confined to membrane tubular cells. In areas of scar kidney fibrosis, atrophic tubules displayed abnormal pattern expression and continued to show diffuse MUC1 tubular expression co-localized with Snail nuclear increased tubular expression (arrows), vimentin abnormal cytoplasmic tubular expression, and  $\beta$ -catenin cytoplasmic delocalization.

**Fig. 8: First week after transplantation (W1) and 3 months after transplantation (M3) MUC1 and EMT markers immunohistochemical expressions correlated with W1 acute tubular necrosis and M3 interstitial fibrosis scores.** (A) Correlation graph between W1 MUC1 tubular cells expression scores and W1 acute tubular necrosis scores. (n=41). (B) Correlation graph between W1 MUC1 tubular cells expression scores and W1  $\beta$ -catenin (B) and vimentin (C) tubular cells expression scores. (n=34). (D-E) Correlation graph between M3  $\beta$ -catenin (D) and vimentin (E) tubular cells expression scores and M3 interstitial fibrosis scores. Interstitial fibrosis was scored according to Banff 07 classification (n=39). (F-G) Correlation graph between M3  $\beta$ -catenin (F) and vimentin (G) tubular cells expression scores and 12 months post-transplantation (M12) estimated glomerular filtration rate (eGFR). eGFR was estimated according to Modification of Diet in Renal Disease Study (MDRD) formulas. (n=36). (H) Repartition of W1-minus-M3 MUC1 expression difference between kidneys with M3 complete kidney repair (n=21) and kidneys with a M3 worsened kidney fibrosis scores compared to W1 (n=17). Statistical comparison was performed using t-test. (I) Correlation graph between M3 interstitial fibrosis scores and W1-M3 MUC1 expression difference scores. Interstitial fibrosis was scored according to Banff 07 classification (n=37). All correlations were analyzed with the Spearman test.

**Fig. S1: MUC1 overexpression induces mesenchymal features.** (A) Phase contrast photomicrographies showed an epithelial cohesive pattern in RPTECs cells under normoxia. On the contrary, after 6 days of hypoxia, RPTECs cells displayed a fibroblastic pattern with elongated cells. The cell shape was restored 7 days after that the RPTECs cells were returned to normoxic conditions (magnification x200). (B) Western blot analysis of MUC1 expression in HEK-293 cells stably transfected with MUC1 expressing vector (MUC1) or an empty vector (EV). Western blots were done on cell lysates.  $\beta$ -actin served as the loaded control. MUC1 transfection was associated with MUC1 in HEK-293 cells.

Figure 1

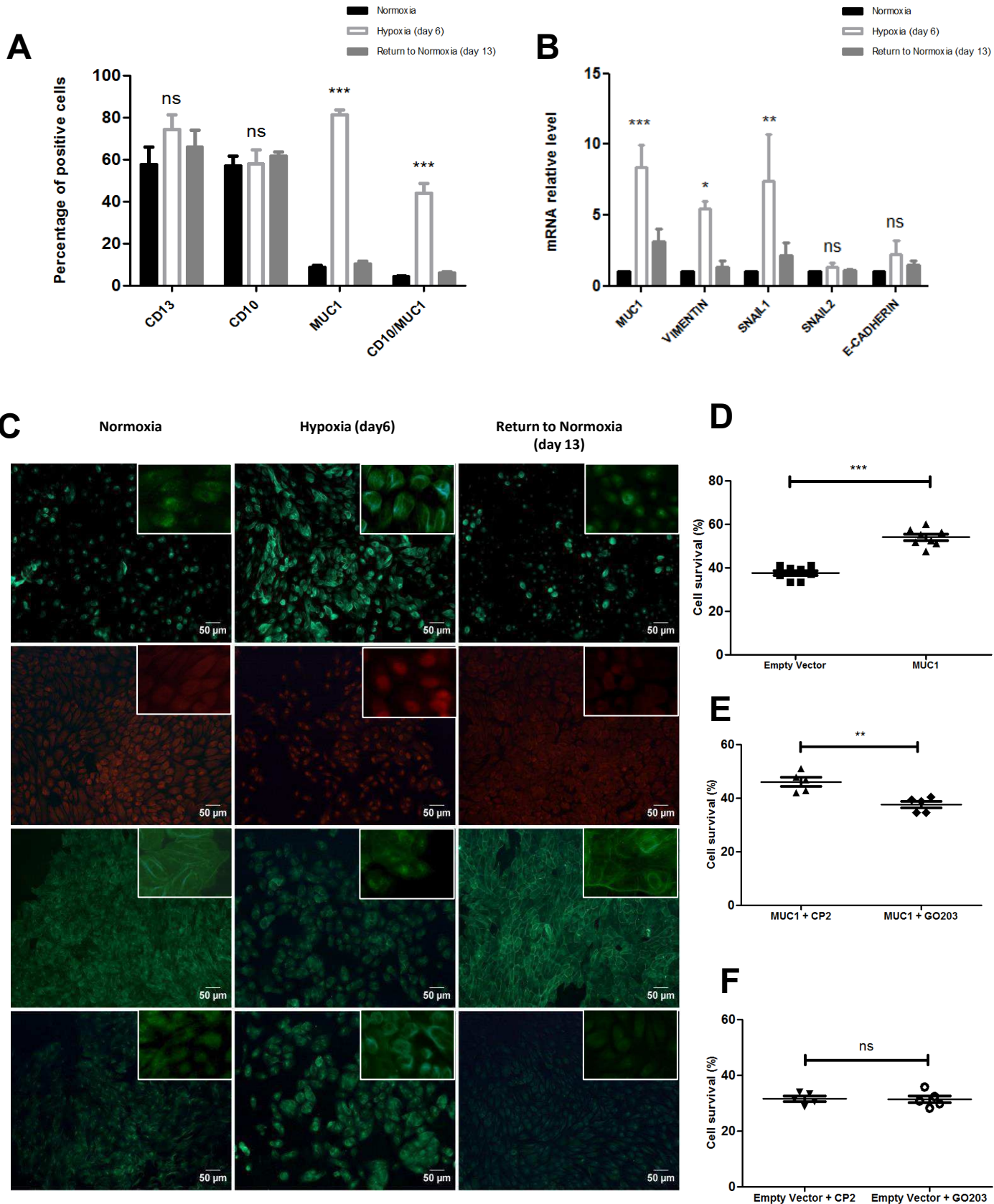


Figure 2

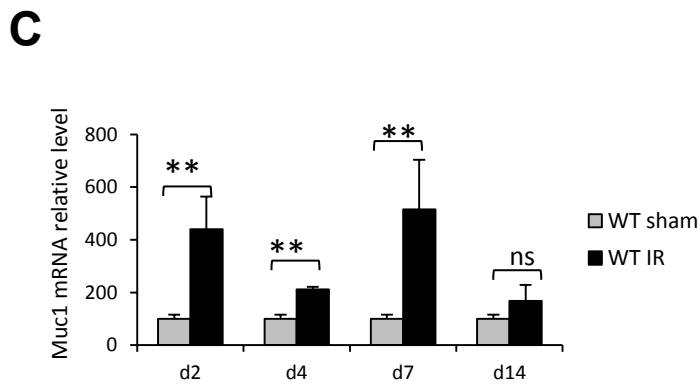
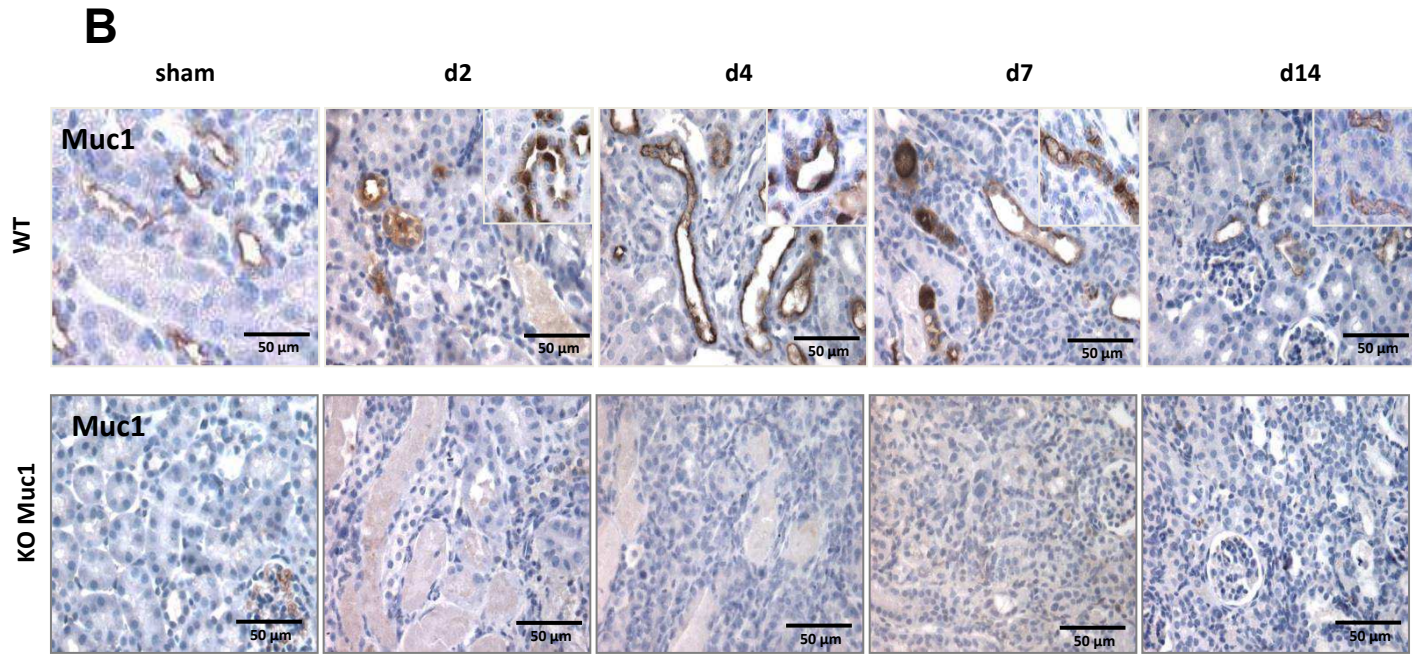
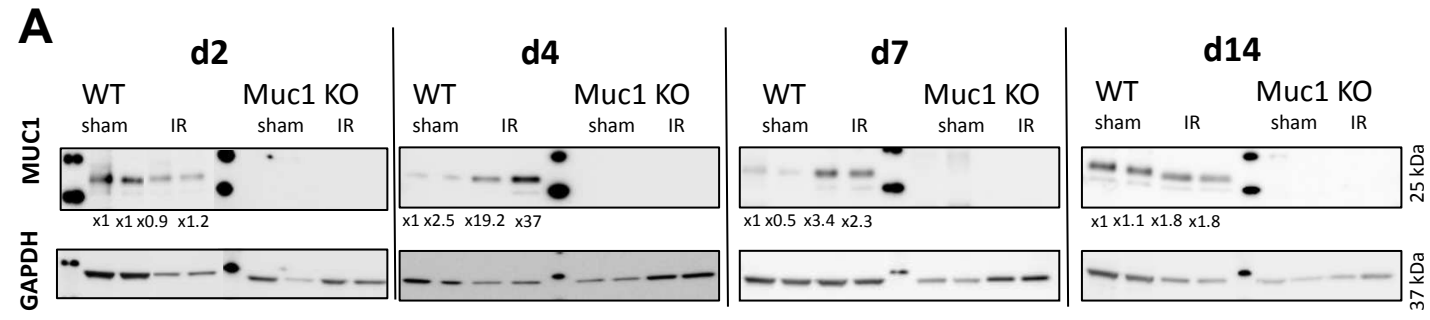


Figure 3

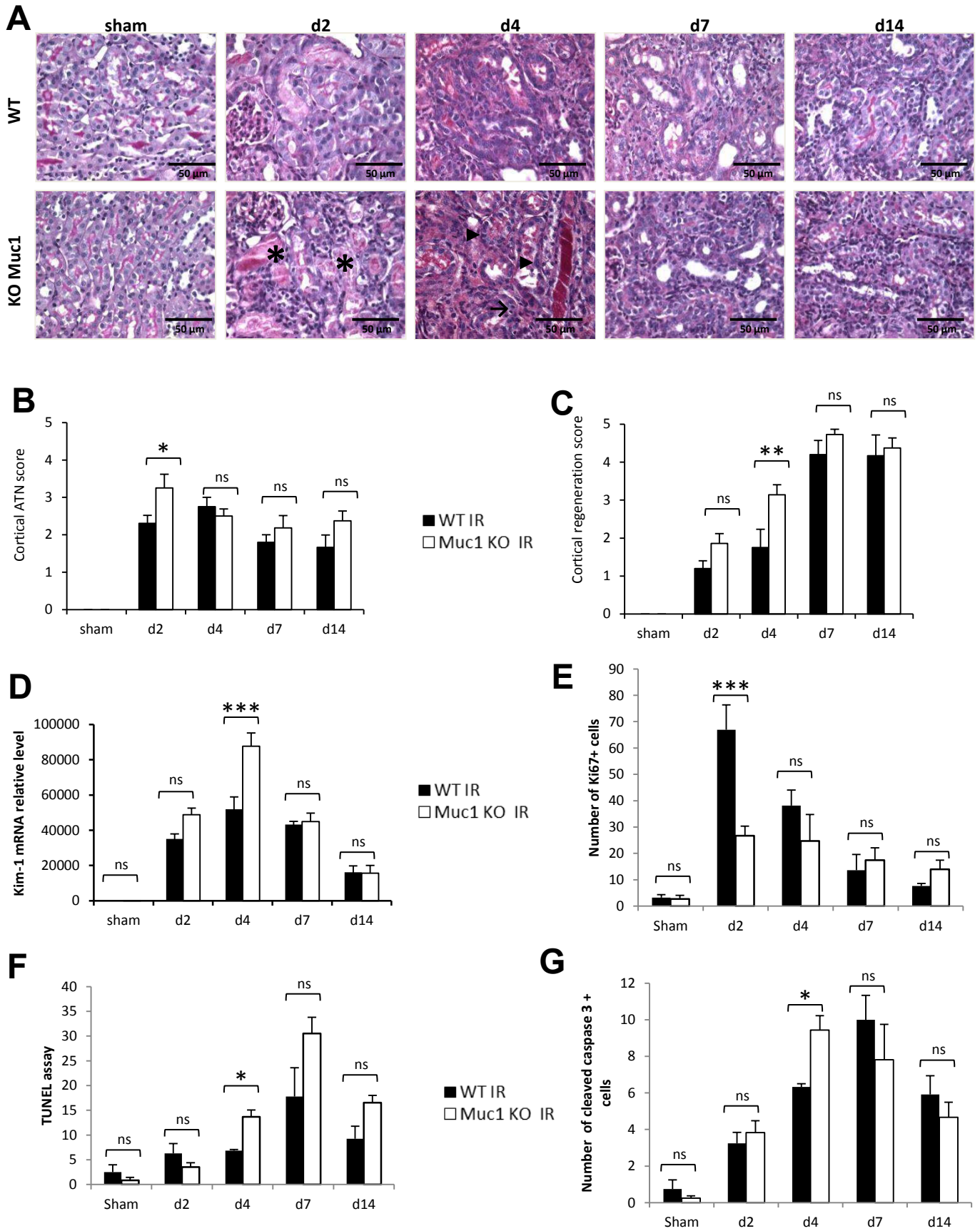
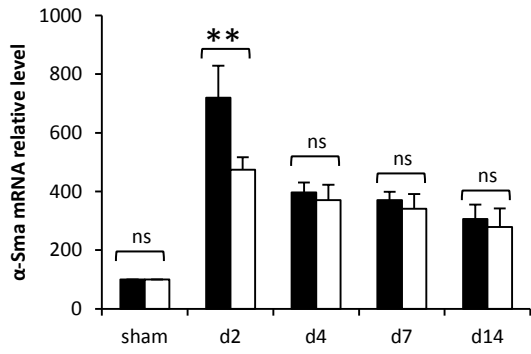


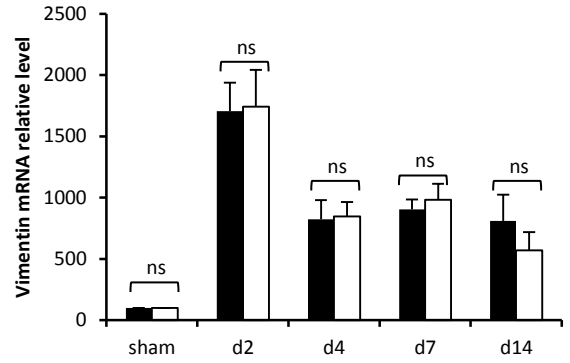


Figure 4

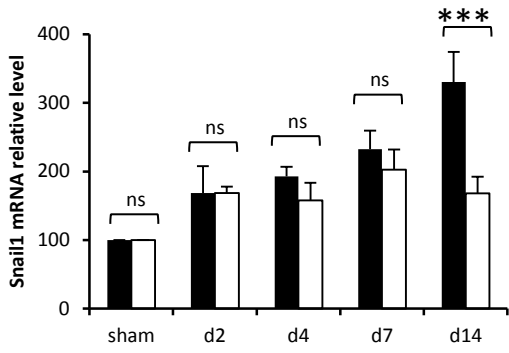
**A**



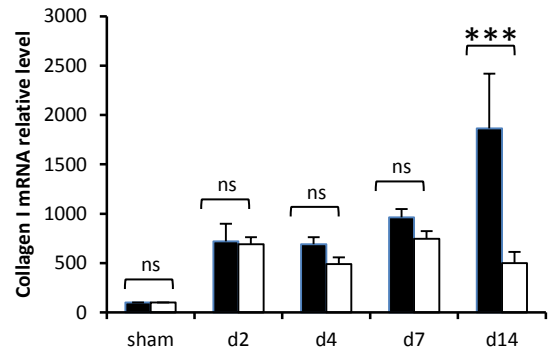
**B**



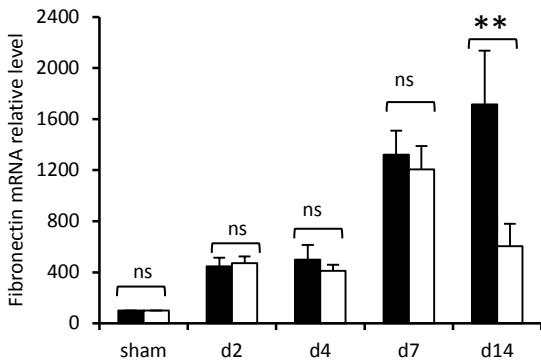
**C**



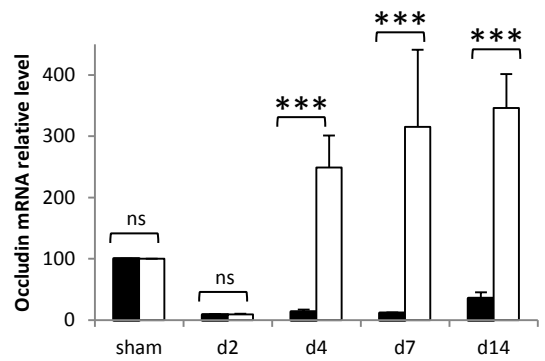
**D**



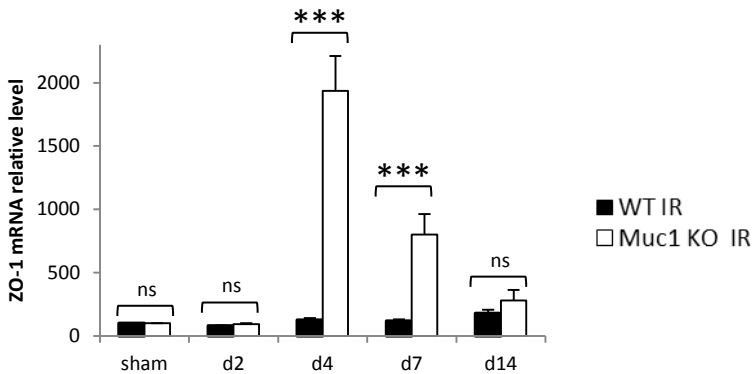
**E**

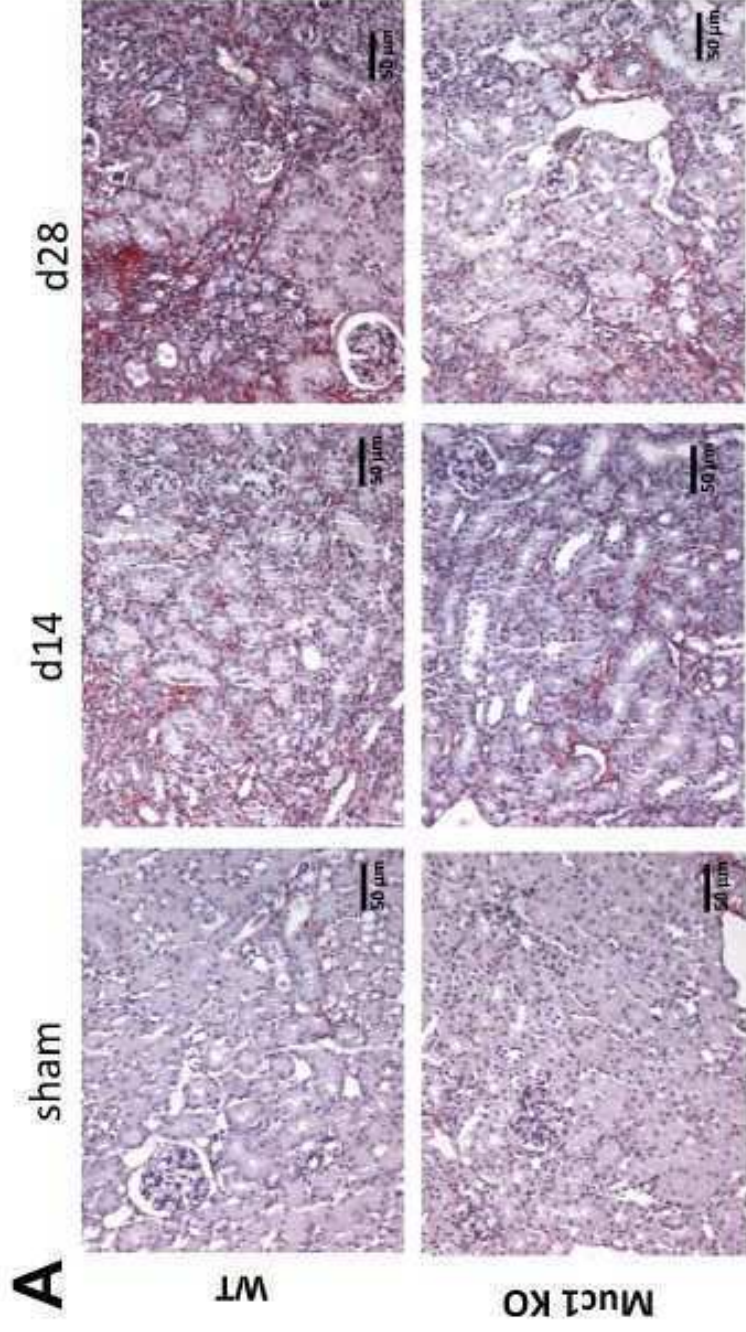


**F**

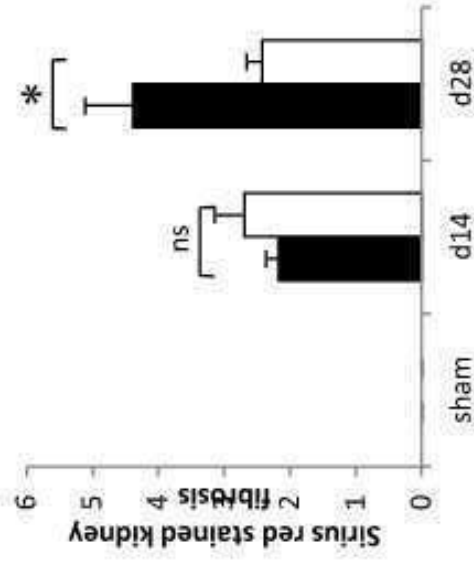


**G**

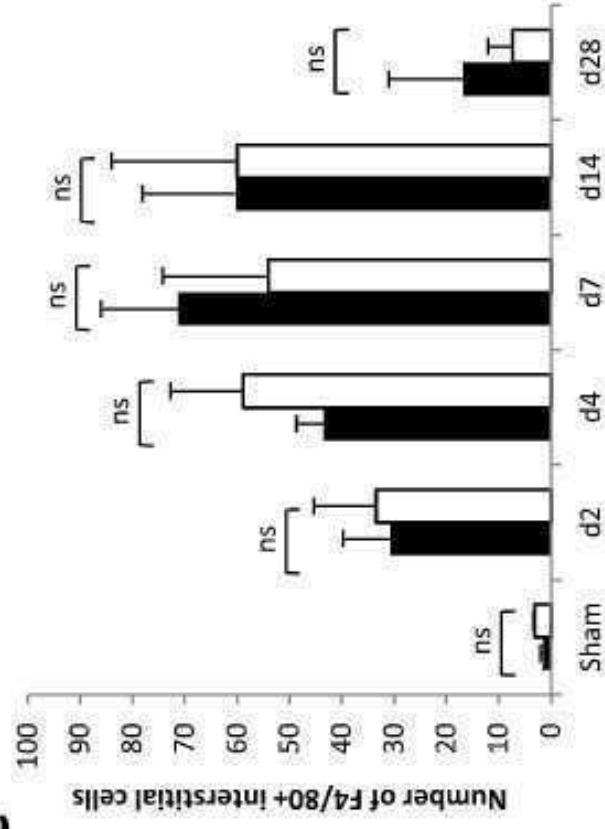




**B**



**C**



**D**

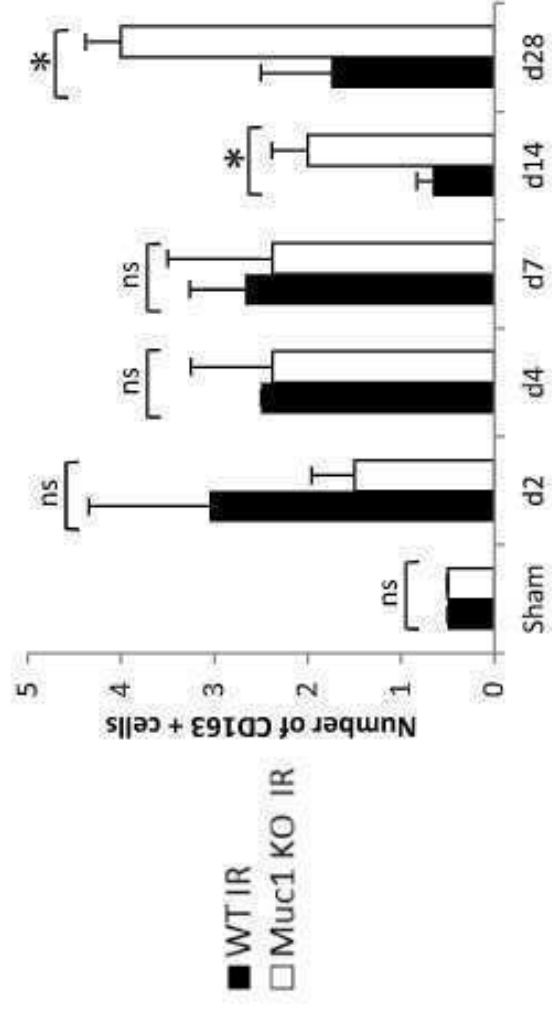
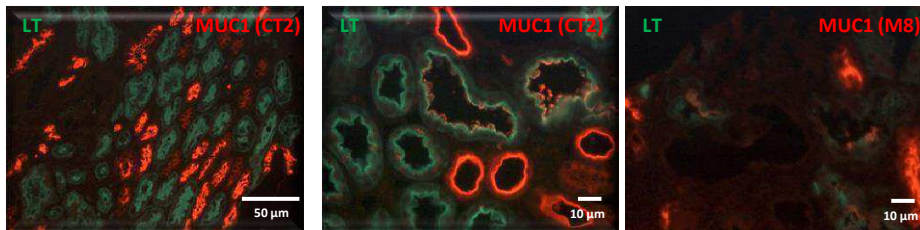


Figure 6

Human control

Human AKI

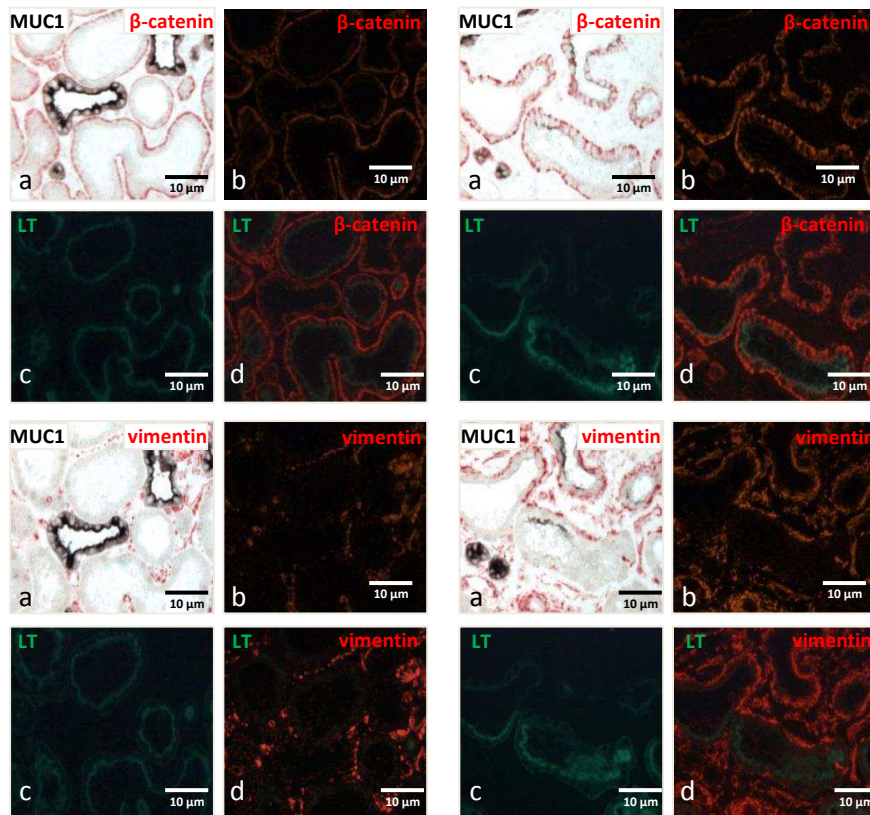
A



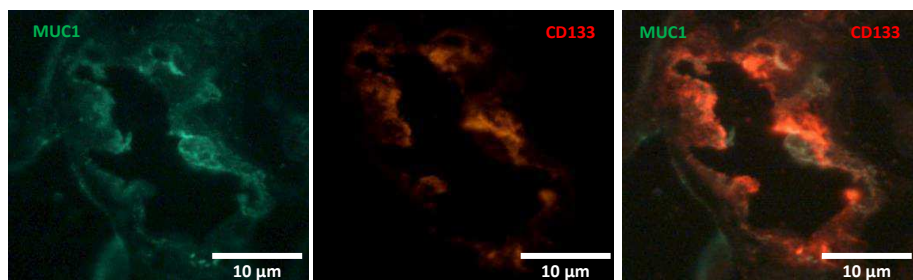
B

Human control

Human AKI



C



D

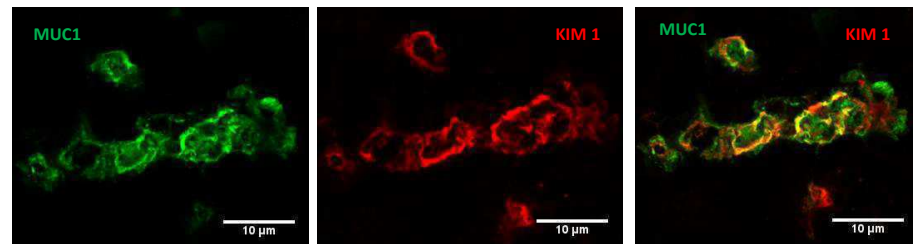


Figure 7

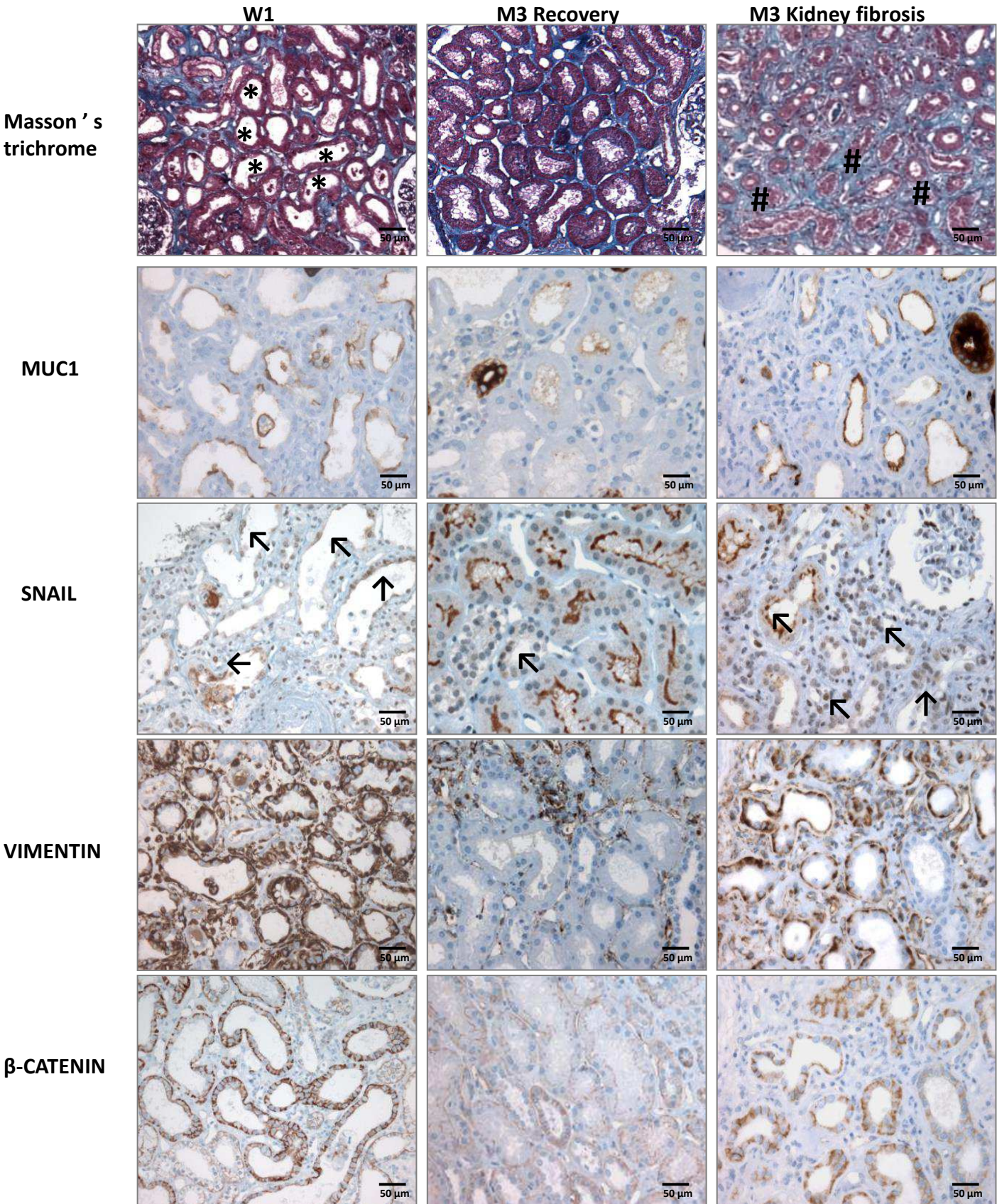
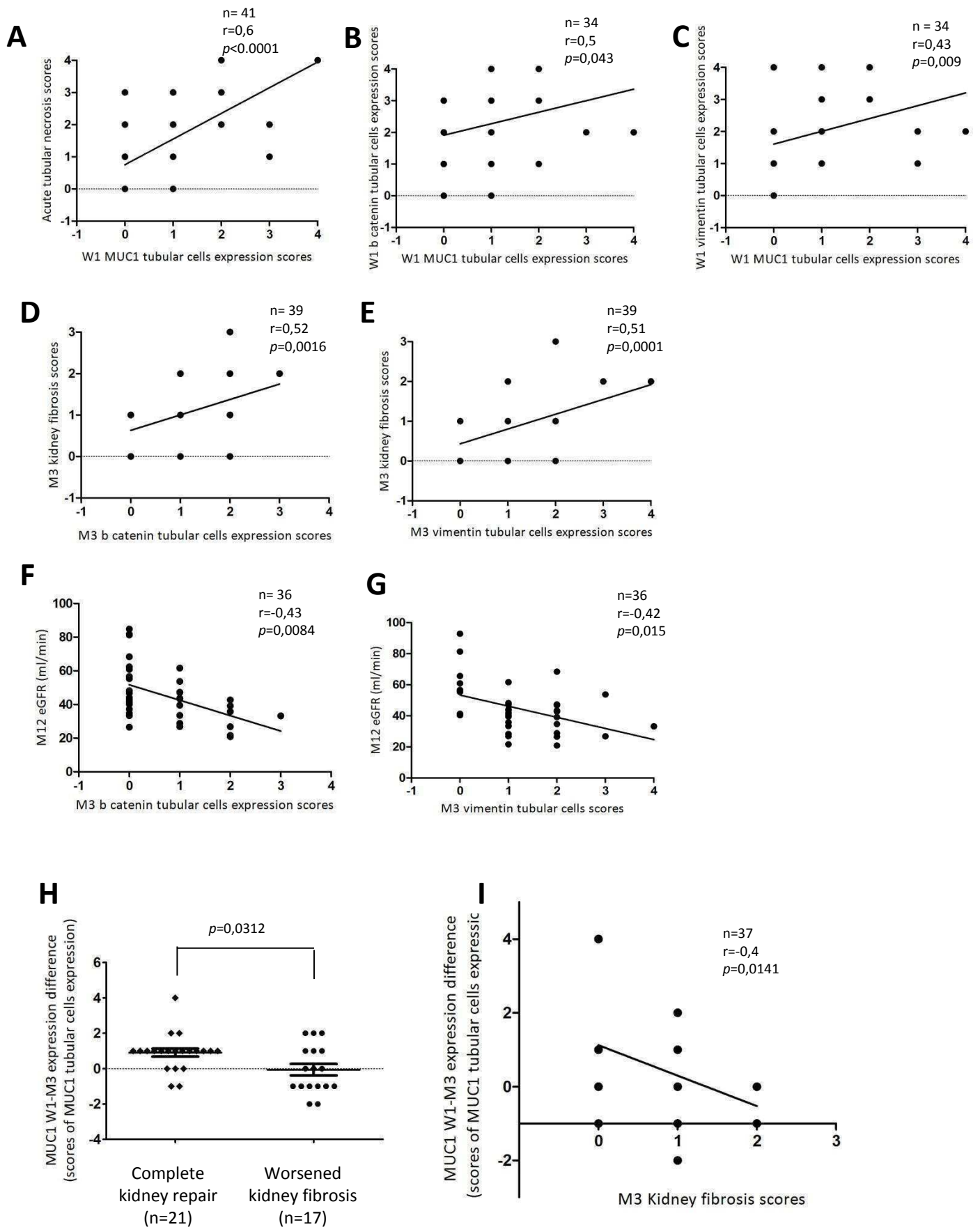


Figure 8



**Complete Manuscript Title:**

MUC1 mitigates renal injury and inflammation in endotoxin induced acute kidney injury by inhibiting the TLR4-MD2 axis and reducing pro-inflammatory macrophages infiltration.

**Authors:**

Jean-Baptiste Gibier<sup>\*1,2</sup>, Thomas Swierczewski<sup>\*1</sup>, Marie Csanyi<sup>1,2</sup>, Brigitte Hemon<sup>1</sup>, Francois Glowacki<sup>1,3</sup>, Patrice Maboudou<sup>4</sup>, Isabelle Van Seuningen<sup>1</sup>, Christelle Cauffiez<sup>1</sup>, Nicolas Pottier<sup>1</sup>, Sebastien Aubert<sup>1,2</sup>, Michael Perrais<sup>1</sup>, Viviane Gnemmi<sup>1,2</sup>.  
(\*equal contribution)

1 : Univ. Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

2 : CHU Lille, Institute of Pathology, F-59000 Lille, France

3 : CHU Lille, Nephrology Department, F-59000 Lille, France

4 : CHU Lille, Biochemistry Emergency Department, F-59000 Lille, France

**Running Head:**

Role of MUC1 during LPS-induced AKI.

**Conflicts of Interest and Source of Funding:**

The authors have no financial conflicts of interest to disclose

## **Abstract**

Sepsis is the leading cause of acute kidney injury (AKI) in critical care patients. A cornerstone of sepsis-associated AKI is dysregulated inflammation driven by excessive activation of TLR4 pathway. MUC1, a membrane bound mucin expressed in both epithelial tubular cells and renal macrophages, has been shown to be involved in the regulation of TLRs. Therefore we hypothesized that MUC1 could mitigate the renal inflammatory response to TLR4 activation. To test this hypothesis, we used a murine model of endotoxin-induced AKI by i.p. injection of lipopolysaccharide (LPS). We showed that Muc1<sup>-/-</sup> mice have a more severe renal dysfunction, an increased activation of the tissular NF-κB pathway and secreted more pro inflammatory cytokines compare to Muc1<sup>+/+</sup> mice. By flow cytometry, we observed that the proportion of M1 (pro-inflammatory) macrophages in the kidneys of Muc1<sup>-/-</sup> mice was significantly increased. In human and murine primary macrophages, we showed that MUC1 is only induced in M1 type macrophages and that macrophages derived from Muc1<sup>-/-</sup> mice secreted more pro-inflammatory cytokines. Eventually, in HEK293 cells, we showed that (i)-MUC1 cytosolic domain (CT) seems necessary for the negative regulation of TLR4 (ii) by proximity ligation assay, MUC1-CT is in close relationship with TLR4 and acts as a competitive inhibitor of the recruitment of MYD88. Overall our results support that in the context of endotoxin-induced AKI, MUC1 plays a significant role in controlling disease severity by regulating negatively the TLR4-MD2 axis.

## **Keywords:**

LPS - MUC1 - Acute Kidney Injury - Inflammation - TLR4 - MYD88

## Introduction

Sepsis induced acute kidney injury (AKI) is a common issue in critically ill patients in particular in intensive care units where its incidence is rising. It is associated with a high mortality and the risk of developing chronic comorbidities (1). It also represents a significant economic burden for the hospital. Despite those consequences on public health care, the pathogenesis of sepsis induced AKI is still incompletely understood and descriptions of its underlying mechanisms are required for the development of new therapeutics (2).

One key step in the pathogenesis of sepsis induced AKI is the regulation of the immune inflammatory response. Toll-like receptors (TLRs) play a pivotal role in this regard (3). TLRs are type I transmembrane proteins characterized by an intracellular Toll/IL1 receptor homology domain that are expressed by immune and non immune cells. They harbor receptors called pattern recognition receptors that are needed to trigger the activation of the innate immune system and the protective self-defense mechanisms in response to an invading pathogen (4). However, in case of excessive TLR activation, it leads to sustained and inappropriate pro-inflammatory response causing bystander tissue damage. Thus, precise control of TLR signaling in response to an injury is critical (5). In the kidney, TLR4 has been described as the main TLR involved during both sepsis and endotoxin-induced AKI (6-8). Even though many experimental studies have shown beneficial effects of blocking this receptor with exogenous molecules in LPS models of AKI (9, 10), data are still missing about the endogenous mechanisms that regulate its activation.

The membrane-bound mucin MUC1 is a large O-glycoprotein localized to the apical membrane of convoluted distal tubules and collecting ducts in the adult kidney (11). Unlike most of the others membrane-bound mucins, MUC1 has a cytosolic tail capable of signal transduction and is also expressed at the surface of a subset of immune cells (macrophages, dendritic cells and lymphocytes) (12). Several studies have suggested that MUC1 could be a negative regulator of inflammation in response to infectious stimuli (13-15). In particular, through its cytosolic region, MUC1 has been reported to inhibit TLR activation in immune and non immune cell types (16-22). However there is currently no data supporting a similar function of MUC1 in kidney.

In this study, using a model of endotoxin induced AKI, we present evidences that MUC1 has a previously unknown renoprotective function in this model. We showed that MUC1 is expressed in pro-inflammatory macrophages in mice and human and that its expression mitigates the inflammation after LPS stimulation. Moreover our results support that MUC1



anti-inflammatory effects are mainly driven through the inhibition of the TLR4-MD2 axis via its cytoplasmic domain.

## Methods

### Animals

Animal experiments were approved by the Animal Care and Research Committee of Nord Pas-de-Calais (protocol number CEEA 2016081119216614). Animals were hosted in standard cages under constant temperature (24 °C), with a 12:12-h light-dark cycle. They were fed a standard diet and had free access to tap water. Germline Muc1 knockout mice, (C57BL/6 background) were generously provided by Dr. Sandra Gendler (Mayo Clinic, Scottsdale, USA). Heterozygous males and females (Muc1<sup>-/+</sup>) were mated to produce WT (Muc1<sup>+/+</sup>) and Muc1 homozygous knockout mice (Muc1<sup>-/-</sup>). The genotypes of the mice were determined by PCR to identify female littermates for experiments as previously described (23). In every experiments, n=6 animals were used in each group.

### Endotoxin induced acute kidney injury

In all experiments, 8- to 10-wk-old female mice were intra peritoneally injected with 10 mg/kg of pure *Escherichia coli* LPS serotype O111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Mice injected with sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) served as control. Mice were sacrificed at 6h, 24h or 48h and kidneys were harvested. Blood samples were obtained *via* tail bleeding under a warming lamp at 24h after LPS injection before sacrifice. They were centrifuged at 4 °C for 10 min at 1400g and serum was stored at -80 °C for later biochemical analysis. Blood urea nitrogen (BUN) concentrations were used to determine renal function and were measured with a AU480 Chemistry Analyzer (Beckman Coulter, Brea, USA).

### Histopathological examination

Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were sliced into 4- $\mu$ m-thick sections and stained with hematoxylin-eosin-saffron and periodic acid-Schiff. Slides were evaluated independently by two pathologists in a blinded manner, and representative images were recorded. Histological scores of acute tubular necrosis were established according to the percentage of involved tubules: score 1 < 10%, score 2 = 10%–25%; score 3 = 26%–50%; score 4 = 51%–75%; score 5 > 75%, as previously described (23).

For immunohistochemistry (IHC), paraffin-embedded renal sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol to water. Endogenous peroxidase activity was quenched on all sections with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Anti-MUC1 (ThermoFisher, MA5-11202), anti-p65 (Abcam, phosphoS536, ab86299), anti-F4/80 (Bio-Rad, Cl:A3-1), anti-NIMP-R14 (Santa Cruz, sc-59338) were used as primary antibodies.

IHC scores were established as follows: For the neutrophils score, the number of NIMP-R14 positive cells per 10 high power fields of renal cortex was used. For the macrophages score, the number of F4/80 positive cells per 10 high power fields of renal cortex was used. For the phosphorylated p65 score, the absolute number of positive tubular cells nuclei per 10 high power fields of renal cortex was considered.

### **Flow cytometry**

First, kidneys were homogenized using a gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec Inc., San Diego, USA). The fragments were then digested in 5 mL of complete DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)/F12 1 : 1 medium (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 2 mg/mL collagenase IV (enzymatic activity: 200 U/mL) (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and 20% dispase (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). This step was performed three times at 37°C for 30 minutes, and the suspension was filtered with a mesh size of 70 µm after the last digestion steps. The cell suspension was washed twice in PBS and centrifuged for 5 minutes at 300 *g*. Erythrocytes were lysed using an RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, USA). After treatment with Fc-blocking Ab, cell surface staining was performed for 30 minutes on ice. Staining was performed with fluorochrome-labeled antibodies against CD45 (30-F11), Ly6G (1A8), MHC class II (M5/114), CD11b (M1/70), CD11c (N418), CD38 (90/CD38) and CD206 (C068C2) all purchased from BD Biosciences (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA). Antibodies were diluted in PBS containing 2% BSA to attenuate non specific signal. For each antibody, matched isotype controls (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA) were used to calibrate the multi-channels compensation and draw the gates. Cell viability was assessed with a Fixable Viability Stain (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA). Stained cells were analyzed on a BD LSRFortessa™X-20 cell analyzer (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA). Data were analyzed with Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter, Brea, USA).

### **RNA extraction and quantification by the reverse-transcription-quantitative polymerase chain reaction technique (RT-qPCR)**

Total RNA extraction was performed with miRNeasy miniKit® (Qiagen Inc., Valencia, CA) and reverse transcription with the "High Capacity cDNA Reverse Transcriptase " kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The Taqman assay (Applied Biosystems, Foster City, USA) was used for RT-qPCR with human- and mouse-specific primers in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Peptidylprolyl isomerase A (Ppia) mRNA was used as an internal control. Transcript levels were calculated by the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. Relative expression levels were

obtained by normalizing with respect to *Ppia* transcripts. For animals, relative expression levels of targeted genes were obtained by setting the expression level of Muc1 +/+ PBS-injected mice at 1. For *in vitro* studies, relative expression levels of targeted genes were obtained by setting the expression level of non committed macrophages from Muc1 +/+ mice at 1.

### **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**

Cytokine concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using kits: Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go® (eBioscience, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions. A standard ELISA curve was generated for each plate. The Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was used for acquiring results.

### **Primary cultures of human macrophages**

Human monocytes isolated by counterflow elutriation of peripheral blood mononuclear cells were purchased from the Plateforme DTC-CICBT0503, Institut de Biologie, CHU Hôtel Dieu de Nantes. To induce macrophage differentiation, human monocytes were treated with either 25ng/mL of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) (Peprtech, London, UK) or 100ng/mL of human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF) (Peprtech, London, UK) for M1 and M2 polarization respectively. M1 human macrophages were obtained after 48h of stimulation by 50 ng/mL ultrapure LPS serotype O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) and 20 ng/mL human IFN- $\gamma$  (Peprtech, London, UK). M2 human macrophages were obtained after 48 hours of stimulation by 20 ng/mL human IL-4 with 20 ng/mL human IL-13 (Peprtech, London, UK). Non-committed macrophages (M0 macrophages) that received only culture medium and GM-CSF were used as controls. Polarization of macrophages was assessed by RT-qPCR analysis for expression of their signature genes (IFN- $\gamma$  and IRF5 as M1 markers and IL-10 and IRF4 as M2 markers).

### **Primary cultures of mouse macrophages**

Mouse macrophages were isolated from 6- to 10-week-old C57BL6/J Muc1+/+ or Muc1-/- mice as follows. Bone marrow was harvested from the femurs and tibias, filtered through mesh size of 70  $\mu$ m and erythrocytes were lysed using an RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, USA). Remaining cells were cultured for 7 days in RPMI medium containing 5% Fetal Bovine Serum and 25 ng/mL murine macrophage colony-stimulating factor (mM-CSF) (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) to induce mouse bone marrow-derived macrophage differentiation. Mouse macrophages were seeded at  $2.0 \times 10^6$  cells/well in 6-well plates and cultured for 2 days before differentiation into M1 cells with 100 ng/mL ultrapure LPS serotype

O111:B4 (Sigma, St. Louis, USA) plus 20 ng/mL murine IFN- $\gamma$  (Peprotech, London, UK), or into M2 cells with 20 ng/mL murine IL-4 plus 20 ng/mL murine IL-13 (Peprotech, London, UK).

Mouse peritoneal macrophages were isolated from thioglycollate-treated mice. Thioglycollate Medium Brewer Modified (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA) was autoclaved and aged for at least 1 month prior to use. Mice were intra peritoneally injected with 1 mL of 4% thioglycollate. 3 days after the injection, peritoneal cells were harvested by peritoneal lavage with cold PBS used. Macrophages were enriched by adherence by plating peritoneal cells in DMEM medium for 3h. Non adherent cells were removed. Peritoneal macrophages were polarized into M1 or M2 macrophages according to the previously described procedure. Polarization of macrophages was assessed by RT-qPCR analysis for expression of their signature genes (CD86 and NOS2 as M1 markers and ARG1 and CHIL3 as M2 markers).

#### **Cell line cultures and *in vitro* assays**

HEK293 clones expressing TLR4-MD2-CD14 were purchased from Invivogen® (Invivogen, Toulouse, France). The cells were maintained at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. For all *in vitro* assays, ultrapure *Escherichia coli* LPS serotype O111:B4 (Sigma, St. Louis, USA) was used.

#### **Luciferase assay**

HEK293-TLR4-MD2-CD14 cells were transiently transfected with the Lipofectamine LTX & Plus Reagent kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) as previously described (24). Different MUC1 expressing vectors were used: MUC1-Full Length (MUC1), MUC1 deleted for its Tandem Repeat domain (MUC1-dTR), MUC1 deleted for its Cytoplasmic Tail (MUC1- dCT) (all gifts from S.J. Gendler, Mayo Clinic, Scottsdale, USA) or an empty vector (EV). To determine NF- $\kappa$ B activity in HEK293 cells, transient transfections were performed with Lipofectamine (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) as previously described (25). Co-transfection experiments were carried out in the presence of 0.5 $\mu$ g of p3NF- $\kappa$ B-luciferase reporter plasmid or pGL2-AP1. Twenty-four hours after transfection, the cells were treated with ultrapure LPS serotype O111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) or PBS. After 24h incubation, cell lysate was measured for firefly luciferase activity with the Dual Luminescence Assay Kit (Promega Corporation, Madison, USA) using a luminometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Results were expressed as relative luciferase units normalized to protein quantity.

### **Proximity Ligation Assays**

HEK293-TLR4-MD2-CD14 cells were transfected with plasmids containing an influenza hemagglutinin (HA)-tagged TLR4 (Invivogen, Toulouse, France) and a GFP reporter. The proximity ligation assay (PLA) was performed using the Duolink *in situ* Red Starter Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The conjugation of the antibodies was performed following the instructions of Duolink® In situ Probemaker: anti-MUC1 (Abcam, ab109185) or anti-MYD88 (Abcam, ab133739) primary antibodies were conjugated with PLA probe PLUS and anti-HA (Santa Cruz, F7, sc-7392) antibody with PLA probe MINUS.

The quantification of spots was performed using the software Qupath (26) on twenty-five GFP+ cells (randomly picked) in each group. Cell detection was performed on DAPI channel and visual assessment was used to assess the correct recognition of nuclei. In non-transfected cells, up to 5 spots corresponding to non specific signal or to superposition of cells could be observed, therefore all results were reduced by a factor 5.

Confocal microscopy was performed on a Zeiss® LSM 710 Live Microscope (Zeiss Humphrey Systems, Dublin, USA).

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software 8.4, San Diego, USA). Data are presented as means  $\pm$  S.E.M. Comparisons between independent groups data were made using one-way (standard) analysis of variance (ANOVA). In the presence of between group correlations, two-way (nested) ANOVA models were chosen to account for the data's non-independency. All significant ANOVA global F-tests were followed by post-hoc tests (all possible comparisons) using the conservative Bonferroni correction to account for the multiple comparisons-linked type I error increase. In regard to ANOVA validation, we systematically assessed the assumption of normality by investigating the standardized residuals both graphically (plots inspection) and empirically (Shapiro-Wilk test). The assumption of homoscedasticity and the lack of influent points were also checked graphically. All tests were two-sided, and *P*-values  $<.05$  were considered as significant.

## Results

### **MUC1 has protective effects on LPS-Induced Renal Injury**

To determine if MUC1 plays a role in endotoxin induced AKI, Muc1<sup>+/+</sup> and Muc1<sup>-/-</sup> mice were intraperitoneally injected with LPS a specific agonist of TLR4. BUN levels and Kidney-injury molecule-1 (Kim-1) transcripts were used for the assessment of renal injury at 24h. As shown in Fig 1-A, increase BUN levels were observed after LPS injection in both mice compared to controls (PBS). Furthermore, Muc1<sup>-/-</sup> mice developed more severe acute renal failure than the Muc1<sup>+/+</sup> mice at 24h after LPS (BUN levels: 78.8 mg/dl  $\pm$  12.5 vs 10.9 mg/dl  $\pm$  2.46;  $p < 0.01$ ). In line with those results, RT-qPCR performed on whole-kidney from LPS treated Muc1<sup>-/-</sup> mice revealed a significant higher level of Kim-1 transcripts as compared to Muc1<sup>-/-</sup> LPS treated animals (Fig 1-B). Histological analysis of harvested kidneys at 24h after the injection of LPS revealed very discrete tubular damages and did not show any difference between the Muc1<sup>-/-</sup> and Muc1<sup>+/+</sup> treated groups (Fig 1-C). We hypothesized that this discrepancy with the functional tests may be related to a delay in the constitution of tissue injury and looked at different time points. At 6h after the injury, both Muc1<sup>+/+</sup> and Muc1<sup>-/-</sup> mice appeared to have subnormal kidney tubules (Fig 1-D). However at 48h, Muc1<sup>-/-</sup> mice exhibited more severe manifestations of acute tubular necrosis (ie loss of brush border membranes, sloughing of tubular epithelial cells, dilation of tubules and cast formation) than Muc1<sup>+/+</sup> (Fig 1-C,D). As LPS is known to induce NF- $\kappa$ B signaling pathways, we also monitored the nuclear expression of the phosphorylated p65 subunit in tubular cells at 6h, 24h and 48h of the injection (Fig1-E,F). Both Muc1<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice enhanced p65 nuclear translocation after LPS injection (Fig1-E). We found a higher proportion of stained nuclei at 6h in the Muc1<sup>-/-</sup> treated mice compared to Muc1<sup>+/+</sup> mice (Fig 1-F), suggesting that Muc1 expression is associated with NF- $\kappa$ B signal pathway inhibition.

### **MUC1 mitigates the secretion of pro-inflammatory cytokines after LPS injection**

To study the effect of the expression of Muc1 on the secretion of pro-inflammatory cytokines generated by LPS renal injury, the levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , Mcp-1, Tnf- $\alpha$ , and IL-18 in murine renal tissue were assessed by RT-qPCR at 24h after the injection of LPS (Fig 2-A to E). After LPS injection, both Muc1<sup>+/+</sup> and <sup>-/-</sup> mice showed significant increase of renal transcripts of pro-inflammatory cytokines compared to controls (PBS). In the LPS treated groups, we found a significant increase in the relative expression of IL-6 and IL-1 $\beta$  in the Muc1<sup>-/-</sup> compared to Muc1<sup>+/+</sup> mice (Fig 2-A,B). This effect was not observed for MCP-1, TNF- $\alpha$  and IL-18 (Fig 2-C to E). ELISA further showed that serum concentrations of IL-6 in treated Muc1<sup>-/-</sup> mice

significantly exceeded those of their WT littermates (107.5 pg/mg  $\pm$ .54.1 vs 26.3 pg/mg  $\pm$ .12.4;  $p < 0.001$ ) (Fig 2-F).

A neutrophilic infiltration of renal parenchyma and an upregulation of adhesion chemokines that mediate neutrophils recruitment such as ICAM-1 have been previously reported after LPS injection (7). So, we monitored the extent of neutrophils in the renal cortex of Muc1<sup>-/-</sup> and Muc1<sup>+/+</sup> mice at different time points (6h, 24h, 48h) by immunohistochemistry. We confirmed that LPS leads to an increase in the number of renal neutrophils in the renal cortex but we found no significant difference between the two treated groups (Fig 2-G). In support of this result, renal relative expression of ICAM-1 at 24h following LPS treatment was comparable between the two groups (Fig 2-H)

### **Recruitment of pro-inflammatory macrophages after LPS injection is reduced in WT mice**

We hypothesized that the infiltration of macrophages within the kidneys might explain the difference in the secretion of pro-inflammatory cytokines between the two groups. To assess this hypothesis, immunohistochemistry with pan-macrophages marker F4/80 was performed on kidney sections at 24h. Even if LPS injection increases the absolute numbers of renal macrophages in all mice, we did not find any significant difference between Muc1<sup>-/-</sup> and Muc1<sup>+/+</sup> treated mice (Fig 3-A).

To gain further insights, renal macrophages were collected from harvested kidneys and analyzed by flow cytometry. In line with our immunohistochemistry results, we found an increased of MHCII<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>low</sup> phagocytic cells in kidneys of both Muc1<sup>+/+</sup> and Muc1<sup>-/-</sup> after LPS injection compared to control (PBS), but no significant difference between the two LPS treated groups (Fig 3-B). However, we noted a significant increase of the M1 macrophagic population (MHCII<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>low</sup>/CD38<sup>+</sup>) in the kidneys of Muc1<sup>-/-</sup> mice compared to Muc1<sup>+/+</sup> after LPS injection (Fig 3-C,D). Interestingly, the percentage of M2 phagocytic cells (MHCII<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>low</sup>/CD206<sup>+</sup>) followed an inverse tendency and was reduced in Muc1<sup>-/-</sup> mice (Fig 3-E,D)

To validate these results, we also characterized the renal M1/M2 macrophage distribution in harvested kidneys by RT-qPCR. Increased mRNA expression of NOS2 (M1 marker) was observed in Muc1<sup>-/-</sup> mice (Fig 3-F) whereas no significant difference was found for ARG1, a M2 marker (Fig 3-G).



## **MUC1 is mainly expressed in pro-inflammatory macrophages in both mice and human and mitigates the secretion of pro-inflammatory cytokines**

First, we studied MUC1 expression in human macrophages obtained from elutriated monocytes. Using RT-qPCR, we showed that MUC1 relative expression was increased in M1 compared to M2 and M0 non-committed human macrophages (Fig 4-A). Moreover, we showed by immunofluorescence that MUC1 protein expression was only observed in M1 macrophages but not in M2 or M0 macrophages (Fig 4-B).

Then, in two populations of mouse macrophages: bone-marrow derived macrophages (mBMdM) and thioglycollate-elicited peritoneal macrophages (Mp), we confirmed that Muc1 expression was induced in M1 macrophages derived from Muc1<sup>+/+</sup> mice (Fig4-C,D). Muc1 was not induced in murine M2 macrophages derived from Muc1<sup>+/+</sup> mice (Fig4-C,D). Thereafter, we compare the relative expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) in both populations of macrophages derived from Muc1<sup>+/+</sup> and Muc1<sup>-/-</sup>. After M1 stimulation (LPS and IFN- $\gamma$ ), we observed that both mBMdM and peritoneal macrophages derived from Muc1<sup>-/-</sup> showed a significant increased relative expression of IL-6 and IL-1 $\beta$  compared to macrophages derived from Muc1<sup>+/+</sup> mice (Fig 4-E,F,G). ELISA determination of IL-6 levels in the supernatants of mBMdM support those findings (Fig 4-I). TNF- $\alpha$  expression was increased in both M1 macrophages compare to M0, but its level did not significantly differ between Muc1<sup>+/+</sup> and Muc1<sup>-/-</sup> mice (Fig 4-H).

## **Anti-inflammatory activity of MUC1 during TLR4 activation is mainly dependent of its cytoplasmic tail which inhibits the recruitment of the intracellular adapter MYD88**

To study the impact of MUC1 in LPS-TLR4 signaling pathway, we used HEK293 cells expressing TLR4-MD2-CD14 transfected with MUC1 expressing vector or an empty vector. First, we observed by RT-qPCR that MUC1 expression was associated with a significant inhibition of the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  expression, after LPS stimulation (Fig 5-A). Then, because NF- $\kappa$ B and activator protein 1 (AP1) are key downstream factors of the TLR4 signaling pathway, we examined whether MUC1 expression influences these pathways by using luciferase gene reporter assays. When the cells were co-transfected with vector expressing MUC1 full length (MUC1), MUC1 deleted of its tandem repeat domain (dTR) or MUC1 deleted of its cytoplasmic tail (dCT), transcriptional activity mediated by NF- $\kappa$ B was significantly decreased (Fig 5-B). Interestingly, MUC1 and MUC1dTR expression decreased significantly transcriptional activity mediated AP1 compared to EV control but not

for MUC1dCT (Fig 5C) suggesting that MUC1 CT domain is involved for the anti-inflammatory effect of MUC1 against TLR4 activation.

Few studies have shown that MUC1 could inhibit TLR5 signaling pathway *via* inhibition of the recruitment of the intracellular adapter MYD88 (19). We hypothesized that MUC1 could also interact with TLR4 and block MYD88 recruitment. By using proximity ligation assay (PLA) which is a technique to detect in cell protein-protein interactions as punctuate spots that can be quantified, we were able to detect positive signals in cells expressing TLR4-HA and MUC1-CT (Fig 5-D) suggesting an interaction between the two proteins. Next, using an MYD88- TLR4-HA PLA assay, we compared the number of spots between HEK-293 cells transfected with either a MUC1 expressing vector or an empty vector. We showed a significant decrease in the absolute number of spots between the two conditions (Fig 5-E, F). This result confirms the inhibition of the MYD88 recruitment to TLR4 in MUC1 expressing cells.

## Discussion

Although MUC1 is the most expressed mucin in the adult kidney (11), there are only limited data about its role in inflammatory kidney diseases. MUC1 is known to serve as a physical barrier for the epithelia towards the aggression by external pathogens (27). Recent data in the airways and in the digestive tract, suggest that MUC1 also exercise anti-inflammatory functions by acting on innate pattern recognition receptors in particular Toll-like receptors (TLRs) (12,14). We and others had reported a nephroprotective role of MUC1 during the early phases of an ischemia-reperfusion model of AKI (23,28) but data regarding its anti-inflammatory properties are lacking in the kidney. Moreover, the interaction of MUC1 and TLR4 which is the main TLR activated in the kidney in both ischemic and sepsis AKI has not been investigated properly. Yet, some reports suggest that MUC1 could negatively regulates TLR4 on both epithelial and immune cells (13,16).

For the first time we present evidence that MUC1 has a nephroprotective role in endotoxin-induced AKI. As we hypothesized, MUC1 mitigates the secretion of pro-inflammatory cytokines and the activation of NF- $\kappa$ B pathway following LPS injection. This decrease of the pro-inflammatory stimuli within the kidney is associated with less tissular damages and better renal function. In line with what has been described in the airways and digestive tract, those results suggest that MUC1 expression prevents the development of an excessive inflammatory response to injury (12).

Influx of different types of inflammatory cells have been described in endotoxin induced AKI. Cunningham *et al* reported renal neutrophil infiltration between 6 and 48h after LPS injection (7,29). They found significantly less neutrophil in mice bearing an inactivating mutation of the TLR4 gene (29). However, our results provide that Muc1 expression seems to have no impact on neutrophils infiltration in kidney after LPS exposure as we failed to observe any difference between Muc1<sup>+/+</sup> and Muc1<sup>-/-</sup> treated mice in our model. Because MUC1 is not expressed on endothelial cells, this result suggests that TLR4 endothelial expression is required for the early leukocytes infiltration as it has been shown in ischemic model (30).

As macrophages are responsible for the early secretion of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced AKI (6), we also monitored the number and the phenotype of F4/80 positive cells. Interestingly, we did not notice any difference in the absolute numbers of macrophages between our two treated groups but we observed a major switch towards M1 phenotype in the Muc1<sup>-/-</sup> mice that could account for the greater pro-inflammatory cytokines secretion in

this group. Those results support the notion that transition from M1 to M2 phenotype is a major protective event during endotoxin induced AKI as it has been reported previously (31).

To characterize the expression and the role of MUC1 in different types of macrophages, we performed *in vitro* polarization of both human and murine macrophages. Because renal macrophages are not only monocyte-derived macrophages but have various origins (32), we studied two populations of mouse macrophages to account for this complexity. As it has been reported by Ueno *et al*, we found MUC1 expression on M1 macrophages but not on none-committed or M2 macrophages (16). Moreover, we showed that both bone-marrow derived macrophages and thioglycollate-elicited peritoneal macrophages issued from Muc1<sup>-/-</sup> generate more pro-inflammatory cytokines than macrophages derived from Muc1<sup>+/+</sup> mice. Considering that pro-inflammatory secretion of cytokines in the endotoxin model is largely dependent on TLR4 pathway (33), those results suggest that the induction of MUC1 on M1 macrophages, which also expresses TLR4, may act as a regulatory mechanism to prevent excessive inflammation.

Our *in vitro* experiments bring new data supporting a direct inhibition of TLR4 by MUC1. As described in the literature, we found that MUC1 regulation of TLR4 seems mainly dependent on the MUC1-CT domain (16). Although less important, the effect of pMUC1-dTR could be secondary to steric hindrance limiting the binding of LPS to TLR4. In the lung, MUC1-CT has been shown to competitively inhibit the recruitment of MYD88 by TLR5 at the membrane (19). To investigate if a similar mechanism could occur, we used a PLA assay and show for the first time that MUC1-CT and TLR4 are in close relationship within the cells. Moreover, we showed that HEK-293 cells expressing MUC1 have a reduced recruitment of MYD88 following LPS exposure than cells transfected with an empty vector. The activation of TLR4 could also trigger a MYD88-independent pathway through the recruitment of TRIF (34). Because MUC1-CT may also be involved in the regulation of this step (35), further studies will be required to precise the respective role of MUC1 on the MYD88 dependant and independent pathways following TLR4 activation.

To conclude, our results support a previously unrecognized role of MUC1 as a nephroprotective agent in LPS-induced AKI through its anti-inflammatory function and the inhibition of TLR4 pathway. Interestingly, in a model of sepsis caused by cecal ligation and puncture (CLP), Wang *et al*. showed that the increased expression of MUC1 was associated with less histological damages in the kidneys and overall less inflammation (36). As TLR4 activation is a major mechanism responsible for sepsis-induced AKI, their results suggest

that MUC1 inhibition of TLR4 may also be important in alleviating kidney damages during sepsis.

Some important questions remained unanswered. In particular, we did not address the respective role of MUC1 in the epithelial and immune contingents. TLR4 is known to be expressed in leukocytes and also in epithelial tubular cells after LPS injection (37). Therefore MUC1 could negatively regulate TLR4 at different levels. Moreover, even if it is well established that cytokines secretion in endotoxin induced AKI is dependent from the immune systems, the question whether or not renal dysfunction is mediated by the epithelial remains controversial (33). As a consequence, we could not exclude that the nephroprotective effect of MUC1 after LPS injection reflects mostly a direct action of MUC1 on epithelial cells rather than a consequence of its anti-inflammatory effects on macrophages. This should prompt further studies to better elucidate those findings.

## Figures

**Fig 1: Muc1 mitigates renal dysfunction and histological tubular lesions in a mouse model of intra-peritoneal LPS injection.** Mice (n=6 per group) were injected with pure *Escherichia coli* LPS serotype O111:B4 (10 mg/kg). (A): Blood samples were collected at 24h for BUN measurement. (B): Kidneys were harvested at 24h after the injection to measure out Kim-1. mRNA expression levels by RT-qPCR. Results were normalized with respect to control Ppia transcripts. (C-F): Kidneys were harvested at 6, 24 and 48 hours after LPS injection for histological analysis (n=6 per group). (C-D): PAS stain was used to assess acute tubular necrosis (ATN). (C): Representative sections were captured (magnification x100). Severe lesions were shown (yellow arrows). (D): ATN histological score from WT and Muc1-KO mice. (E): Immunohistochemistry study performed with anti-p65 antibody (magnification x100). (F): Graphic presentations of immunohistochemistry results showing the score of p65-positive tubular epithelial cells from WT and Muc1-KO mice.

All statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between WT and KO mice was as follows: \* p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; ns = non-significant.

**Fig 2: Muc1 has anti-inflammatory properties in the model of intra-peritoneal LPS injection.** (A–E, H) Levels of mRNAs encoding pro-inflammatory markers (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-18, and TNF- $\alpha$ ) and adhesion molecules (ICAM, MCP-1) were determined by RT-qPCR at 24h (n=6 per group). Results were normalized with respect to control Ppia transcripts. (F) Concentration of IL-6 (pg/mL) was determined by ELISA on total protein extract. (G) Graphic presentation of immunohistochemistry results showing NIMP-R14-positive neutrophils in kidneys from WT and Muc1-KO mice. Inflammatory positive cells were counted in 10 randomly high-magnification ( $\times$  400) fields per kidneys.

All statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between WT and KO mice was as follows: \* p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; ns = non-significant.

**Fig 3: Muc1 influences the phenotype of infiltrating macrophages in the model of intra-peritoneal LPS injection.** (A): Results of the quantification of F4/80-positive macrophages in the kidneys from WT and Muc1-KO mice (n=6 per group). Inflammatory positive cells were counted in 10 randomly high-magnification (magnification  $\times$ 400) fields per kidneys. (B–E): Flow cytometry results. (B): The percentage of MHCII+/CD11b+/CD11c<sup>low</sup> phagocytic cells was increased 24h after LPS injection but was similar between the two mouse strains. (C–E): The percentage of M1 macrophages (CD38+) and M2 macrophages (CD206+) among each condition is presented. (F–G): NOS2 (M1 marker) and ARG1 (M2 marker) were used for RT-qPCR studies. Results were normalized with respect to control Ppia transcripts.

All statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between WT and KO mice was as follows: \* p < 0.05; \*\*\*, p < 0.001; ns = non-significant.

**Fig 4: Muc1 is expressed in pro-inflammatory macrophages.** (A–B): Human monocytes obtained by elutriation were differentiated in macrophages *in vitro*. (A): After polarization, the mRNA level of MUC1 was determined by RT-qPCR in M1, M2 and non committed macrophages. Results were normalized with respect to control Ppia transcripts and the

values obtained of non committed macrophages were set at 1. (B): Immunofluorescence study with anti-MUC1 antibody MUC1 in non committed (M0), M1 and M2 macrophages. Similar results were observed by RT-qPCR in both murine bone marrow derived macrophages (bMfM) (C) and peritoneal macrophages (Mp) (D). Next, the relative expression of IL-6 was determined by RT-qPCR in M1 macrophages issued from Muc1<sup>-/-</sup> or Muc1<sup>+/+</sup> mice. Results were normalized with respect to control Ppia transcripts and the values obtained of Muc1<sup>+/+</sup> non committed macrophages were set at 1. (E, F) In both bMfM and Mp populations, IL-6 relative expression was higher in macrophages derived from Muc1<sup>-/-</sup> mice compare to macrophages from Muc1<sup>+/+</sup>. (G,H) In bMfM, we found similar results with IL-1 $\beta$  by RT-qPCR however there was no significant difference regarding TNF- $\alpha$  relative expression between the M1 macrophages from Muc1<sup>+/+</sup> or Muc1<sup>-/-</sup> (I) Concentration of IL-6 (pg/mL) was determined by ELISA on the supernatants of M1 or non committed macrophages.

1-way ANOVA with Bonferroni correction was performed for Figures 4 A, C and D. All others statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between the macrophages was as follows: \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns = non-significant

**Fig 5: MUC1 inhibits the TLR4 pathway.** (A) HEK-293 cells expressing TLR4-MD2-CD14 were transfected with MUC1 or an empty vector (EV) and stimulated with LPS. The activation of the TLR4 pathway was monitored by RT-qPCR. Results were normalized with respect to control PPIA transcripts and the values of non stimulated EV-HEK-293 cells were set at 1. (B, C) New transfection experiments were performed with MUC1 full length or deleted from its cytoplasmic tail (dCT) or its tandem repeat (dTR). NF-kB and AP-1 luciferase assays were used to monitored the response after LPS stimulation. (D) Proximity ligation assay (PLA) with anti-HA and anti-MUC1 antibodies was performed in HEK-293 cells transfected with TLR4-HA, MUC1 and a GFP reporter. Representative sections showing red spots in GFP<sup>+</sup> cells (arrows). (E) Results of a PLA assay performed with anti-HA and anti-MYD88 antibodies. Representative sections showing increased number of spots in MUC1<sup>-</sup> GFP<sup>+</sup> cells compare to MUC1<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> cells. (F) Graphic presentations of PLA results showing the absolute number of spots in 25 GFP<sup>+</sup> cells (randomly picked) in both groups (quantification was made with QuPath software). *In vitro* experiments are the results of n=3 repeated experiments with multiple replicates. All statistical analysis were performed using 2-way ANOVA followed by Bonferroni post test. The significance of differences between the conditions was as follows: \*  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; ns = non-significant.

**Acknowledgements:**

Muc1-KO mice and the MUC1 expression vector were gifts from SJ Gendler (Mayo Clinic, Scottsdale, AZ, USA). The M8 anti-MUC1 antibody was a gift from D. Swallow (University College London, UK). The authors are grateful to Nicolas Van Poucke (Institute of Pathology, CHRU Lille) and Rose-Marie Siminski & Marie-Hélène Gevaert (Department of Histology, Faculté de Médecine, Lille) for their technical help. The authors thank the staff of the High-Technology Animal Facility, Faculté de Médecine Pôle Recherche, Lille. They also thank Dr. Nathalie Jouy of the Flow Core Facility of BICeL (campus Hospitalo-universitaire IRCL, Lille) and Meryem Tardivel of the Bio Imaging Platform (BiceL, Lille).

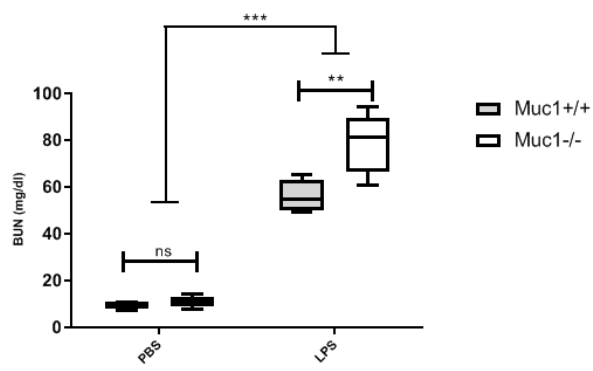
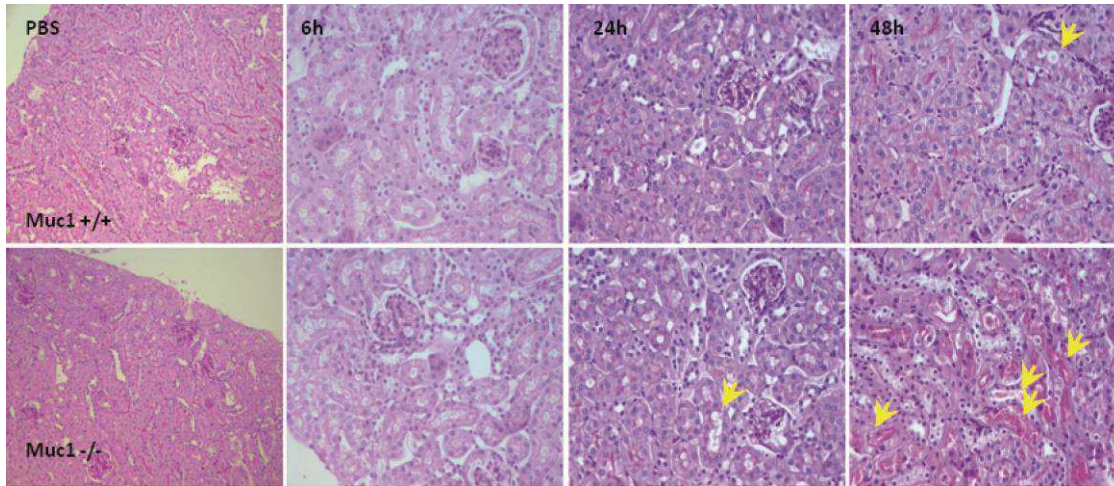
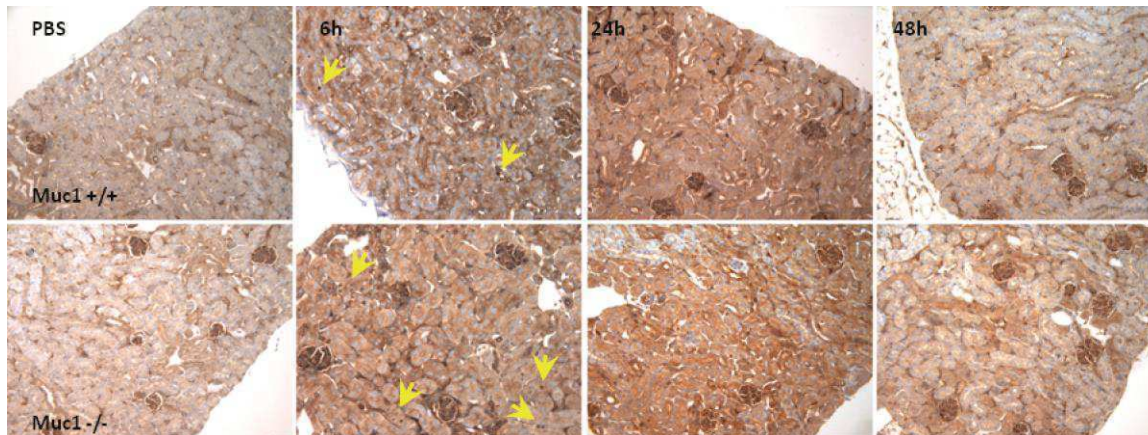
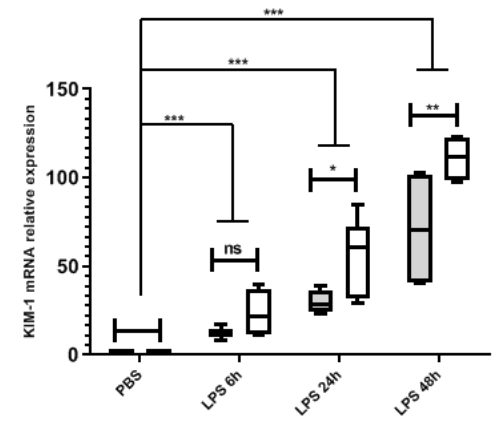
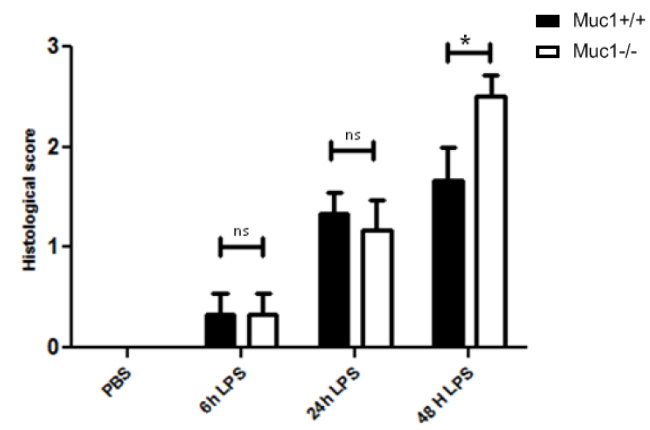
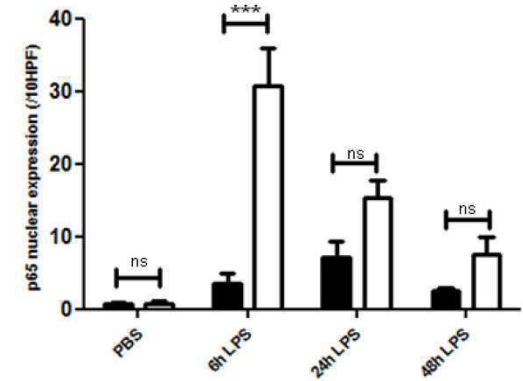


## References

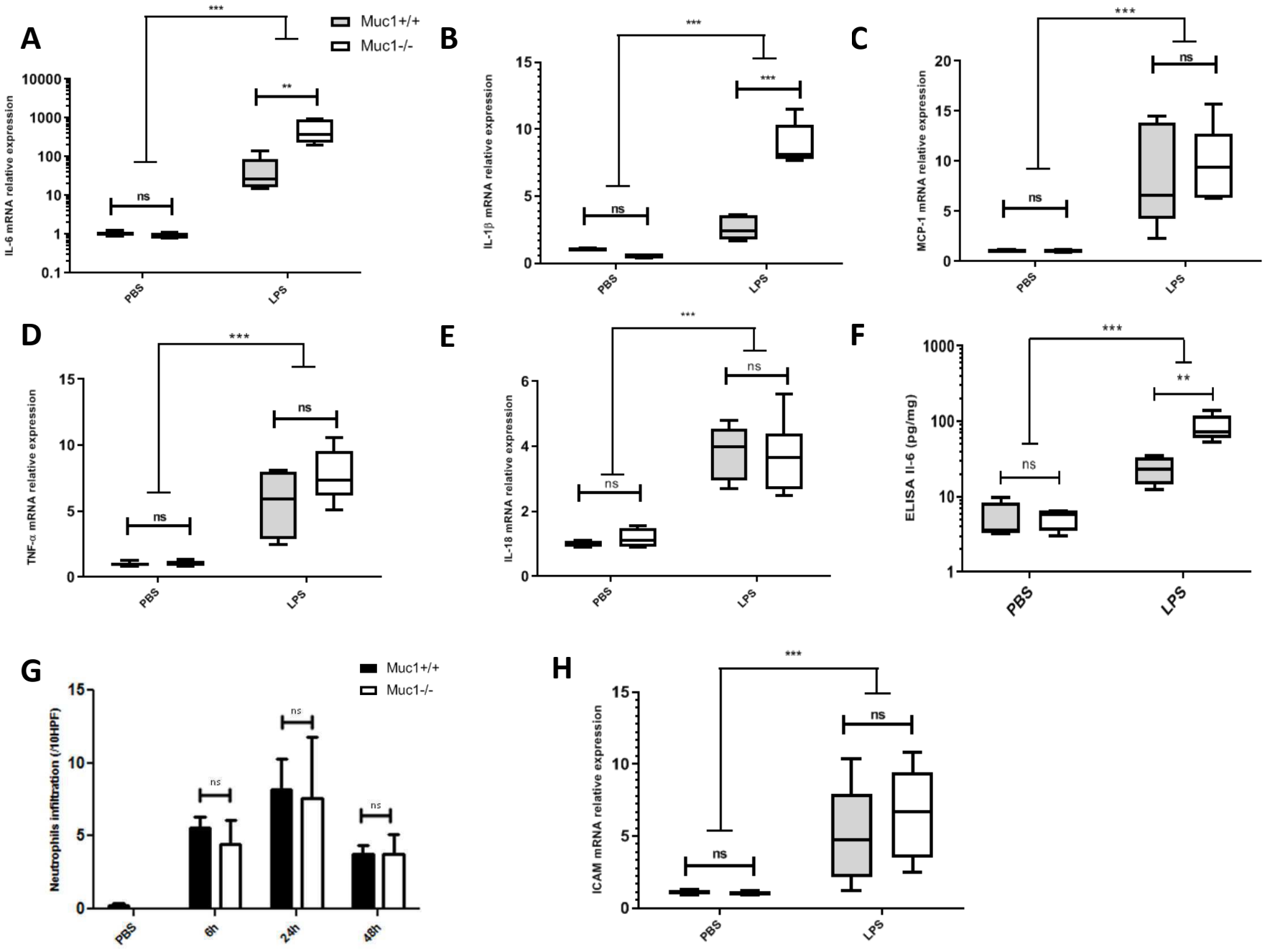
- 1- Zarjou A, Agarwal A. Sepsis and acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(6):999-1006. doi:10.1681/ASN.2010050484
- 2- Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, Kellum JA. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int*. 2019;96(5):1083-1099. doi:10.1016/j.kint.2019.05.026
- 3- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):776-787. doi:10.1038/nri2402
- 4- Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461. Published 2014 Sep 25. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- 5- Tsujimoto H, Ono S, Efron PA, Scumpia PO, Moldawer LL, Mochizuki H. Role of Toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock*. 2008;29(3):315-321. doi:10.1097/SHK.0b013e318157ee55
- 6- Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(3):573-588. doi:10.1111/apha.12798
- 7- Cunningham PN, Wang Y, Guo R, He G, Quigg RJ: Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. *J Immunol* 172: 2629–2635, 2004
- 8- Ramesh G, Zhang B, Uematsu S, Akira S, Reeves WB: Endotoxin and cisplatin synergistically induce renal dysfunction and cytokine production in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F325-F332, 2007
- 9- Fenhammar J, Rundgren M, Forestier J, Kalman S, Eriksson S, Frithiof R. Toll-like receptor 4 inhibitor TAK-242 attenuates acute kidney injury in endotoxemic sheep. *Anesthesiology*. 2011;114(5):1130-1137. doi:10.1097/ALN.0b013e31820b8b44
- 10- Fenhammar J, Rundgren M, Hultenby K, et al. Renal effects of treatment with a TLR4 inhibitor in conscious septic sheep. *Crit Care*. 2014;18(5):488. Published 2014 Sep 3. doi:10.1186/s13054-014-0488-y
- 11- Leroy X, Copin MC, Devisme L, et al. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2002;40(5):450-457. doi:10.1046/j.1365-2559.2002.01408.x
- 12- Kato K, Lillehoj EP, Lu W, Kim KC. MUC1: The First Respiratory Mucin with an Anti-Inflammatory Function. *J Clin Med*. 2017;6(12):110. Published 2017 Nov 29. doi:10.3390/jcm6120110
- 13- Sheng YH, Triyana S, Wang R, et al. MUC1 and MUC13 differentially regulate epithelial inflammation in response to inflammatory and infectious stimuli. *Mucosal Immunol*. 2013;6(3):557-568. doi:10.1038/mi.2012.98
- 14- Ng GZ, Menheniott TR, Every AL, et al. The MUC1 mucin protects against *Helicobacter pylori* pathogenesis in mice by regulation of the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2016;65(7):1087-1099. doi:10.1136/gutjnl-2014-307175

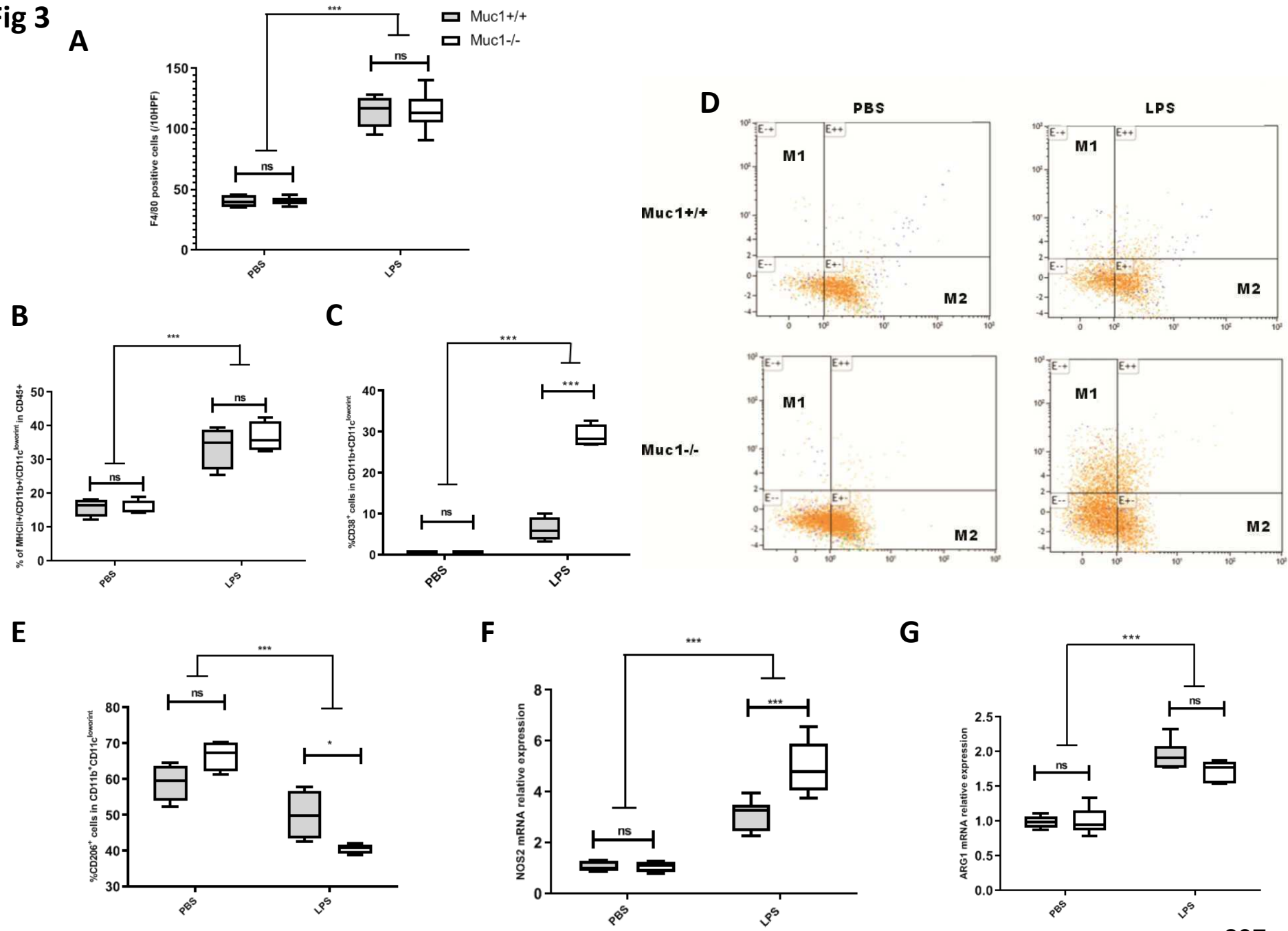
- 15- McAuley JL, Corcilius L, Tan HX, Payne RJ, McGuckin MA, Brown LE. The cell surface mucin MUC1 limits the severity of influenza A virus infection. *Mucosal Immunol.* 2017;10(6):1581-1593. doi:10.1038/mi.2017.16
- 16- Ueno K, Koga T, Kato K, et al. MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38(3):263-268. doi:10.1165/rcmb.2007-0336RC
- 17-Kato K, Uchino R, Lillehoj EP, Knox K, Lin Y, Kim KC. Membrane-Tethered MUC1 Mucin Counter-Regulates the Phagocytic Activity of Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(4):515-523. doi:10.1165/rcmb.2015-0177OC
- 18- Kato K, Lillehoj EP, Kim KC. MUC1 regulates epithelial inflammation and apoptosis by PolyI:C through inhibition of Toll/IL-1 receptor-domain-containing adapter-inducing IFN- $\beta$  (TRIF) recruitment to Toll-like receptor 3. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;51(3):446-454. doi:10.1165/rcmb.2014-0018OC
- 19- Kato K, Lillehoj EP, Park YS, et al. Membrane-tethered MUC1 mucin is phosphorylated by epidermal growth factor receptor in airway epithelial cells and associates with TLR5 to inhibit recruitment of MyD88. *J Immunol.* 2012;188(4):2014-2022. doi:10.4049/jimmunol.1102405
- 20- Menon BB, Kaiser-Marko C, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK. Suppression of Toll-like receptor-mediated innate immune responses at the ocular surface by the membrane-associated mucins MUC1 and MUC16. *Mucosal Immunol.* 2015;8(5):1000-1008. doi:10.1038/mi.2014.127
- 21- Williams MA, Bauer S, Lu W, et al. Deletion of the mucin-like molecule muc1 enhances dendritic cell activation in response to toll-like receptor ligands. *J Innate Immun.* 2010;2(2):123-143. doi:10.1159/000254790
- 22- Kyo Y, Kato K, Park YS, et al. Antiinflammatory role of MUC1 mucin during infection with nontypeable Haemophilus influenzae [published correction appears in Am J Respir Cell Mol Biol.2012 Apr;46(4):561. Gajhate, Sachin [corrected to Gajghate, Sachin]]. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;46(2):149-156. doi:10.1165/rcmb.2011-0142OC
- 23- Gibier JB, Hémon B, Fanchon M, et al. Dual role of MUC1 mucin in kidney ischemia-reperfusion injury: Nephroprotector in early phase, but pro-fibrotic in late phase. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(6):1336-1349. doi:10.1016/j.bbdis.2017.03.023
- 24- Gnemmi V, Bouillez A, Gaudelot K, Hémon B, Ringot B, Pottier N, Glowacki F, Villers A, Vindrieux D, Cauffiez C, Van Seuning I, Bernard D, Leroy X, Aubert S, Perrais M. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett.* 2014 May 1;346(2):225-36. doi:10.1016/j.canlet.2013.12.029.
- 25- Bouillez A., Gnemmi V., Gaudelot K., Hémon B., Ringot B., Pottier N., Glowacki F., Butruille C., Cauffiez C., Hamdane M., Sergeant N., Seuning I. Van, Leroy X., et al MUC1-C nuclear localization drives invasiveness of renal cancer cells through a sheddase/gamma secretase dependent pathway. *Oncotarget.* 2014; 5: 754-763.

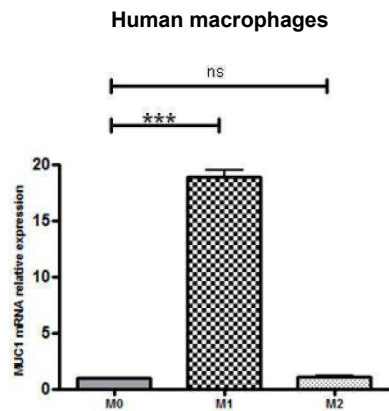
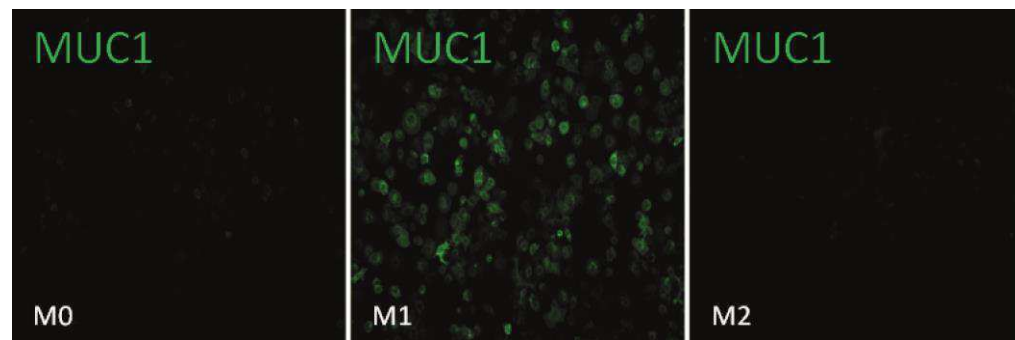
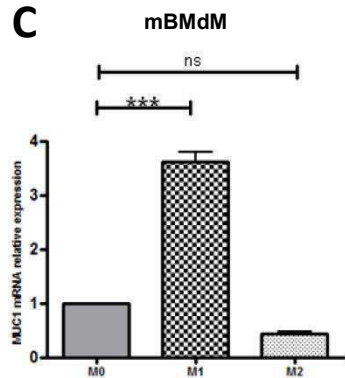
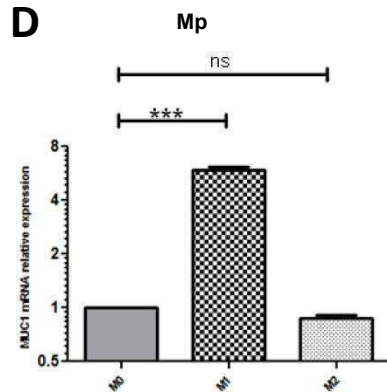
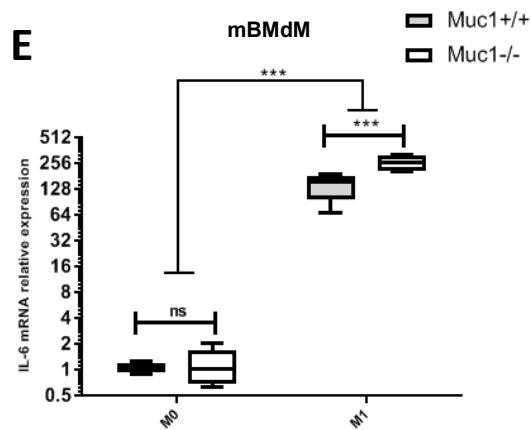
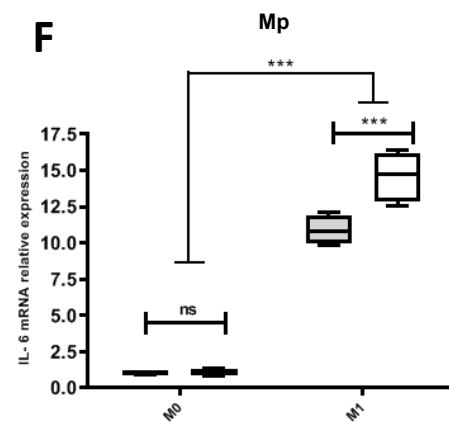
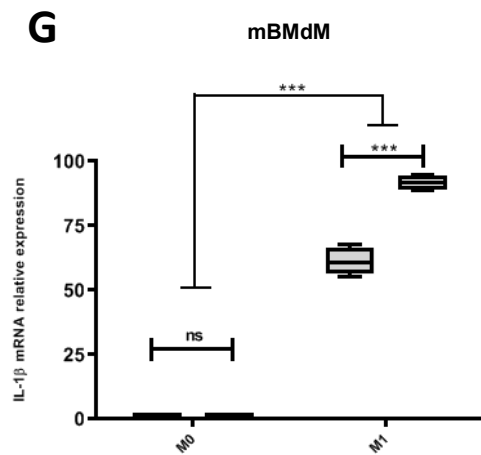
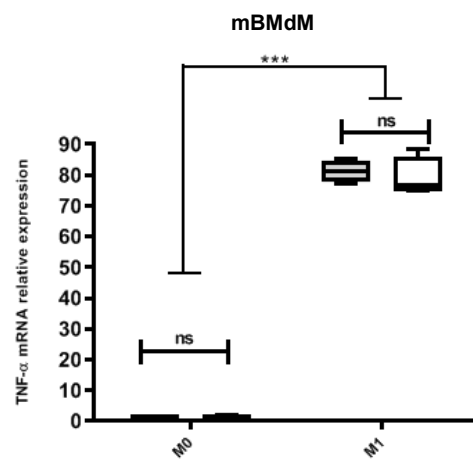
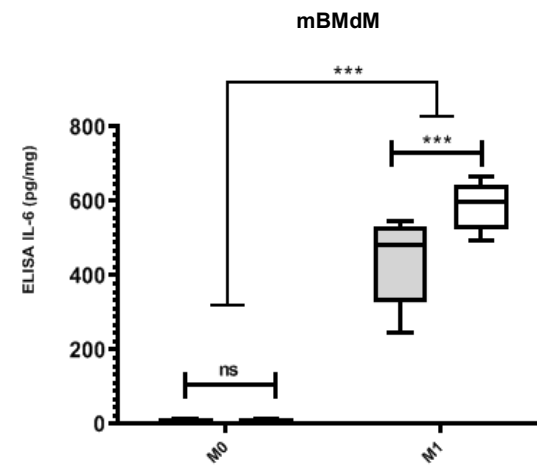
- 26- Bankhead, P. et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- 27- Dhar P, McAuley J. The Role of the Cell Surface Mucin MUC1 as a Barrier to Infection and Regulator of Inflammation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:117. Published 2019 Apr 24. doi:10.3389/fcimb.2019.00117
- 28- Pastor-Soler NM, Sutton TA, Mang HE, et al. Muc1 is protective during kidney ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(12):F1452-F1462. doi:10.1152/ajprenal.00066.2015
- 29- Cunningham, P. N., H. M. Dyanov, P. Park, J. Wang, K. A. Newell, R. J. Quigg. 2002. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *J. Immunol*. 168:5817.
- 30- Chen J, John R, Richardson JA, Shelton JM, Zhou XJ, Wang Y, Wu QQ, Hartono JR, Winterberg PD, Lu CY. Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*. 2011 Feb;79(3):288-99. doi: 10.1038/ki.2010.381.
- 31- Li Y, Zhai P, Zheng Y, Zhang J, Kellum JA, Peng Z. Csf2 Attenuated Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Promoting Alternative Macrophage Transition. *Front Immunol*. 2020;11:1415. Published 2020 Jul 7. doi:10.3389/fimmu.2020.01415
- 32- Liu F, Dai S, Feng D, et al. Distinct fate, dynamics and niches of renal macrophages of bone marrow or embryonic origins. *Nat Commun*. 2020;11(1):2280. Published 2020 May 8. doi:10.1038/s41467-020-16158-z
- 33- Hato T, Winfree S, Kalakeche R, et al. The macrophage mediates the renoprotective effects of endotoxin preconditioning. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(6):1347-1362. doi:10.1681/ASN.2014060561
- 34- Anderberg SB, Luther T, Frithiof R. Physiological aspects of Toll-like receptor 4 activation in sepsis-induced acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(3):573-588. doi:10.1111/apha.12798
- 35- Kato K, Lillehoj EP, Kim KC. MUC1 regulates epithelial inflammation and apoptosis by PolyI:C through inhibition of Toll/IL-1 receptor-domain-containing adapter-inducing IFN- $\beta$  (TRIF) recruitment to Toll-like receptor 3. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(3):446-454. doi:10.1165/rcmb.2014-0018OC
- 36- Wang YM, Ji R, Chen WW, et al. Paclitaxel alleviated sepsis-induced acute lung injury by activating MUC1 and suppressing TLR-4/NF- $\kappa$ B pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:3391-3404. doi:10.2147/DDDT.S222296
- 37- Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol*. 2002;168(3):1286-1293. doi:10.4049/jimmunol.168.3.1286

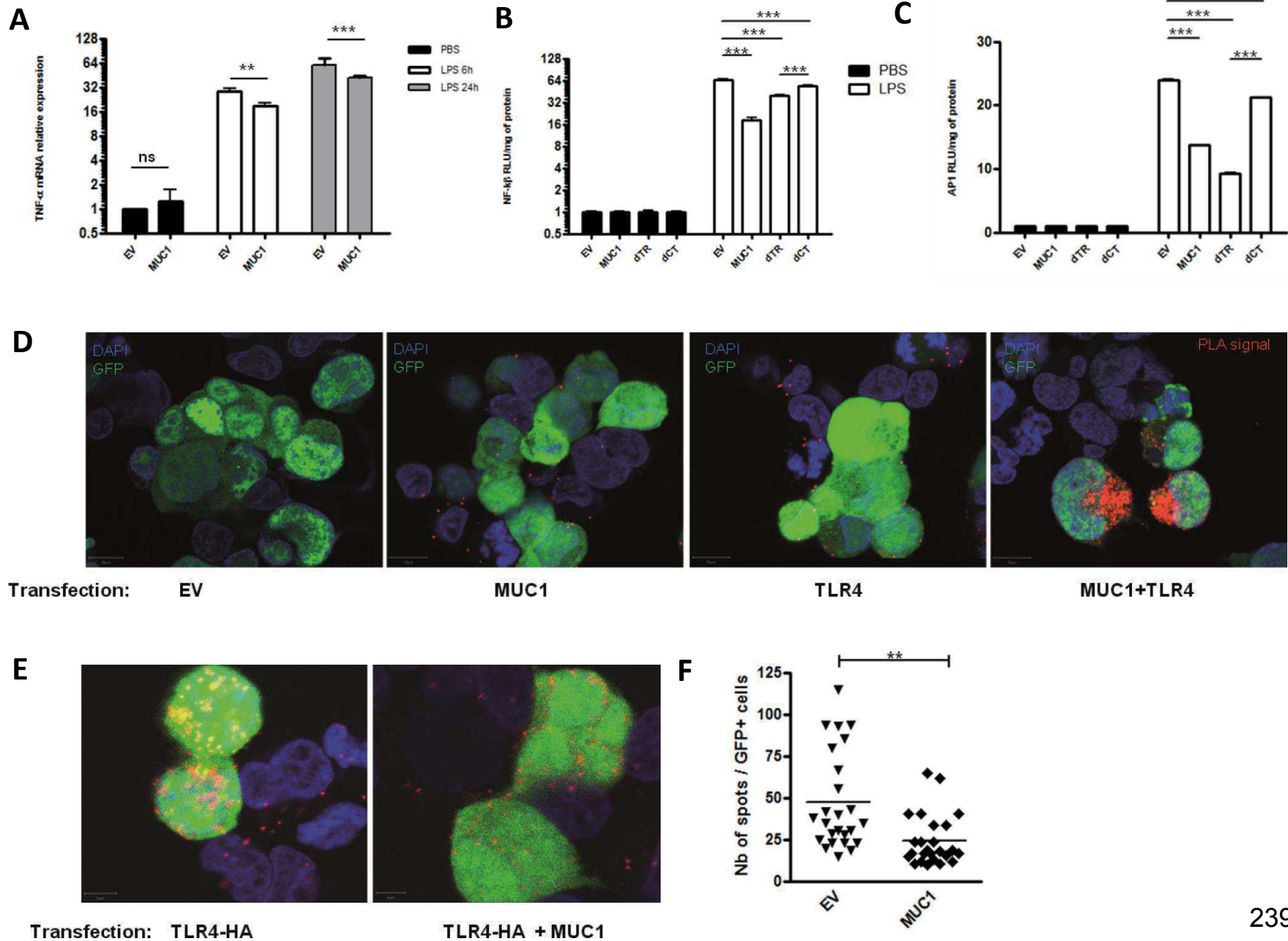
**Fig 1****A****C****E****B****D****F**

**Fig 2**



**Fig 3**

**Fig 4 A****B****C****D****E****F****G****H****I**

**Fig 5**



**AUTEUR : Nom : Gibier**

**Prénom : Jean-Baptiste**

**Date de soutenance : 25 janvier 2021**

**Lieu de soutenance : Université de Lille - Pôle formation -1 Place de Verdun, 59000 Lille, France ; Salle :**

**P.F. AMPHI VISIO**

**Titre de la thèse : Rôle de la mucine MUC1 en pathologie rénale non tumorale**

**Mots-clés : Rein, MUC1, Sepsis, Ischémie, Inflammation,**

**Résumé :** MUC1 est une glycoprotéine exprimée au niveau des tubes distaux et collecteurs du rein adulte. En pathologie rénale, elle est principalement connue pour être exprimée dans certains carcinomes rénaux et en raison de l'existence de mutations du gène responsables d'une forme rare d'insuffisance rénale chronique. Des travaux précédents de notre équipe ont mis en évidence une induction et un rôle néphroprotecteur de MUC1 dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion (IR). Afin de compléter les données sur le rôle de MUC1 dans ce modèle, nous avons spécifiquement étudié l'expression de MUC1 au niveau des tubes proximaux qui sont à l'origine des propriétés uniques de régénération du rein. Nous avons montré que MUC1 est induit dans les cellules épithéliales tubulaires et que son expression s'associe à une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) partielle qui est à l'origine de la plus grande plasticité de ces cellules. Par ailleurs, nous avons observé que l'expression persistante de MUC1 dans le parenchyme rénal est associée à une réparation incomplète des lésions parenchymateuses et à l'évolution vers la fibrose interstitielle et la dysfonction rénale chronique.

Dans un deuxième temps de notre travail, nous avons souhaité étudier le rôle immunomodulateur de MUC1. Dans le modèle d'IR, l'entretien des lésions ischémiques est secondaire à la mise en place d'une inflammation stérile caractérisée par l'activation de l'immunité innée qui succède à la libération de signaux de danger lors de la mort des cellules tubulaires. Dans le tractus respiratoire et digestif, il a été montré que MUC1 joue un rôle anti-inflammatoire notamment *via* l'inhibition des Toll Like Receptors (TLRs), une famille de récepteurs spécialisés dans la reconnaissance de ces signaux de danger. Dans le rein, le TLR4 est le principal TLR impliqué à la fois dans la réponse à l'IR et au sepsis. En utilisant un modèle d'insuffisance rénale aiguë septique par injection de lipopolysaccharide (LPS), un ligand spécifique du TLR4, nous avons pu montrer que MUC1 a une action néphroprotectrice *via* une diminution des signaux inflammatoires. Cette action de MUC1 est secondaire à son expression au niveau des macrophages pro-inflammatoires qui jouent un rôle central dans le sepsis. Plus précisément, l'effet anti-inflammatoire de MUC1 découle de l'inhibition du recrutement de la protéine adaptatrice MYD88 dès les premières étapes de la voie du TLR4. Au total, nos résultats montrent que MUC1 joue un rôle préalablement méconnu au cours de l'agression rénale aiguë qu'elle soit d'origine ischémique ou septique.

**Composition du Jury :**

**Président : Pr Marie-Christine Copin**

**Rapporteurs : Pr Alexandre Hertig, Pr Dominique Guerrot**

**Examinatrice : Dr Christelle Cauffiez**

**Directeur de thèse : Dr Viviane Gnemmi**