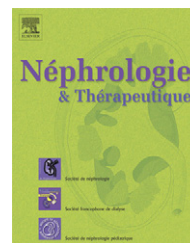




Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com



journal homepage: [//france.elsevier.com/direct/nephro/](http://france.elsevier.com/direct/nephro/)



Communications affichées

Recherche fondamentale

AR001 Affiche Recherche fondamentale

Les lymphocytes T gamma delta des patients transplantés rénaux s'activent contre les cellules infectées par le cytomégalo virus après engagement de leur TCR et grâce à l'interaction ICAM1/LFA1

L. Couzi ^{a,*}, S. Martin ^b, V. Pitard ^c, S. Netzer ^d, P. Merville ^b, J.-F. Moreau ^d, J. Dechanet-Merville ^d

^a Service de néphrologie, département de néphrologie, unité de transplantation, Bordeaux, France : ^b Service de néphrologie, service de néphrologie et transplantation, Bordeaux, France : ^c Cnrs Umr-5164, université Bordeaux-II, Bordeaux, France : ^d Cnrs Umr5164, université Bordeaux-II, Bordeaux, France

* Auteur correspondant.

Rationnel - Une expansion majeure des lymphocytes T gamma delta non delta 2 (LTgd) dans le sang périphérique des patients receveurs d'une allogreffe rénale survient lorsqu'ils développent une infection par le cytomégalo virus (CMV). Des clones de LTgd purifiés et isolés à partir des transplantés ayant développé une infection à CMV, tuent des fibroblastes infectés par le CMV et sont capables d'inhiber la réplication virale in vitro. Ces résultats apportent la preuve in vitro que des LTgd humains sont impliqués dans la réponse anti-virale protectrice contre le CMV. Nous avons constaté par ailleurs que les LTgd anti-CMV présentent une réactivité croisée vis-à-vis de cellules épithéliales tumorales intestinales.

But de l'étude - Montrer que la réactivité anti-CMV et anti-tumorale LTgd passe par l'engagement de leurs TCR.

Matériels et méthodes - Les chaînes gamma et delta d'un clone de LTgd (4-29) généré à partir des LTgd d'un trans-

planté rénal ont été transférées dans un lymphocyte T dépourvu de TCR (Jurkatt RT3 (JRT3) 4-29).

Résultats - Cette JRT3 4-29 est capable de s'activer en présence d'un anticorps (Ac) anti-CD3 ou anti-gd activateur par mesure de l'expression à sa membrane du CD69. La JRT3 4-29 s'active en présence des mêmes lignées tumorales que le clone gd 4-29 montrant ainsi que la réactivité anti-tumorale des LTgd est portée par les chaînes du TCR. En revanche, nous avons observé une absence de réactivité de la lignée JRT3 4-29 contre des fibroblastes (FSF) infectés par le CMV. Nous avons pu montrer que cette perte de réactivité était secondaire à : 1/ une faible expression du ligand du TCR (reconnu par un Ac généré au laboratoire) sur les FSF infectées par le CMV, 2/ à un déficit d'interaction entre ICAM1 sur les FSF infectés et LFA1 sur la JRT3 4-29 imputable à la faible expression de LFA1 sur les cellules JRT3.

Discussion - Ces données montrent que la réactivité du clone Tgd 4-29 est spécifique des chaînes du TCR, mais que l'interaction ICAM1-LFA1 est indispensable pour la réactivité anti-CMV alors qu'elle semble secondaire ou non indispensable dans la réactivité antitumorale. La surexpression de ICAM1 à la surface de la cellule infectée par le CMV semble même à l'origine de la réactivité puisque le niveau d'expression du ligand ne varie pas entre les FSF et les FSF infectées. L'identification de ce ligand reste désormais l'objectif à atteindre.

Conclusion - Les lymphocytes T gamma delta des patients transplantés rénaux s'activent contre les cellules infectées par le cytomégalo virus grâce à l'interaction de leur TCR avec leur ligand et mais aussi par l'interaction ICAM1/LFA1.

AR002 Affiche Recherche fondamentale**Effet bénéfique du potassium sur la pression artérielle : un nouveau mécanisme impliquant le rythme circadien particulier d'excrétion urinaire du potassium et son effet sur la diurèse et l'excrétion diurne du sodium**

J. Perucca, L. Bankir

Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS 872, Équipe 2, Inserm U652, Paris, France

Introduction - Il est bien établi qu'une supplémentation en K fait baisser la pression artérielle, mais le mécanisme de cet effet bénéfique n'est pas élucidé. Nous avons montré dans des travaux précédents qu'un débit urinaire faible freine l'excrétion du Na [1, 2]. D'autre part, il a été montré qu'une charge AIGUE en K induit une augmentation de la natriurèse. Mais l'influence d'une supplémentation en K CHRONIQUE sur le débit urinaire et sur l'excrétion de Na n'a pas été étudiée.

Matériels et méthodes - Nous avons étudié les effets d'un doublement ou quadruplement des apports en K (sous forme de KCl) (régimes 2K ou 4K) sur le débit urinaire et l'excrétion de Na chez des rats vigiles préalablement adaptés aux cages à métabolisme. Un groupe témoin a été maintenu à un régime normal en K (1K) pendant toute l'expérience (n = 12 rats par groupe). L'urine des 24h a été recueillie séparément pendant la période Active (A = 17h - 9h) et la période de Repos (R = 9h - 17h) pendant les jours 6 et 7 de supplémentation en K, alors qu'un nouvel état d'équilibre était atteint. N.B. : les rats étant nocturnes, la période "Active" correspond à la période diurne chez l'homme. Le débit urinaire (ml/h) et l'excrétion de K et de Na (micromol/h) ont été calculés pour chaque période et pour les 24h (moyennes des jours 6 et 7).

Résultats - Sous régime 1K, le K était excrété à un taux horaire deux fois plus élevé pendant A que pendant R. La supplémentation en K a fait augmenter l'excrétion de K surtout pendant A et peu durant R. Elle a aussi fait augmenter le débit urinaire de 24h de 50 et de 150 % respectivement ($p < 0,001$) par rapport au groupe 1K. Cette augmentation a surtout eu lieu durant A ($p < 0,001$), et pas (2K) ou peu (4K) durant R. L'excrétion de Na de 24h n'a pas été modifiée, mais le taux horaire d'excrétion a augmenté durant A et diminué durant R. Ainsi le rapport A/R d'excrétion de Na du groupe 2K a augmenté de 30 % ($p = 0,005$) sans augmentation supplémentaire dans le groupe 4K. La concentration du K dans l'urine pendant A a atteint 400 mmol/L dans le groupe 2K et 450 mmol/L dans le groupe 4K, la capacité à élever K dans l'urine au-dessus des valeurs plasmatiques atteignant sans doute à son maximum (concentration d'environ un facteur 100). L'augmentation de la diurèse associée à l'augmentation des apports en K est sans doute due à un mouvement osmotique d'eau lié à la sécrétion de K dans la lumière du canal collecteur.

Discussion - Ces résultats suggèrent un nouveau mécanisme pour les effets bénéfiques du K sur la pression artérielle. En augmentant le débit urinaire sélectivement durant A, K accélère l'excrétion de Na et réduit donc probablement le volume des liquides extracellulaires, ce qui doit limiter l'augmentation diurne de la volémie.

Conclusion - Les effets bénéfiques du K sur la pression artérielle pourraient être analogues à ceux d'un diurétique, ou plutôt sans doute à ceux d'un "aquarétique" (antagoniste des récepteurs V2 de l'hormone antidiurétique).

Références

- [1] Choukroun G et al., Am J Physiol 1997;273:R1726-R1733.
[2] Bankir L et al., J Am Soc Nephrol 2005;16:1920-1928.

AR003 Affiche Recherche fondamentale**Mise en évidence d'une interaction fonctionnelle entre le cotransporteur sodium-phosphate (NPT2a) et CFTR**N. Bakouh *, P. Hulin, F. Makaci, B. Cherif-Zahar, D. Prié, G. Friedlander, A. Edelman, G. Planelles
Faculté de médecine Necker-Enfants-Malades, Inserm U845, Paris, France

* Auteur correspondant.

Introduction - Les études épidémiologiques sur des patients atteints de la mucoviscidose révèlent des anomalies de la minéralisation osseuse et des néphrolithiases [1]. Au niveau de tubule proximal rénal, le CFTR est co-localisé avec le cotransporteur sodium-phosphate NPT 2a responsable de la réabsorption de phosphate Pi par le rein. Le but de notre travail est de rechercher s'il existe une interaction fonctionnelle entre le CFTR et NPT 2a.

Matériels et méthodes - Nous avons réalisé l'expression hétérologue de CFTR et/ou NPT 2a (porteur d'un tag Myc en N-ter) dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*, après injection des cRNA codant pour ces protéines. En configuration voltage imposé (-50 mV), le courant induit par 1 μ M de forskoline (reflétant l'activité canal chlorure de CFTR) et/ou le courant induit par 1 mM de Pi, I_{PI} (reflétant l'activité de NPT 2a) ont été mesurés. Les anticorps anti-CFTR 24-1et anti Myc ont été utilisés dans les expériences de co-immunoprécipitation.

Résultats - Lors de l'expression de NPT2a seul, I_{PI} n'est pas modifié en présence de forskoline (I_{PI} = -43,71 \pm 4,09 nA vs -50,50 \pm 3,80 nA, n = 21 ; $p = 0,1$). Dans les ovocytes co-exprimant CFTR et NPT2a, I_{PI} est significativement plus faible que dans les ovocytes exprimant NPT 2a seul (I_{PI} = -28,19 \pm 2,26 nA, n = 22 ; $p < 0,05$). Par contre, I_{PI} augmente significativement après stimulation par la forskoline du courant chlorure lié à CFTR (I_{PI} = -42 \pm 2,90 nA, n = 18 ; $p < 0,05$). Dans les ovocytes co-exprimant NPT2a et CFTR, l'analyse cinétique de NPT 2a montre une diminution de V_{max} , sans modification du K_m de phosphate, ce qui suggère une diminution de l'expression membranaire de NPT 2a et/ou une modification de l'activité intrinsèque du transporteur. Dans les expériences de co-immunoprécipitation, les lysats protéiques ont été immunoprécipités par l'anticorps anti-CFTR 24-1 ; le blot a été révélé par l'anticorps anti-myc, révélant une bande à 80kD qui correspond à la taille de la protéine NPT 2a.

Discussion - Nos résultats suggèrent l'existence d'une interaction fonctionnelle et moléculaire entre CFTR et NPT 2a. La nature de l'interaction fonctionnelle entre NPT 2a et CFTR est en cours d'étude, en particulier pour définir si elle est liée à l'activité canal chlorure de CFTR et/ou à des phé-

nomènes de phosphorylation d'un des 2 partenaires (voire d'un troisième).

Conclusion - Nos résultats montrent pour la première fois la régulation de NPT 2a par CFTR (régulateur d'autres transporteurs, en particulier ENaC). Nos résultats pourraient déboucher sur de nouvelles investigations du bilan de phosphate chez des malades atteints de mucoviscidose.

Référence

- [1] Yale J Biol Med. 1996 Jul-Aug;69(4):317. Links Cystic fibrosis and calcium oxalate nephrolithiasis. Chidekel AS, Dolan TF Jr.

AR004 Affiche Recherche fondamentale

L'aminoguanidine prévient le vieillissement vasculaire lié aux AGE (Advanced Glycation Endproducts) chez la souris diabétique

E. Boulanger^a, G. Prevost^{b,*}, H. Bulckaen^a, C. Gaxatte^a, G. Beraud^a, G. Robitaille^a, V. Roquet^a, P. Fontaine^c, F. Puisieux^a

^a Service de biologie du vieillissement vasculaire, faculté de médecine, Lille, France ; ^b Service d'endocrinologie-diabétologie, centre hospitalier, Douai, France ; ^c Service de diabétologie, CHRU Lille, Lille, France

* Auteur correspondant.

Introduction - L'implication des produits de la glycation avancée est démontrée dans les complications micro et macro angiopathiques secondaires au diabète. Nous avons analysé conjointement la cinétique des anomalies de vasomotricité endothélium-dépendante, l'épaisseur intima-média et l'expression du récepteur aux AGE (RAGE) sur des aortes de souris rendues diabétiques par la streptozotocine. L'effet protecteur de l'aminoguanidine, inhibiteur de la formation des AGE, a également été évalué.

Matériels et méthodes - La vasorelaxation endothélium-dépendante a été évaluée par la détermination de la courbe effet-dose de relaxation à l'acétylcholine sur des anneaux aortiques placés en chambre d'organe isolé et préalablement contractés par la phényléphrine. L'épaisseur intima-média et l'expression de RAGE (Western Blot) ont été conjointement quantifiées. L'effet de l'aminoguanidine a été évalué par son adjonction à l'eau de boisson (50 mg/Kg /j).

Résultats - La vasorelaxation endothélium dépendante est significativement altérée dès la 4^{ème} semaine de diabète ($52,7 \pm 4\%$ vs contrôle $76 \pm 5,6\%$, $p < 0,01$) avec aggravation additionnelle après 8 semaines de diabète ($34 \pm 5\%$, $p < 0,001$). L'épaisseur intima-média augmente significativement dès la 4^e semaine de diabète ($64 \pm 9 \mu\text{m}$ versus $50 \pm 3 \mu\text{m}$, $p = 0,01$). Simultanément, les concentrations d'AGE plasmatiques et l'expression du RAGE augmentent significativement chez les souris diabétiques. L'aminoguanidine prévient les anomalies de vasomotricité ($p < 0,01$), la surexpression du RAGE ($p < 0,01$) et limite l'augmentation de l'épaisseur intima-média ($p = 0,05$).

Discussion - L'efficacité de l'aminoguanidine dans les anomalies de vasorelaxation a déjà été décrite ; cependant, notre travail démontre que le traitement par l'aminoguanidine prévient simultanément la surexpression de RAGE et les anomalies histomorphologiques liées au diabète en particulier les lésions qui sont associées au stade précoce

d'athérosclérose telles que l'augmentation de l'épaisseur intima-media.

Conclusion - Notre travail établit une relation entre les effets délétères des AGE et la dysfonction vasculaire dont la prévention semble possible par les inhibiteurs de la glycation.

AR005 Affiche Recherche fondamentale

HLA-C et inhibition de l'alloréactivité : utilisation du R67mAb, anticorps anti-pan HLA-C

A. Jaquet, B. Schmeiser, B. Charpentier, O. Deas, A. Durrbach
Ifrnt néphrologie, dialyse et transplantation rénale-Inserm U542, CHU, Le Kremlin-Bicêtre, France

Introduction - Parmi les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I, HLA-C est caractérisée par son polymorphisme restreint et son activité complexe, pouvant à la fois être activatrice ou inhibitrice de la prolifération lymphocytaire. En transplantation, l'existence d'incompatibilités HLA-C est corrélée à la survenue de rejets aigus.

Matériels et méthodes - Le R67 mAb est un anticorps monoclonal produit chez le rat reconnaissant spécifiquement l'ensemble des molécules HLA-C. Nous avons testé l'effet de cet anticorps sur la réponse allogénique.

Discussion - Utilisé à des concentrations de l'ordre de 500 ng/ml, le R67 mAb inhibe la prolifération lymphocytaire lors de stimulation forte par OKT3/IL2 ou OKT3/CD28 ou lors de réaction lymphocytaire mixte (MLR). Cet effet inhibiteur est observé lors de cultures de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) mais non sur des populations de lymphocytes T purifiés, suggérant un rôle potentiel des macrophages dans le mécanisme inhibiteur (par cross-linking et/ou production de cytokines). Cet effet inhibiteur n'est pas dû à l'induction de la mort cellulaire (par apoptose ou nécrose), la mortalité cellulaire observée étant comparable à la mortalité des cellules non stimulées, mais est lié à l'inhibition de la prolifération lymphocytaire. Cet effet est réversible. De plus R67 mAb inhibe l'activation (priming) lymphocytaire. Les voies de signalisation impliquant le R67 mAb sont actuellement à l'étude.

Conclusion - Ainsi, l'inhibition de l'interaction entre HLA-C et TCR pourrait s'avérer être une stratégie utile pour limiter l'alloréactivité lymphocytaire. Dans ce contexte, le R67mAb pourrait constituer un nouvel outil thérapeutique en transplantation.

AR006 Affiche Recherche fondamentale

Belatacept induit l'expression de HLA-G in vivo et in vitro via les cellules dendritiques myéloïdes

R. Bahri^a, A. Naji^b, N. Rouas-Freiss^b, E. Carosella^b, B. Charpentier^a, A. Durrbach

^a Ifrnt néphrologie, dialyse et transplantation rénale-Inserm U542, CHU, Le Kremlin-Bicêtre ; ^b Service d'immunologie, Cea, Paris, France

Introduction - Belatacept est une nouvelle molécule (CTLA4-Ig) qui interfère avec le deuxième signal d'activation des lymphocytes T. CTLA4-Ig induit la tolérance d'allo-

greffe de cellules T chez les rongeurs. Chez l'homme, elle n'est pas associée à l'expansion de lymphocytes régulateurs (CD4+CD25+high). HLA-G est une molécule qui est associée à une meilleure tolérance de greffe.

Matériels et méthodes - L'expression de HLA-G a été déterminée par ELISA chez les malades traités par Belatacept (étude 100-300) (n = 10) ou dans le groupe contrôle traité par Néoral. Les cellules circulantes exprimant HLA-G ont été déterminées.

Discussion - Chez 7 des 10 malades testés et traités par Belatacept, l'expression de HLA-G a pu être déterminée dans le sérum alors que HLA-G n'a pas été détecté dans le sérum de malades du groupe contrôle. HLA-G soluble, identifié chez ces malades, a été purifié à l'aide de billes magnétiques recouvertes de l'anticorps spécifique 4H84. Il

inhibe la prolifération de lymphocytes T alloréactifs in vitro alors que les mêmes billes incubées avec le sérum de malades traités par Néoral n'ont aucun effet. Par analyse immunocytométrique (utilisant l'anticorps 4H84), nous avons pu observer que seules les cellules CD34+ mais non les lymphocytes de ces malades expriment HLA-G. De plus, nous avons observé que les cellules dendritiques d'origine myéloïdes de malades traités par Belatacept et non celles de malades traités par Néoral expriment HLA-G. In vitro, nous avons pu observer que des cellules dendritiques traitées par HLA-G et traitées par LPS et Interféron expriment HLA-G.

Conclusion - Nos résultats indiquent que Belatacept induit l'expression de HLA-G in vivo et in vitro. Cette molécule, associée à une meilleure tolérance de greffe, pourrait permettre le suivi thérapeutique de malades traités.