

THÈSE



Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS UFR de médecine et de pharmacie Ischémie reperfusion en transplantation d'organes mécanismes et innovations thérapeutiques -IRTOMIT (Poitiers) (Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

> École doctorale : Sciences Biologiques et Santé (Limoges) Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

> > Présentée par : Louise Barbier

Rôle de l'alarmine IL-33 dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique

Directeur(s) de Thèse : André Herbelin, Ephrem Salamé

Soutenue le 20 décembre 2019 devant le jury

<u>Jury :</u>

Président	Christine Silvain	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Rapporteur	Jean-Pierre Couty	Professeur, CRC, Université Paris Diderot
Rapporteur	Mickaël Lesurtel	Professeur et praticien hospitalier, CHU, Lyon
Membre	André Herbelin	Directeur de recherche INSERM, IRTOMIT, Poitiers
Membre	Ephrem Salamé	Professeur et praticien hospitalier, Université F. Rabelais, Tours
Membre	Claire Piquet-Pellorce	Maître de conférences, IRSET, Université de Rennes

Pour citer cette thèse :

Louise Barbier. *Rôle de l'alarmine IL-33 dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion hépatique* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2019. Disponible sur Internet http://theses.univ-poitiers.fr

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

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

Ecole Doctorale « Sciences Biologiques & Santé »

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Mme Louise BARBIER

Rôle de l'alarmine IL-33 dans un modèle murin d'ischémiereperfusion hépatique

Directeurs de Thèse : Dr André HERBELIN – Pr Ephrem SALAME

Soutenue le 20/12/2019 devant la Commission d'Examen

<u>JURY</u>

Dr André HERBELIN, Poitiers, Co-directeur Pr Ephrem SALAME, Tours, Co-directeur Pr Christine SILVAIN, Poitiers, Présidente Dr Jean-Pierre COUTY, Paris, Rapporteur Pr Mickaël LESURTEL, Lyon, Rapporteur Dr Claire PIQUET-PELLORCE, Rennes, Examinatrice

RESUME

<u>Introduction</u>: L'interleukine (IL)-33 joue un rôle d'alarmine dans l'initiation de la réponse inflammatoire aux lésions d'ischémie-reperfusion (I/R) rénale, impliquant les lymphocytes T "invariant natural killer" (iNKT).

<u>Objectifs</u> : Déterminer si l'IL-33 agit également comme une alarmine en I/R hépatique et évaluer la contribution de l'IL-33 et des cellules iNKT dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles et des monocytes/macrophages après I/R.

<u>Méthodes</u> : Nous avons choisi un modèle d'ischémie chaude hépatique par clampage à 70% du foie de Souris C57BL/6 sauvages, déficientes en IL-33 (IL-33 KO) ou déficientes en cellules iNKT (J α 18 KO). La sévérité des lésions d'I/R a été évaluée par dosage plasmatique des Alanine amino transférases (ALAT) et analyse histologique des lobes de foie clampés. L'IL-33 a été déterminée dans le sang et le foie, respectivement par ELISA (pour « *enzyme-linked immunosorbent assay* ») et western blot et sa néo-synthèse par RT-PCRq (pour « *reverse transcriptase-polymerase chain reaction quantitative* »). Le recrutement des cellules immuno-inflammatoires dans le foie après I/R a été analysé par cytométrie en flux.

<u>Résultats</u> : Chez les Souris sauvages, l'IL-33 était constitutivement exprimée dans les cellules endothéliales des sinusoïdes et des veinules portes du foie et était immédiatement libérée pendant la phase d'ischémie dans la circulation sanguine sans néo-synthèse. Quatre heures après la reperfusion, les lésions d'I/R étaient diminuées chez les souris déficientes en IL-33, comparativement aux souris sauvages. Ainsi, dès les premières heures après l'ischémie, l'IL-33 agit comme une alarmine et est en partie responsable des lésions d'I/R.

Les lésions d'I/R étaient également diminuées chez les souris déficientes en cellules iNKT, tandis que chez les Souris sauvages, les cellules iNKT étaient activées en périphérie (dans la rate) et recrutées localement. Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages étaient recrutés dans le foie après une heure de reperfusion chez les Souris sauvages, alors que ce recrutement était significativement réduit chez les souris déficientes en IL-33 et chez les souris déficientes en iNKT, suggérant qu'à la fois l'IL-33 et les cellules iNKT contribuent au recrutement de cellules immuno-inflammatoires. Enfin, le recrutement des cellules iNKT était significativement diminué chez les souris déficientes en IL-33 comparativement aux souris sauvages. Cet ensemble de résultat est conciliable avec l'existence d'un axe IL-33/iNKT intervenant dans les phases précoces de l'inflammation lors de l'I/R hépatique.

<u>Conclusion</u> : L'IL-33, en tant qu'alarmine, contribue précocement aux lésions d'I/R hépatique. Elle pourrait agir en mobilisant les cellules iNKT, lesquelles avec l'IL-33, amplifieraient le recrutement des cellules immuno-inflammatoires. L'IL-33 constitue donc une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour réduire les lésions d'I/R en transplantation hépatique.

SUMMARY

Role of the alarmin IL-33 in a mouse model of hepatic ischemia-reperfusion injury

<u>Introduction</u>: Interleukin (IL)-33 plays a role as an alarmin in the initiation of the inflammatory response in renal ischemia/reperfusion (I/R) injury, involving invariant natural killer T (iNKT) cells.

<u>Aims</u>: The aim of this study was to establish whether IL-33 also acts as an alarmin in hepatic I/R injury and to explore the contribution of IL-33 and iNKT cells in the recruitment of neutrophil granulocytes and monocytes/macrophages after I/R.

<u>Methods</u>: A model of warm hepatic ischemia with clamping of 70% of the liver was chosen in wildtype mice, IL-33 knock out (KO) mice and iNKT cell-deficient (J α 18 KO) mice with C57BL/6 background. Severity of I/R injury was assessed by plasma alanin-aminotransferase (ALT) measurement and histological analysis. Interleukin-33 was measured in blood and in liver by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and western blot while IL-33 neo synthesis was measured by RT-qPCR (reverse transcriptase- quantitative polymerase chain reaction). The recruitment of immune cells in liver after I/R was analyzed by flow cytometry.

<u>Results</u>: In wild-type mice, IL-33 was constitutively expressed in liver endothelial cells of the sinusoids and of the portal venules, and was released from the ischemic phase and its immediate course into systemic circulation without neo-synthesis. I/R injury was decreased in IL-33-deficient mice after 4 hours of reperfusion, comparing to wild type mice. Therefore, in the first hours after ischemia, IL-33 acts as an alarmin and is at least partly responsible for I/R injury.

I/R injury was also decreased in iNKT cell-deficient mice after 4 hours while in wild-type mice, iNKT cells were found activated in periphery (spleen) and recruited locally. Neutrophil granulocytes and monocytes/macrophages were recruited in the liver after one hour of reperfusion in wild type mice, whereas this recruitment was decreased in IL-33-deficient mice and in iNKT cell-deficient mice. These findings along with the fact that recruitment of iNKT cells was significantly decreased in IL-33 deficient mice, as compared to WT, lead to propose that an IL-33/iNKT cell axis mediates the early stages of inflammation in I/R liver injury.

<u>Conclusion</u>: Interleukin-33, as an alarmin, early contributes to I/R liver injuries. It could act by recruiting iNKT cells that would in turn amplify the recruitment of immuno-inflammatory cells together with IL-33. Interleukin-33 hence represents a major potential therapeutic target to decrease I/R injury in liver transplantation.

Mots clés : foie, transplantation, famille IL-1, inflammation, IL-33, alarmine, cellules natural killer

Т

Key words: liver, transplantation, IL-1 family, inflammation, IL-33, alarmin, natural killer T cells

« Rien ne peut arrêter mon âme fugitive » Pour ma mère, pour ma fille

SOMMAIRE

Abréviations1
Avant-propos4
Introduction générale9
1. Le foie : un organe à part
1.5.3. Tolérance et axe intestin-foie 1.6. Dérégulation immunitaire et maladies hépatiques
2. Inflammation stérile et I/R
3. L'IL-33, un modèle d'alarmine
4. L'immunité naturelle, à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative42
5. Les cellules NKT

5.1.3. Les cellules iNKT chez l'Homme et la Souris	
5.1.4. La molécule CD1 et la présentation de lipides	
5.2. Les cellules INKT, acteurs de l'Inflammation sterile et de l'Immunité natu	relie47
5.2.1. Interactions avec les autres centres infinitimentes	nulations
de NIKT	pulations
5.3 Implication des cellules iNKT dans les maladies	49
5.3.1 Infections	
5.3.2. Immunité anti-tumorale	
5.3.3. Maladies auto-immunes et inflammatoires	
5.3.4. Maladies hépatiques	
5.4. Rôle des iNKT dans la genèse des lésions d'ischémie-reperfusion hépatiq	ue52
5.4.1. Arguments plaidant pour un axe IL-33/iNKT	
Objectifs du travail	55
Démarche expérimentale	57
·	
1. Développement du modèle d'ischémie chaude-reperfusion chez la Souris	58
1.1. Description du modèle	58
1.2. Intérêt et contraintes du modèle	59
2. Développement de la grille de lecture histologique	60
2.1. Remarques générales sur l'analyse histologique des foies de Souris	60
2.2. Lésions histologiques liées à l'1/R	61
2.3. Développement d'une grille de lecture standardisée	65
	60
Article original	68
Discussion generale et Perspectives	118
1. Mise en perspective des resultats du travail par rapport à la litterature	
1.1. Resume des principaux resultats dans la mécanistique de l'U/P	119
1.2. Integration de nos resultats dans la mecanistique de l'I/R	119
2 Une phase encore plus précoce indépendante de l'11-33	123
3. Les sources d'IL-33	127
3.1. IL-33 constitutive	127
3.2. IL-33 en situation de stress	127
4. L'axe IL-33/ST2	130
4.1. Effet direct de l'IL-33 sur le recrutement des PNNs	130
4.2. Effet de l'IL-33 sur les cellules iNKT	130
4.3. Mise en jeu du récepteur spécifique de l'IL-33 ?	132
4.4. L'IL-33 dans l'I/R rénale et hépatique	132
4.5. Autres rôles de l'IL-33	132

5. L'axe IL-33/iNKT	
5.1. L'activation précoce des cellules iNKT n'est pas responsable	
du relargage d'IL-33	133
5.2. L'IL-33 envoie un signal de danger aux cellules iNKT	
5.3. Existence d'un rétrocontrôle positif de la synthèse d'IL-33	
par les cellules iNKT ?	136
5.4. Un switch vers la réparation ?	137
6. Généralisation des résultats chez l'Homme	
Conclusion générale	142
Ribliographia	1/2
Dibilographile	145
Annexes	151

- Implication de l'équipe dans le travail et valorisation
- **Revue 1.** <u>Barbier L</u>, Ferhat M, Salamé E, Robin A, Herbelin A, Gombert JM, Silvain C, Barbarin A. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. Front Immunol. 2019 Aug 27;10:2014.
- **Revue 2.** Ferhat MH, Robin A, <u>Barbier L</u>, Thierry A, Gombert JM, Barbarin A, Herbelin A. The Impact of Invariant NKT Cells in Sterile Inflammation: The Possible Contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33. The Impact of Invariant NKT Cells in Sterile Inflammation: The Possible Contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33.

Figures et tableaux du manuscrit hors article

Figure 1. Conséquences de l'I/R et objectifs en lien avec le contrôle de l'I/R en
transplantation hépatique7
Figure 2. Division des afférences vasculaires au foie déterminant le foie droit et le foie
gauche11
Figure 3. Anatomie du foie Humain avec son système veineux12
Figure 4. Anatomie du foie de Souris, face ventrale13
Figure 5. Le lobule hépatique, schéma fonctionnel14
Figure 6. Le lobule hépatique, dessins et coupe histologique15
Figure 7. Les cellules immunitaires du foie16
Figure 8. Répartition des différentes populations cellulaires dans le foie Humain17
Figure 9. Signaux externes et paracrines impliqués dans la régénération hépatique après
hépatectomie à 70%22
Figure 10. Les différentes étapes de l'I/R
Figure 11. Place des différents types d'immunité en fonction du temps après stimulation43
Figure 12. Les trois voies d'activation des cellules NKT47
Figure 13. Implication des cellules NKT dans la genèse des pathologies hépatiques52
Figure 14. Objectifs du travail56
Figure 15. Clampage de 70% du foie58
Figure 16. Foie normal62
Figure 17. Foie après clampage : souffrance hépatocytaire et stéatose micro vésiculaire63
Figure 18. Foie après clampage : congestion sinusoïdale et œdème portal64
Figure 19. Grille de lecture anatomo-pathologique standardisée des lésions d'I/R chez la
Souris67
Figure 20. Schéma récapitulatif des principaux résultats de l'étude121
Figure 21. Intégration de nos résultats dans la mécanistique des lésions d'I/R122
Figure 22. Dosage plasmatique des ALT (UI/L) et score histologique d'I/R chez les Souris
Sham et après une heure de reperfusion, chez les Souris sauvages, déficientes en IL-33 et
déficientes en cellules iNKT124

Figure 23. Coupes histologiques du foie chez une Souris sauvage et déficiente en IL-33 après
une heure de reperfusion125
Figure 24. Détection du stress oxydatif en immunofluorescence par CellROX sur une coupe
de foie issue d'une Souris sauvage, 1 heure après reperfusion126
Figure 25. Coupes histologiques de foie de Souris WT après 4 heures et 8 heures de
reperfusion129
Figure 26. Immunohistochimie avec marquage des PNNs par Ly6G après 24 heures de
reperfusion131
Figure 27. L'activation précoce des cellules iNKT ne s'accompagne pas d'une modification du
relargage d'IL-33
Figure 28. La production d'IFNy des cellules iNKT induite précocement par l'I/R hépatique
dépend de l'IL-33136
Figure 29. Diagramme de flux de l'étude observationnelle chez l'Homme140

Tableau 1. Principaux DAMPs et leurs récepteurs	30
Tableau 2. Mécanismes de réparation médiés par les cellules immunitaires innées	après
lésion stérile	31
Tableau 3. Les deux types de cellules NKT	45
Tableau 4. Grille de lecture anatomo-pathologique des biopsies à coeur battant et	après
déclampage du greffon	141

Figures et tableaux de l'article

Figure 1. Interleukin-33 is constitutively expressed in the nucleus of liver endothelial cells
from the portal venules and the sinusoids100
Figure 2. Plasma levels of IL-33 reach peak levels at the end of the ischemic phase and
returns to basal state after 24 hours of reperfusion101
Figure 3. Interleukin-33 is immediately released in systemic circulation in response to
hepatic pedicle clamping102

Figure 4. Interleukin-33-deficient mice are protected against I/R injury after 4 hours of
reperfusion
Figure 5. Immuno-inflammatory cells are early recruited during liver I/R104
Figure 6. Early immuno-inflammatory cell recruitment and I/R lesions are attenuated in iNKT
cell- deficient mice105
Figure 7. Invariant NKT cells are activated in spleen and recruited in the liver in WT mice but
not in IL-33-deficient mice106

Supplementary data

Supplementary Table 1. Histological grading of I/R injuries in mice107
Supplementary Figure 1. Experimental procedure of hepatic warm I/R injury108
Supplementary Figure 2. Gating strategy for immuno-inflammatory and iNKT cell analysis by
flow cytometry109
Supplementary Figure 3. Controls from Figure 1A110
Supplementary Figure 4. Plasma levels of IL-6 and expression of <i>il-6</i> mRNA in the liver111
Supplementary Figure 5. Expression of II-33 mRNA assessed by RT-qPCR method in the
clamped liver lobes before any surgical procedure (T0), in Sham animals, at the end of the
ischemia phase (I(70min)) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h))112
Supplementary Figure 6. Liver I/R injury in clamped and non-clamped liver lobes of WT and
IL-33-deficient mice113-114
Supplementary Figure 7. Representative results for flow cytometry analysis of neutrophils
(CD11b+GR-1 ^{high}), macrophages (CD11b+F4/80+), and monocytes (CD11b ^{high} F4/80 ^{low} GR-
1 ^{low})
Supplementary Figure 8. Representative results for flow cytometry analysis of iNKT
cells
Supplementary Figure 9. CD69 expression (Mean Fluorescence Intensity) in iNKT cells117

ABREVIATIONS

- ADN : acide désoxyribonucléïque
- ATP : adénosine triphosphate
- **CBP** : cholangite biliaire primitive
- CD40L : CD40 ligand
- **CD** : cellule dendritique
- **CHC :** carcinome hépatocellulaire
- CK : cellule de Kupffer
- CPA : cellules présentatrices de l'antigène
- **CSF-1**: colony stimulating factor-1
- CXCL-2 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
- DAMP : danger-associated molecular pattern
- DBD : donation after brain death
- DCD : donation after cardiac death
- CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
- **ECD** : extended criteria donors
- **EGF** : *epidermal growth factor*
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
- EP: espace porte
- HBV : virus de l'hépatite B
- **VHC :** virus de l'hépatite C
- **HGF** : hepatocyte growth factor
- **HIF-1** α : hypoxia-inductible factor 1 α
- HLA : human leukocyte antigen
- **HMGB-1**: high-mobility group box-1
- ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1
- IL : interleukine
- ILC : innate lymphoid cells
- iNKT : Natural Killer T invariantes
- I/R : ischémie/reperfusion
- LSECs : liver sinusoidal endothelial cells
- MAF : maladie alcoolique du foie
- MAMP : microbe-associated molecular pattern

- MAPK : mitogen-activated protein kinases
- MCPIP-1 : monocyte chemoattractant protein-induced protein 1
- MyD88 : myeloid differentiation primary response 88
- **NAFLD :** non alcoholic fatty liver disease
- **NET :** neutrophil extracellular traps
- **NF-кB** : nuclear factor-кВ
- **NKT :** natural killer T
- NK : natural killer
- NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
- NOX : neutrophil NADPH oxidase
- **OPN**: osteopontine
- **PBS** : phosphate-buffered saline
- **PNN :** polynucléaire neutrophile
- PRR : pattern recognition receptor
- RAGE : receptor for advanced glycation end products
- **RT-PCRq :** reverse transcriptase-polymerase chain reaction quantitative
- **SOCS** : suppressors of cytokine signaling
- **ST2** : suppression of tumorigenicity 2
- VAP-1: vascular adhesion protein-1
- VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1
- VCL : veine centrolobulaire

AVANT-PROPOS

La transplantation hépatique constitue le traitement curatif de choix dans de nombreuses maladies hépatiques chroniques terminales, en cas d'insuffisance hépatique aigüe et pour certaines tumeurs primitives et secondaires. L'augmentation des indications de greffe et la diminution de la mortalité par accident chez les personnes jeunes a progressivement abouti à un déséquilibre entre le nombre de donneurs et le nombre de receveurs, puisqu'actuellement, selon le dernier rapport de l'agence de biomédecine, 2,5 patients sont en attente de transplantation hépatique pour un donneur en France.

L'amélioration des résultats de la greffe hépatique a d'abord été le résultat d'une meilleure immunosuppression et des progrès techniques chirurgicaux. Cependant, la nécessité d'augmenter le pool des donneurs et de diminuer le nombre de retransplantations a amené à réfléchir au contrôle des phénomènes liés à l'ischémie et à la reperfusion, inhérents à la transplantation d'organes solides (voir **Figure 1**).

Les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R) concernent l'ensemble des populations cellulaires constituant le foie, avec notamment une atteinte des hépatocytes, à l'origine d'un retard ou d'une absence de fonction, des cellules endothéliales, avec des thrombi micro vasculaires, et des cellules cholangiolaires, avec une augmentation des lésions de cholangite ischémique. Toutes ces atteintes contribuent à une diminution de la survie des greffons, et justifient désormais que le contrôle des lésions d'I/R soit considéré comme un enjeu crucial.

La nécessité d'augmentation du pool des greffons implique depuis une dizaine d'années l'utilisation de greffons dits « à critères étendus », tels que les greffons stéatosiques, les greffons de donneurs âgés ou les greffons de donneurs ayant présenté un arrêt cardiaque (cas par exemple des donneurs de la catégorie 3 de Maastricht). L'arrêt cardiaque chez le donneur est à l'origine d'une ischémie chaude, qui s'ajoute à l'ischémie froide entre l'explantation chez le donneur et l'implantation chez le receveur, et est plus particulièrement à l'origine de lésions de la microcirculation affectant les voies biliaires.

Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires d'initiation des lésions d'I/R et des voies de signalisation engageant la réponse cellulaire immuno-inflammatoire est nécessaire pour pouvoir proposer des cibles thérapeutiques chez le receveur, en particulier en cas de conservation

réfrigérée statique du greffon, ou en complément de l'utilisation des machines de perfusion normo et hypothermiques.

Le modèle murin est un modèle particulièrement intéressant pour la modélisation de l'I/R hépatique en raison des lignées de Souris déficientes pour certaines molécules de signalisation ou certains types cellulaires impliqués dans l'inflammation stérile engendrée par l'I/R.

En tant que clinicienne en transplantation hépatique, j'ai fait le choix dans le cadre de ma thèse d'étudier les éléments moléculaires et cellulaires précoces impliqués dans l'activation du système immuno-inflammatoire suivant la reperfusion du greffon. La première partie de ma recherche constitue mon travail de thèse et est menée sur un modèle murin d'ischémie chaude ; la deuxième partie, dans la continuité, visera à valider ou non les hypothèses développées chez la Souris dans le cadre de la transplantation hépatique chez l'Homme.



Conséquences de l'ischémie et de la reperfusion		
Lésions parenchymateuses	Plus de non-fonction primaire du greffon	
	Plus de retard à la reprise de fonction	
Lésions endothéliales	Thromboses micro vasculaires	
	Thromboses sinusoïdales	
Lésions biliaires	Sténoses biliaires non-anastomotiques tardives	
Augmentation du rejet ?		
-> Diminution de la survie du greffon		



Figure 1. Conséquences de l'I/R et objectifs en lien avec le contrôle de l'I/R en transplantation hépatique

La transplantation d'un organe tel que le foie implique une phase d'ischémie, après clampage chez le donneur (A), pendant laquelle le greffon est transporté, le plus souvent de façon réfrigérée et statique. La phase d'ischémie froide est suivie d'une phase de reperfusion chez le receveur (B), après mise en circuit de la veine cave et de la veine porte. Ce phénomène aboutit à des lésions histologiques du greffon d'I/R affectant l'ensemble des populations cellulaires du foie et impactant négativement la survie des greffons. Les stratégies pour diminuer l'I/R, telles que l'utilisation de machines de perfusion (**graphe en bas à gauche**) ou l'inhibition de ses voies de signalisation, visent à augmenter la survie des greffons (**graphe en bas à droite**), ainsi qu'à augmenter le pool de greffons en rendant plus sûre l'utilisation de greffons provenant de donneurs à critères étendus, de moins bonne qualité et plus sensibles à l'ischémie.

Photo histologique extraite de R. Lopez Panqueva, *Revista Colombiana de Gastroenterologia*, 2016 (1) ; Graphe en bas à gauche extrait de Matton A, *Liver Transpl* 2014 (2) : ECD : pour « *extended criteria donors* », DBD : pour « *donation after brain death* », DCD : pour « *donation after cardiac death* » ; Graphe en bas à droite extrait du Rapport 2018 de l'Agence de la Biomédecine disponible à l'adresse suivante : <u>https://www.agence-biomedecine.fr/</u>. Les éléments en vert indiquent le gain potentiel en termes de qualité du greffon (**graphe en bas à gauche**) et de survie (**graphe en bas à droite**) lié au contrôle des phénomènes d'I/R.

INTRODUCTION GENERALE

Le foie est indispensable à la vie et ne peut être suppléé. Il assure des fonctions de synthèse (albumine, facteurs de coagulation), de métabolisme (des lipides et des glucides notamment), de dégradation (des médicaments par exemple) et d'excrétion de bilirubine. Il s'agit d'un organe central qui assure des fonctions essentielles à l'homéostasie de l'organisme.

1.1. Rappels anatomiques du foie

1.1.1. Anatomie descriptive et fonctionnelle commune à l'Homme et la Souris

Le foie est un organe intra-abdominal situé dans l'hypochondre droit, sous l'auvent costal.

La particularité du foie est sa double vascularisation systémique et porte qui la différencie des autres organes. On distingue également sur le plan vasculaire ce qui arrive au foie (l'afflux sanguin, vascularisation afférente) et ce qui en part (l'efflux sanguin, vascularisation efférente).

Le pédicule hépatique est l'élément par lequel arrive l'afflux sanguin. Il comprend les éléments suivants qui cheminent côte à côte dans la capsule de Glisson, depuis le hile hépatique jusqu'à l'intérieur du parenchyme :

- la veine porte, qui transporte vers le foie l'ensemble du sang veineux faiblement oxygéné provenant du système digestif et de la rate (environ 70% de l'afflux sanguin),

- l'artère hépatique, naissant du tronc cœliaque, qui transporte du sang oxygéné et qui participe notamment à la vascularisation des voies biliaires (environ 30% de l'afflux sanguin),

- les voies biliaires.

Les éléments du pédicule hépatique cheminent ensemble dans la capsule de Glisson, et se divisent au fur et à mesure des différents lobes hépatiques. L'afflux sanguin vers le foie est donc assuré par les branches de la veine porte et de l'artère hépatique. Le drainage veineux du foie (l'efflux sanguin) est assuré par les veines hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure, ramenant ainsi le sang « traité » par le foie vers la circulation systémique.

1.1.2. Particularités chez l'Homme

Le foie chez l'Homme représente environ 2% du poids du corps et est constitué d'un foie droit et d'un foie gauche. La division en 8 segments suit la division des pédicules glissoniens au fur et à mesure de leur pénétration dans le parenchyme hépatique (voir **Figures 2 et 3**). Au repos, environ 25% du débit cardiaque perfuse le foie. Le foie contient 10 à 15% du volume sanguin total, et le sang représente 20 à 25% du volume du foie. Le volume sanguin hépatique peut augmenter passivement en cas d'élévation de la pression dans les sinusoïdes, par exemple en cas d'insuffisance cardiaque droite ou d'obstruction des veines hépatiques, le foie apparaissant alors congestif.



Figure 2. Division des afférences vasculaires au foie (veine porte et artère) déterminant le foie droit (segments V à VIII) et le foie gauche (segments I à IV)

Schéma issu de l'encyclopédie médico-chirurgicale (EMC, Elsevier-Masson).



Figure 3. Anatomie du foie Humain avec son système veineux

Bleu clair : système porte, Bleu foncé : système cave inférieur. Les chiffres en gras indiquent les numéros des segments.

A : 1 : veine cave inférieure, 2 : branche portale droite, 3 : branche portale gauche, 4 : branche portale gauche, 4 : veine hépatique droite, 5 : veine hépatique moyenne, 6 : veine hépatique gauche.

B: 1 : veine porte pédiculaire, 2 : veine cave inférieure infra-hépatique, 3 : veine hépatique droite,4 : veine hépatique moyenne, 5 : veine hépatique gauche.

Schémas issus de l'encyclopédie médico-chirurgicale (EMC, Elsevier-Masson).

1.1.3. Particularités chez la Souris

Le foie chez la Souris est composé de 5 lobes : lobe latéral gauche, lobe intermédiaire droit, lobe latéral droit, lobe caudé et lobe carré (ce-dernier comprenant le processus papillaire). La vésicule biliaire est située au niveau du lobe intermédiaire droit, à sa face ventrale. La **Figure 4** décrit l'anatomie et la vascularisation du foie chez la Souris.



Figure 4. Anatomie du foie de Souris, face ventrale

Cinq lobes composent le foie. Les éléments du pédicule hépatique comprennent les voies biliaires (en jaune), la veine porte (en bleu) et l'artère hépatique (en rouge). Les veines hépatiques ne sont pas visibles sur ce schéma.

Crédit figure @Mathieu Faliu.

1.2. Le lobule hépatique

Le lobule hépatique est la structure fonctionnelle du foie (voir **Figures 5 et 6**). Il est de forme hexagonale et délimité par les espaces portes qui comprennent la veinule portale, l'artériole hépatique et le canalicule biliaire. Au milieu du lobule hépatique se trouve la veine centrolobulaire qui se jette dans la veine hépatique et représente donc le drainage du lobule. Le lobule portal est, quant à lui, délimité par les veines centrolobulaires.

Les hépatocytes sont disposés en ordre en fonction de ces structures fonctionnelles. Les sinusoïdes cheminent entre les hépatocytes, depuis les espaces portes jusqu'au veinules centrolobulaires. On dénomme « hépatocytes de la zone 1 » les hépatocytes situés autour des

espaces portes et « hépatocytes de la zone 3 » ceux situés près de la veinule centrolobulaire. La zone 2 correspond à la zone médiolobulaire. Le flux sanguin au sein des sinusoïdes est ralenti, favorisant les échanges immunitaires.



Figure 5. Le lobule hépatique, schéma fonctionnel

Le lobule hépatique, de forme schématiquement hexagonale, est délimité par les espaces portes qui comprennent la veinule portale, l'artériole hépatique et le canalicule biliaire. La veine centrolobulaire est située au milieu du lobule. Les travées hépatocytaires cheminent au sein du lobule, séparées par les sinusoïdes.

A : Zone 1 : zone périportale, zone 2 : zone médiolobulaire, zone 3 : zone centrolobulaire.

B : Vue tridimensionnelle figurant une cellule de Kupffer au sein d'un sinusoïde.

Schémas issus des Fondamentaux de la pathologie digestive, chapitre 6, Elsevier-Masson, 2014.



Figure 6. Le lobule hépatique, dessins et coupe histologique

A : Schéma d'une coupe histologique figurant les veines centrolobulaires (isolées) et les espaces portes, plus fibreux, et au sein desquels on peut visualiser le canalicule biliaire et l'artériole.

B : Schéma d'une coupe histologique d'un espace porte figurant la veinule portale (en blanc, la plus grande), au sein de fibrose, et figurant en coupe l'artériole et le canalicule biliaire.

C : Coupe histologique avec l'espace porte entouré en blanc et la veinule centrolobulaire entourée en noir.

A et B sont issus de l'Atlas d'anatomie humaine de Netter, *Elsevier-Masson*.

C est issu des Fondamentaux de la pathologie digestive, chapitre 6, Elsevier-Masson, 2014.

1.3. Le foie, siège de diversité cellulaire et niche immunologique

Le foie, de par la diversité des types cellulaires immunitaires et non immunitaires qu'il abrite et de par sa situation entre la circulation systémique et la circulation portale, est un organe unique capable de régénérer et d'induire une tolérance. Une meilleure connaissance des populations cellulaires hépatiques, de leurs systèmes de communication et d'activation, est nécessaire pour appréhender les mécanismes de régénération impliqués dans la plupart des maladies hépatiques, ainsi que pour mieux comprendre les mécanismes de tolérance du greffon hépatique.

Les populations cellulaires présentes dans le foie sont donc à la fois des cellules épithéliales et des cellules du système immunitaire. Les hépatocytes représentent 60 à 80% de la population cellulaire. Les autres lignées cellulaires comprennent les cellules endothéliales, les cellules stellaires, les cholangiocytes, ainsi que les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. Les **Figures 7 et 8** illustrent les différentes populations cellulaires présentes dans le foie.



Figure 7. Les cellules immunitaires du foie

Le trafic des cellules immunitaires se fait au niveau des sinusoïdes, où le flux sanguin est ralenti et les LSECs (pour « *liver sinusoidal endothelial cells* » ou cellules endothéliales des sinusoïdes) fenêtrées. L'espace de Disse contient des cellules stellaires responsables de la sécrétion de la matrice extra-cellulaire.

B : cellule B, T : cellule T, NK : cellule *Natural Killer*, CK : cellule de Kupffer, VCL : veinule centrolobulaire, VP : veinule portale, AH : artériole hépatique, CB : canalicule biliaire, CD : cellule dendritique. D'après Racanelli *et al.*, *Hepatology* 2006 (3). *Crédit figure @Mathieu Faliu*.



Figure 8. Répartition des différentes populations cellulaires dans le foie Humain Les pourcentages sont approximatifs. Chaque pourcentage se réfère à la population immédiatement au-dessus. Librement adapté de Racanelli *et al., Hepatology* 2006 (3)

1.3.1. Populations de cellules non immunitaires

Aizarani *et al.* ont récemment publié dans *Nature* (4) un atlas cellulaire du foie à partir du séquençage « *single-cell* » de 10 000 cellules provenant de tissu hépatique humain de pièces de résection. Cet atlas a rapporté une hétérogénéité importante au sein des types cellulaires ainsi que la présence de progéniteurs épithéliaux. Les auteurs ont pu confirmer que 40% des gènes exprimés dans les hépatocytes et analysés dans le cadre de l'étude présentaient une répartition en fonction des zones 1 (périportale), 2 (médiolobulaire) et 3 (centrolobulaire). Les hépatocytes de la zone 1 étaient enrichis en gène du métabolisme oxydatif, de la synthèse du glycogène et du cycle de l'urée. Les hépatocytes de la zone 2 étaient enrichis en enzymes du métabolisme des xenobiotiques tel le cytochrome p450.

Deux types de cellules endothéliales peuvent être distingués : les LSECs (pour « *Liver Sinusoidal Endothelial Cells* », cellules endothéliales des sinusoïdes), qui présentent des fenestrations importantes facilitant le passage des cellules immunitaires au sein des sinusoïdes dans lesquels le flux sanguin est ralenti, et les MaVECs (pour « *macrovascular endothelial cells* », cellules endothéliales macrovasculaires) qui correspondent aux cellules des petits vaisseaux constitués par les veinules portales et les veinules centrolobulaires. L'analyse des gènes exprimés par les LSECs a permis de montrer qu'il existait également dans les LSECs une répartition en fonction des zones, suggérant une co-localisation de cette expression avec les hépatocytes de la même zone. Cette répartition fonctionnelle en fonction des zones n'est pas entièrement conservée entre la

Souris et l'Homme. Les LSECs ont une capacité de cellules présentatrice de l'antigène (CPAs) et sont aussi source de sécrétion d'IL-10 et de TGFβ.

Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales constituant les canalicules biliaires, situés dans les espaces portes. La présence de progéniteurs épithéliaux bi-potents pouvant se différencier en hépatocytes ou en cholangiocytes a longtemps été suggérée. Aizarani *et al.* suggèrent néanmoins que la population de progéniteurs hépatiques portant la signature TROP2^{int} est en fait une sous-population de cellules des canalicules biliaires.

Les cellules stellaires synthétisent les constituants de la matrice extra-cellulaire et stockent la vitamine A. Activées par des cytokines pro-inflammatoires, les cellules stellaires se différencient en myofibroblastes contractiles responsables de la genèse de fibrose. Les cellules stellaires sont aussi des CPA professionnelles (5) et peuvent moduler les réponses cellulaires T (6). A ce titre, elles constituent une population de cellules immunitaires du foie.

1.3.2. Populations de cellules immunitaires

La particularité du foie est une grande richesse en cellules immunitaires résidentes et circulantes. Il existe quatre types cellulaires capables de présenter l'antigène au niveau du foie : les LSECs, les cellules stellaires, les cellules de Kupffer (CKs) et les cellules dendritiques (CDs).

Les CKs sont les macrophages résidents du foie. Elles ne proviennent pas du pool circulant de monocytes mais de cellules souches résidentes provenant du sac vitellin fœtal (7). Le partage de

certaines expressions génomiques suggère aussi une coopération entre les CKs et les cellules endothéliales. Il n'y a cependant pas chez l'Homme de marqueur spécifique des CKs pour les distinguer avec certitude des cellules dérivées des monocytes.

Les CDs sont également résidentes dans le foie, plutôt au niveau des espaces portes et autour des veinules centrolobulaires, et jouent un rôle clé dans l'immunité innée. Elles sont capables de phagocytose mais sont aussi les CPA les plus efficaces pour l'activation de l'immunité cellulaire T. Dans le foie humain, seules ont été identifiées les CDs myéloïdes : 70% sont BDCA1⁺ et 30% sont BDCA3⁺, alors que ces proportions sont respectivement de 95% et 5% dans le sang. Dans le foie murin, les deux populations de CDs myéloïdes (type 1 et type 2) et plasmacytoïdes ont été identifiées (8). L'IL-10 et le TGFβ, secrétés de façon constitutive par les CKs et les LSECs et de façon inductible par les cellules stellaires, ont la capacité de rendre les CDs résidentes tolérogènes (3).

Récemment, une nouvelle population de macrophages provenant du pool circulant de monocytes avec des dendrites et spécifiques de la capsule de Glisson a été identifiée, formant un réseau capsulaire à l'interface péritoine/parenchyme hépatique. Ces cellules, dépendantes de CSF-1 (pour « *colony stimulating factor-1* »), sont recrutées via les sinusoïdes depuis le sang périphériques et ont une action dans la défense contre les germes disséminés par voie péritonéale (9).

Les cellules B sont également présentes, avec l'identification par les auteurs d'une souspopulation circulante avec une expression forte des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) II et une sous-population résidente MZB1⁺.

Les populations des cellules NK (pour « *natural killer* ») et NKT (pour « *natural killer T* »), lesquelles appartiennent à l'immunité dite « naturelle » (voir **Introduction/paragraphe 4 plus bas**) sont également hétérogènes avec des niveaux d'expression variables des gènes codant les ligands des chemokines, les granzymes, et les récepteurs « lectin-like ».

Les cellules T comprennent les cellules T CD4⁺, T CD8⁺, les cellules NKT et cellules T régulatrices FoxP3⁺. Parmi les lymphocytes CD3⁺ hépatiques, le ratio CD4/CD8 est l'inverse de celui du sang périphérique, environ à 3. Le « trapping » des cellules T peut être médié par l'engagement de TLR4 qui induit la régulation positive des molécules d'adhésion telles ICAM-1 (pour « *intracellular*

adhesion molecule-1 »), VCAM-1 (pour « *vascular cell adhesion molecule-1* ») et VAP-1 (pour « *vascular adhesion protein-1* ») sur les LSECs, les CKs et les cellules stellaires. Dans des conditions d'homéostasie, cette interaction aboutit généralement à un dialogue cellulaire entraînant la tolérance, par des mécanismes comprenant par l'expansion des cellules T régulatrices FoxP3⁺, l'inactivation clonale ou la délétion de cellules T auto réactives, particulièrement en ce qui concerne les cellules T CD8⁺ (10).

Les ILCs (pour « *innate lymphoid cells* ») sont des cellules de l'immunité innée au développement thymus-indépendant et sans récepteur réarrangé intervenant dans la régulation de l'homéostasie, l'inflammation et la médiation des réponses immunitaires. Les cellules NK, qui disposent d'une activité cytolytique, appartiennent au groupe des ILCs. Les cellules NK sont beaucoup plus nombreuses dans le foie humain que dans le foie murin.

Le foie a donc une architecture unique et plusieurs réseaux de cellules épithéliales et immunitaires qui communiquent entre eux. Les cellules circulantes sont aisément recrutées depuis la périphérie par les sinusoïdes, mais le foie contient également plusieurs types de populations de cellules immunitaires, dont certaines sont spécifiques au foie. Finalement, il semble que le foie soit « habillé » d'un réseau de cellules immunitaires spécifiques au niveau du péritoine et intervenant dans les défenses contre les infections intra-abdominales, contribuant ainsi au concept de niche immunologique hépatique.

1.4. Capacités régénératives

Une caractéristique unique du foie est sa capacité de régénération. La régénération concerne non seulement les hépatocytes, mais l'ensemble de l'architecture hépatique, notamment les cellules endothéliales, au risque d'avoir une régénération non fonctionnelle. En cas de régénération hépatique, le volume précède la fonction, comme cela a été démontré chez le rongeur après hépatectomie partielle (11), de même que le volume ne peut pas toujours prédire la fonction chez l'Homme (12).

Les différentes voies impliquées dans la régénération comprennent les cytokines, les facteurs de croissance et les réseaux métaboliques (13), avec des rôles complémentaires et qui se

chevauchent. La régénération après hépatectomie met à contribution les hépatocytes restants (voir **Figure 9**), tandis que la régénération après hépatite aigüe repose en partie de la différentiation des cellules progénitrices (13). Les voies de régénération alternatives développées lors de la perte chronique d'hépatocytes sont associées à un effort continu de prolifération hépatocytaire et ont souvent des effets secondaires collatéraux comme le développement de cirrhose ou de cancer (14).

L'initiation de la régénération hépatique est menée par les cellules du système immunitaire inné activé par les DAMPs (pour « danger associated molecular patterns »). Le TNFa et l'IL-6 (15), qui tiennent un rôle central dans l'initiation de la régénération hépatique, ainsi que le TNF et le NF-KB (pour « nuclear factor-κB »), activent la transcription précoce de gènes (16) dans les hépatocytes permettant d'initier la réplication cellulaire et de maintenir les fonctions homéostasiques (17) pendant l'épisode de régénération. Les CKs, dont l'activation est induite par les PNNs (polynucléaires neutrophiles) recrutés dans le foie, jouent un rôle central dans l'initiation de la régénération hépatique par le relargage d'IL-6 et TNFα (18). La synthèse d'ADN (acide désoxyribonucléïque) progresse depuis les hépatocytes de la zone 1 périportale jusqu'à ceux de la zone 3 (19). Les facteurs de croissance mitogéniques permettent la progression des cellules à travers les différentes phases de la mitose. Parmi eux, on note l'HGF (pour « hepatocyte growth factor ») (20) secrété par les cellules stellaires et l'EGF (pour « epidermal growth factor ») secrété par les glandes duodénales de Brunner (21). Les cytokines non mitogéniques ont un rôle très important pour optimiser la coordination de la prolifération hépatocytaire et les interactions cellulaires paracrines. Le TNF, l'IL-6 produite par les macrophages et les hépatocytes, la sérotonine produite par les plaquettes (22) comptent parmi elles. Pendant cette régénération hépatocytaire, les besoins métaboliques du foie sont importants, tant pour subvenir aux besoins de base que pour fournir l'énergie nécessaire à la réplication cellulaire. La fin de la multiplication cellulaire est permise par un rétrocontrôle impliquant les facteurs SOCS (pour « suppressors of cytokine signaling ») qui bloquent la surexpression de l'IL-6 (23). Le TGFβ produit par les cellules stellaires en réponse à l'HGF et l'EGF a un rôle antiprolifératif et stimule la matrice extra cellulaire ainsi que le réseau sinusoïdal à la fin du processus de régénération (24).

En cas de nécrose importante du foie natif, des cellules cholangiolaires, au cours de la réaction ductulaire, pourraient également s'activer et se répliquer pour se différencier en hépatocytes (25).

Notons que ce phénomène est en accord avec l'hypothèse de progéniteur bi-potent avancée par Aizarani *et al.* (4).



Figure 9. Signaux externes et paracrines impliqués dans la régénération hépatique après hépatectomie à 70%

Adapté de Michalopoulos et al., Hepatology 2017 (14).

Diagramme schématique des voies de signalisation qui déclenchent la régénération et qui établissent des signaux de croissance et de régulation entre les hépatocytes et les cellules non parenchymateuses que sont les cellules stellaires, les cellules endothéliales et les CKs. *Crédit figure @Mathieu Faliu.*

1.5. Tolérance

1.5.1. Tolérance, tolérance opérationnelle et tolérogénicité dans le contexte de la transplantation

Le concept de tolérance du greffon a été introduit au début de la transplantation d'organes, en 1953, par Billingham (26) : une tolérance immunologique activement acquise avait été décrite chez des souris traitées à la naissance avec des cellules dérivées de la moelle osseuse du donneur. Elles toléraient par la suite des greffons de peau issus de ces mêmes donneurs, en rejetant toujours des greffons de peau issus de donneurs différents.

La tolérance du greffon «complète» est donc un état permanent et spécifique de non-réponse à des antigènes étrangers, en l'absence d'immunosuppression. Elle est caractérisée par l'absence d'allo-réactivité vis-à-vis du donneur, *in vitro* et *in vivo*. Dans une perspective clinique, la tolérance opérationnelle est définie par l'absence de rejet chronique ou aigu, et une survie indéterminée du greffon, avec une fonction et une histologie normales chez un receveur immunocompétent habituellement après sevrage réussi en immunosuppresseurs.

Contrairement à la tolérance complète du greffon, la définition pragmatique de la tolérance opérationnelle n'implique pas forcément un état de non-réponse complet du système immunitaire envers le greffon, mais plutôt l'absence de réponse immunitaire destructrice envers le greffon, malgré un état d'immunocompétence.

La tolérogénicité est la propriété désignant l'action d'induire la tolérance immunitaire à un antigène. Le foie est un organe particulièrement bien toléré (accepté par le receveur) mais également tolérogène car il induit la tolérance immunitaire à un antigène : par exemple, la tolérance d'autres organes provenant du même donneur. En 1969, Calne *et al.* (27) ont démontré chez le cochon que la présence d'un greffon hépatique protégeait du rejet des greffons de peau et de rein issus du même donneur. Ces expériences ont identifié le foie comme l'organe protecteur, tolérogène. Ces résultats ont été confirmés chez la Souris sauvage (28) ainsi que dans des combinaisons de différentes souches de Rats (29,30). Les animaux receveurs de greffons

hépatiques acceptent alors également des greffons de peau ou de cœur de la même souche d'animal donneur, tout en rejetant des greffons issus d'une souche différente (29,30).

Chez le Rat, le rejet de greffons de peau peut être traité par la greffe d'un foie du même donneur. Le même effet tolérogène du foie est observé sur la transplantation d'intestin grêle chez le Rat (31). Chez l'Homme, bien qu'un cross-match positif puisse être à l'origine d'épisodes de rejet aigu plus fréquents en post-transplantation, ceux-ci sont traitables, et il n'y a pas d'impact sur la survie du patient (32). Le cross-match n'est donc plus effectué en routine mais dans des optiques de recherche. Les anticorps anti-donneur préformés chez le receveur peuvent disparaître au fil du temps, démontrant une capacité de « clairance » des anticorps par le greffon hépatique.

De la même façon, bien que la compatibilité HLA (pour « *human leukocyte antigen* ») entre donneur et receveur joue un rôle important pour prévenir le rejet aigu et le rejet chronique d'autres organes solides, des incompatibilités en transplantation hépatique n'ont pas d'effet sur la survie globale à long-terme chez l'enfant et chez l'adulte. Une discordance HLA semble cependant diminuer la fréquence des épisodes de rejet aigu (33). Le développement en post-transplantation d'anticorps anti-donneur spécifiques est plus fréquent chez les receveurs jeunes, avec de faibles taux d'inhibiteurs de la calcineurine et avec une mauvaise observance au traitement. Même si l'apparition d'anticorps anti-donneur spécifiques et un rejet histologique humoral doivent être recherchés en cas de perturbation inexpliquée du bilan hépatique, ceux-ci n'impactent pas sur la survie du patients et du greffon (34,35).

En transplantation hépatique chez l'Homme, la minimisation ou la suppression de l'immunosuppression a été historiquement utilisée comme stratégie d'optimisation de la longévité des receveurs de greffons hépatiques, ceci dans le but de diminuer les effets secondaires tels que les lymphomes sous immunosuppresseurs. Plus récemment, des études prospectives randomisées on proposé l'arrêt total des immunosuppresseurs chez des receveurs adultes et pédiatriques très sélectionnés qui ont montré des taux de tolérance respectifs de 40% et 60%. Ces receveurs tolérants peuvent cependant avoir des stigmates histologiques inquiétants d'inflammation et de fibrose dont l'étiologie et le pronostic ne sont pas encore connus. il n'y a actuellement pas de bio marqueur fiable permettant de surveiller la tolérance et le niveau minimal d'immunosuppression requis, l'analyse histologique de ponction-biopsie hépatique restant le standard de référence (36).
Les mécanismes qui sous-tendent ces propriétés uniques de tolérance et de tolérogénicité du foie sont encore mal connus. Des hypothèses ont été évoquées et sont développées dans le paragraphe ci-dessous.

> 1.5.2. Mécanismes immunologiques mis en jeu dans la tolérance du greffon hépatique

Les connaissances concernant les mécanismes immunologiques de la tolérance hépatique sont en constante évolution. La complexité des mécanismes est à la hauteur de la richesse et de la diversité des populations cellulaires immunitaires du foie.

Nous ne nommons ici que les principaux mécanismes mis en jeu dans la tolérance du greffon hépatique et rapportés dans la récente revue de Demetris *et al.* (37). Ceux-ci comprennent :

- Les propriétés hématopoïétiques du donneur, dont :
 - le micro-chimérisme à long terme,
 - la délétion des lymphocytes effecteurs du receveur induite par leur activation,
 - une présentation antigénique déficiente en raison de bas niveaux d'expression du
 CMH et de molécules de co-stimulation, ou d'une augmentation de l'expression de molécules inhibitrices.
- L'activation des lymphocytes du receveur par des CPAs « tolérogènes » (LSECs, CKs, cellules stellaires, cellules myéloïdes suppressives, hépatocytes) à l'origine de l'apoptose des cellules effectrices, l'anergie, la sénescence et/ou la génération de cellules T régulatrices FoxP3⁺.
- Une charge antigénique importante comprenant la sécrétion de molécules du CMH de classe I soluble du donneur, corrélant sur le long terme à la sénescence lymphocytaire et à la tolérance opérationnelle

Beaucoup des axes de recherche concernant la tolérance du greffon sont centrés sur les cellules T et l'immunité adaptative en général, mais la modulation de l'inflammation et de l'immunité innée sont actuellement à l'étude dans la tolérance ultérieure du greffon.

1.5.3. Tolérance et axe intestin-foie

La tolérance hépatique permet de prévenir les réponses potentiellement délétères aux antigènes de la nourriture ou aux bactéries commensales du tube digestif. L'interrelation anatomique et physiologique entre le tube digestif et le foie a été dénommée « l'axe intestin-foie ». Cette interrelation est établie par la veine porte qui convoie vers le foie les produits dérivés de l'intestin, et en retour par la bile et la sécrétion d'anticorps vers l'intestin. La base de cet axe microbiote-foie est la barrière intestinale constituée des cellules épithéliales intestinales qui permet de maintenir l'homéostasie intestinale en séparant le microbiote intestinal des cellules immunitaires. Le mucus sépare physiquement le microbiote de la couche de cellules épithéliales et permet ainsi d'éviter une sur-réaction au microbiote. Ainsi, la plupart des microbes interagissent avec l'hôte *via* leurs produits métaboliques appelés post-biotiques, issus de la fermentation des aliments. Dans de rares cas, le microbiote est capable de franchir la barrière de mucus et d'interagir directement avec les cellules épithéliales de l'hôte (38).

Juste sous le mucus se trouve la barrière intestinale composée d'une monocouche de cellules épithéliales : entérocytes, cellules de Goblet, cellules de Tuft et cellules entérochromaffines (39). Ces cellules coopèrent pour protéger l'intestin des lésions potentielles provenant du microbiote et d'éventuels agents infectieux. Cette barrière présente des jonctions serrées ainsi qu'une charge négative. Si les bactéries parviennent à la passer, elles atteignent alors la *lamina propria*. D'autres « filtres « permettent ensuite encore de diminuer la probabilité que les bactéries disséminent par voie hématogène, grâce à la barrière vasculaire de l'intestin et aux adénopathies mésentériques.

La barrière intestinale est renforcée par la présence d'une série de cellules immunitaires : des lymphocytes conventionnels et non-conventionnels T- $\alpha\beta$ et T- $\gamma\delta$ et des phagocytes mononucléés intra-épithéliaux. Ces cellules sont les premières mises en jeu en cas d'infection et participent à l'induction de la tolérance orale aux aliments et aux antigènes microbiens.

Enfin, il existe un dialogue (40,41) entre les acides biliaires et le microbiote ; le microbiote affecte le métabolisme des acides biliaires, alors que les acides biliaires affectent la composition du microbiote.

1.6. Dérégulation immunitaire et maladies hépatiques

Chaque maladie hépatique déclenche la réponse d'une ou plusieurs catégories de cellules immunitaires du foie qui va perpétuer ou restreindre l'inflammation hépatique. Le développement de la maladie repose sur l'équilibre de la balance réparation/effet délétère suite à l'agression du foie.

L'inflammation pathologique engendre la progression depuis la fibrose hépatique jusqu'à la cirrhose, et établit une balance déséquilibrée entre inflammation et immunosuppression au sein du foie. L'inflammation excessive ou persistante caractérise de nombreuses maladies hépatiques. L'activation persistante des mécanismes déclencheurs de l'immunité innée par une infection chronique, des lésions tissulaires, la consommation excessive de gras ou d'alcool, ou la croissance tumorale mène aux caractéristiques classiques de l'inflammation. Cette inflammation excessive résulte en la perte des mécanismes de tolérogénicité du foie, entraînant encore plus d'inflammation. Les signaux inflammatoires maintiennent les cellules stellaires dans un état activé, limitant la sénescence des myofibroblastes. Les macrophages dérivés des monocytes sont recrutés dans le foie et réduisent l'activation des cellules T régulatrices FoxP3⁺ par les CKs (42).

Les mécanismes tolérogènes normaux du foie peuvent également contribuer à la persistance de virus hépatotropes comme l'hépatite virale C ou au développement des tumeurs primitives et secondaires.

En même temps, l'activation de l'immunité innée, en réponse aux MAMPs (pour « *microbe-associated molecular pattern* ») ou aux DAMPs relargués au cours des infections ou de la croissance tumorale engendre une inflammation persistante et la régulation positive de nombreuses voies régulatrices visant à minimiser les lésions tissulaires et cellulaires. Ces voies régulatrices comprennent la promotion de cellules immunorégulatrices myéloïdes suppressives, des modifications épigénétiques et métaboliques favorisant l'immunotolérance, l'induction de régulateurs négatifs des voies de signalisation pro-inflammatoires, et le développement de l'épuisement des lymphocytes T, aussi dénommée « exhaustion » T (42).

La stimulation non spécifique du système immunitaire par des bactéries, des lipoprotéines, ou un régime alimentaire occidental induit une modification de la réponse immunitaire pro-

inflammatoire dépendant des cellules myéloïdes (monocytes ou macrophages) et de l'IL-1, phénomène qui est à la base du concept de « *trained immunity* », autrement dit du développement d'une mémoire innée dans les cellules d'origine myéloïde (43).

Nous proposons en annexe une revue de la littérature parue en 2019 dans *Frontiers in Immunology* (44) écrite au sein du laboratoire et centrée sur les maladies inflammatoires du foie et le rôle dans leur développement de la super famille des IL-1, plus particulièrement l'IL-1 α et l'IL-1 β ainsi que l'IL-33.

2.1. Définition de l'inflammation stérile

L'inflammation est une réponse coordonnée du système immunitaire visant à maintenir ou à restaurer l'intégrité tissulaire. L'inflammation stérile peut être déclenchée par des stimuli physiques, chimiques ou métaboliques (45), et la réponse au stress induit le recrutement de cellules inflammatoires et aboutit à l'inflammation.

En pathologie hépatique, l'inflammation stérile est un processus central dans les hépatites médicamenteuses (par exemple au paracétamol), la stéatohépatite non-alcoolique, la maladie alcoolique du foie et l'I/R, intervenant dans le développement de la fibrose et la carcinogénèse.

Les DAMPs (voir **Tableau 1**), molécules relarguées lors de la lésion tissulaire, et les cytokines de la superfamille des IL-1 (voir **revue en Annexe** (44)) sont des médiateurs importants de l'inflammation stérile. Les DAMPs activent les PRRs (pour « *pattern recognition receptors* »), aboutissant à différents types de réponses : la production de cytokines pro-inflammatoires, le recrutement de cellules inflammatoires sur le site lésé (voir **Tableau 2**), ainsi que l'activation de l'inflammasome qui permet à son tour l'activation et la sécrétion des cytokines de la famille de l'IL-1 (46).

	DAMPs	Récepteurs / Médiateurs de signalisation
DAMPs	Adénosine triphosphate	Récepteurs P2X et P2Y
intracellulaires	Adénosine	Récepteurs P1
	ADN double-brin	TLR9, AIM2
	HMGB-1	RAGE, TLR4/2, CD24
	Histones	NLRP3, TLRs
	ARN	TLR3
	Cristaux de cholestérol	NLRP3, CD36
	Urate de sodium	NLRP3, cholestérol membranaire
	IL-1α	IL-1R
	Protéines S100	RAGE
	Protéines heat shock	TLR4/2, CD24
	ADN mitochondrial	TLR9
	Peptides mitochondriaux N-formyl	FPR1
DAMPs	Fragments courts d'acide	CD44, TLR2, TLR4, NLRP3
extracellulaires	hyaluronique	
	Versican	TLR2, TLR6
	Biglycan	TLR2, TLR4
	Fragments de collagène (proline-	Effets dépendants de CXCR2
	glycine-proline)	

Tableau 1. Principaux DAMPs et leurs récepteurs

D'après McDonald et Kubes, Gastroenterology 2016 (47)

Type de cellule	Mécanisme de réparation	
immunitaire innée		
PNNs	Phagocytose des débris cellulaires, angiogenèse, switching phénotypique	
	des macrophages, régénération du parenchyme lésé, synthèse de matrice	
	extra-cellulaire, migration « inverse » à l'extérieur du site lésé	
Monocytes	Phagocytose des débris cellulaires, digestion de la matrice extra-	
	cellulaire, différentiation en monocytes et macrophages pro-résolution	
	de l'inflammation	
Cellules iNKT	Conversion de monocytes inflammatoires en monocytes de la réparation	
	via la sécrétion d'IL-4, régénération hépatocytaire	
Macrophages	Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires pour recruter d'autres cellules	
résidents des tissus	immunitaires, phagocytose des cellules mortes	

Tableau 2. Mécanismes de réparation médiés par les cellules immunitaires innées après lésion stérile

D'après Hossain et Kubes, Eur J Immunol 2019 (48)

2.2. Comment définir l'I/R par rapport à l'inflammation stérile ?

L'I/R est un signal endogène non infectieux déclenchant un processus d'inflammation stérile. Les lésions d'I/R correspondent à tous les phénomènes délétères résultant de la privation en oxygène du foie suivie de la restauration de sa perfusion. L'ischémie peut être chaude, se développant *in situ* lors de chirurgies hépatiques ou en cas de traumatisme, ou froide, c'est-à-dire ayant lieu *ex vivo* lors de la préservation du greffon en transplantation hépatique. L'ischémie froide est suivie d'une phase d'ischémie chaude au moment où la revascularisation du greffon a lieu.

La lésion ischémique est un processus localisé de perturbations métaboliques résultant de la consommation de glycogène, d'un manque d'oxygène et de déplétion en ATP (adénosine triphosphate), menant à la mort cellulaire parenchymateuse. La lésion de reperfusion suivant la lésion ischémique n'est pas seulement le résultat de perturbations métaboliques mais également

d'une réponse cellulaire immunitaire impliquant à la fois des mécanismes cytotoxiques directs et indirects (49).

Bien que l'inflammation soit un processus visant à réparer un organe ou un tissu lésé, l'I/R hépatique est caractérisée par une réponse immunitaire disproportionnée délétère pour la fonction de l'organe. Ainsi, la réponse du foie à l'inflammation est critique puisque la prévention de l'activation immunitaire locale améliore les lésions d'I/R. La connaissance des mécanismes de l'immunité innée mis en jeu est donc importante pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques afin de permettre de diminuer les réponses pro-inflammatoires tout en épargnant ou en augmentant les mécanismes anti-inflammatoires.

2.3. Principaux mécanismes mis en jeu dans l'I/R (Figure 10)

2.3.1. Dérivés oxygénés et nitrogénés

Les dérivés oxygénés et nitrogénés sont des molécules hautement réactives et de courte durée de vie, impliqués dans l'initiation des lésions d'I/R mais aussi dans les étapes ultérieures. Ils sont normalement utilisés comme molécules de signalisation pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Cependant, durant la phase de reperfusion, les concentrations intra-hépatiques des dérivés oxygénés réactifs et nitrogénés augmentent jusqu'à des niveaux cytotoxiques, engendrant la (per)oxydation et la perte de fonction des biomolécules (protéines, lipides, ADN), compromettant ainsi la viabilité cellulaire.

Les phagocytes résidents et circulants (CKs, PNNs, mais aussi monocytes et CDs) sont impliqués dans la production de ces dérivés oxygénés et nitrogénés qu'ils utilisent pour tuer et digérer les pathogènes opsonisés. Dans le cas de l'inflammation stérile, les phagocytes sont activés par les DAMPs mais l'absence de pathogène entraîne le relargage dans le milieu extra cellulaire de leur arsenal toxique, amplifiant alors les lésions hépatocellulaires (50).

2.3.2. DAMPs et alarmines

Les dérivés oxygénés réactifs sont impliqués dans la libération des DAMPs et dans la signalisation cellulaire impliquée en aval des DAMPs.

Les DAMPs correspondent à un ensemble de biomolécules du soi relarguées ou sécrétées en cas de lésions cellulaires et capables de déclencher une réponse inflammatoire en contexte stérile. Elles correspondent à un signal de danger capable de déclencher la réponse immunitaire.

Le DAMP le plus étudié en I/R est l'HMGB-1 (pour « *high-mobility group box-1* »), molécule ubiquitaire liée à l'ADN. Les hépatocytes sont capables de libérer l'HMGB-1 en produisant une quantité excessive de dérivés oxygénés réactifs en réponse à un signal mettant en jeu TLR-4, sans mourir. L'ADN fragmenté peut également être reconnu par TLR-9 présent sur les CDs et les PNNs. Le complexe ADN-HMGB-1 est quant à lui détecté par les CDs *via* RAGE (pour « *receptor for advanced glycation end products* ») (50). Un des mécanismes initiaux de l'I/R est la dysfonction mitochondriale causée par les dérivés oxygénés et nitrogénés, causant la rupture de la membrane mitochondriale, libérant ainsi de l'ADN mitochondrial, lequel peut alors agir comme DAMPs. L'ATP et l'urate, relâchés dans le compartiment extra-cellulaire par les cellules nécrotiques et apoptotiques, peuvent aussi agir comme DAMPs.

Certains DAMPs partagent des caractéristiques communes (51) :

- le relargage rapide en réponse à la lésion,
- un effet chemotactique et activateur sur les CPAs,
- des propriétés immunostimulatrices in vivo.

Cette population de DAMPs alerte le système immunitaire de l'hôte en augmentant les réponses innée et adaptative : elle correspond aux alarmines. Dans le cadre de l'I/R, l'alarmine qui a été décrite en premier est l'HMGB-1.

2.3.3. Inflammasome

L'inflammasome NRLP3 (pour « *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3* ») est un complexe multi-protéique intracellulaire régulant l'activation de la caspase-1 et qui constitue un élément critique du système immunitaire inné. La caspase-1 est indispensable à la production d'IL-1β, IL-18 et IL-37, cytokines de la super famille de l'IL-1 impliquées dans les phénomènes d'I/R. L'IL-33, bien qu'appartenant aussi à la super famille de l'IL-1 (voir **Paragraphe 3**), est libérée

directement dans sa forme active sans nécessité d'activation par l'inflammasome. En revanche, l'activation de l'inflammasome exerce un rétrocontrôle sur la l'IL-33 puisque l'IL-33 est inactivée par la caspase 3.

Plusieurs voies peuvent mener à l'activation de l'inflammasome après I/R : les alarmines et DAMPs, les radicaux oxygénés libres, l'ATP extracellulaire ou l'ADN de l'hôte. L'inflammasome contribue à l'activation des populations cellulaires *via* la production de cytokines pro-inflammatoires (52).

2.3.4. Activation du complément

Activé par les DAMPs endogènes, les protéines du complément semblent avoir un rôle dans l'I/R. Les protéines les plus impliquées sont C3a, C5a, C5b-9 et C4d (53). La cascade d'activation du complément est à l'origine de l'activation des cellules de l'immunité innée, notamment les granulocytes, résultant en la libération de métalloprotéinases et de dérivés oxygénés et nitrogénés. Le complément active aussi le système hémostatique, incluant la cascade du plasma et l'activation plaquettaire (« thromboinflammation »).

2.3.5. Activation cellulaire

Au cours de l'I/R, on assiste à la fois à l'activation de populations cellulaires résidentes mais aussi au recrutement de cellules immunitaires périphériques, dont les PNNs.

Les cellules T jouent un rôle unique dans l'I/R, impliquant différentes sous-populations : les cellules T CD4⁺, les cellules NKT (voir **Paragraphe 5**), et les cellules T non conventionnelles T- $\gamma\delta$. Les cellules T CD4⁺, principalement localisées dans les sinusoïdes, facilitent les interactions entre cellules. Les cellules NKT sont à l'origine de la production d'IFN γ et d'IL-17, contribuant au recrutement et à la migration des PNNs. Les lymphocytes T- $\gamma\delta$, quant à eux, participent également au recrutement des PNNs *via* leur production d'IL-17 (54).

A l'instar des cellules NKT, les cellules NK, activées par les DAMPs et les cellules T, produisent des médiateurs de l'inflammation contribuant au recrutement des PNNs. Dans le cas de l'I/R rénale par exemple, les DAMPs relargués par les cellules épithéliales tubulaires semblent activer non seulement les cellules iNKT mais aussi les cellules NK sur le site lésionnel. Les cellules NK sont à

l'origine de l'induction de CXCL2 (pour « *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2* ») à la membrane des cellules épithéliales tubulaires, aboutissant au recrutement de PNNs ; leur production d'IFNγ induit les médiateurs pro inflammatoires et l'activation M1 des macrophages, contribuant *in fine* à la progression des lésions tubulaires (55). Mais contrairement aux cellules NKT, il n'y a pas de consensus sur la contribution des cellules NK aux lésions d'I/R rénale (56).

Une fois activés et recrutés, les PNNs expriment des molécules d'adhésion leur permettant de migrer à travers les sinusoïdes sur le lieu de l'I/R, relarguant à leur tour l'IFNγ ainsi que des dérivés oxygénés et nitrogénés (50).

Au total, les mécanismes mis en jeu dans l'I/R reposent sur la libération de dérivés oxygénés et nitrogénés, la libération de signaux de danger tels que les DAMPs, la mise en jeu de l'inflammasome et des protéines du complément, aboutissant à l'activation et au recrutement de cellules immunitaires, entraînant une réponse inflammatoire stérile disproportionnée et à l'origine de dommages cellulaires.



Figure 10. Les différentes étapes de l'I/R

La lésion ischémique, processus localisé de perturbations métaboliques hépatiques, résulte de la consommation de glycogène, du manque d'oxygène et de la déplétion en ATP. Les DAMPs relargués par les phénomènes de mort cellulaire, les dérivés oxygénés et nitrogénés et les protéines du complément participent lors de la reperfusion à l'activation immunitaire, laquelle implique plusieurs types cellulaires : les CDs (cellules dendritiques), les CKs (cellules de Kupffer), les cellules NK (*natural killer*) et NKT (*natural killer* T), les lymphocytes T CD4⁺ et T- $\gamma\delta$, ainsi que les polynucléaires neutrophiles (PNNs). La cascade pro-inflammatoire déclenchée par l'1/R s'auto-entretient par le recrutement depuis la circulation de cellules immunitaires.

D'après Zhai et al. Nature Reviews. Gastroenterology and Hepatology 2013 Crédit figure @Mathieu Faliu

3.1. La molécule IL-33 et son récepteur

Décrite en 2003 (57) puis 2005 (58), l'IL-33 est une molécule appartenant aux nouveaux membres de la superfamille de l'IL-1. Elle est abondamment exprimée dans le noyau des cellules endothéliales, des cellules épithéliales et des cellules fibroblastes-like à l'état basal. En cas de mort cellulaire, l'IL-33 est relarguée et peut agir en tant qu'alarmine, alertant immédiatement les éléments du système immunitaire inné. Mais l'IL-33 est aussi inductible lors de certaines réponses inflammatoires (59). Dans ce dernier cas, l'IL-33 nécessite une néo-synthèse au niveau transcriptionnel et agit alors en tant que cytokine.

Le gène codant l'IL-33 comprend 8 exons chez l'Homme et la Souris. La protéine IL-33 comprend un domaine N-terminal nucléaire et un domaine « cytokinique » C-terminal IL-1-like. La protéine humaine a 52% d'homologie avec la protéine murine.

Son récepteur est constitué de IL-1RACP (pour « *IL-1R accessory protein* ») et de l'IL-1-R4 ou ST2 (pour « *suppression of tumorigenicity 2* »). L'IL-1RACP a une portion extracellulaire avec un domaine immunoglobuline-like et une portion cytoplasmique intracellulaire avec un domaine TIR (pour « *Toll-Interleukin-1R* »). Après stimulation, MyD88 (pour « *myeloid differentiation primary response 88* ») se lie au domaine TIR, déclenchant la translocation de NF-KB et l'activation de MAPK (pour « *mitogen-activated protein kinases* »), à l'origine de la réponse pro-inflammatoire. Il existe une forme soluble de ST2 dénommée sST2, issue de l'épissage de l'ARN messager de ST2. Son rôle biologique n'est pas encore bien connu : il pourrait s'agir d'un « decoy » récepteur capable de neutraliser l'IL-33, ou simplement la signature de l'activation de l'axe IL-33/ST2, avec des concentrations sériques de sST2 corrélant avec la sévérité de la maladie (59,60).

Les cellules immunitaires résidentes des tissus exprimant le plus fortement de façon constitutive ST2 sont les cibles majeures de l'IL-33 : il s'agit des mastocytes, des ILCs de type 2 et cellules T régulatrices FoxP3⁺, ainsi que des cellules NK et iNKT. Cependant, l'expression de ST2 est inductible dans de nombreuses autres cellules du système immunitaire (polynucléaires

éosinophiles et basophiles, macrophages, CDs, lymphocytes T Th1 et Th2, cellules NK et iNKT, lymphocytes T CD8⁺, mais également de cellules non immunitaires telles que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes, les astrocytes et les neurones (59).

L'IL-33 est relarguée par les cellules lésées ou nécrotiques directement dans sa forme active fonctionnelle. Elle est inactivée par clivage par les caspases 1, 3 et 7 intracellulaires. Les cellules NK, les cellules épithéliales, les macrophages, les mastocytes et les PNNs sécrètent des protéases inflammatoires qui permettent de cliver l'IL-33 en une forme super-active (voir **Revue en Annexe** (44)).

L'activité de l'IL-33 peut être régulée négativement par rétention nucléaire, par inactivation pendant l'apoptose, par inactivation par l'oxydation et par séquestration par le « *decoy* » récepteur sST2 (61).

3.2. L'IL-33 porte bien le concept d'alarmine

L'IL-33 est exprimée de façon constitutive dans le noyau des cellules endothéliales des tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes et des cellules épithéliales (62). Se comportant comme une alarmine, elle est libérée dans le milieu extra cellulaire immédiatement en réponse à des lésions cellulaires épithéliales ou endothéliales au cours d'un traumatisme ou d'une infection. Sur le plan fonctionnel, elle s'apparente à HMGB-1, l'archétype de l'alarmine, en alertant rapidement la réponse immunitaire innée.

Lorsque l'expression d'IL-33 devient inductible, celle-ci a un rôle de cytokine « classique ». Sa sécrétion devient alors continue par les cellules hématopoïétiques tels les macrophages et les mastocytes (63,64). Bien que l'expression de l'ARNm de *l'il-33* soit inductible dans les cellules hématopoïétiques dans un contexte inflammatoire, les taux observés après stimulation sont bien plus bas que ceux trouvés dans les tissus (61).

Cette dualité alarmine/cytokine a été bien démontrée par Shimokawa *et al.* en 2017 (65) dans un modèle d'infection à Helminthes dans lequel l'IL-33 est relarguée immédiatement et participe à

l'alerte du système immunitaire *via* la production d'IL-13 par les ILCs de type 2. De façon concomitante, les mastocytes exprimant le récepteur purinergique P2X7R sont activés par l'ATP (relargué à la phase initiale comme DAMP) de façon à produire et sécréter l'IL-33, intervenant là comme une cytokine, qui à son tour renforce la production d'IL-13 par les ILCs de type 2.

3.3. L'IL-33 dans l'homéostasie tissulaire et les maladies

L'IL-33 intervient dans l'homéostasie tissulaire de différents tissus. Son rôle a par exemple été documenté dans le tissu adipeux, les cellules de l'endomètre ou des glandes mammaires et dans le système nerveux central (66).

La première mise en évidence du rôle de l'IL-33 dans la défense anti-infectieuse a été rapportée dans l'infection parasitaire à Helminthe (67), au cours de laquelle l'IL-33 induit une réponse Th2, l'activation des mastocytes et des ILCs de type 2. Dans la leishmaniose viscérale, l'IL-33 est impliquée dans la suppression de la réponse Th1 (diminution de la sécrétion de l'IFNy, par exemple) (68). Dans la toxoplasmose cérébrale et le neuro-paludisme, l'IL-33 intervient dans l'expansion des ILCs de type 2, la polarisation M2 des macrophages et l'expansion de la population T régulatrice FoxP3⁺ (69,70). Concernant les infections fungiques, le rôle de l'IL-33 est plus complexe et dépend du tissu infecté et du type de lésion ayant conduit à l'altération de la barrière à l'origine de l'invasion et de la dissémination des pathogènes (61). Dans les infections bactériennes, l'IL-33 semble avoir un rôle protecteur lors de la phase aigüe mais pourrait être à l'origine d'une dysfonction immunitaire au long cours (61). Le rôle de l'IL-33 dans les infections virale semble être très dépendant du type de virus (VIH, dengue, coxsackie...).

L'IL-33 relarguée lors de lésions cellulaires peut être à l'origine d'une réponse inflammatoire excessive ; de même, les processus de contrôle de l'IL-33 (par les cellules T régulatrices FoxP3⁺, les ILCs de type 2, les macrophages M2) peuvent être déficients et conférer un rôle pro-inflammatoire à l'IL-33. L'IL-33 est ainsi impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires comme les phénomènes allergiques respiratoires, la rhinite allergique, l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique oblitérante, l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite

ankylosante, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'obésité et le diabète de type 2, notamment *via* son rôle dans l'homéostasie du tissu adipeux (61).

L'IL-33 ayant un rôle dans des processus tels que l'angiogénèse, la production de composants de la matrice extracellulaire, la fibrose et la modulation des populations cellulaires immunitaires, des liens entre l'axe IL-33/ST2 et la tumorigenèse ont été recherchés. La plupart des études (71) mettent en évidence un lien entre les niveaux sériques d'IL-33 et certaines tumeurs comme le cancer du sein (72), le cancer pulmonaire non à petites cellules (73), le cancer de l'ovaire (74) et le cancer colo-rectal (75), montrant des corrélations également avec le pronostic de ces tumeurs. Le rôle de l'IL-33 dans des processus de tumorigénèse « classiques » a été démontré, tels la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration et l'invasion (76). L'IL-33 semble avoir également un rôle anti-tumoral, notamment dans le cancer du col utérin (77) et le myélome (78) dans lesquels les taux sériques d'IL-33 corrèlent négativement avec le stade tumoral. Des travaux chez l'animal ont également suggéré un potentiel anti-tumoral de l'injection d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-33 (79,80), notamment dans un modèle de cancer colique dans lequel l'IL-33 endogène augmente la réponse anti-tumorale médiée par les lymphocytes T CD8+ en organisant un shift de la balance lymphocytes T CD8⁺/ cellules T régulatrices FoxP3⁺ en faveur des lymphocytes T CD8⁺ (81).

A l'état basal, l'IL-33 est exprimée dans les LSECs et les MaVECs du foie. En pathologie hépatique, l'IL-33 est impliquée dans l'insuffisance hépatique aigüe, la maladie alcoolique du foie, la stéatohépatite non-alcoolique, l'hépatite auto-immune, l'infection chronique par le virus de l'hépatite B, la fibrose et la cirrhose, le carcinome hépatocellulaire et les lésions d'I/R (voir **Paragraphe 3.4** plus bas). Nous avons décrit en détail dans notre **revue en Annexe** (44) le rôle de l'IL-33 dans les maladies inflammatoires du foie.

3.4. Rôle de l'IL-33 dans l'I/R hépatique

Le rôle de l'IL-33 dans les modèles d'I/R n'est pas formellement établi. Il n'a été étudié que dans des modèles murins d'ischémie chaude, à l'exception du dosage de l'IL-33 après ischémie chaude et reperfusion chez l'Homme au cours de résections hépatiques (Yazdani *et al.* (82)). Il n'y a pas

d'étude dans le contexte de la transplantation hépatique chez l'Homme, ni avec une ischémie froide dans un modèle animal. Il s'agit de modèles avec 60 à 90 minutes d'ischémie chaude, et généralement 4 à 6 heures de reperfusion. La diversité des fonds génétiques utilisés (Souris BALB/c ou C57BI/6) et l'étude de l'IL-33 constitutive « naturelle »/endogène ou l'injection d'IL-33 recombinante, l'existence ou non d'un pré-conditionnement expliquent probablement en grande partie les différences dans les résultats observés.

Yazdani *et al.* (82) ont récemment montré chez la souris, en utilisant des souris C57BI/6 déficientes en IL-33 et des souris BALB/c déficientes en ST2 que l'IL-33 relarguée à partir des LSECs augmentait l'inflammation stérile, aboutissant à la formation de NETs (pour *«neutrophil extracellular traps »* ou *«* pièges *»* extracellulaires à PNNs) dans le foie, tandis que l'administration d'IL-33 recombinante pendant l'I/R augmentait l'hépatotoxicité et l'inflammation. Chez l'Homme, on notait une augmentation des taux sériques d'IL-33 concomitamment à l'ischémie chaude lors de résections hépatiques, comparativement à des volontaires sains.

En revanche, le pré-conditionnement avec une injection intra-péritonéale d'IL-33 recombinante au moment de la reperfusion (83) avait un effet protecteur sur les hépatocytes, avec une diminution des lésions d'I/R *via* l'activation de NK-κB, de la p38 MAPK, de la cycline D1 et de bcl-2. Les auteurs concluaient que l'IL-33 protégeait des lésions d'I/R en réduisant les cytokines pro-inflammatoires et la production de chémokines par les hépatocytes et les CKs ainsi que l'activité des PNNs.

Il y a donc nécessité de mieux expliciter les mécanismes impliquant l'IL-33 comme alarmine dans l'I/R hépatique avant de pouvoir étudier de potentiels moyens thérapeutiques avec l'injection d'IL-33 recombinante, le blocage de l'IL-33 par son « decoy » récepteur sST2 ou le préconditionnement avec l'IL-33. L'inflammation stérile est un moteur de l'immunité innée et de l'immunité naturelle. L'immunité naturelle (voir **Figure 11**) est à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elle rentre en jeu quelques heures à quelques jours après la lésion initiale et le déclenchement de la réponse immunitaire innée mettant en jeu les DAMPs et les alarmines, les monocytes, les PNNs et les cellules NK. En mettant en jeu des populations lymphocytaires T atypiques telles que les cellules T- $\gamma\delta$, les cellules iNKT et les cellules MAIT, l'immunité naturelle constitue un relais précoce avec des cellules porteuses de TCRs non conventionnels, ceci avant d'être elle-même relayée par l'immunité adaptative spécifique.

Les cellules MAIT ont un TCR- $\alpha\beta$ invariant et sont associés aux muqueuses. Elles reconnaissent les vitamines microbiennes, les métabolites B et l' α -Mannosyl présentés par MR1. Elles sécrètent l'IFN γ , l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13. Les cellules T- $\gamma\delta$ ont un répertoire TCR variable et reconnaissent des structures antigéniques non polypeptidiques tels que le sulfatide et les petits métabolites bactériens phosphorylés présentés par le CMH et CD1 a, b, c et d. Les cellules T- $\gamma\delta$ sécrètent principalement le TNF α , l'IFN γ et l'IL-17 (84). Le **Paragraphe 5** qui suit est dédié à la population cellulaire iNKT à laquelle une partie de nos travaux de thèse a été consacrée.

Les acteurs moléculaires et cellulaires permettant de faire le lien entre immunité innée et immunité adaptative sont de plus en plus reconnus comme ayant une influence-clé sur la reprise de fonction précoce du greffon mais aussi sur la détermination du microenvironnement qui va guider les résultats à long terme de la transplantation (85).

Le relais le plus proche sur le plan cellulaire des DAMPs et des alarmines se situe donc au niveau des cellules de l'immunité naturelle. Parmi elles, les cellules iNKT, très présentes dans le foie chez la Souris, représentent une cible intéressante de l'IL-33. Elles sont en effet capables à leur tour d'augmenter la réponse inflammatoire stérile ou au contraire de la diminuer pour aller vers la résolution de l'inflammation (86,87).



Figure 11. Place des différents types d'immunité en fonction du temps après stimulation

PAMP: pour « *pathogen associated molecular pattern* », DAMP : pour « *danger associated molecular pattern* », iNKT : pour « *invariant natural killer T* », MAIT : pour « *mucosal-associated invariant T*», NK : pour « *natural killer* ».

D'après Jean-Marc Gombert.

5.1. Les cellules NKT

5.1.1. Définition des cellules iNKT

Ces 30 dernières années ont été marquées par la découverte de populations lymphocytaires T invariantes ou semi-invariantes, dont le répertoire TCR est monomorphe sans diversité des réarrangements V, D et/ou J (88). Les cellules iNKT qui en font partie expriment des marqueurs/fonctions des cellules NK et des cellules T. Elles sont dérivées du thymus et participent à l'immunité innée et naturelle. Elles sont sélectionnées puis activées/régulées *via* leur TCR par des glycolipides endogènes et/ou exogènes présentés par la molécule CD1d (89). Les cellules iNKT peuvent être identifiées en utilisant des tétramères CD1d chargés avec le ligand synthétique α GalCer.

5.1.2. Les deux sous-populations de lymphocytes NKT : type I et type II

A côté des cellules NKT avec un TCR- $\alpha\beta$ invariant (encodé par V α 14-J α 18 chez la souris et V α 24-J α 18 chez l'Homme) et dénommées iNKT (ou NKT de type I), il existe des cellules NKT utilisant divers récepteurs T variants et reconnaissant donc un répertoire TCR plus diversifié ; elles sont dénommées cellules NKT de type II. Dans les deux cas, la présentation est restreinte par le CD1d. Le **Tableau 3** reprend leurs principales caractéristiques.

	Cellules NKT type I (iNKT)	Cellules NKT type II
CD1d	Dépendant	Dépendant
Récepteurs T	TCR $\alpha\beta$ invariant codé par V α 14	Divers TCR
(TCR)	chez la Souris et V α 24 chez	
	l'Homme et Jα18	
Antigènes	Analogues de l' α GalCer,	Sulfatides, lysosulfatide,
reconnus	glycosphingolipides,	lysophospholipides
	diacylglycerols, phospholipides	
Proportions	> 95% des cellules NKT chez la	< 5% des cellules NKT chez la
	Souris	Souris
		Proportion plus importante chez
		l'Homme, surtout dans le foie
Phénotype mature	NK1.1+ chez la Souris,	CD161+ chez l'Homme
Modèle knockout	CD1d KO* et Ja18 KO	CD1d KO (mais pas J $lpha$ 18 KO)
murin		
Production	IFNγ, IL-4, IL-13	IL-4, IL-13, IL-10, IFNγ
cytokinique		

Tableau 3. Les deux types de cellules NKT

* Souris CD1d KO obtenue par délétion du locus Cd1d1/Cd1d2 par recombinaison homologue KO : knockout

D'après la revue de Gao et al., J Leuk Bio 2009 (90) et Liao et al., Inflamm Bowel Dis 2013 (91)

5.1.3. Les cellules iNKT chez l'Homme et la Souris

Les cellules iNKT chez l'homme présentent un haut degré de similarité avec les cellules iNKT de la Souris. L'utilisation du TCR, la spécificité des ligands et les fonctionnalités sont similaires entre les deux espèces. Les cellules iNKT constituent une population T minoritaire chez la Souris avec des localisations privilégiées puisqu'elles peuvent constituer jusqu'à 40% des lymphocytes hépatiques. Elles sont beaucoup plus rares chez l'Homme et représentent alors seulement 0,5 à 10% de la population lymphocytaire hépatique CD3⁺ (90).

5.1.4. La molécule CD1d et la présentation de lipides

Chez l'Homme, il existe 5 isoformes de la molécule non classique CMH 1-like CD1 : CD1-a, -b, -c, -d, -e alors que la Souris n'exprime que la molécule CD1d. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire exprimée par la majorité des cellules hématopoïétiques et notamment les CPAs. Dans le foie (92), la molécule CD1d est aussi exprimée à la surface des hépatocytes, des CKs et des LSECs. La reconnaissance de l'antigène et l'activation des cellules iNKT dépendent du niveau d'expression de CD1d à la surface des CPA, lequel peut être augmenté par l'IFNγ ou le TNFα.

Initialement, la reconnaissance des antigènes lipidiques présentés par la molécule CD1d a été démontrée dans le cas de *Mycobacterium tuberculosis*. La plupart des études *in vitro* et *in vivo* utilisent l'αGalCer synthétique et ses analogues. Les différents glycolipides bactériens reconnus par le TCR des cellules iNKT incluent des lipides de *Helicobacter pylori, Borrelia burgdorferi, Bacteroides fragilis, Aspergillus fumigatus,* démontrant la spécificité très large des cellules iNKT pour leurs ligands (89).

Les cellules iNKT peuvent également reconnaître des lipides du soi présentés par les CPA en conjonction avec un deuxième signal. L'importance de la reconnaissance des lipides du soi a été mise en évidence au cours des infections bactériennes par exemple à *Staphyloccoccus aureus* ou *Aspergillus fumigatus*, mais également au cours de l'inflammation stérile (voir plus bas).

Il existe trois types d'activation des cellules iNKT (89) (Figure 12) :

- l'activation directement par le TCR, sans nécessité d'autres signaux,
- l'activation par le TCR mais avec nécessité d'un deuxième signal par des cytokines sécrétées par des CDs activées via leurs PRRs,
- l'activation indépendante du TCR, aussi dénommée activation « de type NK », réalisée uniquement par des cytokines comme l'IL-12 ou l'IL-18.



Figure 12. Les trois voies d'activation des cellules iNKT

A : Les agonistes glycolipidiques comme l' α GalCer présentés dans le contexte CD1d activent *via* leur TCR les cellules iNKT sans besoin de signal supplémentaire.

B : Certains microbes contenant des lipopolysaccharides activent indirectement les cellules iNKT *via* leur TCR en induisant la production d'IL-12 par les cellules dendritiques (CD), ce qui amplifie la réponse faible permise par la reconnaissance CD1d-glycolipide endogène.

C : Les cellules iNKT peuvent être activées directement par des cytokines, sans activation du TCR.

D'après Hill et al., eLS 2016. Crédit figure @Mathieu Faliu

5.2. Les cellules iNKT, acteurs de l'inflammation stérile et de l'immunité naturelle

5.2.1. Interactions avec les autres cellules immunitaires

L'activation des cellules iNKT aboutit à la production rapide et massive de cytokines mais également à l'augmentation de l'expression membranaire de CD154 et CD40 ligand (CD40L).

L'interaction entre le CD40L et le CD40 des CPA participe à la maturation des CDs, qui à leur tour produisent l'IL-12 indispensable à la production d'IFNy par les cellules iNKT (93).

La production d'IFNy par les cellules iNKT, ainsi que l'IL-12 produite par les CDs activées par les cellules iNKT, conduit à la transactivation et à la prolifération des cellules NK (94).

Les cellules iNKT, *via* leur TCR et/ou les cytokines, dialoguent également avec les lymphocytes B (activation des lymphocytes B), les cellules TCD4⁺ et TCD8⁺ (activation et différenciation), les monocytes/macrophages (activation et polarisation M1 *vs* M2) et les PNNs (recrutement et régulation des activités suppressives) (86).

5.2.2. Différents profils cytokiniques à l'origine de plusieurs sous-populations de cellules iNKT

Chez la Souris, les cellules NKT sont une population hétérogène constituée d'au moins 4 souspopulations distinctes (NKT1, NKT2, NKT10, NKT17) en fonction de leur production de cytokines et de l'expression de facteurs de transcription, réparties différemment en fonction des tissus et du fond génétique considéré (86,89,95).

- Les cellules iNKT1, lesquelles représentent la majorité des cellules NKT du foie et de la rate chez la Souris. Les facteurs de transcription les caractérisant sont PLZF et T-bet ; elles sont principalement NK1.1^{+.} Elles secrètent majoritairement l'IFNγ et à un moindre degré l'IL-4. Elles ont plus particulièrement un rôle dans l'immunité anti-tumorale et l'I/R (96)
- Les cellules iNKT2, lesquelles sont principalement situées dans les ganglions, les poumons et l'intestin. Les facteurs de transcription les caractérisant sont PLZF et GATA3 ; elles sont NK1.1⁺ ou NK1.1⁻ et expriment le CD4 et l'IL-25R à leur surface. Elles produisent l'IL-4, l'IL-19, l'IL-10, l'IL-13 et à un moindre degré le GM-CSF. Elles sont notamment impliquées dans l'hyperréactivité bronchique (97–99) et le développement du carcinome hépatocellulaire par inhibition de l'expansion des cellules T CD8⁺ spécifiques (100)
- <u>Les cellules iNKT17</u>, lesquelles sont principalement situées dans les ganglions, les poumons et la peau. Les facteurs de transcription sont PZLF et RORγt. Elles sont NK1.1⁻ et expriment

l'IL-23R. Elles produisent l'IL-17A, l'IL-21 et l'IL-22. Elles sont impliquées dans l'hyperréactivité bronchique et l'encéphalomyélite auto-immune chez la Souris (101).

Les cellules iNKT10, lesquelles ont été identifiées plus récemment et qui sont localisées principalement dans le tissu adipeux. Leur développement et leurs fonctions effectrices sont indépendants de PZLF, facteur de transcription que seule cette sous-population de cellules iNKT n'exprime pas. Elles sont impliquées dans la tolérance immunitaire et la résolution de l'inflammation. Le déséquilibre entre les sous-populations iNKT1 et iNKT10 a été suggéré (102) comme un mécanisme du développement de l'inflammation chronique dans le tissu adipeux chez la Souris obèse. L'activation des cellules iNKT10 favorise la polarisation M2 des macrophages et améliore cette inflammation chronique du tissu adipeux.

5.3. Implication des cellules iNKT dans les maladies

Les propriétés uniques des iNKT (nature des ligands lipidiques restreints par CD1d, leurs moyens d'activation et leurs fonctions effectrices et immunorégulatrices) et leur réponse rapide après stimulation font des cellules iNKT des cibles potentielles importantes tant pour la mise au point de vaccins que d'immunothérapies dans les maladies auto-immunes, infectieuses ou en situation tumorale.

Nous donnons ci-dessous un aperçu des grands types de maladies (89,103) dans lesquelles les cellules iNKT sont impliquées, avant de documenter en détail leur rôle dans l'inflammation stérile et l'I/R.

5.3.1. Infections

En réponse à l' α GalDAG de *Borrelia burgdorferi*, les cellules iNKT prolifèrent rapidement et sécrètent l'IFN γ et l'IL-4 (104) ; elles permettent également de circonscrire l'infection en tuant les bactéries *via* le granzyme. Les cellules iNKT sont également impliquées dans la clairance de *Streptococcus pneumoniae* par le recrutement des PNNs vers le poumon infecté (105). Chez la Souris, l' α GalCer, en activant les NKT et en induisant une production rapide d'IFN γ , induisait la

protection contre des infections par la malaria, *Cryptococcus neoformans*, le virus de l'hépatite B et celui de l'encéphalomyocardite. Cependant, la protection induite par l'aGalCer semble dépendre du site de l'infection et des sous-populations de cellules iNKT impliquées. Dans le cas particulier de l'infection par le virus influenza, il semblerait que les cellules iNKT contribuent au contrôle du virus, et que l'activation des cellules iNKT par l'aGalCer favorise la production d'anticorps protecteurs (86)

5.3.2. Immunité anti-tumorale

La sous-population iNKT1 semble particulièrement impliquée dans l'immunité anti-tumorale. Les mécanismes de cette protection ne sont pas encore complètement connus mais semblent impliquer l'activation de plusieurs effecteurs situés en aval des cellules iNKT : cellules NK, lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, cellules Th1 et Th17, lymphocytes T- $\gamma\delta$, INF γ . Les cellules iNKT seraient impliquées dans la lyse directe des cellules de la lignée myéloïde (106).

5.3.3. Maladies auto-immunes et inflammatoires

Les mécanismes liés aux cellules iNKT impliquées dans l'auto-immunité (diabète de type I, sclérose en plaques, lupus érythémateux disséminé) doivent encore être explorés mais impliqueraient la balance Th1/Th2/Th17 dans la réponse aux auto-antigènes spécifiques, l'induction de l'anergie des cellules T pathogéniques, des effets directs sur les cellules B, l'induction de cellules T régulatrices FoxP3⁺ et la suppression de cellules myéloïdes.

Un rôle des cellules iNKT a été suggéré dans les colites des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin par réorientation de la réponse Th1/Th17 (91). Les lésions d'athérosclérose contiennent des molécules CD1d et des cellules iNKT et l' α GalCer exacerbe l'athérogenèse, soulignant le rôle des cellules iNKT dans l'athérosclérose (107).

Les cellules iNKT sont également impliquées dans l'hépatite auto-immune, avec un rôle délétère ou protecteur en fonction du modèle utilisé (CCl4, Concanavaline A), ainsi que la participation au développement de lésions de fibrose (108,109).

5.3.4. Maladies hépatiques

Les cellules NKT sont au centre de multiples dialogues cellulaires dans le foie. Plusieurs facteurs, dont les cytokines, les structures antigéniques, les types de CPA, peuvent moduler les réponses immunitaires médiées par les cellules iNKT (voir **Figure 13**). L'activation des cellules iNKT (103) peut mener à la fibrose, la maladie alcoolique du foie, la cholangite biliaire primitive et la stéatohépatite non-alcoolique *via* l'activation des cellules stellaires par hedgehog et l'ostéopontine, des lymphocytes B, des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK ainsi que la mort des hépatocytes par l'activation de la voie Fas-FasL. Les cellules iNKT sont également impliquées dans la clairance des virus de l'hépatite B, de l'hépatite C et du carcinome hépatocellulaire par la promotion de cytokines Th2, possiblement par des interactions avec les macrophages M2, les adipocytes et les hépatocytes.



Figure 13. Implication des cellules NKT dans la genèse des pathologies hépatiques

MAF : maladie alcoolique du foie, CBP : cholangite biliaire primitive, NAFLD : pour « *non alcoholic fatty liver disease* », OPN : osteopontine, HBV : virus de l'hépatite B, VHC : virus de l'hépatite C, CHC : carcinome hépatocellulaire.

D'après Zhu et al., Frontiers of Medicine 2018 (103).

Crédit figure @Mathieu Faliu.

5.4. Rôle des cellules iNKT dans la genèse des lésions d'I/R hépatique

Les cellules iNKT, en fonction de leur mode de stimulation et du type de sous-population activée, promeuvent soit la réponse inflammatoire *via* la sécrétion d'IFNγ ou d'IL-17A, soit sa résolution *via* la sécrétion des cytokines IL-4 et IL-10. Les cellules iNKT représentent donc une population cellulaire unique capable de déclencher et résoudre le processus d'inflammation stérile.

Plusieurs séries de travaux ont documenté l'implication des interactions TCR/CD1d dans l'activation des cellules iNKT dans le contexte d'inflammation stérile induit par l'I/R dans différents organes : foie, rein, poumon (voir **Revue en Annexe** « *The impact of invariant NKT cells in sterile inflammation : the possible contribution of the alarmine/cytokine IL-33* » (110)).

En I/R hépatique, Lappas *et al.* (96) ont démontré dans un modèle murin que les lésions d'I/R étaient initiées par l'activation des cellules NKT *via* le CD1d. L'activation des cellules iNKT était expérimentalement inhibée par l'activation des récepteurs adénosine A2A par un agoniste. Ces résultats sur la participation des cellules iNKT aux lésions d'I/R ont été confirmés par Kuboki *et al.* (111) dans un modèle murin d'ischémie chaude comprenant successivement 90 min d'ischémie partielle et 8 heures de reperfusion. Arrenberg *et al.* (112) dans un modèle murin d'I/R chaude, ont démontré des effets contraires des cellules NKT de type I et des cellules NKT de type II. Les cellules NKT de type I, autrement dit les cellules iNKT, étaient bien à l'origine d'une augmentation des lésions d'I/R (diminution des lésions chez les souris J α 18 KO) alors que les cellules NKT de type II, activées par le sulfatide, diminuaient ces lésions, notamment en diminuant la production d'IFNy et le recrutement des cellules myéloïdes CD11b⁺Gr-1⁻ et des cellules NK.

En revanche, les résultats semblent différents dans un contexte de pré-conditionnement : Cao et al. (113) ont montré que la pré-activation des cellules iNKT par de l'aGalCer, au contraire, protège des lésions d'I/R (avec notamment une diminution des PNNs dans le foie ischémique) selon un mécanisme dépendant de l'IL-13 et des récepteurs adénosine A2A.

Récemment, Liew *et al.* (87), grâce à un modèle de lésion hépatique localisée induite par la chaleur, ont montré que l'activation des cellules iNKT par des antigènes du soi induisait la sécrétion d'IL-4 mais pas d'IFNy. L'IL-4 induisait la prolifération hépatocytaire, la transition des monocytes avec une baisse d'expression de Ly6C et améliorait la guérison de la lésion. Ces cellules iNKT accédaient dans un second temps sur le lieu lésionnel, attirés par les antigènes du soi et les cytokines, et se rendaient exactement sur le lieu de l'inflammation à l'endroit où les monocytes co-localisaient et les hépatocytes proliféraient.

5.4.1. Arguments plaidant pour un axe IL-33/iNKT

Nous avons développé le concept de l'axe IL-33/iNKT dans la **Revue en Annexe** « *The impact of invariant NKT cells in sterile inflammation : the possible contribution of the alarmine/cytokine IL-33* » publiée par mon équipe d'accueil au sein du laboratoire (premier auteur : Maroua Ferhat). Les premiers arguments en faveur d'un axe IL-33/iNKT ont été publiés en 2009 (114) avec la prolifération, l'activation et l'expression de ST2 des cellules iNKT en réponse à un traitement par IL-33 recombinante chez la Souris. La sécrétion d'IFNγ par les cellules iNKT dépendait de l'IL-12 endogène.

Au sein du laboratoire, Thierry *et al.* ont démontré en transplantation rénale chez l'Homme (115) que l'IL-33 tant plasmatique qu'urinaire était corrélée à la durée d'ischémie froide et que les cellules iNKT étaient activées dès la première heure post-greffe, postulant l'existence d'un axe alarmine IL-33/iNKT. Cette observation a donc amené un autre travail publié par Ferhat *et al.* (56) s'intéressant à la mécanistique de cet axe dans un modèle murin d'I/R rénale. Nous avons pu démontrer que l'IL-33 agissait bien comme une alarmine en étant relarguée très précocement, et qu'elle était à l'origine du recrutement de cellules iNKT avec la production d'IFNγ et d'IL-17A, de façon dépendante de l'IL-12. L'activation des cellules iNKT permettait le recrutement des PNNs sur le site de l'ischémie, participant ainsi aux lésions d'I/R.

En I/R hépatique, la preuve d'un axe IL-33/iNKT n'a pas encore été apportée. Nous pouvons postuler que cette action coordonnée de l'IL-33 en tant qu'alarmine et des cellules iNKT s'applique également au foie où, comme dans le rein, la sévérité des lésions d'I/R dépend de l'IFNγ et de l'IL-17A (110).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif principal de ce travail était de déterminer si, à l'instar de ce qui a été démontré en I/R rénale, l'IL-33 agit également comme une alarmine dans le contexte de l'I/R hépatique dans un modèle d'ischémie chaude chez la Souris.

L'objectif secondaire était de déterminer le rôle des cellules iNKT dans ces phénomènes d'I/R : définir si elles participent avec l'IL-33 au recrutement des cellules immuno-inflammatoires (granulocytes neutrophiles et des monocytes/macrophages) et dans l'affirmative déterminer comment l'axe IL-33/iNKT peut s'articuler.



Figure 14. Objectifs du travail

Après un stress cellulaire comme celui engendré par l'I/R hépatique, les cellules endothéliales libèrent des médiateurs solubles du danger aboutissant au recrutement de cellules immunoinflammatoires, et finalement à des lésions histologiques de l'organe dont la fonction sera altérée. Les objectifs de ce travail étaient de savoir si l'IL-33 agit comme une alarmine dans ce contexte, et si elle contribue avec les cellules iNKT au recrutement de cellules immuno-inflammatoires. **DEMARCHE EXPERIMENTALE**

1.1. Description du modèle

Nous avons établi notre modèle d'I/R chaude chez la Souris selon les modèles déjà utilisés dans la littérature, notamment par Abe *et al.* (116).

Le clampage total n'étant pas toléré chez la Souris, nous avons donc choisi de clamper 70% du foie total, ce qui correspond aux lobes latéral gauche et intermédiaire droit (voir **Figure 15**). Le clampage était réalisé par un clamp vasculaire de microchirurgie atraumatique.

La durée de clampage de 70 min a été déterminée en prenant appui sur la littérature qui documente des durées de clampage comprises entre 60 min (113,117) et 90 min (111,118), permettant d'obtenir chez les Souris sauvages des pics de cytolyse entre 3500 UI/L et 8000 UI/L après 3 à 8 heures de reperfusion (96,111,113,117–119). Nous avons choisi des temps d'analyse très précoces (juste après le déclampage, puis après 1 et 4 heures de reperfusion) de façon à identifier les mécanismes de signalisation du danger cellulaire tels que les alarmines.



Figure 15. Clampage de 70% du foie

Clampage des pédicules glissoniens à destinée du lobe intermédiaire droit et du lobe latéral gauche. *Crédit figure @Mathieu Faliu*

1.2. Intérêt et contraintes du modèle

L'ischémie froide avec transplantation hépatique chez la Souris, qui serait plus proche du déroulé d'une transplantation hépatique chez l'Homme, est un modèle particulièrement difficile à réaliser, notamment car la Souris ne tolère pas plus de 20 min d'anhépatie, ce qui implique que la durée maximale entre l'ablation du foie natif et les anastomoses cave et porte du foie transplanté est de 20 min. C'est principalement cette contrainte qui rend le modèle de transplantation hépatique/ischémie froide chez la Souris particulièrement difficile à réaliser, avec une faible reproductibilité en dehors d'équipes spécialisées.

De plus, le modèle d'ischémie chaude/reperfusion se rapproche des conditions de la chirurgie hépatique de résection chez l'Homme lorsque le pédicule est clampé en totalité de façon intermittente lors de la transsection parenchymateuse.

Au total, le modèle d'ischémie chaude/reperfusion par clampage de 70% du pédicule hépatique est un modèle fiable, robuste et reproductible, au plus proche des conditions en pratique clinique chez l'Homme de résection hépatique sous clampage, et dans une plus faible mesure des conditions de la transplantation hépatique.

Il faut cependant noter que dans ce modèle d'I/R, seul le pédicule glissonien est clampé (afflux de sang au foie), mais pas les veines hépatiques : l'efflux veineux n'est donc pas interrompu, contrairement à ce qui se passe lors d'une transplantation hépatique. Ceci implique que, dès le début du clampage, des molécules ou des cellules peuvent quitter le foie vers la circulation systémique. Dans le cadre de la transplantation hépatique, le relargage des médiateurs moléculaires et cellulaires ne se fait qu'après déclampage des anastomoses cave et porte et remise en circuit du greffon.

2.1. Remarques générales sur l'analyse histologique des foies de Souris

Pour notre étude, le foie était d'abord rincé avec du PBS (pour « *phosphate-buffered saline* ») de façon rétrograde (par la veine cave inférieure infra-hépatique et après section de la veine porte) afin de débarrasser les gros vaisseaux des éléments sanguins. Les prélèvements étaient conservés dans du formol neutre après mis en paraffine, coupe et coloration HPS (Hémalin, Phloxine, Safran) au laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique de Tours. Certaines lames ont été colorées à l'acide périodique Schiff pour mieux visualiser la perte en charge glycogénique des hépatocytes.

Les premières coupes ont été lues avec le Dr Dujardin (Praticien Hospitalier dans le service d'anatomie et cytologie pathologique du CHU de Tours) de façon à reconnaître les différents éléments physiologiques et pathologiques. Puis j'ai analysé seule toutes les autres coupes, en revenant vers le Dr Dujardin pour relire certaines lames ensemble, ceci seulement en cas de difficulté d'interprétation.

De façon générale, les espaces portes sont moins facilement identifiables que chez l'Homme car moins fibreux et avec des artérioles de très petites tailles qui ne sont pas aisément identifiées. Le canalicule biliaire, lorsqu'il est visible, permet de reconnaître l'espace porte. La veine centrolobulaire est isolée, sans autre canal en coupe à proximité. Les hépatocytes chez la Souris ont fréquemment plusieurs noyaux, contrairement à ce qui est observé chez l'Homme. Les lésions histologiques « classiques » de fibrose, cholestase, stéatose macro vésiculaire n'ont été observées chez aucune Souris mais ont été recherchées à chaque fois. Les lésions d'origine purement toxique comme les corps de Mallory et les lésions de surcharge ferrique n'ont pas été recherchées.
2.2. Lésions histologiques liées à l'I/R

Les lésions histologiques hépatiques rencontrées au décours de l'I/R sont les suivantes (voir **Figures 16 à 18** pour l'illustration en images des principales lésions) :

• Souffrance hépatocytaire

Il s'agit de la lésion la plus facilement identifiable, allant de plages focales à des plages étendues. Elle comprend la présence de noyaux pycnotiques, une clarification du cytoplasme et une perte de la charge glycogénique. Ce sont des lésions pré-nécrotiques.

- Infiltrat inflammatoire à PNNs
- Congestion et dilatation sinusoïdale

Les globules rouges stagnent dans les sinusoïdes qui sont congestifs, voire dilatés.

• Stéatose micro vésiculaire

Elle est le reflet d'une souffrance cellulaire ; et pas d'une surcharge en gras comme la stéatose macro vésiculaire.

• Œdème portal

L'œdème portal est visible au niveau des espaces portes, avec un aspect feuilleté de la veinule portale.

• Ballonisation hépatocytaire

La ballonisation correspond au minimum à un doublement de la taille de l'hépatocyte.

• Clarification hépatocytaire

La clarification du cytoplasme des hépatocytes par perte de sa charge glycogénique est un des premiers signes de souffrance hépatocytaire.

La ballonisation hépatocytaire, la clarification hépatocytaire et la stéatose micro vésiculaire sont des signes caractéristiques de lésions d'I/R lorsqu'elles sont situées dans la zone 3 péricentrolobulaire. Isolées et situées dans la zone 1, elles peuvent correspondre à d'autres types de lésions.







В

Figure 16. Foie normal à faible (A) et fort (B) grossissement.

On peut distinguer les espaces portes (EP), reconnaissables car le canal biliaire est visible en coupe à côté de la veinule portale, de la veine centrolobulaire (VCL) qui est isolée. Entre les espaces portes et la veine centrolobulaire, on observe les travées hépatocytaires séparées par les sinusoïdes.



В

Figure 17. Foie après clampage : souffrance hépatocytaire et stéatose micro vésiculaire

A : Les zones de souffrance hépatocytaire apparaissent en clair par perte de la charge glycogénique. La zone 1 péri-portale apparaît un peu plus préservée.

B: Stéatose micro vésiculaire en zone 3, autour d'une veine centrolobulaire.



В

Figure 18. Foie après clampage : congestion sinusoïdale et œdème portal

A : Les zones de souffrance hépatocytaire apparaissent en clair. La congestion sinusoïdale est bien visible au niveau des travées sinusoïdales.

B : Plus fort grossissement montrant un espace porte entouré d'une couronne d'hépatocytes qui ne souffrent pas (plus foncés) avec un aspect « feuilleté » correspondant à de l'œdème portal.

2.3. Développement d'une grille de lecture standardisée

Nous avons développé en collaboration avec le médecin anatomopathologiste du CHU de Tours, le Dr Fanny Dujardin, spécialiste de la pathologie hépatique, une grille de lecture histologique comparable chez la Souris (voir **Figure 19**) et chez l'Homme (Partie **Discussion et Perspectives**), dans le cadre de l'exploitation de la biocollection réalisée dans le cadre du travail de thèse (voir Discussion et perspectives). Le but était de pouvoir semi-quantifier les lésions observées dans le cadre de l'I/R dans leur diversité, et pas uniquement en utilisant un logiciel permettant de calculer les surfaces. Les items étaient ou côtés oui/non avec un maximum de 1 point, ou de « absence » à « sévère » ou « absence » à « plus de 2/3 de la surface » en fonction de l'importance des lésions, avec un maximum de 3 points. En routine, chez l'Homme, ce même système de quantification « à l'œil » du pathologiste est utilisé, sans quantification informatique.

Cette grille est inspirée des travaux précédemment publiés dans des modèles animaux par Brockmann *et al.* (modèle porcin, 2005) (120), Liu *et al.* (modèle porcin de donneur à cœur arrêté, 2014) (121) et Suzuki *et al.* (chez le Rat, 1993) (122), ainsi que des grilles de lecture proposée en pathologie humaine par Shahbazi *et al.* (2015) (123), , Hubscher *et al.* (2001) (124), Ricca *et al.* (2014) (125) et des critères histologiques de Stanford (http://surgpathcriteria.stanford.edu/transplant/liverpreservationinjury/).

Chez la Souris, par rapport à ce qui est observé en pathologie humaine, nous avons choisi de ne pas inclure les lésions relevant de mécanismes toxiques auxquels les animaux n'étaient pas exposés (corps de Mallory, surcharge ferrique). Les plages de souffrance hépatocytaire observées étaient pré-nécrotiques, mais susceptibles de récupérer, raison pour laquelle nous avons préféré le terme de « souffrance hépatocytaire » à celui de « nécrose hépatocytaire ». Dans la nécrose hépatocytaire, seuls des fantômes d'hépatocytes sont visibles, alors que chez la Souris nous avons relevé des plages de clarification cytoplasmique par perte de la charge en glycogène (confirmée à la coloration PAS) avec des noyaux pycnotiques.

Enfin, nous avions inclus initialement l'item « infiltrat inflammatoire à PNNs », avec un maximum de 15 points au total du score de lésions hépatiques. Je me suis aperçue au fil des analyses que cette lésion était difficile à identifier à l'œil nu sans immunohistochimie pour mon œil non-expert.

Nous avons donc décidé de retirer cet item de la grille qui n'est désormais plus que sur un total de 12 points et avons préféré l'identification de l'infiltrat des PNNs par cytométrie en flux, méthode plus objective et quantitative.

GRILLES DE LECTURE - EXAMEN ANATOMOPATHOLOGIQUE DE FOIES DE SOURIS AVEC OU SANS

CLAMPAGE DU PEDICULE HEPATIQUE

Date de prélèvement :			
Type d'expérimentation :			
Nombre d'espaces porte : <20	20 à 40	>40	
Colorations effectuées : HPS	PAS	Trichrome Masson	Autre :

	Souffrance hépatocytaire	Absente (0) Légèr	re (1) Modérée (2) Sévère (3)	
Ischémie-	Infiltrat inflammatoire à	Absent (0) Léger	(1) Modéré (2) Sévère (3)	
Renerfusi	polynucléaires neutrophiles			
on	Congestion sinusoïdale	Absente (0) Légère (1) Modérée (2) Sévère (3)		
	Stéatose microvésiculaire	Absente (0) <1/3 (1) 1/3-2/3 (2) >2/3 (3)		
	Œdème portal	Oui (1) Non (0)		
Autres	Clarification hépatocytaire	Oui (1) Non (0)		
lésions	Ballonisation hépatocytaire	Oui (1) Non (0)		
	Fibrose	Localisation :	Absente F1 F2 F3 F4	
	Cholestase Oui Non	Localisation :	Prolifération cholangiolaire associée ?	
			Oui Non	
	Stéatose macrovésiculaire	Absente <1/3	1/3-2/3 >2/3	

Remarques:

Figure 19. Grille de lecture anatomo-pathologique standardisée des lésions d'I/R chez la Souris

Cette grille a été établie en collaboration avec le Dr F. Dujardin du département d'anatomie et cytologie pathologique de Tours. Les points attribués pour le score sont en bleu. L'infiltrat à PNNs, difficile à identifier pour un non-spécialiste en anatomo-pathologie, a été finalement retiré du score final.

ARTICLE ORIGINAL

L'article original en anglais sera soumis à *Hepatology* (IF : 14,9), journal centré sur l'étude du foie en recherche clinique et fondamentale.

Interleukin -33 contributes as an alarm signal to early hepatic ischemia-reperfusion injury by recruiting invariant Natural Killer T cells in a mouse model

Louise Barbier ^{1,2,3,4}, Aurélie Robin ^{1,5}, Héloïse Ducousso ^{1,4,5}, Fanny Dujardin⁷, Antoine Thierry ^{1,4,8}, Thierry Hauet ^{1,4,9}, Jean-Philippe Girard ¹⁰, Jean-Marc Gombert ^{1,4,11}, Ephrem Salamé ^{1,2,3}, André Herbelin ^{1,4}

<u>E-mails:</u>

LB: louisebarbier@hotmail.fr

- AR: robin.aurelie@ymail.com
- HD: heloise.ducousso@gmail.com
- FD: f.dujardin@chu-tours.fr
- AT: a.thierry@chu-poitiers.fr
- TH: thierry.hauet@chu-poitiers.fr
- JPG: jean-philippe.girard@ipbs.fr
- JMG: jean-marc.gombert@chu-poitiers.fr
- ES: e.salame@chu-tours.fr

AH: andre.herbelin@inserm.fr

Affiliations:

- 1: INSERM U1082, FHU SUPORT, Poitiers, France
- 2: Digestive surgery and liver transplantation, university hospital of Tours, France
- 3: University of Tours, Tours, France
- 4: University of Poitiers, Poitiers, France
- 5: University hospital of Poitiers, France
- 6: Urology, university hospital of Poitiers, France

7: Pathology, university hospital of Tours, France

8: Nephrology, university hospital of Poitiers, France

9: Biochemistry, university hospital of Poitiers, France

10: Institute of Pharmacology and Structural Biology - CNRS UMR 5089, Toulouse, France

11: Immunology, university hospital of Poitiers, France

Keywords: transplantation; liver; Interleukin-1 family; inflammation

Contact information of corresponding author:

André Herbelin

andre.herbelin@inserm.fr

IRATI (ImmunoRegulation, Alarmins and Innate T cells) group, Inserm U1082 unit

Pole Biologie Sante – B36 – 1, rue Georges Bonnet – TSA 51106 – 86073 POITIERS Cedex 9 –

FRANCE

Phone: (33) 5 49 44 30 89

Fax: (33) 5 49 44 49 22

Abbreviations:

ALT: alanine amino-transferase

DNA: deoxyribonucleic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FACS: fluorescence activated cell sorting

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HPS: haematoxylin phloxine saffron

HRP: horseradish peroxidase

IL: interleukin

iNKT: invariant Natural Killer T
I/R: ischemia-reperfusion
LSEC: liver sinusoidal endothelial cell
KO: knock out
NKT: natural killer T
PAS: periodic acid Schiff
PCR: quantitative polymerase chain reaction
RNA: ribonucleic acid
RT-qPCR: real-time quantitative polymerase chain reaction
ST2: suppression of tumorigenicity
WT: wild-type

Financial support:

The study was supported by The Nouvelle Aquitaine region, INSERM, the university hospital center of Poitiers, the university hospital of Tours, and the university of Poitiers.

Abstract

Background & Aims

Interleukin (IL)-33 plays a role as an alarmin in the initiation of the inflammatory response in renal ischemia/reperfusion (I/R) injury, involving invariant natural killer T (iNKT) cells. The aim of this study was to establish whether IL-33 also acts as an alarmin in hepatic I/R and to explore the contribution of iNKT cells.

Approach & Results

A model of warm hepatic ischemia with clamping of 70% of the liver was used in wild-type (WT) mice, IL-33-deficient (IL-33^{Gt/Gt}) mice and iNKT cell-deficient (J α 18 knock out) mice with C57BI/6 background. Severity of I/R injury was assessed with plasma alanine amino-transferase measurement and histological analysis.

In WT mice, IL-33 was constitutively expressed in liver endothelial cells of the sinusoids and of the portal venules, and was released as soon as the end of the ischemic phase without neo-synthesis. I/R injury was attenuated in IL-33-deficient mice after 4 hours of reperfusion, comparing to WT mice. Therefore, in the first hours after ischemia, IL-33 is released as an alarmin and is at least partly responsible for early I/R injury.

I/R injury was also decreased in iNKT cell-deficient mice after 4 hours while in WT mice, but not in IL-33-deficient mice, iNKT cells were activated in periphery (spleen) and recruited locally. Neutrophil granulocytes and monocytes/macrophages were recruited in the liver after one hour of reperfusion in WT mice, whereas this recruitment was decreased in both IL-33- and iNKT cell- deficient mice.

Conclusions

As an alarmin, IL-33 early contributes to I/R liver injuries by recruiting iNKT cells that would in turn amplify the recruitment of immuno-inflammatory cells together with IL-33, defining the IL-33/iNKT cell axis as a new mechanism of sterile inflammatory liver injury.

Introduction

In the setting of human liver transplantation, cold storage followed by warm reperfusion in the recipient induces ischemia/reperfusion (I/R) lesions, that are partly responsible for liver graft function recovery (1,2). Previous publications (3,4) demonstrated that I/R lesions are also involved in the triggering of adaptive immune response in liver and kidney transplantation with impact on organs fibrosis and rejection. Warm ischemia may also occur during liver transplantation, either in case of technical issue during the procedure, or with the use of grafts from donation after cardiac death donors, resulting in higher rates of liver graft dysfunction and late biliary complications (5).

Hence, reducing the genesis and the impact of the sterile inflammation process involved in I/R lesions represents a major challenge in liver transplantation, especially in the context of organ shortage and the need to use liver grafts from extended criteria donors (with cardiac arrest, steatosis, or elderly grafts) particularly prone to I/R injuries (6), as evidenced by the wide development of normothermic and hypothermic machine perfusion (7).

The triggering of innate immune response after I/R relies on the release of dangerassociated molecular patterns. Among them, interleukin (IL)-33 belongs to the IL-1 superfamily (8) and is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells. Interleukin-33 is rapidly released in response to danger signal after endothelial or epithelial cell damage during trauma or infection (9). On binding to its specific receptor ST2 and coreceptor IL-1 receptor accessory protein, IL-33 initiates the Myeloid differentiation primary response gene 88- dependent inflammatory pathway, thereby explaining its key role in various inflammatory diseases (10). Considering mouse models of

I/R injury, even though a role of IL-33 as an alarmin has been recently demonstrated in renal I/R (11), no direct evidence points to that conclusion regarding hepatic I/R (12). Yazdani *et al.* (12) demonstrated in a mouse model of I/R the pivotal role of IL-33 released by liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) in the promotion of neutrophil extracellular trap formation, whereas Sakai *et al.* (13) reported a direct protective effect of IL-33 on hepatocytes. In the two models, early alarmin-like release of IL-33 has not been documented, because IL-33 was apparently synthetized after I/R induction, like a conventional cytokine, or was exogenously administered. Moreover, the discordance of these two studies, i.e, a protective effect with pre-treatment of IL-33 vs. liver damage and systemic inflammation when administered after ischemia, seems to be a result of different time points of IL-33 action. Therefore, the role of IL-33 in liver I/R injury could be either pro-inflammatory or protective, depending on timing of its release and/or neo-synthesis. In humans, the relevance of IL-33 to human liver pathophysiology has been suggested in liver failure (14) and warm ischemia during liver surgery (12).

Natural killer T (NKT) cells, by representing up to 40% of T cells in the liver of the mouse, is an important potential cellular target for liver I/R (15). Accordingly, an implication of iNKT cells in the induction of liver sterile inflammation has been previously suggested in mouse models (16–18), while a potential role of liver-resident iNKT cells in switching from inflammatory response to resolution of liver injury has been further documented (19). Remarkably, IL-33 directly targets iNKT cells *in vitro*, inducing IFN-γ and IL-17A production (11,20,21), while recruitment of iNKT cells by IL-33 *in vivo* has been initially demonstrated in a model of innate-cell-driven lung inflammation (22). We further characterized a previously

undefined mechanism during kidney I/R where IL-33/ST2 engagement promotes iNKT cell recruitment, IFN-γ and IL-17A cytokine production, resulting in PMN infiltration (11,21).

These data led us to propose the concept of an IL-33/iNKT cell biological axis in renal I/R injury.

The primary objective of this study was to assess whether IL-33 is released and acts as an alarmin in a warm liver I/R model by recruiting immuno-inflammatory cells. Presuming that the coordinated action of IL-33 and iNKT cells resulting in immuno-inflammatory cell infiltration during kidney I/R may apply to the liver, we further sought to determine the contribution of iNKT cells in response to IL-33 in our liver I/R model.

Experimental procedures

This study is reported according to Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines, developed by the National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs) (23).

Ethical statement

Animal research was realized according to number 2010/63/UE European union directive from 10/22/2010, French order number 2012-10 from 01/05/2012, and French decree number 2013-118 from 02/01/2013.

Authorization for this study has been granted on 02/15/2017 by regional Ethical Committee (COMETHEA Poitou Charentes) under reference number 2016110211568800.

Study design

All surgical experiments were conducted using the same protocol. Three types of controls were used: (i) each animal was its own control as regards to histological analysis of the liver, with concomitant analysis of clamped and non-clamped liver samples, (ii) for IL measurement, some animals were their own control with blood sampling seven days before any surgical procedure and after surgical procedure, (iii) Sham-operated animals served as controls for surgical procedures. Sham animals underwent at the same time anesthesia and opening of the abdominal cavity and exposure of the hepatic pedicle without clamping, and were treated exactly as animals from the experimental group, except for the pedicle clamping.

Experimental animals

Wild-type (WT) C57BI/6 mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). IL-33-deficient mice with a Lac-z gene-trap (Gt) reporter (IL-33Gt/Gt) onto a C57BI/6 background were generated as described by Pichery *et al.* (24). Jα18 knock out mice (lacking iNKT cells) onto a C57BI/6 background were kindly provided by M. Taniguchi (25). Ten-to-twelve week-old male mice weighing between 22 and 30 g were used in all experiments.

Housing and husbandry

All animal research was conducted in PREBIOS animal facility (#86-050) of University of Poitiers, with authorization from regional Ethical Committee (COMETHEA Poitou Charentes) under number C2EA-84. All mice were maintained under specific pathogen-free conditions, with 5 animals maximum per cage provided with wood-shaving beddings, cardboard and paper nesting, and free access to food and water. There was no specific diet.

Sample size

In order to assess the reproducibility of the results, each group comprised at least 4 mice. Number of animals for each experiment is detailed in the figures' legends.

Mouse model of warm I/R injury (see Supplementary Figure 1)

All interventions were performed in the morning during the light cycle in a room dedicated to surgical procedures in mice. The whole procedure of warm I/R was adapted from the technique described by Abe *et al.* (26). Briefly, a clamp was placed in order to induce ischemia of 70% of the liver for 70 min.

Thirty minutes before general anaesthesia, mice received analgesia with subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg). Mice were then anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) in the lower right quadrant of the abdomen using a 25-gauge needle. Mice were then immobilized with tape on a heating pad at 37°C and received continuous anesthesia with gaseous administration of isoflurane (2% then 1.5% for maintenance). After swabbing of the abdomen with 70% ethanol, a laparotomy with right subcostal and upper midline incision was performed. The intestine was gently place on the left side on the mouse with moistened cotton swabs in order to expose the hepatic pedicle. Median and left lateral lobes were lift up to expose their hepatic pedicle just above the branching to the right lateral lobe and an atraumatic clamp was placed. This technique allows a partial ischemia of 70% of the liver (median and left lateral lobes), while right lateral and caudate, quadrate lobes are still perfused. Then, the intestine was replaced in the abdominal cavity. Saline serum was carefully added to the abdominal cavity for hydration, and the abdominal wall and skin were closed partially under the clamp to decrease heat loss and prevent dehydration. Clamp was applied for 70 minutes under gaseous isoflurane anesthesia. The clamp was then removed and the abdominal wall and skin were totally closed before isoflurane cessation. For mice with 1 to 24 hours of reperfusion, another intraperitoneal injection of buprenorphin (0.05 mg/kg) was performed for analgesia. Animals were culled at various time points after reperfusion by cervical dislocation.

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

Sample collection

For animals being sacrificed, blood samples were obtained by cardiac puncture under gaseous isoflurane 2% before euthanasia by cervical dislocation. For animals kept for further experiment, blood samples were obtained by retro-orbital bleed under gaseous isoflurane (5%). Blood samples were collected in tubes containing heparin. After centrifugation (10 min, 2000 g), plasma samples were stored at -20°C prior to alanine amino transferase (ALT) measurement and protein quantification by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Regarding liver collection, the portal vein was cut immediately after euthanasia and the inferior vena cava was injected with phosphate-buffered saline to perfuse the liver. Liver samples were preserved in formalin before paraffin embedding or in cryo-embedding media (OCT) before freezing in isopentane on dry ice and storage at -20°C, and stored at -80°C for protein and messenger RNA (mRNA) quantification.

Plasma ALT measurement

Plasma ALTs were measured at 37°C and calibrated with Calibrator for automated systems (Roche Diagnostic) using 8000 Roche/Hitachi Cobas c 701/702 analyzer.

Histological analysis of I/R injury lesions

All liver biopsies were 4% formalin-fixed and paraffin-embedded. Samples were cut at 3.5µm and were subjected to HPS (hematoxylin phloxine saffron) staining, and to PAS (periodic acid schiff) staining for some samples. LB and FD performed all histological examination.

A reading grid (see **Supplementary Table 1**) that has been established from previously published studies in animal models (27–30) by FD was used for all liver samples. In an attempt to quantify histological lesions of I/R injury, points were given for main histological

lesions, as follows: (i) Hepatocytes suffering: from none (0 point) to severe (3 points), (ii) Sinusoidal congestion: from none (0 point) to severe (3 points), (iii) Portal oedema: 1 point if present, (iv) Microvesicular steatosis: from none (0 point) to >2/3 of hepatocytes (3 points), (v) Cytoplasmic clarification of hepatocytes: 1 point if present, and (vi) Ballooning degeneration of hepatocytes: 1 point if present. The three last items were considered as I/R lesions when involving zone 3 hepatocytes. Hepatocytes necrosis corresponded to prenecrotic lesions with pyknotic nuclei, clarification of cytoplasm and loss of glycogen load. Total points for each animal was referred as liver injury score.

Interleukin-33 detection by immunohistochemistry

For IL-33 detection, 5µm cryo-sections were prepared and were fixed in acetone. After an immersion in peroxydase block solution (Diagnostic BioSystems K004), the sections were incubated with 1% foetal calf serum and then with a polyclonal goat anti-mouse antibody (R&D Systems, clone) overnight at 4°C. After incubation with the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-goat IgG secondary antibody (1:200, ThermoScientific), the immune complexes were visualized using DAB substrate (SK 4100 Vector). Cut sections were counterstained with haematoxylin (DAKO S2020) and rehydrated in ethanol and Histosol. Images were obtained by light microscopy.

Soluble protein quantification by ELISA

ELISAs were performed on plasma samples using Mouse IL-33 (Quantikine kit, R&D Biosystems) and IL-6 (Duoset, R&D Biosystems) kits.

Ribonucleic acid (RNA) extraction and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR)

Liver samples were weighted and placed in manufacturer's lysis buffer in gentleMACSTM M tubes (Miltenyi Biotec#130-096-335), dissociated with gentleMACSTM dissociator (Miltenyi Biotec) at room temperature, according to the manufacturer's instructions.

Total RNA was extracted from liver samples using the commercial kit Nucleospin® RNA (Macherey Nagel, Hoerdt), according to the manufacturer's instructions. A complementary desoxyribonucleic acid (DNA) was synthetized via reverse transcription from a total of 2 µg of ARN of each sample with High-Capacity complementary DNA Reverse Transcription kit (Applied BioSystems). Real-Time PCR assays were performed on an Applied 7500 Biosystems® thermal cycler using Power SYBR® Green PCR master Mix kit and priming for il-33 gene at 10 μΜ (Forward-CTACTGCATGAGACTCCGTTCTG and Reverse-AGAATCCCGTGGATAGGCAGAG). Priming for *il-6* gene was performed at 10 µM (Forward-CACAAGTCCGGAGAGGAGAC and Reverse-TTGCCATTGCACAACTCTTT). Quantification of mRNA normalized with *hprt* (horseradish peroxidase) gene (Forwardwas CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG and Reverse-CCAGTTTCACTAATGACACAAACG).

Protein extraction and Western blotting analyses

Liver samples were weighted and placed in RIPA lysis buffer (Cell Signaling Technology) with Complete[™] Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Clinisciences) in gentleMACS [™] M tubes (Miltenyi Biotec), dissociated with gentleMACS[™] dissociator (Miltenyi Biotec) at room temperature according to the manufacturer's instructions. Supernatants were collected after centrifugation (5 min, 2000g). Total concentration of protein in supernatant was assessed by using Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

Liver lysates were resolved on SDS-PAGE (Criterion TGX Precast Gel 12%, Bio-Rad) and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare Life sciences Amersham[™]). Non-specific binding sites were blocked with non-fat dry milk and incubated overnight at 4°C with goat anti-mouse IL-33 antibody (1:500), and then with an HRP-conjugated rabbit anti-goat polyclonal antibody (1:2000, Invitrogen). The immunoreactive proteins were visualized with ECL Clarity kit (Bio-Rad), using the ChemiDoc[™] MP imaging system (Bio-Rad). Relative protein levels were normalized to Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a loading control (1:2000, Cell Signaling, clone 14C10).

Cell preparation and staining for flow cytometry

Liver and spleen samples were harvested for flow cytometry analysis. After liver retrograde perfusion as described above, liver lobes were weighted and placed in DMEM cell culture media (Thermo Fischer) with enzymes from Liver Dissociation kit (Miltenyi Biotec) in gentleMACSTM C tubes (Miltenyi Biotec) before dissociation at 37°C with gentleMACSTM dissociator (Miltenyi Biotec) during 30 min according to the manufacturer's instructions. Spleen were weighted and placed in RPMI 1640 (Life Technologies) in gentleMACSTM C tubes (Miltenyi Biotec) before dissociation at room temperature with gentleMACSTM dissociator (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Samples were homogenized through a 100-µm cell-strainer and washed. Parenchymal cells were removed by centrifugation and red blood cells were lysed in ammonium chloride buffer before suspension in DMEM cell culture media for liver samples and RPMI 1640 for spleen samples. Cell counting was performed in tryptan blue. Cells were re-suspended in phosphate-buffered saline at 5.10⁶ cells/mL. Then, 1.10⁶ cells were transferred in each well before re-suspension in phosphate-buffered saline.

Cell staining and fluorescence-activated cell sorting analysis

Zombie NIR fixable viability kit-APC-Cy7 (BioLegend) was used to assess cell viability. Membrane labelling was performed using the following mouse antibodies: TCRb-PerCP-Cy5.5 (Biolegend, clone H57), CD45-AF488 (Biolegend, clone 30-F11), CD11b-PE (Biolegend, clone M1/70), F4/80–PE-Vio 770 (Biolegend, clone REA), GR-1-BV421 (Biolegend, clone RB6-8C5), CD69-BV421 (B H1.2F3), and unloaded MHC Tetramer (NIH) used as control with incubation during 30 min at 4°C and at room temperature for viability assessment. Control samples were performed with isotype-matched control antibodies and fluorescence minus one controls.

Fluorescence intensity was measured using BD FACS Verse[™] cytometer (BD Biosciences) and FlowJo v7 software (TreeStar, Inc). Gating strategy used for fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis is detailed in **Supplementary Figure 2**.

Statistical methods

Statistical analysis was performed using Excel[®] for Mac Os (Microsoft[®] Corporation) and Graph Pad Prism software v5 (La Jolla, Inc.).

Quantitative data are presented as absolute numbers. Qualitative data are presented as mean (standard error of the mean). Nonparametric tests were used because of the small number of animals per group and in order to increase robustness. Experimental and control groups were compared with two-tailed Mann-Whitney test. When animals were their own control, two-tailed Wilcoxon signed-rank test was used. Statistical significance was set at 0.05. Outliers were identified by extreme studentized deviate method (available at https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm). For each outlier data, the

experimental procedure and sample collection were checked. If a deviation from protocol appeared and was consistent with the outlier data, the latter was removed from analysis. If the deviation concerned the surgical procedure itself, all results from the same animal were excluded. If the deviation concerned only the collection or the analysis of a single sample, the other results from the same animal were not excluded.

Results

1. IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of liver endothelial cells from the portal venules and the sinusoids.

Immunostaining with anti-IL-33 antibody of frozen liver sections of WT mice without surgical procedure showed a constitutive presence of IL-33 in the nucleus of endothelial cells of the portal venules (**Figure 1A and B**) and of the sinusoids (LSECs, **Figure 1C**). There was no staining in the nucleus of endothelial cells of the centrilobular venules. **Supplementary Figure 3** displays the negative controls for immunohistochemistry.

2. Interleukin-33 reach peak levels at the end of the ischemic phase and return to basal state after 24 hours of reperfusion.

Before any experimental procedure, IL-33 was absent in the plasma (Figure 2A). Plasma levels of IL-33 increased immediately after ischemia and returned progressively to basal state after 24 hours of reperfusion. Meanwhile, a neo-synthesis of IL-33 appeared in the liver after 4 hours of reperfusion and was still present after 24 hours of reperfusion (Figure 2B). Comparing to the classical cytokine IL-6 (Supplementary Figure 4) that requires neo-synthesis before increase in plasma levels, IL-33 plasma levels rose very early, suggesting a release of pre-existing rather than neo-synthetized IL-33.

To explore more thoroughly this phenomenon, we focused on the very early phase in experimental and Sham animals.

3. IL-33 is immediately released in systemic circulation in response to hepatic pedicle clamping

In the same animals, plasma levels of IL-33 were nil before any surgical procedure, but significantly increased at the end of the ischemic phase (**Figure 3, A, left**), on the opposite of animals with Sham procedure (**Figure 3A, right**). Total amount of IL-33 protein in the liver significantly decreased just at the end of the ischemic phase and after one hour of reperfusion (**Figure 3B**), while neo-synthesis has not yet begun (**Supplementary Figure 5**). Taken together, these results show that IL-33 acts as an alarmin as soon as the early stage in warm ischemia and reperfusion, with constitutive expression in endothelial cells and immediate release upon danger signal, while neo-synthesis begins only after 4 hours of reperfusion. In order to study the consequences of this very early release of IL-33 after I/R, we compared the level of liver injury after 4 hours of reperfusion in WT and IL-33 deficient mice.

4. IL-33-deficient mice are protected against I/R injury after 4 hours of reperfusion.

After 4 hours of reperfusion, IL-33-deficient mice had less I/R injury, as demonstrated by less histological lesions assessed by the liver injury score (**Figure 4A and B**) and significantly lower levels of ALT (**Figure 4C**), compared to WT mice.

As these results showed evidence for the role of IL-33 in the triggering of I/R injury, we presumed that the recruitment of inflammatory immune cells in the liver also depends on IL-33, and we tested the hypothesis of an IL-33/iNKT cell axis involved in this recruitment, as an underlying mechanism.

5. Early recruitment of inflammatory cells depends on IL-33 after I/R injury

After one hour of reperfusion, inflammatory cells (neutrophils, macrophages, and monocytes) were recruited in clamped liver lobes in WT mice. This recruitment was significantly lesser in IL-33-deficient mice regarding local neutrophil counts (Figure 5A, Supplementary Figure 7), while no recruitment of macrophages (Figure 5B, Supplementary Figure 7) and monocytes (Figure 5C, Supplementary Figure 7) occurred in IL-33-deficient mice, suggesting that the alarmin IL-33 is at least partly responsible the recruitment of inflammatory cells on the site of sterile injury in WT mice.

6. Invariant NKT cells contribute to the recruitment of inflammatory cells after I/R.

In order to study the role of iNKT cells in the inflammatory recruitment after I/R, we used iNKT cell-deficient mice. After 1 hour of reperfusion (**Figure 6A, Supplementary Figure 7**), recruitment of neutrophils in the liver was significantly lesser in iNKT cell-deficient mice than in WT mice. There was no recruitment of macrophages and monocytes in iNKT cell-deficient mice, on the opposite of WT mice. After 4 hours of reperfusion, I/R lesions were lesser in iNKT cell-deficient mice with decreased ALT levels (**Figure 6B**) and less histological lesions (**Figure 6C**) compared to WT mice.

7. IL-33 is involved in the recruitment of iNKT cells in the liver.

To test the hypothesis of an IL-33/iNKT cell axis, we studied iNKT cells in the spleen and in the liver after 1 hour of reperfusion (**Figure 7, Supplementary Figures 8 and 9**). After one hour of reperfusion, the number of iNKT cells decreased in the spleen and

increased in the liver of WT mice, while being activated. On the opposite, IL-33-deficient

mice showed neither recruitment nor activation of iNKT cells in the liver, demonstrating that recruitment and activation of iNKT cells after I/R depends on IL-33.

Taken together, these results demonstrate that IL-33 recruits and activates iNKT cells in the spleen and in the liver. Once triggered, the IL-33/iNKT cell axis participates in the recruitment of monocytes/macrophages and neutrophils in the liver, and is at least partly responsible for I/R lesions.

Discussion

This work consequently provides evidence that IL-33 acts as an alarmin and is at least partly responsible for I/R injury involving iNKT cells and the recruitment of immune-inflammatory cells. These results support the hypothesis of an IL-33/iNKT cell axis in hepatic I/R injury, as it has previously been previously demonstrated in renal I/R injury (11,21).

Evidence supporting the existence of an IL-33/iNKT cell axis that promotes neutrophils infiltration in liver after I/R may be summarized as follows: (i) iNKT cells constitutively express the IL-33 receptor-specific ST2 chain (20), (ii) IL-33 drives recruitment and activation of iNKT cells in response to I/R, (iii) IL-33 and iNKT cells participate in the recruitment of immune-inflammatory cells.

We confirm in this study the deleterious effect of IL-33 and iNKT cells in I/R injury, as it has previously been shown in various mouse model (12,16,17).

By focusing on the very early stage of hepatic I/R, starting immediately at the end of the ischemic phase, we clearly demonstrated the role of IL-33 as an alarmin. Interleukin-33 acts here as a danger signal released by endogenous endothelial cells, before its neo-synthesis began, supporting the theory of the dual function alarmin/cytokine of IL-33.

We identified constitutive IL-33 in the nucleus of endothelial cells located both in the portal venules (macro vascular endothelial cells) and in the sinusoids (LSECs). This location is consistent with the previous results of Marvie *et al.* (31). Yazdani *et al.* (12) found constitutive IL-33 to be in LSECs with co-localization in immunofluorescence imaging.

However, the authors used LYVE-1 as a marker for endothelial cells that mostly binds to LSECs from zones 2 and 3, and not to macro vascular endothelial cells (32).

The impact of IL-33 on the recruitment of neutrophils showed in our study is in accordance with the results of Yazdani *et al.* (12). However, the authors demonstrated a direct effect of IL-33 on neutrophils in a ST2-dependent manner, by the mean of MAPK (mitogen-activated protein kinases) and NF-κB (nuclear factor- κB) pathways, and with direct correlation between IL-33 levels and neutrophil extracellular traps. Our hypothesis of an IL-33/iNKT cell axis can integrate into their findings, considering that: (i) the authors showed that adoptive transfer of ST2 KO neutrophils in depleted recipient mice indeed induced less I/R lesions that adoptive transfer of WT neutrophils that did not lack ST2 receptor ; however, these animals still had increased neutrophil extracellular trap comparing to sham animals, (ii) we, as others (16,17), demonstrated that recruitment of myeloid cells was dependent on iNKT cells, with decreased recruitment of neutrophils in mice deficient in iNKT cells. Two mechanisms of neutrophils through ST2 signaling, and indirect effect mediated by iNKT cells in the setting of an IL-33/iNKT cell axis.

Notably, the effect of IL-33 and of iNKT cells seems to be different in the context of preconditioning. Cao *et al.* (33) showed a decrease in I/R injury, and less neutrophil infiltration of the ischemic liver with α GalCer-preactivated iNKT cells 1 hour prior to warm I/R. Sakai *et al.* (13) demonstrated that pre-conditioning with recombinant IL-33 decreased hepatic I/R injury by activation of NF- κ B, p38 MAPK, cyclin D1, and Bcl-2 that limits liver injury and reduces the stimulus for inflammation. Yazdani *et al.* (12) reproduced this pre-activation with recombinant IL-33 in their model and also found that IL-33 displayed protective effect when injected just before ischemia and deleterious effect when injected just after reperfusion.

Given that both iNKT cells and IL-33 have a role in the resolution of injury in liver sterile inflammation models (13,19,33–36), the possibility that they also act in a concerted manner to resolve sterile inflammation driven by I/R may represent further working hypotheses.

This study has some bias, i.e. the absence of cold ischemia, limiting the model of liver transplantation, and the absence of proof of concept in human transplantation. However, IL-33 seems to be involved in human pathology in the context of liver failure (14) and liver resection (12), and CD1d-dependent activation of NKT cells is preserved from mice to Humans. Hence, strategies to impact on I/R injury in mouse models should be applicable in human liver transplantation and should represent therapeutic targets for graft function and tolerance.

References

- Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. Transplantation. 1993;55:807–13.
- 2. Varotti G, Grazi GL, Vetrone G, Ercolani G, Cescon M, Gaudio M Del, et al. Causes of early acute graft failure after liver transplantation: analysis of a 17-year single-centre experience. Clin. Transplant. 2005;19:492–500.
- Kron P, Schlegel A, Muller X, Gaspert A, Clavien P-A, Dutkowski P. Hypothermic Oxygenated Perfusion: A Simple and Effective Method to Modulate the Immune Response in Kidney Transplantation. Transplantation. 2019;103:e128–e136.
- 4. Schlegel A, Kron P, Graf R, Clavien PA, Dutkowski P. Hypothermic Oxygenated Perfusion (HOPE) downregulates the immune response in a rat model of liver transplantation. Ann. Surg. 2014;260:931–938.
- 5. O'Neill S, Roebuck A, Khoo E, Wigmore SJ, Harrison EM. A meta-analysis and metaregression of outcomes including biliary complications in donation after cardiac death liver transplantation. Transpl. Int. 2014;27:1159–1174.
- Hide D, Warren A, Fernández-Iglesias A, Maeso-Díaz R, Peralta C, Le Couteur DG, et al. Ischemia/reperfusion injury in the aged liver: The importance of the sinusoidal endothelium in developing therapeutic strategies for the elderly. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2019;
- 7. Dutkowski P, Guarrera J V., de Jonge J, Martins PN, Porte RJ, Clavien PA. Evolving Trends in Machine Perfusion for Liver Transplantation. Gastroenterology.

2019;156:1542-1547.

- 8. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. Immunol. Rev. 2018;281:154–168.
- 9. Moussion C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel "alarmin"? PLoS One. 2008;3:e3331.
- Barbier L, Ferhat M, Salamé E, Robin A, Herbelin A, Gombert J-M, et al. Interleukin-1
 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. Front. Immunol. 2019;10:2014.
- Ferhat M, Robin A, Giraud S, Sena S, Goujon J-M, Touchard G, et al. Endogenous IL-33
 Contributes to Kidney Ischemia-Reperfusion Injury as an Alarmin. J. Am. Soc. Nephrol. 2018;29:1272–1288.
- 12. Yazdani HO, Chen H-W, Tohme S, Tai S, van der Windt DJ, Loughran P, et al. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. J. Hepatol. 2017;68:130–139.
- Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. Hepatology. 2012;56:1468–78.
- Roth G a, Zimmermann M, Lubsczyk B a, Pilz J, Faybik P, Hetz H, et al. Up-regulation of interleukin 33 and soluble ST2 serum levels in liver failure. J. Surg. Res. 2010;163:e79-83.
- 15. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemiareperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013;10:79–89.

- Lappas CM, Day Y-J, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. J. Exp. Med. 2006;203:2639–48.
- Arrenberg P, Maricic I, Kumar V. Sulfatide-mediated activation of type II natural killer
 T cells prevents hepatic ischemic reperfusion injury in mice. Gastroenterology.
 2011;140:646–55.
- 18. Richards JA, Wigmore SJ, Anderton SM, Howie SEM. NKT cells are important mediators of hepatic ischemia-reperfusion injury. Transpl. Immunol. 2017;45:15–21.
- 19. Liew PX, Lee W-Y, Kubes P. iNKT Cells Orchestrate a Switch from Inflammation to Resolution of Sterile Liver Injury. Immunity. 2017;47:752-765.e5.
- 20. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. Eur. J. Immunol. 2009;39:1046–55.
- 21. Ferhat MH, Robin A, Barbier L, Thierry A, Gombert J-M, Barbarin A, et al. The Impact of Invariant NKT Cells in Sterile Inflammation: The Possible Contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33. Front. Immunol. 2018;9:2308.
- 22. Bourgeois E a, Levescot A, Diem S, Chauvineau A, Bergès H, Milpied P, et al. A natural protective function of invariant NKT cells in a mouse model of innate-cell-driven lung inflammation. Eur. J. Immunol. 2011;41:299–305.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS Biol. 2010;8:e1000412.
- 24. Pichery M, Mirey E, Mercier P, Lefrancais E, Dujardin A, Ortega N, et al. Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain,

Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel II-33–LacZ Gene Trap Reporter Strain . J. Immunol. 2012;188:3488–3495.

- 25. Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, et al. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. Science. 1997;278:1623–6.
- 26. Abe Y, Hines IN, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, et al. Mouse Model of Liver Ischemia and Reperfusion Injury: Method to Study Reactive Oxygen and Nitrogen Metabolites in vivo. Nat. Med. 2009;46:1–7.
- 27. Brockmann JG, August C, Wolters HH, Hömme R, Palmes D, Baba H, et al. Sequence of reperfusion influences ischemia/reperfusion injury and primary graft function following porcine liver transplantation. Liver Transplant. 2005;11:1214–1222.
- 28. Chang WT, Kao WY, Chau GY, Su CW, Lei HJ, Wu JC, et al. Hepatic resection can provide long-term survival of patients with non-early-stage hepatocellular carcinoma: Extending the Indication for resection? Surg. (United States). 2012;152:809–820.
- 29. Liu Q, Vekemans K, Iania L, Komuta M, Parkkinen J, Heedfeld V, et al. Assessing warm ischemic injury of pig livers at hypothermic machine perfusion. J. Surg. Res. 2014;186:379–89.
- 30. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. Transplantation. 1993;55:1265–72.
- Marvie P, Lisbonne M, L'helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin 33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. J. Cell. Mol.
 Med. 2010;14:1726–39.
- 32. Strauss O, Phillips A, Ruggiero K, Bartlett A, Dunbar PR. Immunofluorescence identifies distinct subsets of endothelial cells in the human liver. Sci. Rep. 2017;7:44356.
- 33. Cao Z, Yuan Y, Jeyabalan G, Du Q, Tsung A, Geller DA, et al. Preactivation of NKT cells with alpha-GalCer protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mouse by a mechanism involving IL-13 and adenosine A2A receptor. Am. J. Physiol. Gastrointest. liver Physiol. 2009;297:G249-58.
- 34. Cottagiri M, Nyandjo M, Stephens M, Mantilla J, Saito H, Mackay IR, et al. In druginduced, immune-mediated hepatitis, interleukin-33 reduces hepatitis and improves survival independently and as a consequence of FoxP3+ T-cell activity. Cell. Mol. Immunol. 2018;
- 35. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. J. Hepatol. 2012;56:26–33.
- 36. Noel G, Arshad MI, Filliol A, Genet V, Rauch M, Lucas-Clerc C, et al. Ablation of interaction between IL-33 and ST2 ⁺ regulatory T cells increases immune cell-mediated hepatitis and activated NK cell liver infiltration. Am. J. Physiol. Liver Physiol. 2016;311:G313–G323.

Author contributions:

LB developed methodology, performed investigation, and wrote the original draft

AR performed investigation and formal analysis.

HD performed investigation.

FD developed methodology, provided resources and performed investigation.

AT reviewed the manuscript.

JPG provided resources and reviewed the manuscript.

ES and TH were involved in project administration, performed supervision and reviewed the manuscript.

JMG and AH were involved in conceptualization and project administration, performed supervision, and wrote the manuscript (reviewing and editing).

Acknowledgments:

To Ms Sandrine Joffrion from the biochemistry laboratory of University Hospital of Poitiers (Head: Prof Thierry Hauet) for processing liver function tests

To the technical team from pathology laboratory of Tours University Hospital of Trousseau (Head: Prof Gonzague de Pinieux) for processing formol liver samples

To Mr Jeffrey Arsham for English editing

To the team of PREBIOS animal facility and to the CPER/FEDER program "HABISAN" To program FEDER/CPER "HABISAN" of Nouvelle Aquitaine for their participation in equipment funding.

To the PREBIOS platform (University of Poitiers) for the facilities and expertise

To Dr Adriana Delwail of Image Up platform, University of Poitiers, for flow cytometry

To the National Institute of Health (NIH) for complimentary providiing of unloaded MHC tetramer.



Figure 1. Interleukin-33 is constitutively expressed in the nucleus of liver endothelial cells from the portal venules and the sinusoids.

Frozen section of liver of WT mouse without surgical procedure (T0), immunohistochemistry with anti-IL-33 antibody: a nuclear staining (brown staining) appears in endothelial cells located in the portal venule (A and B, plain arrows) and in the sinusoids (C, dotted arrows).



Figure 2. Plasma levels of IL-33 reach peak levels at the end of the ischemic phase and return to basal state after 24 hours of reperfusion.

A: Plasma levels of IL-33 in pg/mL measured by ELISA method at different time points: before any surgical procedure (T0), at the end of the 70-min ischemic phase (I (70min)), and after 1, 4, 8, and 24 hours of reperfusion (I/R (1 to 24h)). Mean+SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=8 to 19 mice per group

B: Expression of *II-33* mRNA assessed by RT-qPCR method in the clamped liver lobes. Transcript levels of *II-33* were normalized against transcript levels for *hprt*. Mean+SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=5 to 9 mice per group

ns: non significant, * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001. ND: not done.





Figure 3. Interleukin-33 is immediately released in systemic circulation in response to hepatic pedicle clamping.

A: left: Plasma levels of IL-33 in pg/mL measured by ELISA method in the same animals before any surgical procedure (TO) and at the end of the ischemia phase (I (70min)). Each value is displayed, Wilcoxon signed-rank test, n=5 animals ; right: Plasma levels of IL-33 in pg/mL in WT mice measured by ELISA method in the same animals before any surgical procedure (TO) and after Sham surgical procedure. Wilcoxon signed-rank test, n=5 animals.

B: Total IL-33 content of the liver by Western blotting in WT mice before any surgical procedure (T0), at the end of the ischemia phase (I (70min)) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h), and in Sham animals. Expression of IL-33 was normalized against GAPDH expression. Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=4 to 6 mice per group ns: non significant, * p<0.05



Figure 4. Interleukin-33-deficient mice are protected against I/R injury after 4 hours of reperfusion.

A: Histological sections after paraffin embedding and HPS staining.

Up, left: Clamped liver of a WT mouse after 4 hours of reperfusion at 10 times magnification. Lesions are located next to the portal area, in Zone 1 hepatocytes. * shows a necrotic pale area next to the portal triad, # shows an area with sinusoidal congestion and dilatation (red blood cells in sinusoidal spaces), ° shows a non-necrotic area next to the centrilobular venule in Zone 3 hepatocytes. On the left of the demarcation line, lesions are less intense.

Up, right: Liver of a Sham WT mouse at 10 times magnification showing a normal liver.

Down, left: Clamped liver of an IL-33-deficient mouse after 4 hours of reperfusion at 10 times magnification. There is no necrotic area; only some minor sinusoidal congestion can be identified (#).

Down, right: Liver of a Sham IL-33-deficient mouse at 10 times magnification showing a normal liver.

B: Plasma levels of ALT (UI/L) in WT (left) and IL-33-deficient mice (right) in Sham animals, and after 4 hours of reperfusion. Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=5 to 9 mice per group.

C: Liver injury score in WT (left) and IL-33-- mice (right) in Sham animals, and after 4 hours of reperfusion (I/R (4h)). Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=5 to 10 mice per group. ns: non significant, * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.



Figure 5. Immuno-inflammatory cells are early recruited during liver I/R.

Neutrophil count (**A**), macrophage count (**B**), and monocyte count (**C**) in the clamped liver lobes of WT and IL-33-deficient mice, before clamping (T0) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h)). Immuno-inflammatory cells were identified by flow cytometry and results are displayed in absolute numbers per mg of liver. Mean+SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=4 to 11 mice per group. ns: non significant, * p<0.05, ** p<0.001



Figure 6. Early immuno-inflammatory cell recruitment and I/R lesions are attenuated in iNKT celldeficient mice.

A: Flow cytometry analysis of neutrophil count (up), macrophage count (middle), and monocyte count (down) in the clamped liver lobes of WT and iNKT-deficient mice, before clamping (T0) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h)). Results are displayed in absolute numbers per mg of liver. Mean+ SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=3 to 9 mice per group. ns: non significant, * p<0.05, ** to p<0.001.
B: Plasma levels of ALT (UI/L) in WT (left) and iNKT-- mice (right) in Sham animals, and after 4 hours of reperfusion (I/R (4h)). Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=5 to 7 mice per group.
C: Liver injury score in WT (left) and iNKT cell-deficient mice (right) in Sham animals, and after 4 hours of reperfusion (I/R (4h)). Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=4 to 5 mice per group.



Figure 7. Invariant NKT cells are activated in spleen and recruited in the liver in WT mice but not in IL-33-deficient mice.

A: Flow cytometry analysis of iNKT cells count in the spleen (left) and clamped liver lobes (right) of WT and IL-33-deficient mice, before clamping (T0) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h)). Results are displayed in absolute numbers per mg of liver or per mg of spleen. Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=5 to 12 mice per group.

B: CD69 expression of iNKT cells (Mean Fluorescence Intensity) in the spleen (left) and in the clamped liver lobes (right) of WT and IL-33-deficient mice, before clamping (T0) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h)). Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=5 to 12 mice per group.

ns: non significant, * <0.05, ** p<0.001, *** p<0.0001.

Ischemia- reperfusion injury	Hepatocytes suffering	None (0) Mild (1) Moderate (2) Severe (3)
	Sinusoidal congestion	None (0) Mild (1) Moderate (2) Severe (3)
	Microvesicular steatosis	None (0) <1/3 (1) 1/3-2/3 (2) >2/3 (3)
	Portal oedema	Yes (1) No (0)
Other lesions	Cytoplasmic clarification of	Yes (1) No (0)
	hepatocytes	
	Ballooning degeneration of	Yes (1) No (0))
	hepatocytes	
	Fibrosis Yes No	Location: None F1 F2 F3 F4
	Cholestasis Yes No	Location: Associated cholangiocytes proliferation?
		Yes No
	Macrovesicular steatosis	None <1/3 1/3-2/3 >2/3

Supplementary table 1. Histological grading of I/R injuries in mice.

Points attributed to each lesion are in blue font.



Supplementary figure 1. Experimental procedure of hepatic warm ischemia-reperfusion injury. A right subcostal and upper midline incision was performed under general anesthesia. After gentle placement of the intestine on the left side of the animal, median and left lateral liver lobes were lifted up and an atraumatic clamp was placed on the hepatic pedicle of the median and left lateral lobes in order to induce their ischemia. The intestine was placed in the abdominal cavity and the abdominal wall was partially closed during the ischemic phase of 70 minutes. Then, the clamp was removed and the abdominal wall and skin were totally closed. Animals were sacrificed at different time points: before surgical procedure (T0), at the end of the ischemic phase (I (70min)), and after 1, 4, 8 and 24 hours of reperfusion (I/R (1 to 24h)). Blood, clamped and non-clamped liver lobes were collected for ALT measurement, paraffin histology, frozen histology, Western Blot, RT-qPCR and flow cytometry analysis.

ALT: alanine amino-transferase, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, IHC: immunohistochemistry, RT-qPCR: real-time quantitative polymerase chain reaction



Supplementary Figure 2. Gating strategy for immuno-inflammatory and iNKT cell analysis by flow cytometry A: Neutrophils (CD11b⁺GR-1^{high}), monocytes (CD11b^{high} F4/80^{low} GR-1^{low}) and macrophages (CD11b⁺F4/80⁺) B: iNKT cells

CTR: control



Supplementary Figure 3. Controls from Figure 1A.

A: Frozen section of liver of WT mouse without surgical procedure, immunohistochemistry with anti-IL-33 antibody (as in figure 1 panel A). **B**: Frozen section of liver of WT mouse without surgical procedure, immunohistochemistry with anti-IL-33 antibody: negative control with anti-goat secondary antibody. **C**: Frozen section of liver of IL-33 deficient mouse without surgical procedure, immunohistochemistry with anti-IL-33 antibody: negative control with anti-goat secondary antibody. **D**: Frozen section of liver of IL-33 deficient mouse without surgical procedure, immunohistochemistry with anti-IL-33 antibody: negative control with anti-goat secondary antibody. **D**: Frozen section of liver of IL-33 deficient mouse without surgical procedure, immunohistochemistry with anti-IL-33 antibody: negative control with anti-goat secondary antibody. **D**: Frozen section of liver of IL-33-deficient mouse without surgical procedure, immunohistochemistry with anti-IL-33 antibody: negative control.



Supplementary Figure 4. Plasma levels of IL-6 and expression of *il-6* mRNA in the liver

A: Plasma levels of IL-6 in pg/mL measured by ELISA method at different time points: before any surgical procedure (T0), at the end of the 70-min ischemic phase (I (70min)), and after 1, 4, 8, and 24 hours of reperfusion. Mean+SEM, Mann-Whitney test, n=2 to 6 mice per group.

B: Expression of *II-6* mRNA assessed by RT-qPCR method in the clamped liver lobes. Transcript levels of IL-6 were normalized against transcript levels for *hprt*. Mean+SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=6 to 11 mice per group, ns: non significant, * p<0.05, ** p<0.001, ND: not done.



Supplementary Figure 5. Expression of *II-33* mRNA assessed by RTqPCR method in the clamped liver lobes before any surgical procedure (T0), in Sham animals, at the end of the ischemia phase (I(70min)) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h)). Transcript levels of *II-33* were normalized against transcript levels for *hprt*. Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, n=5 to 9 mice per group, ns: non significant.





IL-33 KO mouse/I/R (4h)/NCL





WT mouse/I/R (4h)/CL/PAS staining



WT mouse/I/R (4h)/CL/PAS staining



WT mouse/I/R (4h)/NCL



Supplementary Figure 6. Liver I/R injury in clamped and non-clamped liver lobes of WT and IL-33-deficient mice.

A: Liver injury score in clamped lobes (CL) and in non-clamped liver lobes (NCL) of WT mice (left), and in in clamped lobes (CL) and in non-clamped liver lobes (NCL) of IL-33-deficient mice. Mean+/- SEM, two-tailed Mann-Whitney test, 5 to 8 mice per group, ns: non significant, * p<0.05.

B: Clamped liver (up) and non-clamped liver (down) of an IL-33-deficient mouse after 4 hours of reperfusion at 10 times magnification, HPS staining. There is only minimal sinusoidal congestion in both livers.

C: Clamped liver (up) and non-clamped liver (down) of a WT mouse after 4 hours of reperfusion at 10 times magnification, HPS staining. The non-clamped liver shows no I/R lesion, on the contrary of the clamped liver. In the middle, clamped liver of the same WT mouse after 4 hours of reperfusion at 5 and 10 times magnification with PAS staining, showing the loss of glycogen load in suffering areas that appear lighter. Glycogen in hepatocytes appears purple. The suffering areas concern zone 2 and zone 3 hepatocytes, with a relative preservation of zone 1 hepatocytes, in accordance to location of I/R injuries.



Supplementary Figure 7. Representative results for flow cytometry analysis of neutrophils (CD11b⁺GR-1^{high}), macrophages (CD11b⁺F4/80⁺), and monocytes (CD11b^{high} F4/80^{low} GR-1^{low}) in the clamped liver lobes of WT mice, IL-33-deficient mice (T0), and iNKT cell-deficient mice before clamping and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h)).



Supplementary figure 8. Representative results for flow cytometry analysis of iNKT cells (TCR $\alpha\beta^+$ PBS57-CD1d⁺ (Tetramer⁺)) in the clamped liver lobes of WT mice and IL-33-deficient mice before clamping (TO) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h)).



Supplementary Figure 9. CD69 expression (Mean Fluorescence Intensity) in iNKT cells in the spleen (left) and in the clamped liver lobes (right) of WT and IL-33-deficient mice, before clamping (T0) and after 1 hour of reperfusion (I/R (1h)). N=5 to 12 mice per group.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Mise en perspective des résultats du travail par rapport à la littérature

1.1. Résumé des principaux résultats de l'étude

Nous avons donc pu démontrer (voir **Figure 20**), à travers la modélisation chez la Souris d'une ischémie chaude suivie de reperfusion, que l'IL-33 était immédiatement relarguée à partir des cellules endothéliales des veinules portes et des sinusoïdes, agissant donc bien comme une alarmine.

L'IL-33 recrute depuis la rate et active les cellules iNKT qui sécrètent de l'IFNy et, à leur tour, recrutent les cellules immuno-inflammatoires : PNNs, macrophages et monocytes.

L'infiltration par le foie des cellules inflammatoires participe aux lésions histologiques d'I/R.

1.2. Intégration de nos résultats dans la mécanistique de l'I/R

Notre proposition d'un axe IL-33/iNKT s'intègre dans la mécanistique générale des lésions d'I/R hépatique. Chaque étape proposée dans la **Figure 21** sera discutée plus bas.

Une phase très précoce, dès le début de la phase d'ischémie, peut-être médiée par les radicaux oxygénés et nitrogénés (126), semblerait intervenir avant le relargage de l'IL-33 par les cellules endothéliales, expliquant la présence de lésions même chez les Souris déficientes en IL-33 à la phase très précoce (voir **Paragraphe 2** suivant).

Les CKs, résidentes dans le foie, pourraient également intervenir (127,128), ainsi que les molécules du complément (53).

Les cellules endothéliales sinusoïdales (notre étude, (82,129)) et les veinules portes (notre étude, (129)) libèrent l'IL-33 dans le milieu extra cellulaire dès la fin de la phase ischémique. Son expression ultérieure par d'autres cellules du foie, tels les hépatocytes (82) de façon inductible, dans le cadre de la fonction cytokine de l'IL-33, n'est pas encore parfaitement établie. Elle a un rôle direct dans le recrutement et l'activation des PNNs (82) et des cellules iNKT (notre étude) *via* le récepteur ST2. Les cellules iNKT sécrètent l'IFNy (notre étude, (96)) participent à leur tour au recrutement et à l'activation des cellules immuno-inflammatoires (PNNs, monocytes et macrophages) et des cellules NK (112).

L'hypothèse d'un rétrocontrôle de la synthèse de l'IL-33 par les cellules iNKT, participant peut-être à la résolution de l'inflammation, doit être soulevée. Le switch de la phase inflammatoire vers la phase de résolution de l'I/R pourrait être orchestré par les cellules iNKT *via* la sécrétion d'IL-4 (87), par l'IL-33, en favorisant le profil M2 des macrophages (70), ou encore par les ILCs de type 2 (65). Les cellules NKT de type II (87) et l'injection de ST2 soluble (117) pourraient avoir un effet protecteur.

Parmi les stratégies de pré-conditionnement pouvant être mises en œuvre pour diminuer les lésions d'I/R, nous retrouvons l'injection par injection d'IL-33 recombinante (83) ou la stimulation pharmacologique des cellules iNKT *via* leur TCR (113).



Figure 20. Schéma récapitulatif des principaux résultats de l'étude. PNN : polynucléaire neutrophile, iNKT : cellule NKT invariante Crédit figure @Mathieu Faliu



Figure 21. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'induction et le contrôle de l'I/R hépatique : intégration de nos résultats (flèches oranges), des résultats acquis dans la littérature (flèches vertes) et des voies de recherche futures (en rouge). ROS : dérivés oxygénés, iNKT : cellule natural killer T invariante, PNN : polynucléaire neutrophile, T reg : cellule T régulatrice FoxP3⁺, NK : cellule natural killer, ILC : cellule « innate lymphoid ».

Nous avons montré dans l'article original des taux plasmatiques d'ALAT plus faibles et des lésions histologiques moins marquées après 4 heures de reperfusion chez les Souris déficientes en IL-33 et déficientes en cellules iNKT par rapport aux Souris sauvages.

Nous avons analysé l'atteinte hépatique de façon plus précoce, soit après une heure de reperfusion, avec le dosage des ALT plasmatiques et la détermination des scores histologiques (Figure 22 et Figure 23).

Après une heure de reperfusion, on objective déjà une souffrance hépatocytaire (dosage ALT) et des lésions d'I/R (score histologique). Mais il n'existe pas de différence significative dans leur intensité entre les différents groupes sauvages, déficients en IL-33 et déficients en cellules iNKT.

L'hypothèse d'un mécanisme initial aboutissant à de la souffrance hépatocytaire et ne dépendant pas de l'IL-33 peut donc être avancée. Il pourrait s'agir d'un mécanisme local dépendant du stress oxydatif induit par l'hypoxie plutôt que par la reperfusion, par exemple par toxicité directe des dérivés oxygénés et nitrogénés.

Chez certaines Souris (tous groupes confondus), il a été noté des zones de souffrance hépatocytaire plutôt dans la zone 1 péri-portale que dans la zone 3 péri-centrolobulaire où sont classiquement observées les lésions d'I/R. Cette observation n'était cependant pas généralisable à tous les animaux. La zone 1 correspond à la zone par laquelle arrive l'oxygène au foie. En plus des sinusoïdes, c'est dans cette zone que l'IL-33 est présente constitutivement au niveau des cellules endothéliales. Al-Khafaji et al. (130) ont pu démontrer chez la Souris que le superoxide, un radical intermédiaire du métabolisme de l'oxygène, participe à la formation de NETs via TLR4 et NOX (pour « neutrophil NADPH oxidase »). Dans cette étude, cependant, les lésions d'I/R n'étaient cependant observées qu'après 6 heures de reperfusion. Sun et al. ont montré que MCPIP-1 (pour « monocyte chemoattractant protein-induced protein 1 ») avait un effet protecteur partiellement médié par HIF-1 α (pour « *hypoxia-inductible factor 1\alpha* »), protéine d'adaptation au stress oxydant. Au total, la quantification des dérivés oxygénés et nitrogénés en histologie serait intéressante pour explorer cette première étape très précoce. La Figure 24 illustre la faisabilité d'une détection du stress oxydatif dans les cellules par la technique CellROX, en immunofluorescence après un clampage hépatique suivi d'une heure de reperfusion. Une analyse comparative des lobes clampés au niveau transcriptomique pour hif-1 α et au niveau protéique par western blot chez les Souris

123

sauvages et déficientes en IL-33 permettrait de confirmer notre hypothèse d'un mécanisme précoce de lésion et de tester l'hypothèse d'un axe HIF-1 α /IL-33.



Figure 22. Dosage plasmatique des ALT (UI/L), en haut, **et score histologique d'I/R**, en bas, chez les Souris Sham et après une heure de reperfusion, chez les Souris sauvages (WT), déficientes en IL-33 et déficientes en cellules iNKT (Jα18 KO). Tests de Mann-Whitney bilatéraux, moyenne+/écart standard de la moyenne, 3 à 9 animaux par groupe.



Figure 23. Coupes histologiques du foie, grossissement 5, coloration HPS chez une Souris sauvage (en haut) et déficiente en IL-33 (en bas) après une heure de reperfusion

Les zones plus claires correspondent à des zones de souffrance hépatocytaire, plutôt situées en zone 3 ; on les observe chez la Souris sauvage et chez la Souris déficiente en IL-33. On peut également observer une congestion et une dilatation sinusoïdale.



Figure 24. Détection du stress oxydatif en immunofluorescence par CellROX sur une coupe de foie issue d'une Souris sauvage, 1 heure après reperfusion

Par rapport à un modèle d'ischémie froide avec transplantation hépatique, le drainage veineux est conservé lors de l'ischémie chaude avec possibilité pour certains médiateurs d'atteindre la circulation systémique dès le début de la phase d'ischémie et sans attendre la reperfusion par le pédicule hépatique. Par conséquent, l'arrivée de médiateurs par voie systémique n'est pas exclue et les hypothèses ne peuvent pas être uniquement locales au niveau du foie.

3.1. IL-33 constitutive

De la même façon que Marvie *et al.* en 2010 (129), nous avons documenté par immunohistochimie une expression constitutive d'IL-33 dans le noyau des cellules endothéliales situées au niveau des sinusoïdes (LSECs) mais aussi des cellules des vaisseaux (MaVECs). Dans notre étude, nous avons localisé l'expression de l'IL-33 au niveau des MaVECs des veinules portes mais pas des veinules centrolobulaires.

Comme détaillé dans la discussion de leur article, Yazdani *et al.* (82) n'ont identifié l'IL-33 que dans les LSECs, mais en utilisant par technique d'immunofluorescence un marqueur spécifique des LSECs (131).

La zone 1, autour de la veinule portale, est la première à ressentir l'hypoxie car c'est elle qui contient l'artériole apportant le sang oxygéné. Cet argument de co-localisation serait en faveur d'une relation entre les dérivés oxygénés et nitrogénés et l'IL-33.

3.2. IL-33 en situation de stress

Dans les foies fibreux, Marvie *et al.* (129) ont montré l'expression nucléaire d'IL-33 dans les cellules stellaires activées en myofibroblastes. En situation normale (foie sain), cette expression n'est pas visible au sein des cellules stellaires.

Nous posons donc la question de savoir si d'autres types cellulaires peuvent sécréter l'IL-33 en situation de stress lié à l'I/R, par exemple les hépatocytes. Arshad *et al.* en 2012 ont identifié l'expression d'IL-33 dans les hépatocytes en situation de stress induit par la Concanavaline A qui constitue un modèle d'hépatite auto-immune (132).

Nous avons mis en évidence une néo-synthèse inductible d'IL-33 dans le foie à partir de 4 heures de reperfusion (**Figure 2** de l'article original). Le sens physiologique de cette néo-synthèse reste à déterminer. Il pourrait s'agir d'une reconstitution du stock « alarmine » dans le noyau des cellules

endothéliales et/ou de l'induction d'une synthèse dans les hépatocytes. La possibilité d'une étape correspondant au rôle de cytokine, inductible, de l'IL-33, après son rôle précoce d'alarmine stockée/relarguée en lien avec une fonction protectrice/réparatrice sera discutée en détail ciaprès dans les **paragraphes 5.3** et **5.4**.

De nouvelles analyses d'immunohistochimie après I/R seront nécessaires pour valider ou non l'hypothèse d'une synthèse d'IL-33 par les hépatocytes dans le contexte de l'I/R hépatique. Remarquons que dans les plages de souffrance hépatocytaire après I/R, les noyaux des hépatocytes sont pycnotiques, ce qui peut engendrer une difficulté d'identification. Nous ne pouvons pas exclure dans des hépatocytes en souffrance une localisation intracytoplasmique de l'IL-33 ; cependant, les marquages intra-cytoplasmiques sont souvent peu spécifiques (133).

En immunohistochimie sur coupes cryopréservées (voir **Figure 25**), l'architecture était souvent assez peu conservée pour pouvoir définitivement montrer qu'il existait une synthèse d'IL-33 dans les hépatocytes. Nous compléterons ces analyses en recherchant une co-localisation IL-33 / antigène hépatocytaire.



Figure 25. Coupes histologiques de foie de Souris WT après 4 heures (en haut) et 8 heures (en bas) de reperfusion.

Les flèches noires indiquent un marquage de l'IL-33 localisé dans les MaVECs, et les flèches bleues, un marquage possiblement localisé dans les hépatocytes.

4.1. Effet direct de l'IL-33 sur le recrutement des PNNs

Yazdani *et al.* (82) ont montré, tant dans le modèle murin que *in vitro*, une action directe de l'IL-33 sur le recrutement des PNNs sous la forme de NETs. Ces résultats sont conciliables avec les nôtres (**Figures 5 et 6** de l'article original) : nous montrons après dissection des foies et leur analyse quantitative par cytométrie en flux que chez les Souris déficientes en IL-33 et en cellules iNKT, il existe un recrutement de PNNs beaucoup plus faible que chez les Souris sauvages, mais tout de même présent, avec un compte de PNNs significativement plus élevé après 1 heure de reperfusion par rapport aux animaux avant I/R.

La **Figure 26** montre la présence de PNNs sur les coupes 24 heures après la reperfusion chez une Souris sauvages et chez une Souris déficiente en IL-33. Chez la Souris sauvage, on note la présence de PNNs au sein de larges plages de souffrance hépatocytaire / nécrose hépatocytaire. Chez la Souris déficiente en IL-33, des PNNs sont présents entre les hépatocytes mais il n'y a pas de large plage de souffrance hépatocytaire comme chez la Souris sauvage.

Il semble donc exister plusieurs voies de recrutement et d'activation des PNNs, même en l'absence d'IL-33 ou de cellules iNKT.

4.2. Effet de l'IL-33 sur les cellules iNKT

Nous avons pu démontrer dans notre article original que les cellules iNKT intervenaient dans le recrutement des PNNs, que l'IL-33 agissait comme une alarmine en recrutant les cellules iNKT et que donc l'ensemble de ces mécanismes explique au moins en partie le recrutement des PNNs chez la Souris sauvage.





В



С

Figure 26. Immunohistochimie avec marquage des PNNs par Ly6G après 24 heures de reperfusion

Marquage chez une Souris sauvage (A) montrant un marquage des PNNs au sein des zones de souffrance/nécrose hépatocytaire et chez une Souris déficiente en IL-33 (B) montrant un marquage des PNNs en dehors de zones de souffrance. Contrôle négatif par anticorps secondaire anti-rat (C).

4.3. Mise en jeu du récepteur spécifique de l'IL-33 ?

Afin de pouvoir évaluer la mise en jeu d'un axe IL-33/ST2, nous avons réalisé les procédures de clampage chez des Souris ST2 KO. A 4 heures, contrairement aux Souris déficientes en IL-33, nous avons observé des lésions significatives d'I/R objectivées en histologie. Nous pouvons évidemment postuler un rôle de l'IL-33 indépendamment de son récepteur ST2, à l'image de celui évoqué par Cottagiri *et al.* (134), dans un modèle d'hépatite aigüe induite mettant en jeu l'IL-33 *via* l'induction de cellules T régulatrices FoxP3⁺ n'exprimant pas ST2. Nous avons observé dans les foies des Souris déficientes en ST2 des infiltrats de macrophages non retrouvés chez les Souris sauvages, les souris déficientes en IL-33 et déficientes en cellules iNKT. Ce constat nous a amenés à ne pas tenir compte de ces premiers résultats et à arrêter l'élevage de la lignée.

4.4. L'IL-33 dans l'I/R rénale et hépatique

Nous avons donc pu démontrer l'existence d'un axe IL-33/iNKT dans le foie, de la même façon que dans le rein (56). Le foie, de par sa richesse unique en cellules immunitaires et non immunitaires et de par sa capacité de régénération, représente probablement un système plus « malléable » que le rein pour l'étude des fonctions « alarmines » *vs* « cytokines » de l'IL-33 au cours des phénomènes d'I/R. Les interactions cellulaires en aval des DAMPs et des alarmines/cytokines sont probablement plus nombreuses, avec des systèmes de rétrocontrôle permettant l'évolution vers la résolution de l'inflammation.

4.5. Autres rôles de l'IL-33

D'autres rôles de l'IL-33 sont encore à explorer : l'influence sur l'homéostasie du foie indépendamment du système immunitaire, une action en retour sur les cellules endothéliales *via* leur récepteur ST2 sans mise en jeu des cellules iNKT, le rôle potentiellement hépatoprotecteur de l'IL-33 en fonction du moment (pré-conditionnement *vs.* post-conditionnement) ou de la source de l'IL-33 (IL-33 « naturelle » *vs.* IL-33 recombinante)...
5.1. L'activation précoce des cellules iNKT n'est pas responsable du relargage d'IL-33

Une question importante est celle du lien précoce éventuel entre les cellules iNKT et l'IL-33 au cours des phénomènes d'I/R. Précisément, le relargage d'IL-33 est-il la conséquence directe du stress endothélial sous l'effet de l'hypoxie ou bien est -il secondaire à l'action des cellules iNKT ? Après une heure de reperfusion, le taux d'IL-33 libérée dans la circulation en réponse au stress endothélial est maximal tant chez la Souris sauvage (**Figures 2** de l'article original) que chez la Souris déficiente en cellules iNKT (**Figure 27**). Le fait que ce taux maximal d'IL-33 libérée était similaire entre les deux groupes a permis de conclure que le relargage initial d'IL-33 « alarmine » ne dépend pas des cellules iNKT.





Dosages plasmatiques par ELISA de l'IL-33 (pg/mL) chez des Souris déficientes en cellules iNKT (J α 18 KO).

En haut, cinétique complète depuis en fin de l'ischémie (I (70min)), puis 1, 4, 8 et 24 h de reperfusion (I/R (1 à 24h). Quatre à huit animaux par groupe, moyenne+/- écart standard.

En bas à gauche, dosages plasmatiques chez 8 Souris avant (T0) et après ischémie (I (70min)). Test des rangs signés de Wilcoxon, ** p<0.001.

En bas à droite, dosages plasmatiques chez 3 Souris avant (T0) et après ischémie (I (70min)) chez des Sham. Test des rangs signés de Wilcoxon ; ns : non significatif.

5.2. L'IL-33 envoie un signal de danger aux cellules iNKT

Nous avons réalisé la mesure par cytométrie en flux de l'IFNy dans la rate et le foie, chez les Souris sauvages et déficientes en IL-33 (**Figure 28**). Nous avons donc pu ainsi mettre en évidence une augmentation de l'IFNy après une heure de reperfusion dans le foie des Souris sauvages, alors que nous observions une diminution chez les Souris déficientes en IL-33.

Lappas *et al.* (96). ont montré que l'I/R hépatique entraînait une activation des cellules iNKT attestée par la production rapide d'IFN_Y connue pour recruter les PNNs. Nous confirmons cette activation et apportons le complément d'information que cette activation pourrait dépendre de l'IL-33 puisqu'elle est diminuée chez les souris déficientes en IL-33. Nous apportons aussi par là même un argument majeur en faveur de l'existence de l'axe iNKT/IL-33 dans la mise en jeu de l'IFN_Y pour activer/recruter les PNNs. Une originalité de ce modèle est de pouvoir mesurer directement l'IFN_Y des cellules iNKT *in vivo* sans être obligé d'établir des mesures indirectes de leurs fonctions par leur restimulation *in vitro*.

Afin d'apporter la démonstration définitive de l'existence d'un axe IL-33/iNKT en I/R hépatique, nous proposons la réalisation d'expériences de transfert à des souris iNKT déficientes (Jα18 KO) de cellules iNKT provenant de Souris sauvages *vs.* de Souris ST2 KO. Nous présumons ainsi pouvoir montrer directement l'existence de l'interaction IL-33/iNKT *in vivo* et ses conséquences physiopathologiques dans notre modèle d'intérêt.

Une autre question soulevée par notre travail est celle de l'origine splénique locale des cellules iNKT contribuant aux lésions d'I/R hépatique. Nos données présentées dans l'**article original** (**Figure 7**) sont conciliables avec un recrutement précoce (1 heure après reperfusion) des cellules iNKT spléniques dans le foie sans que l'on puisse cependant exclure une contribution des cellules iNKT locales résidentes.

Pour explorer la provenance des cellules iNKT responsables des lésions d'I/R, nous proposons les deux approches expérimentales complémentaires suivantes :

- la réalisation de splénectomies, pour empêcher le recrutement de cellules iNKT de la rate,

- la reconstitution par transfert adoptif de cellules iNKT de la rate chez des animaux splénectomisés.



Figure 28. La production d'IFNγ des cellules iNKT induite précocement par l'I/R hépatique dépend de l'IL-33

Mesure de l'IFNy par cytométrie en flux dans le foie clampé des Souris sauvages (WT) et des Souris déficientes en IL-33 (IL-33 KO) après 1 heure de reperfusion (I/R (1h)) et chez des animaux Sham. ** p<0.001. Test de Mann-Whitney bilatéral, moyenne +/- écart standard, 4 à 8 animaux par groupe.

5.3. Existence d'un rétrocontrôle positif de la synthèse d'IL-33 par les cellules iNKT ?

Arshad *et al.* (135)ont suggéré que les cellules iNKT exercent un rétrocontrôle positif sur la sécrétion d'IL-33 dans le modèle d'hépatite auto immune induite par la Concanavaline A. Pour tester l'hypothèse d'un rétrocontrôle par les cellules iNKT sur le relargage de l'IL-33 dans notre modèle d'I/R, il sera nécessaire de comparer la cinétique d'expression de l'IL-33 dans le foie chez les Souris sauvages et déficientes en cellules iNKT.

Nous pourrons ainsi explorer le rôle des cellules iNKT dans la néo-synthèse de l'IL-33 « cytokine », possiblement par les hépatocytes. Si l'IL-33 « cytokine » avait un rôle hépatoprotecteur et que sa synthèse était favorisée par les cellules iNKT, ceci pourrait constituer un mécanisme protecteur des cellules iNKT, après un effet initial délétère.

5.4. Un switch vers la réparation ?

Au-delà de son effet possible sur la néo-synthèse de l'IL-33, l'hypothèse d'un switch vers la réparation tissulaire orchestré par les cellules iNKT est purement spéculative, et ce bien que certains éléments dans la littérature le suggèrent, en particulier lorsqu'on considère le modèle de lésion thermique localisée du foie (87).

Nous pourrions quantifier les lésions histologiques d'I/R et analyser l'infiltrat par les cellules inflammatoires à plus de 24 heures de reperfusion, chez des Souris sauvages et déficientes en cellules iNKT, en recherchant une corrélation négative avec le niveau de synthèse éventuel d'IL-33 dans les hépatocytes.

Enfin, nous ne pouvons pas exclure une implication des cellules T régulatrices FoxP3⁺, lesquelles sont en principe recrutables par l'IL-33. Bien que reconnues mobilisables et réparatrices dans le modèle expérimental d 'hépatite aux halogénés (134), il reste à documenter leur cinétique de recrutement dans le foie et leur possible dépendance vis-à-vis de l'IL-33 « endogène » dans ce phénomène, ceci par l'emploi de souris déficientes en IL-33.

Plus généralement, afin de tenter de discriminer les rôles successivement délétère et (supposément) protecteur de l'IL-33, nous proposons le blocage de l'IL-33 endogène à différents

137

temps (précoce avant le relargage d'IL-33 *vs.* tardif lors de sa néo-synthèse, par exemple après 4 heures de reperfusion) par injection d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-33 par voie péritonéale.

Une seconde approche complémentaire et élégante reposerait sur l'exploitation d'une expression d'IL-33 abolie spécifiquement dans les cellules endothéliales ou les hépatocytes grâce au système Crelox.

Nous projetons d'étudier chez l'Homme à partir du sang périphérique et au décours immédiat de la transplantation hépatique, l'IL-33 en tant qu'alarmine, ainsi que de rechercher parallèlement la signature d'une activation précoce des cellules iNKT.

A cette fin, j'ai initié il y a 18 mois puis géré la constitution d'une biocollection financée par le CHRU de Tours et conservée au Centre de Ressources Biologiques Touraine, laquelle est de prélèvements sanguins de receveurs de greffons hépatiques, désormais complète, avec un peu plus de 100 patients (voir **Figure 29**).

Précisément, nous avons conservé du plasma et des cellules mononucléées du sang circulant avant greffe et dans les 7 premiers jours post-greffe (ainsi qu'un prélèvement à un an) et quantifié les lésions histologiques d'I/R (biopsie de déclampage comparée à la biopsie à cœur battant chez le donneur pour éliminer les lésions sous-jacentes du greffon, voir **Tableau 4**).

Le but est de corréler les taux plasmatiques d'IL-33, de sST2, et de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que les proportions des différentes populations cellulaires d'intérêt aux autres paramètres cliniques et biologiques de l'I/R mesurés par les bilans biologiques (bilan hépatique et de coagulation, insuffisance rénale), les lésions histologiques d'I/R et le syndrome de reperfusion en per-opératoire au déclampage.

Nous projetons les actions suivantes :

- déterminer si l'IL-33 agit chez l'Homme également comme alarmine après transplantation hépatique,
- évaluer si les taux d'IL-33 sont corrélés à la durée d'ischémie du greffon ainsi qu'à la sévérité des lésions histologiques d'I/R,
- déterminer si l'IL-33 est un marqueur prédictif de la reprise de fonction du greffon,
- sur le plan mécanistique, éprouver l'hypothèse d'un axe IL-33/iNKT en recherchant une corrélation positive entre les taux plasmatiques d'IL-33 et le niveau d'activation des populations cellulaires immunitaires, et plus particulièrement des cellules iNKT et des cellules NK (136).

La réalisation de cette biocollection a requis une mobilisation de l'ensemble des équipes hospitalières médicales et paramédicales (chirurgie, hépatologie, réanimation, anatomopathologie), des équipes et technicien(ne)s des laboratoires de biochimie et du centre de ressources biologiques, ainsi qu'une collaboration entre l'INSERM de Poitiers et le CHU de Tours dans le cadre de la fédération hospitalo-universitaire SUPORT.

Cette collection a obtenu l'autorisation de l'agence de la biomédecine, de la CNIL, du CPP et du Ministère de la Recherche. Elle a aussi permis d'obtenir en 2019 un financement de 27 000 € pour son exploitation.

Ce travail chez l'Homme qui constitue la suite logique de mon travail de thèse en modélisation animale, fait l'objet du travail d'un étudiant de Master 2 de sciences chirurgicales.



Figure 29. Diagramme de flux de l'étude observationnelle chez l'Homme

Nombre d'espa	aces portes					
	Nécrose (ou perte)	Absente Légère	Modérée Sévère			
	hépatocytaire					
Ischémie-	Infiltrat inflammatoire à	Absent Léger	Modéré Sévère			
Reperfusion	polynucléaires neutrophiles					
	Congestion sinusoïdale	Absente Légère	Modérée Sévère			
	Stéatose microvésiculaire	Absente <1/3	1/3-2/3 >2/3			
	Ballonisation hépatocytaire	Oui Non				
	Fibrose	Localisation :	Absente F1 F2 F3 F4			
	Cholestase	Localisation :	Prolifération cholangiolaire associée ?			
Autres			Oui Non			
lésions	Surcharge en fer	Localisation :	Absente Légère Modérée Sévère			
	Stéatose macrovésiculaire	Absente <1/3	1/3-2/3 >2/3			
	Charge glycogénique intra-	Conservée Diminuée				
	cytoplasmique					

Tableau 4. Grille de lecture anatomo-pathologique des biopsies à cœur battant et aprèsdéclampage du greffon, établie avec le Dr F. Dujardin du laboratoire d'anatomo-pathologie deTours

Nous avons démontré dans un modèle d'I/R chaude hépatique chez la Souris, que l'IL-33 était libérée et agissait bien promptement comme une alarmine, participant au recrutement et à l'activation des cellules iNKT. Les cellules iNKT constituent un élément cellulaire majeur du recrutement et de l'activation des cellules immuno-inflammatoires dont les PNNs.

Des pistes restent à explorer, comme le rôle exact de l'IL-33 néo-synthétisée « cytokine » et le rôle des cellules iNKT dans une phase ultérieure de l'I/R, orchestrant peut-être le switch vers la réparation des lésions d'I/R.

L'IL-33 et les cellules iNKT constituent des cibles thérapeutiques potentielles dans la modulation de l'I/R hépatique. L'application de la connaissance de ces phénomènes à l'Homme dans le contexte de la transplantation hépatique est indispensable pour envisager une modulation thérapeutique de l'I/R *in vivo* chez les receveurs greffés.

Les références présentées sont celles du manuscrit en dehors de l'article en anglais qui comprend

sa propre bibliographie.

- 1. López Panqueva R del P. Biopsia hepática en la patología del trasplante, período postrasplante temprano, enfoque dirigido al diagnóstico histopatológico y su correlación clínicopatológica. Rev. Colomb. Gastroenterol. 2017;31:169.
- 2. Matton APM, Porte RJ. Opportunities for scientific expansion of the deceased donor pool. Liver Transpl. 2014;20 Suppl 2:S5.
- 3. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. Hepatology. 2006;43.
- 4. Aizarani N, Saviano A, Sagar, Mailly L, Durand S, Herman JS, et al. A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. Nature. 2019;
- 5. Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, et al. Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses. Immunity. 2007;26:117– 129.
- 6. Charles R, Chou HS, Wang L, Fung JJ, Lu L, Qian S. Human hepatic stellate cells inhibit t-cell response through B7-H1 pathway. Transplantation. 2013;96:17–24.
- 7. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. Nature. 2015;518:547–551.
- 8. Soysa R, Wu X, Crispe IN. Dendritic cells in hepatitis and liver transplantation. Liver Transplant. 2017;23:1433–1439.
- 9. Sierro F, Evrard M, Rizzetto S, Melino M, Mitchell AJ, Florido M, et al. A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment. Immunity. 2017;47:374-388.e6.
- 10. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver-from homeostasis to disease. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2016;13:88–110.
- 11. de Graaf W, van Lienden KP, van Gulik TM, Bennink RJ. (99m)Tc-mebrofenin hepatobiliary scintigraphy with SPECT for the assessment of hepatic function and liver functional volume before partial hepatectomy. J. Nucl. Med. 2010;51:229–36.
- 12. Dinant S, de Graaf W, Verwer BJ, Bennink RJ, van Lienden KP, Gouma DJ, et al. Risk assessment of posthepatectomy liver failure using hepatobiliary scintigraphy and CT volumetry. J. Nucl. Med. 2007;48:685–92.
- 13. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. Hepatology. 2006;43:S45-53.
- 14. Michalopoulos GK. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. Hepatology. 2017;65:1384–1392.
- 15. Tao Y, Wang M, Chen E, Tang H. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. Mediators Inflamm. 2017;2017.
- 16. Li W, Liang X, Leu JI, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. Global changes in interleukin-6dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. Hepatology. 2001;33:1377–86.
- 17. Michalopoulos GK. Liver regeneration. J. Cell. Physiol. 2007;213:286–300.
- 18. Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, Van Rooijen N, Clavien P-A. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-

alpha/IL-6 in mice. Gastroenterology. 2003;124:692–700.

- 19. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. Cancer Res. 1962;22:842–9.
- 20. Michalopoulos GK, Khan Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. Gastroenterology. 2005;128:503–6.
- 21. Skov Olsen P, Boesby S, Kirkegaard P, Therkelsen K, Almdal T, Poulsen SS, et al. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Hepatology. 8:992–6.
- 22. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. Science (80-.). 2006;312:104–107.
- 23. Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, et al. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. J. Clin. Invest. 2001;107:1285–92.
- 24. Ichikawa T, Zhang YQ, Kogure K, Hasegawa Y, Takagi H, Mori M, et al. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. Hepatology. 2001;34:918–25.
- 25. Manco R, Leclercq IA, Clerbaux LA. Liver regeneration: Different sub-populations of parenchymal cells at play choreographed by an injury-specific microenvironment. Int. J. Mol. Sci. 2018;19.
- 26. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. Nature. 1953;172:603–6.
- 27. Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. Nature. 1969;223:472–6.
- 28. Sugioka A, Morita M, Fujita J, Hasumi A, Shiroishi T. Graft acceptance and tolerance induction in mouse liver transplantation using wild mice. Transplant. Proc. 33:137–9.
- 29. Kamada N, Davies HS, Roser B. Reversal of transplantation immunity by liver grafting. Nature. 1981;292:840–2.
- 30. Kamada N, Davies HS, Wight D, Culank L, Roser B. Liver transplantation in the rat. Biochemical and histological evidence of complete tolerance induction in non-rejector strains. Transplantation. 1983;35:304–11.
- 31. Kobayashi E, Kamada N, Enosawa S, Toyama N, Walker NI, Miyata M. Prevention by liver transplantation of the graft-versus-host reaction and allograft rejection in a rat model of small bowel transplantation. Transplantation. 1994;57:177–81.
- 32. Sugawara Y, Makuuchi M, Kaneko J, Kishi Y, Hata S, Kokudo N. Positive T lymphocytotoxic cross-match in living donor liver transplantation. Liver Transpl. 2003;9:1062–6.
- 33. Lan X. Impact of human leukocyte antigen mismatching on outcomes of liver transplantation: A meta-analysis. World J. Gastroenterol. 2010;16:3457.
- 34. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Danjoux M, Muscari F, Lavayssière L, Esposito L, et al. De novo donor-specific anti-HLA antibodies mediated rejection in liver-transplant patients. Transpl. Int. 2015;28.
- 35. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Muscari F, Lavayssière L, Esposito L, Cardeau-Desangles I, et al. Prevalence, incidence and risk factors for donor-specific anti-HLA antibodies in maintenance liver transplant patients. Am. J. Transplant. 2014;14.
- 36. Feng S, Bucuvalas J. Tolerance after liver transplantation: Where are we? Liver Transplant. 2017;23:1601–1614.
- 37. Demetris AJ, Bellamy COC, Gandhi CR, Prost S, Nakanuma Y, Stolz DB. Functional Immune Anatomy of the Liver-As an Allograft. Am. J. Transplant. 2016;16:1653–80.
- 38. Albillos A, Gottardi A De, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: pathophysiological

basis for therapy. J. Hepatol. 2019;

- 39. Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. Annu. Rev. Immunol. 2017;35:119–147.
- 40. Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall H-U, Bamberg K, et al. Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. Cell Metab. 2013;17:225–235.
- 41. Wahlström A, Sayin SI, Marschall HU, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. Cell Metab. 2016;24:41–50.
- 42. Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. Cell. Mol. Immunol. 2016;13:267–276.
- 43. Bekkering S, Arts RJW, Novakovic B, Kourtzelis I, van der Heijden CDCC, Li Y, et al. Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. Cell. 2018;172:135-146.e9.
- 44. Barbier L, Ferhat M, Salamé E, Robin A, Herbelin A, Gombert J-M, et al. Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. Front. Immunol. 2019;10:2014.
- 45. Rubartelli A, Lotze MT, Latz E, Manfredi A. Mechanisms of sterile inflammation. Front. Immunol. 2013;4:398.
- 46. Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. Gastroenterology. 2012;143:1158– 1172.
- 47. McDonald B, Kubes P. Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. Gastroenterology. 2016;151:1087–1095.
- 48. Hossain M, Kubes P. Innate immune cells orchestrate the repair of sterile injury in the liver and beyond. Eur. J. Immunol. 2019;49:831–841.
- 49. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013;10:79–89.
- 50. van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. The sterile immune response during hepatic ischemia/reperfusion. Cytokine Growth Factor Rev. 2012;23:69–84.
- 51. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: Chemotactic activators of immune responses. Curr. Opin. Immunol. 2005;17:359–365.
- 52. Lu L, Zhou H, Ni M, Wang X, Busuttil R, Kupiec-Weglinski J, et al. Innate Immune Regulations and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. Transplantation. 2016;100:2601–2610.
- 53. Thorgersen EB, Barratt-Due A, Haugaa H, Harboe M, Pischke SE, Nilsson PH, et al. The Role of Complement in Liver Injury, Regeneration, and Transplantation. Hepatology. 2019;70:725–736.
- 54. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. Nat. Rev. Immunol. 2010;10:467–78.
- 55. Turner J-E, Rickassel C, Healy H, Kassianos AJ. Natural Killer Cells in Kidney Health and Disease. Front. Immunol. 2019;10:587.
- 56. Ferhat M, Robin A, Giraud S, Sena S, Goujon J-M, Touchard G, et al. Endogenous IL-33 Contributes to Kidney Ischemia-Reperfusion Injury as an Alarmin. J. Am. Soc. Nephrol. 2018;29:1272–1288.
- 57. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen F-E, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. Am. J. Pathol. 2003;163:69–79.
- 58. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity. 2005;23:479–90.

- 59. Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. Immunol. Rev. 2018;281:154–168.
- 60. Bandara G, Beaven MA, Olivera A, Gilfillan AM, Metcalfe DD. Activated mast cells synthesize and release soluble ST2-a decoy receptor for IL-33. Eur. J. Immunol. 2015;45:3034–44.
- 61. Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 2016;16:676–689.
- 62. Moussion C, Ortega N, Girard J-P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel "alarmin"? PLoS One. 2008;3:e3331.
- 63. Michaudel C, Mackowiak C, Maillet I, Fauconnier L, Akdis CA, Sokolowska M, et al. Ozone exposure induces respiratory barrier biphasic injury and inflammation controlled by IL-33. J. Allergy Clin. Immunol. 2018;142:942–958.
- 64. Gadani SP, Walsh JT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. Neuron. 2015;85:703–9.
- 65. Shimokawa C, Kanaya T, Hachisuka M, Ishiwata K, Hisaeda H, Kurashima Y, et al. Mast Cells Are Crucial for Induction of Group 2 Innate Lymphoid Cells and Clearance of Helminth Infections. Immunity. 2017;46:863-874.e4.
- 66. Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. Immunity. 2015;42:1005–19.
- 67. Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grencis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. J. Immunol. 2008;180:2443–9.
- 68. Rostan O, Gangneux J, Piquet-Pellorce C, Manuel C, McKenzie ANJ, Guiguen C, et al. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with Leishmania donovani. MBio. 2013;4:e00383-13.
- 69. Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agosssou A, et al. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. Clin. Exp. Immunol. 2011;166:218–26.
- 70. Jones LA, Roberts F, Nickdel MB, Brombacher F, McKenzie ANJ, Henriquez FL, et al. IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with Toxoplasma gondii. Eur. J. Immunol. 2010;40:426–36.
- 71. Baker KJ, Houston A, Brint E. IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. Front. Immunol. 2019;10:1197.
- 72. Yang Z-P, Ling D-Y, Xie Y-H, Wu W-X, Li J-R, Jiang J, et al. The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer. Dis. Markers. 2015;2015:516895.
- 73. Wang C, Chen Z, Bu X, Han Y, Shan S, Ren T, et al. IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016;479:461–468.
- 74. Tong X, Barbour M, Hou K, Gao C, Cao S, Zheng J, et al. Interleukin-33 predicts poor prognosis and promotes ovarian cancer cell growth and metastasis through regulating ERK and JNK signaling pathways. Mol. Oncol. 2016;10:113–25.
- 75. Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, et al. IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2015;112:E2487-96.
- 76. Millar NL, O'Donnell C, McInnes IB, Brint E. Wounds that heal and wounds that don't The role of the IL-33/ST2 pathway in tissue repair and tumorigenesis. Semin. Cell Dev. Biol. 2017;61:41–50.
- 77. Wang L, Li H, Liang F, Hong Y, Jiang S, Xiao L. Examining IL-33 expression in the cervix of HPV-infected patients: a preliminary study comparing IL-33 levels in different stages of disease and analyzing its potential association with IFN-γ. Med. Oncol. 2014;31:143.

- 78. Musolino C, Allegra A, Profita M, Alonci A, Saitta S, Russo S, et al. Reduced IL-33 plasma levels in multiple myeloma patients are associated with more advanced stage of disease. Br. J. Haematol. 2013;160:709–10.
- 79. Dominguez D, Ye C, Geng Z, Chen S, Fan J, Qin L, et al. Exogenous IL-33 Restores Dendritic Cell Activation and Maturation in Established Cancer. J. Immunol. 2017;198:1365–1375.
- 80. Lucarini V, Ziccheddu G, Macchia I, La Sorsa V, Peschiaroli F, Buccione C, et al. IL-33 restricts tumor growth and inhibits pulmonary metastasis in melanoma-bearing mice through eosinophils. Oncoimmunology. 2017;6:e1317420.
- 81. Xia Y, Ohno T, Nishii N, Bhingare A, Tachinami H, Kashima Y, et al. Endogenous IL-33 exerts CD8+ T cell antitumor responses overcoming pro-tumor effects by regulatory T cells in a colon carcinoma model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019;518:331–336.
- 82. Yazdani HO, Chen H-W, Tohme S, Tai S, van der Windt DJ, Loughran P, et al. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. J. Hepatol. 2017;68:130–139.
- 83. Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. Hepatology. 2012;56:1468–78.
- Heller NM, Berga-Bolanos R, Naler L, Sen JM. Natural Killer T (NKT) Cells in Mice and Men.
 In: Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function. Boca Raton : Taylor & Francis, 2017.: CRC Press; 2017. p. 119–146.
- 85. Wood KJ, Mariat C, Thaunat O, Mousson C, Rifle G. Bridging innate with adaptive immunity in transplantation: Triggers, sensors, and modulators. Transplantation. 2014;98:1021–1024.
- 86. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: An innate activation scheme linked to diverse effector functions. Nat. Rev. Immunol. 2013;13:101–117.
- 87. Liew PX, Lee W-Y, Kubes P. iNKT Cells Orchestrate a Switch from Inflammation to Resolution of Sterile Liver Injury. Immunity. 2017;47:752-765.e5.
- 88. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. Nat. Immunol. 2010;11:197–206.
- 89. Hill TM, Bezbradica JS, Van Kaer L, Joyce S. CD1d-Restricted Natural Killer T Cells. In: eLS. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016. p. 1–27.
- 90. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. J. Leukoc. Biol. 2009;86:513–28.
- 91. Liao C-M, Zimmer MI, Wang C-R. The functions of type I and type II natural killer T cells in inflammatory bowel diseases. Inflamm. Bowel Dis. 2013;19:1330–8.
- 92. Agrati C, Martini F, Nisii C, Oliva A, D'Offizi G, Narciso P, et al. CD1d expression by hepatocytes is a main restriction element for intrahepatic T-cell recognition. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 19:41–8.
- 93. Fujii S-I, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. J. Exp. Med. 2003;198:267–79.
- 94. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. J. Immunol. 1999;163:4647–50.
- 95. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1-NKT cell population. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008;105:11287–92.
- 96. Lappas CM, Day Y-J, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor

activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. J. Exp. Med. 2006;203:2639–48.

- 97. Matsuda H, Takeda K, Koya T, Okamoto M, Shiraishi Y, Miyahara N, et al. Plasticity of invariant NKT cell regulation of allergic airway disease is dependent on IFN-gamma production. J. Immunol. 2010;185:253–62.
- 98. Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, et al. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. Nat. Med. 2008;14:633–40.
- 99. Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. Nat. Med. 2003;9:582–8.
- 100. Bricard G, Cesson V, Devevre E, Bouzourene H, Barbey C, Rufer N, et al. Enrichment of human CD4+ V(alpha)24/Vbeta11 invariant NKT cells in intrahepatic malignant tumors. J. Immunol. 2009;182:5140–51.
- 101. Waddell A, Zhao J, Cantorna MT. NKT cells can help mediate the protective effects of 1,25dihydroxyvitamin D3 in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Int. Immunol. 2015;27:237–44.
- 102. Chen D, Zhao H, Gao X, Chen S, Liu H, Zhang J, et al. Subcutaneous administration of α -GalCer activates iNKT10 cells to promote M2 macrophage polarization and ameliorates chronic inflammation of obese adipose tissue. Int. Immunopharmacol. 2019;77:105948.
- 103. Zhu S, Zhang H, Bai L. NKT cells in liver diseases. Front. Med. 2018;12:249–261.
- 104. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, Fujio M, Garcia-Navarro R, Benhnia MR-E-I, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. Nat. Immunol. 2006;7:978–86.
- 105. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, Miyagi K, Nakasone C, Uezu K, et al. Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against Streptococcus pneumoniae infection. Eur. J. Immunol. 2003;33:3322–30.
- 106. Fujii S-I, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, et al. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. Front. Immunol. 2013;4:409.
- 107. Braun NA, Covarrubias R, Major AS. Natural killer T cells and atherosclerosis: form and function meet pathogenesis. J. Innate Immun. 2010;2:316–24.
- 108. Mattner J. Natural killer T (NKT) cells in autoimmune hepatitis. Curr. Opin. Immunol. 2013;25:697–703.
- 109. Lisbonne M, L'Helgoualc'h A, Nauwelaers G, Turlin B, Lucas C, Herbelin A, et al. Invariant natural killer T-cell-deficient mice display increased CCl₄ -induced hepatitis associated with CXCL1 over-expression and neutrophil infiltration. Eur. J. Immunol. 2011;41:1720–32.
- 110. Ferhat MH, Robin A, Barbier L, Thierry A, Gombert J-M, Barbarin A, et al. The Impact of Invariant NKT Cells in Sterile Inflammation: The Possible Contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33. Front. Immunol. 2018;9:2308.
- 111. Kuboki S, Sakai N, Tschop J, Edwards MJ, Lentsch AB, Caldwell CC. Distinct contributions of CD4+ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2009;296:G1054-9.
- 112. Arrenberg P, Maricic I, Kumar V. Sulfatide-mediated activation of type II natural killer T cells prevents hepatic ischemic reperfusion injury in mice. Gastroenterology. 2011;140:646–55.
- 113. Cao Z, Yuan Y, Jeyabalan G, Du Q, Tsung A, Geller DA, et al. Preactivation of NKT cells with alpha-GalCer protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mouse by a mechanism involving IL-13 and adenosine A2A receptor. Am. J. Physiol. Gastrointest. liver Physiol. 2009;297:G249-58.
- 114. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33

directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. Eur. J. Immunol. 2009;39:1046–55.

- 115. Thierry A, Giraud S, Robin A, Barra A, Bridoux F, Ameteau V, et al. The Alarmin Concept Applied to Human Renal Transplantation: Evidence for a Differential Implication of HMGB1 and IL-33. PLoS One. 2014;9:e88742.
- 116. Abe Y, Hines IN, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, et al. Mouse Model of Liver Ischemia and Reperfusion Injury: Method to Study Reactive Oxygen and Nitrogen Metabolites in vivo. Nat. Med. 2009;46:1–7.
- 117. Yin H, Huang B-J, Yang H, Huang Y-F, Xiong P, Zheng F, et al. Pretreatment with soluble ST2 reduces warm hepatic ischemia/reperfusion injury. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006;351:940–6.
- 118. Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, et al. Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and nonparenchymal cells. J. Gastroenterol. Hepatol. 2012;27:1609–16.
- 119. Beldi G, Banz Y, Kroemer A, Sun X, Wu Y, Graubardt N, et al. Deletion of CD39 on natural killer cells attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. Hepatology. 2010;51:1702–11.
- 120. Brockmann JG, August C, Wolters HH, Hömme R, Palmes D, Baba H, et al. Sequence of reperfusion influences ischemia/reperfusion injury and primary graft function following porcine liver transplantation. Liver Transplant. 2005;11:1214–1222.
- Liu Q, Vekemans K, Iania L, Komuta M, Parkkinen J, Heedfeld V, et al. Assessing warm ischemic injury of pig livers at hypothermic machine perfusion. J. Surg. Res. 2014;186:379– 89.
- 122. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. Transplantation. 1993;55:1265–72.
- 123. Shahbazi N, Haeri H, Nasiri Toosi M, Jafarian A, Shahsiah R, Talebian Moghadam M, et al. Correlation of Histopathologic Findings of Non-Graft Threatening Preservation/Reperfusion Injury in Time-Zero Liver Needle Biopsies With Short-Term Post-transplantation Laboratory Alterations. Hepat. Mon. 2015;15:4–9.
- 124. Neil DA, Hubscher SG. Are parenchymal changes in early post-transplant biopsies related to preservation-reperfusion injury or rejection? Transplantation. 2001;71:1566–72.
- 125. Ricca L, Lemoine A, Cauchy F, Hamelin J, Sebagh M, Esposti DD, et al. Ischemic Postconditioning of the Liver Graft in Adult Liver Transplantation. Transplantation. 2015;99:1633–43.
- 126. Senoner T, Schindler S, Stättner S, Öfner D, Troppmair J, Primavesi F. Associations of Oxidative Stress and Postoperative Outcome in Liver Surgery with an Outlook to Future Potential Therapeutic Options. Oxid. Med. Cell. Longev. 2019;2019.
- 127. Li Y, Ma D, Wang Z, Yang J. MicroRNA-155 Deficiency in Kupffer Cells Ameliorates Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. Transplantation. 2017;101:1600–1608.
- 128. Bai H, Wen J, Gong J-P, Wu H, Yuan F-C, Cao D, et al. Blockade of the Notch1/Jagged1 pathway in Kupffer cells aggravates ischemia-reperfusion injury of orthotopic liver transplantation in mice. Autoimmunity. 2019;52:176–184.
- 129. Marvie P, Lisbonne M, L'helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. J. Cell. Mol. Med. 2010;14:1726–39.
- 130. Al-Khafaji AB, Tohme S, Yazdani HO, Miller D, Huang H, Tsung A. Superoxide induces neutrophil extracellular trap formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism. Mol.

Med. 2016;22:621-631.

- 131. Strauss O, Phillips A, Ruggiero K, Bartlett A, Dunbar PR. Immunofluorescence identifies distinct subsets of endothelial cells in the human liver. Sci. Rep. 2017;7:44356.
- 132. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S, Ezan F, et al. TRAIL but not FasL and TNFα, regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. Hepatology. 2012;56:2353–2362.
- 133. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: A novel "Alarmin"? PLoS One. 2008;3:1–8.
- 134. Cottagiri M, Nyandjo M, Stephens M, Mantilla J, Saito H, Mackay IR, et al. In drug-induced, immune-mediated hepatitis, interleukin-33 reduces hepatitis and improves survival independently and as a consequence of FoxP3+ T-cell activity. Cell. Mol. Immunol. 2018;
- 135. Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, et al. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. Eur. J. Immunol. 2011;41:2341–2348.
- 136. Fahrner R, Dondorf F, Ardelt M, Settmacher U, Rauchfuss F. Role of NK, NKT cells and macrophages in liver transplantation. World J. Gastroenterol. 2016;22:6135–6144.

ANNEXES

Ce travail de thèse a été encadré par ses deux co-directeurs, André Herbelin et Ephrem Salamé, ainsi que Jean-Marc Gombert. Aurélie Robin, ingénieure dans l'unité, a contribué à la réalisation des expérimentations et à l'analyse des résultats.

Héloïse Ducousso a réalisé son Master 2 en 2017-2018 dans le cadre de mon travail de thèse et a donc également participé à la réalisation des expérimentations et à l'analyse des résultats.

Rémy Sindayigaya va réaliser en 2019-2020 son Master 2 dans le prolongement de ce travail de thèse en étudiant l'IL-33 en transplantation hépatique chez l'Homme (voir plus bas). Un financement à hauteur de 27 000€ a été obtenu auprès de l'Agence de la Biomédecine pour l'exploitation de la bio collection réalisée au CHU de Tours dans le cadre de la fédération hospitalo-universitaire SUPORT (pour « survival optimization in organ transplantation »).

L'équipe de l'unité, avec Maroua Ferhat qui a étudié l'axe IL-33/iNKT en I/R rénale et Alice Barbarin, a publié deux revues sur l'axe IL-33/iNKT dans l'inflammation stérile et l'implication des cytokines de la super famille de l'IL-1 dans les maladies inflammatoires du foie, proposées en annexe.

Le travail faisant l'objet de l'article original a été présenté :

- en communication affichée au congrès de l'ILTS (pour « *international liver transplantation society* ») à Toronto en 2019 et au congrès de la SFT (société francophone de transplantation) à Bordeaux en 2019

- en communication orale au congrès de l'ESOT (pour « *european society for organ transplantation* ») à Copenhague en 2019.

152





Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases

Louise Barbier^{1,2}, Maroua Ferhat³, Ephrem Salamé^{1,2}, Aurélie Robin⁴, André Herbelin^{3*}, Jean-Marc Gombert^{1,5}, Christine Silvain⁶ and Alice Barbarin¹

¹ INSERM U1082, Poitiers, France, ² Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation, Trousseau University Hospital, Tours University, Tours, France, ³ INSERM U1082, Poitiers University, Poitiers, France, ⁴ INSERM U1082, Poitiers University Hospital, Poitiers, France, ⁵ Department of Immunology and Inflammation, Poitiers University Hospital, University of Poitiers, France, ⁶ Department of Hepatology and Gastroenterology, Poitiers University Hospital, University of Poitiers, France

The pyrogenic property being the first activity described, members of the interleukin-1 superfamily (IL-1α, IL-1β, IL-18, and the newest members: IL-33, IL-36, IL-37, and IL-38) are now known to be involved in several inflammatory diseases such as obesity, atherosclerosis, cancer, viral and parasite infections, and auto-inflammatory syndromes as well as liver diseases. Inflammation processes are keystones of chronic liver diseases, of which the etiology may be viral or toxic, as in alcoholic or non-alcoholic liver diseases. Inflammation is also at stake in acute liver failure involving massive necrosis, and in ischemia-reperfusion injury in the setting of liver transplantation. The role of the IL-1 superfamily of cytokines and receptors in liver diseases can be either protective or pro-inflammatory, depending on timing and the environment. Our review provides an overview of current understanding of the IL-1 family members in liver inflammation, highlighting recent key investigations, and therapeutic perspectives. We have tried to apply the concept of trained immunity to liver diseases, based on the role of the members of the IL-1 superfamily, first of all IL-1β but also IL-18 and IL-33, in modulating innate lymphoid immunity carried by natural killer cells, innate lymphoid cells or innate T-αβ lymphocytes.

Keywords: interleukin-1 family cytokines, liver diseases, inflammation, innate immunity, trained immunity, invariant natural killer T-cells, natural killer cells, innate lymphoid cells

THE EXPANDING FAMILY OF INTERLEUKIN (IL)-1 CYTOKINES AND THEIR RECEPTORS

From "Endogenous Pyrogens" to the IL-1 Superfamily of Cytokines

The story of the IL-1 superfamily of cytokines began in the 1940s when Menkin (1), Beeson (2), and then Atkins (3) described a group of proteins, named "endogenous pyrogens," responsible for fever, produced by leucocytes, and able to mediate multiple biological activities (4–6). By the late 1970s, the term "interleukin" was being used to describe the pleiotropic factors implicated in inflammatory immune response and the designation "IL-1" was then used to define the factors secreted by macrophages (4, 6). The discovery of IL-1, and its two forms IL-1 α and IL-1 β , is considered the birth of "cytokine biology," and it led to the discovery of more members. This

OPEN ACCESS

Edited by:

Elizabeth Brint, University College Cork, Ireland

Reviewed by:

Aldo Tagliabue, Institute for Genetic and Biomedical Research (IRGB), Italy Parameswaran Ramakrishnan, Case Western Reserve University, United States

> *Correspondence: André Herbelin andre.herbelin@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to Cytokines and Soluble Mediators in Immunity, a section of the journal Frontiers in Immunology

> Received: 07 March 2019 Accepted: 08 August 2019 Published: 27 August 2019

Citation:

Barbier L, Ferhat M, Salamé E, Robin A, Herbelin A, Gombert J-M, Silvain C and Barbarin A (2019) Interleukin-1 Family Cytokines: Keystones in Liver Inflammatory Diseases. Front. Immunol. 10:2014. doi: 10.3389/fimmu.2019.02014

1

is how, over the years, IL-18, IL-33, IL-36, IL-37, and IL-38, which share several functional and structural properties, have been added to and included in the IL-1 superfamily of cytokines.

IL-1 Sub-Families

IL-1 superfamily (7) is divided into three sub-families according to the length of the N-term pro-pieces: IL-1 sub-family (IL- 1α , IL-1 β and IL-33, IL-1Ra), IL-18 sub-family (IL-18 and IL-37), and IL-36 sub-family (IL-36 α , β , γ , and IL-38) (**Table 1**). Among these cytokines, in each sub-family one may distinguish "pro-inflammatory" members such as IL-1 α , IL-1 β , IL-33 or IL-18 from "anti-inflammatory" members such as IL-1Ra, IL-36Ra, IL-37, or IL-38 [**Table 1**, and for reviews: (7–9)].

All of their receptors are heteropolymers of which at least one sub-unit is a member of the family of IL-1 receptors (IL-1R), which are characterized by extracellular immunoglobulin-like domains and an intracellular Toll/Interleukin-1R (TIR) domain within their cytoplasmic tail. Upon cell stimulation, IL-1R subunits are oligomerized through the TIR domains. Secondly, MyD88 binds to the TIR domain, triggering nuclear factor- κ B (NF- κ B) translocation to the nucleus and activation of mitogenactivated protein kinases (MAPK) such as p38 and JNK, thereby leading to pro-inflammatory responses.

The combination of receptor sub-units conditions the type of signal transduced. For example, while association of IL-1RAcP (chain common to IL-1 and IL-1R3 receptors in the new nomenclature; **Table 1**) with the IL-1R1 sub-unit transduces an activation signal following binding of IL-1 α or IL-1 β , association of IL-1RAcP with IL-1R2 constitutes an IL-1 β receptor that transduces an inhibitory signal.

IL-1RAcP is also a sub-unit of the IL-33 and IL-36 receptors, which associate IL-1RAcP with the IL-1RL1 chain (also called ST2: "suppression of tumorigenicity 2", T1/ST2 or IL-1-R4) and with the IL-1Rrp chain (also called IL-36 R or IL-1R6), respectively.

IL-1R8 (SIGIRR for Single Ig IL-1 related receptor), another receptor of the IL-1 family, has no known ligands but transduces

an inhibitory signal and has been described as a checkpoint for terminal maturation and acquisition of the effector functions of NK cells (10). Mantovani et al. have suggested that IL-1R8 interferes with the TIR-domain oligomerization of the IL-1 family receptors engaged by a ligand agonist, thereby leading to blocked recruitment of the MyD88 adapter (9, 11). Lastly, IL-1R8 is a sub-unit of the IL-37 receptor. IL-37 can reduce production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 α and IL-1 β , IL-1Ra, IL-8, IL-17, IL-23, tumor necrosis factor (TNF α), and interferon γ (IFN γ) through IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) (12).

It is important to note that there exist soluble forms of the IL-1, sIL-1R1, and sIL-1R2 receptors that possess the inhibitory functions of IL-1. On the same token, IL-18BP (Binding Protein), which consists in a single IgG domain such as the transmembrane receptor IL-1R8, is a soluble factor interfering with the liaison of IL-18 and its receptor. IL-18BP possesses a particularly strong affinity with IL-18. Seric concentrations of IL-18BP in a healthy individual generally range from 2,000 to 4,000 pg/ml, which means that in steady state circulation, there is always a major excess of IL-18BP compared to IL-18. In a pathological situation, however, the anti-inflammatory effects of IL-18BP are liable to be attenuated due to the fact that IL-18BP likewise binds to IL-37. While blocking the anti-inflammatory functions of IL-37, this association is liable to render excessive the active free form of IL-18.

As regards the IL-33 receptor, there exists a soluble free form of the chain specific to the ST2 receptor, sST2. It is derived from alternative splicing of the ST2 mRNA (13). The biological relevance of the sST2 chain has remained elusive: Is it, as suggested in some studies, a decoy receptor enabling IL-33 neutralization, or is it simply the signature of the bringing into play of the IL-33/ST2 axis, with the seric sST2 concentrations being correlated with the severity of the pathology under consideration (13–16).

All in all, these different elements demonstrate the existence of cross-regulation between the different IL-1 family cytokines, of which each member possesses a counter-regulatory receptor or ligand.

IL-1 Superfamily Members Differentially Depend on Processing Mechanisms to Function

IL-1 superfamily members (cytokines and receptors) contribute to a wide spectrum of immunological and inflammatory responses. Most of their members lack a signal peptide and are not immediately secreted. They are found diffusely in the cytoplasm as precursors containing cleavage sites and the difference that exists between members in terms of expression and proteolytic processing impact their respective roles *in vivo*. Indeed, to be biologically active, full-length precursors of IL-1 β , IL-18, and IL-37 require intracellular processing, which depends on caspase-1, and the activation of the NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)-inflammasome, required for conversion of the procaspase-1 into the active caspase-1. While pro-IL-36 and pro-IL-38 also need to be cleaved to

Abbreviations: AID, induced cytidine deaminase; ACLF, HBV acute-on-chronic liver failure; ALD, alcoholic liver disease; ALF, acute liver failure; Areg, Amphiregulin; BP, binding protein; CHB, chronic HBV; ConA, concanavalin A; DAMP, damage-associated molecular pattern; DT2, type 2 diabetes; EMT, epithelial-mesenchymal transition; ERK, extracellular signal-regulated kinases; HAV, hepatitis virus A; HBV, hepatitis virus B; HCV, hepatitis virus C; HCC, hepatocellular carcinoma; HFD, high fat diet; HIF, hypoxia-inducible factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IkB, inhibitor of kappa B; IL, interleukin; IL-1Ra, IL-1 receptor antagonist; IL-1R, IL-1 receptor; IL-1RAcP, IL-1 receptor accessory protein; IFNy, interferon y; ILC, innate lymphoid cell; iNKT, invariant Natural Killer T; IR, ischemia-reperfusion; IRS-1, insulin receptor substrate-1; KC, Kupffer cells; LSEC, liver sinusoidal endothelial cells; MAPK, mitogen-activated protein kinases; miR, microRNA; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NF-KB, nuclear factor- KB; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; NLRP6, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 6; NAPQI, N-acetyl-p-benzoquinone-imine; NK, natural killer; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PMN, polymorphonuclear neutrophils; PR3, proteinase 3; ROS, Reactive oxygen species; SIGIRR, single Ig IL-1 related receptor; ST2L, suppression of tumorigenicity 2 ligand; sST2, soluble ST2; TAM, Tumor-associated macrophages; TCR, T-cell receptor; Th, T helper; TLR, toll-like receptor; TLR/IL-1R, TIR domain TLR/IL-1R; TNF, tumor necrosis factor; Treg, T regulatory; TXNIP, thioredoxin-interacting protein; WT, wild-type.

Cytokine name	Specific receptor chain	Alternative receptor name	Co-receptor	Alternative co-receptor	Function	Inhibitory ligand/Interference
	name			name		ligand
IL-1α, IL-1β	IL-1R1	CD121a	IL-1R3	IL-1RAcP	Pro-inflammatory	IL-1Ra, sIL-1R1
IL-1β	IL-1R2	CD121b	IL-1R3	IL-1RAcP	Anti-inflammatory	sIL-1R2
IL-18	IL-1R5	IL-18Rα, IL-2Rrp, CD218a	IL-1R7, and/or IL-R8 (inhibitory)	IL-18Rβ, IL-18RAcP, CD218b	Pro-inflammatory	IL-18BP
IL-33	IL-1R4	T1/ST2, ST2L, IL-1RL1, IL-33R	IL-1R3 and/or IL-R8 (inhibitory)	IL-1RAcP	Pro-inflammatory	sST2 (sIL1R4)
IL-36α, IL-36β, IL-36γ	IL-1R6	IL-1Rrp2, IL-1RL2, IL-36R	IL-1R3	IL-1RAcP	Pro-inflammatory	IL-36Ra
IL-36Ra	IL-1R6	IL-1Rrp2, IL-1RL2, IL-36R	IL-1R3	IL-1RAcP	Anti-inflammatory	
IL-37	IL-1R5	IL-18Rα, IL-2Rrp, CD218a	IL-1R8	TIR8, SIGIRR	Anti-inflammatory	
IL-38	IL-1R6	IL-1Rrp2, IL-1RL2, IL-36R	IL-1R9	IL-1RAPL, TIGIRR-2	Anti-inflammatory	
Not known	NA		IL-1R8	TIR8, SIGIRR	Anti-inflammatory	
Not known	NA		IL-1R9 and IL-1R10	IL-1RAPL, TIGIRR-2 TIGIRR, TIGIRR-1	Not known	

TABLE 1 | IL-1 cytokine superfamily characteristics.

IL-1RACP, Interleukin-1 Receptor Associated Protein; IL-1RAPL, Interleukin-1 Associated Protein Like 1/2; IL-1Ra, Interleukin-1 antagonist; IL-18BP, IL-18 Binding Protein; SIGIRP, Single Ig Interleukin-1 Related Receptor; TIGIRP, Three Ig Interleukin-1 Related Receptor; NA, not applicable.

generate a mature active form, the underlying mechanism does not depend on caspase-1 and remains unclear.

Remarkably, IL-1a and IL-33 are considered dual-function cytokines, meaning that in addition to their function as a classical cytokine, full-length IL-1 α and full-length IL-33 (as part of damage-associated molecular pattern or DAMP) act as an "alarmin." IL-1a and IL-33 precursors are constitutively expressed in the nuclei of epithelial and endothelial cells from different organs such as kidneys, liver, and lung. Moreover, the nuclear location of IL-33 seems to correspond to a storage function, a supposition confirmed by observation showing that mice expressing IL-33 from which the nuclear anchoring area has been eliminated have a fatal systemic inflammatory response syndrome, which is due to the absence of cellular retention of IL-33 (17). As regards IL-1 α , a steady-state shuttle of cytokines between nucleus and cytoplasm has been described (18). In the event of a pro-apoptotic signal, IL-1 α leaves the cytoplasm, is closely bound with the chromatin complex, and has no proinflammatory biological activity. By contrast, in the event of a necrotic signal, IL-1a leaves the nucleus and moves toward the cytoplasm, as the necrotic cell releases pro-inflammatory IL-1 α (18). To this day no similar phenomenon has been documented regarding IL-33.

Consequent to tissue damage, biologically active full-length IL-1 α and IL-33 are rapidly released by necrotic cells to alert the immune system to the danger, resulting in rapid production of pro-inflammatory mediators and infiltration of polymorphonuclear neutrophils (PMN) initially followed by monocytes/macrophages to the insult site.

With the exception of IL-1 α and IL-33, cytokine precursors of the IL-1 family generally require intracellular processing to

generate active forms. However, extracellular processing also occurs, involving different proteases. Protease driven from PMN, including elastase and cathepsin G, as well as chymase from mast cells and macrophages, proteinase 3 from PMN and macrophages, granzyme B from natural killer (NK) cells, and meprims from epithelial cells, are able to convert pro-IL-1 β , pro-IL-18, pro-IL-36 α , β , and γ into their corresponding fully active forms. Active pro-IL-33 can also be cleaved extracellularly by these proteases to generate a super active form (**Figure 1**).

Immune Cell Targets of IL-1 Superfamily Members

IL-1 Superfamily Members and Myelopoiesis Control While IL-1 superfamily members have a role in the activation and mobilization of monocytes and in the recruitment of PMN, they also fulfill a critical function in the induction of emergency hematopoiesis leading to sustained myeloid M1 skewing. In this setting, IL-1 α and IL-1 β are both liable to be produced by the medullar environment. However, emergency hematopoiesis and its pro-inflammatory component are strongly associated with IL-1 β , which mainly acts systemically (see section Concept of Trained Immunity and Innate Immunological Memory: The Place of the IL-1 Cytokine Family: trained immunity), whereas IL-1 α in its role as cytokine/alarmin seems to exercise juxtracrine action (9, 19–21).

Cytokines of the IL-1 Superfamily and Control of T Helper 1 Effectors and NK Cells

IL-18 and IL-1 are implicated in the genesis of type 1 responses through the recruitment and differentiation of T helper (Th)1 lymphocytes and the activation of NK cells and of innate



lymphoid cells (ILC)1, particularly by inducing IFN γ production. In a mouse model, absence of IL-18 production or of its mature form leads to loss of anti-tumoral activity, loss that is partially objectified by the absence of the FasL-dependent cytotoxic function by hepatic NK cells, a circumstance favoring pulmonary and colorectal cancers (22).

The existence of antigen-specific and/or NK memory cells was recently described [for review (23)]. Remarkably, these are liverresident NK cells serving as the support for memory responses in mice and, quite probably, in humans as well (23–25). That much said, in men as well as mice there exist several models suggesting that IL-18 is a factor implicated in the generation of antigenspecific and/or NK memory cells (26). However, study of mice genetically deficient in IL-18 or IL-18R α shows that IL-18 is not essential in this function (24).

IL-1R8 seems to be an antagonist of IL-18 insofar as the effector/cytotoxic function of NK cells increase pronouncedly in mice genetically deficient in IL-1R8. Remarkably, these

mice are resistant to the induction of hepatocellular carcinoma (HCC) or hepatic metastases of colorectal or pulmonary cancer. IL-1R8 at least partially exercises its antagonistic effects on the effector functions of NK cells by interfering with the IL-18/IL-18R α /Myd88 signaling pathway. In humans, IL-37, of which the receptor consists in the IL-1R8 and IL-18R α sub-units, is suppressive with regard to NK CD56(dim)CD57(+)Fc ϵ R γ (+)NKG2C(-) cells.

So it is that the cytokine/receptor couples IL-18/IL-1R5 and IL-37/IL-1R8 have opposed effects in the effector/cytotoxic functions of NK/cytotoxic cells.

According to organism site or the tissue, the effects of IL-1R8 favor or disfavor the emergence of infections and/or cancers. For example, IL-1R8 represents not only a protective factor as concerns the development of some colon cancers (11), infectious complications of keratitis (27), and acute *Pseudomonas aruginosa* pneumopathies (28), but also a promoting factor as concerns mammary cancer and HCC (10, 29). One interpretation of these opposed effects is that in the absence of IL-1R8, an exacerbated inflammatory response (bringing into play the different cell types sensitive to IL-18/IL-33 and IL-37) favors solid tumorigenesis and tissue lesions during infections, while censoring of cancers in liver, particularly hepatic metastases, is partially counteracted by IL-1R8.

IL-18BP (Binding Protein) is also involved and blocks IL-18 action and seems critical as a means of limiting deleterious hepatic NK responses in hepatic aggression models (30, 31) (see Acetaminophen-Induced ALF and Post-Viral Hepatitis A ALF).

IL-1 α/β and Th17 Lymphocyte Differentiation

IL-1 superfamily members are cytokines of critical importance in control of IL-17 production and in differentiation of Th17 lymphocytes and ILC3 (9, 32, 33). This function of IL-1 superfamily members is synergic with that of IL-23. As a result, IL-1R1-deficient mice are lacking in differentiation of Th17 lymphocytes/ILC3 and protected from experimental autoimmune encephalitis induction (34, 35).

The Complex Effects of IL-33 on the Dynamics of Immune Response

- Pro-Th2 effects: IL-33 is a key factor in ILC2 and M2 macrophage differentiation/maturation and also intervenes in Th2 lymphocyte differentiation. From that standpoint, IL-33 has a critical role in the immune responses of mucus epitheliums, as has been demonstrated in mouse models of bronchial hyper-reactivity, pulmonary allergies, and pulmonary response to *A fumigatus* (13). Remarkably, IL-33 on ILC2 induces expression of amphiregulin (Areg), a factor implicated in tissue repair (36, 37).
- The facilitating effects of Th1/cytotoxic/NK cell response: In addition to its effects on type 2 immunity, IL-33 plays a role in control of T cytotoxic and NK cell responses. Associated with IL-12, IL-33 induces IFNy production by NK cells and seems to have a spectrum of action similar to that of IL-18 (25, 38, 39). According to the timing of stimulation and its chronicity at the level of the bronchial mucus, IL-33 will either favor a type 2 response by means of ILC2 or, on the contrary, induce a pro-Th1 NK cell response, as in the case of chronic lung inflammation due to tobacco in chronic obstructive pneumopathy disease (40). In a context of antiviral response, IL-33 serves as an amplification factor of effector cytotoxic T CD8 cell response by favoring the expansion of short live effector cells (41). Lastly, IL-33, in combination with IL-12, induces IFNy production by invariant natural killer T (iNKT) cells (38, 42). From this standpoint, we may note the role of the IL-33/iNKT/IFNy axis in the genesis of renal ischemia-reperfusion (IR) injury in animal models and in humans following transplantation (43-45).
- A role in the recruitment and acquisition of T regulatory lymphocytes' innate competences IL-33 is implicated in the recruitment of T regulatory (Treg) lymphocytes during renal IR injury (46), and is associated with improved renal IR injury tolerance. Furthermore, the eutrophic functions of Treg lymphocytes present in visceral adipose tissue are dependent on the production of IL-33 by the stromal cells in adipose

tissue (47, 48). Lastly, IL-33, and to a certain extent IL-18, are liable to induce Areg production independently of the T cell receptor (TCR) (innate Treg function), thereby contributing to restorative functions, particularly those of the epitheliums, and also favoring tumor promotion and growth (36, 49).

Concept of Trained Immunity and Innate Immunological Memory: the Place of the IL-1 Cytokine Family

A series of recent studies has shown that non-specific stimulation of the immune system (pathogenic agent through Mycobacterium tuberculosis or BCG, oxidized low-density lipoproteins, Western diets...) induces modification of the pro-inflammatory immune response program driven by or dependent on myeloid cells (monocytes/macrophages) (19-21, 50, 51). Acquisition of this imprint depends on IL-1β. This inflammatory emergency hematopoiesis is implicated in the genesis of atherosclerosis lesions, metabolic syndrome, NAFLD or induction of tumor transformation, in particular by a promoting effect of epithelialmesenchymal transition (EMT). It is the demonstration that this phenomenon leads to the constitution of an innate memory of cells of myeloid origin that led to the proposal of the new concept of "trained immunity." We have attempted here to apply the concept of trained immunity to liver diseases, based on the role of the IL-1 superfamily, first of all IL-1β but also IL-18 and IL-33, in modulating innate lymphoid immunity carried by NK cells, ILC or innate T-αβ lymphocytes.

CONTRIBUTION OF IL-1 SUPERFAMILY OF CYTOKINES TO HEPATIC DISEASES Constitutive and Inducible Expression of Members of the IL-1 Superfamily in the Liver

In steady-state, the liver expresses the IL-1 α and IL-33 cytokines/alarmins, IL-18 cytokine, the receptors functioning as decoys or inhibitors of these three cytokines: IL-1Ra, IL-18BP, and IL-1R2. While pro-IL-1 α is expressed in hepatocytes, pro-IL-18 is expressed in Kupffer cells (KC). IL-33 is constitutively expressed in liver vascular endothelial and liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) (52). Such constitutive expression may have major implications during liver injuries in which cell death by necrosis is predominant and a rapid immune response is required.

Expression in steady-state in liver also occurs for antiinflammatory factors such as IL-1Ra, which antagonizes IL-1-related functions and modulates a variety of immune and inflammatory responses (53) or IL-18BP, of which the spontaneous production neutralizes locally produced basal IL-18. The sources of IL-18BP in the liver seem to be the hepatocytes themselves, KC and hepatic stellate cells (HSC) (31). The soluble form of IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is constitutively produced by the liver and forms a complex with the soluble IL-1RII, which binds and neutralizes IL-1 β (8, 54). IL-33 and ST2 are also constitutively expressed in the normal liver (55).

Under pathological conditions that drive liver damage, IL-1 superfamily members are up-regulated. IL-1 and IL-1Ra/IL1-R1 are expressed in almost all cells, especially in activated non-parenchymal cells such as KC. As an alarmin, IL-33 is rapidly released from LSEC and vascular endothelial cells following carbon tetrachloride or Concanavalin A (ConA)-induced hepatitis (52) to mediate a pro-inflammatory response. In response to these danger signals, IL-33 may also be newly secreted in hepatocytes and/or HSC. Its specific receptor ST2 (IL-1 receptor-like 1) and co-receptor IL-1RAcP constitutively expressed on innate immune cells contribute to a rapid immune response.

Acute Liver Failure

Acute liver failure (ALF) is defined as the rapid development (within days or weeks) of severe liver injury with impaired liver function and hepatic encephalopathy (56). ALF is a life-threatening condition and refers to a wide variety of causes, among which toxin/drug-induced (usually acetaminophen) liver damage or viral hepatitis (hepatitis A, B, and E) are most common in the United States and Europe (56, 57).

The Contributions of Experimental Models

In vivo studies in animals have shown the existence of mechanisms common to the different ALF models. So it is that cell death by necrosis results in rapid IL-1 α precursor

release, upregulation of IL-1 β and IL-18 leading to tissue injury through the IL-1R/IL-18R-MyD88 pathway (58–60) with massive upregulation of anti-inflammatory molecule IL-1Ra (61). Following ALF, IL-1 α , IL-1 β , and IL-18 all up-regulate the proinflammatory process through a dramatic decrease in hepatic inhibitor of kappa B (I κ B) levels and NF- κ B pathway activation, leading to IL-6 and TNF α secretion, which contributes to apoptosis, and ultimately to liver damage and animal death (60).

Lipopolysaccharide-induced ALF

In the study by Tsutsui et al. (62) KC were shown to be the main producers of IL-18, acting not in a caspase-1-dependent manner but upon Fas Ligand stimulation, thereby increasing IFN γ and TNF α production, which causes substantial acute liver damage. Furthermore, Yan et al. demonstrated a correlation between IL-1 and MMP9 expression implicated in extracellular matrix degradation, sinusoidal collapse, leading to parenchymal cell death, and loss of liver function after ALF induction (63). Inhibition of the IL-1 pathway (using adenovirus IL-1Ra) before the induction of ALF led to a significant reduction in plasma levels of hepatic enzymes and to animal survival improvement (64). Lastly, in humans, treatment by recombinant human IL-1Ra (Anakinra) improved survival of patients with acute liver injury in a post-septic situation (65).

Acetaminophen-induced ALF

In the acetaminophen (acetyl-*p*-Aminophenol, APAP)induced acute liver injury model, KC were shown to be the



FIGURE 2 | IL-1α/β and IL-18 members are involved in ALF. (A) *Acetaminophen-induced ALF*. NAPQI (N-acetyl-*p*-benzoquinone-imine) is a toxic acetaminophen metabolite generated by hepatic cytochrome Cype2e1 and Cyp1a2. Under NAPQI action, injured and necrotic centrilobular hepatocytes secrete DAMP. Among them, ATP and TLR9 receptor ligand induce IL-1β and IL-18 production by Kupffer cells. Both cytokines drive NK and iNKT cell killing function through FasL and IFN-γ production. This inflammatory process can be blocked either by endogenous IL-18BP production by non-damaged hepatocytes, Kupffer and stellate cells, or by recombinant IL-18BP treatment. (B) *Critical role of IL-18 in HAV fulminant hepatitis*. HAV-infected hepatocytes produce IL-15 as well as PAMP and DAMP which, in turn, activate IL-18 production by Kupffer cells. IL-18 activates IFN-γ production by NK cells and CD8 T-cells with innate functions, hence promoting cytotoxicity toward infected hepatocytes. In healthy infected subjects (left), endogenous IL-18BP blocks the deleterious IL-18 action and modulates NK cell and probably CD8 T-cell activation. In IL-18BP deficient subjects (right), there is no inhibition of the deleterious effects of NK cell and CD8 T-cell activation. ALF, acute liver failure; KC, Kupffer cells; NK, natural killer; Hep, hepatocyte; bounded arrow, presumably yes.

main producers of IL-1ß and IL-18, in a TLR9-dependent induction and NALP3-ASC-caspase-1-dependent manner increasing/inducing IFN-y and TNF-a production by Th1 and NK cells, which causes substantial acute liver damage (30, 62, 66) (Figure 2A). Overexpression of IL-18, known to induce FasL expression on NK cells and CD4(+) T cells, also increased expression of Fas on hepatocytes, which were thereby sensitized to NK cytotoxicity. These Fas/Fas Ligand interactions induced hepatocyte apoptosis, massive periportal fibrosis, inflammation, and severe liver failure (67). Remarkably, IL-18-deficient mice were resistant to ALF induction by APAP, and blocking of IL-1 β by a neutralizing antibody reduced ALF severity (68). Moreover, using the same model, it was recently shown that treatment of mice by IL-18BP, which blocks the binding of IL-18 to its receptor, provided protection from induction of hepatic lesions, thereby confirming the critical role of IL-18/IL-18R-NK cells (30).

To further explore the mechanisms involving the IL-33/ST2 axis in ALF, Antunes et al. (69) used a mouse model of APAP-IL (-induced liver) failure and showed that liver necrosis was associated with massive IL-33 and chemokine release. Non-parenchymal liver cells were the main sensors of IL-33, and the inflammatory response triggered by IL-33 was amplified by liver PMN infiltration. In this model, IL-33 may have acted in synergy with IL-18 in the recruitment of NK cells.

IL-36 is induced after treatment with acetaminophen, presumably in hepatocytes, and up-regulates chemokine ligand 20, a chemokine implicated in tissue protection and repair. Administration of the antagonist ILliver 36Ra aggravates damage and disturbs tissue recovery (70).

Poly-I:C-induced ALF

In a mouse model of ALF induced by poly(I:C), IL-33 expression was up-regulated and correlated with severe liver injury. Interestingly, iNKT cell-deficient mice exhibited protection against poly(I:C)-induced hepatitis accompanied by an increased number of IL-33-positive hepatocytes compared with wild-type (WT) controls (52, 71).

Liver IR injury

Ischemia, followed by reperfusion at the time of liver graft implantation, leads to what is called IR injury. Understanding of the mechanisms involved could help to identify novel therapeutic targets in view of improving organ survival. In mice and rats, warm ischemia followed by reperfusion represents the most common model to study IR injury.

On the one hand, IL-1 β and the NLRP3 inflammasome are implicated in the lesions of warm IR injury *via* high-mobility group box 1, NF- κ B and toll-like receptor (TLR)4 (72). Reactive oxygen species (ROS) mediate inflammasome activation in KC (73). On the other hand, it has been suggested that NLRP3 could be involved in IR injury independently of inflammasomes through PMN recruitment (74). Sadatomo et al. (75) showed in a murine model that macrophages secreted pro-IL-1 β , which is activated by neutrophils-derived proteinases.

Interaction between neutrophils and macrophages promoted IL-1 β maturation and causes IL-1 β -driven inflammation in the IR liver.

Regarding the role of IL-33 and its receptor ST2 in warm IR injury, Yazdani et al. (76) demonstrated in a warm IR injury murine model (confirmed in human liver resection specimens) that IL-33 release from LSEC increases sterile inflammation and results in PMN extracellular trap formation, while administration of recombinant IL-33 during IR exacerbates hepatotoxicity and inflammation. One may note that iNKT cells mediate hepatic IR injury by promotion of intrahepatic PMN influx (77), similarly to what has been shown in models of IR injury involving other organs, such as the kidney (43). Interestingly, preconditioning with intra-peritoneal injection of IL-33 (55) showed that IL-33 has a protective effect on hepatocytes, with decreased liver IR injury via the activation of NF-κB, p38 MAPK, cyclinD1, and Bcl-2. Sakai et al. (78) used a mouse model of IR with injection of recombinant IL-37 at the time of reperfusion. They demonstrated that IL-37 protects against IR injury by reducing pro-inflammatory cytokine and chemokine production by hepatocytes and KC, and suppression of PMN activity.

Observational Clinical Studies

The pro-inflammatory/anti-inflammatory balance of IL-1 family members determines the clinical outcome

Clinical observations first revealed the contribution of the IL-1 family of cytokines to the pathophysiology of ALF. Significant increase in serum levels of the pro-inflammatory cytokine IL-1 α (79), IL-1 β (80), IL-18 and its activator Caspase-1 (81), IL-33 (82) positively correlates with acute hepatitis in humans. Both highly significant elevation in IL-1 α levels (79) and reduction in the IL-1Ra over IL-1 β ratio (IL-1Ra/IL-1 β) (80) have been detected in ALF patients with a fatal outcome. These findings show that the IL-1 family members brought into play are systematically associated in the event of a fatal outcome with loss of balance in the liver between inflammatory signals IL-1 α / β /IL-18 and anti-inflammatory IL-1Ra.

Upregulation of IL-33 and sST2 in serum has been shown to exist in ALF and acute-on-chronic liver failure in patients (82), correlating with the intensity of necrosis as assessed by transaminase activity. Interestingly, sST2 was elevated in acute and acute-on-chronic liver failure, but not in chronic liver failure, suggesting that sST2 could be a tool to monitor the course of the disease.

Post-viral hepatitis A ALF

Less than 1% of acute hepatitis A virus (HAV) infections result in acute fulminant hepatitis. A few cases of post-AHV ALF family isolates have been reported, suggesting the role of a genetic factor implicated in the determinism of this pathology. The study by Belkaya et al. (31) on an 11-year-old patient having died from fulminant HAV hepatitis, with no previous personal of familial medical history, identified a deletion of 40 nucleotides of the gene coding IL-18BP, leading to instability at the mRNA level, and loss of the normal structure, or the absence of IL-18BP.

During the acute phases of viral hepatitis, particularly HAV, massive secretion in patients' serum of IL-18 and IL-15 has

been observed (83). Interestingly, the secretion is accompanied by the appearance of a cell population consisting in innate CD8 T lymphocytes (whose expansion and cytotoxic function are independent of TCR engagement) in the blood and the liver (83). It is highly likely that acquisition of this "innate memory" phenotype depends, as has been described above (section Cytokines of the IL-1 Superfamily and Control of T Helper 1 Effectors and NK Cells), on the joint action of IL-18 and IL-15. Belkaya et al. (31) went on to show that in the patient having succumbed to post-HAV ALF, the aforementioned absence of IL-18BP was accompanied by excessive activation of NK cells, activation that depended on IL-18. On the basis of their analysis of this clinical case, the authors hypothesized that the IL-18BP deficiency could partially explain the fulminant viral hepatitis (**Figure 2B**).

To sum up, the different findings from experimental models and from clinical situations involving ALF underline the importance of the implication of NK/T CD8 cells by means of IL-18 and IL-1 and confirm the decisive role of "negative" regulatory elements (IL-1R8, IL-18BP, IL-37) whose appearance attenuates or reduces the severity of acute hepatic inflammation (**Figure 2**).

Alcoholic Liver Diseases

Alcoholic liver diseases (ALD) includes liver manifestations due to alcohol overconsumption: fatty liver, alcoholic hepatitis, and chronic hepatitis with liver fibrosis or cirrhosis.

Alcohol acts as an "exogenous signal" on KC through TLR with activation of the inflammasome NLRP3-caspase 1 and production of IL-1 β . A second "endogenous signal" leading to activation of the same pathway, is the release of two DAMP: ATP and uric acid by damaged hepatocytes

because of alcohol damage (84). Upregulation of IL-1 β activity leads to inflammation, steatosis, and additional damage (85, 86) (**Figure 3**).

Recently, Heo et al. (87) demonstrated in human and murine liver samples that alcohol decreases microRNA (miR)-148a through the transcriptional regulator forkhead box protein O1. TXNIP (thioredoxin-interacting protein) is a direct target of miR-148a and is overexpressed during alcoholic liver disease, activating NLRP3 inflammasome in hepatocytes, and caspase 1-mediated pyroptosis. Hepatocyte-specific delivery of miR-148a to mice abrogates alcohol-induced TXNIP overexpression and inflammasome activation (**Figure 3**).

In human patients with alcoholic liver disease, sST2 but not IL-33 was correlated to the severity of the disease (88). In the same fashion, Wang et al. (89) showed with IL-33and ST2- deficient mice that ST2 decreases the inflammatory activation of hepatic macrophages by inhibiting NF- κ B in alcoholic liver disease, in an IL-33-independent manner. However, during severe liver injury, massive cell death, and release of IL-33 triggers IL33/ST2 signaling and increases tissue damage, presumably by local activation of different cells expressing ST2, namely hepatic NK cells, iNKT cells, ILC2, and Treg lymphocytes.

During ALD, one target of IL-1 β , and possibly IL-33, is the iNKT cell population (86). From this standpoint, it is interesting to note that mice genetically deficient in J α 18 T cells or CD1d, and consequently without iNKT lymphocytes, are at least partially protected from ALD (90, 91). In these models, iNKT lymphocytes are responsible for PMN influx during ALD progression.



Non-alcoholic Fatty Liver Disease

With prevalence of 30% for adults and 10% for children in Western countries, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a growing public health issue frequently associated with morbid obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome (92, 93). NAFLD is characterized by excessive fat accumulation in the liver associated with insulin resistance, and is defined by the presence of steatosis in hepatocytes. NAFLD ranges from simple steatosis or non-alcoholic fatty liver to a more serious form called non-alcoholic steatohepatitis, which is characterized by liver inflammation and tissue damage that can lead to fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (94).

There is increasing evidence that the induction of inflammation and production of inflammatory mediators released from the adipose tissue of obese subjects, such as adipocytokines and classical cytokines contribute to obesity-induced NAFLD, in which IL- $1\alpha/\beta$ plays a key role (**Figure 4**) (95, 96). In fact, NAFLD is the last step of lowgrade inflammation depending on the bringing into play of "trained immunity".

Free fatty acids, acting as DAMP, are capable together with TLR ligands present in gut microbiota of activating NLRP3 and NLRP6 inflammasomes, thereby inducing caspase-1 activation and the release of IL-1 α , IL-1 β , and IL-18 in hepatocytes (97, 98). IL-1 α/β , in turn, activates inflammasome, TNF α and IL1 β and IL-18 release in KC (98). Other extra-hepatic cell types such as adipocytes could also be important sources of IL-1 α and IL-1 β during NAFLD associated with obesity (99).

IL-1 β promotes hepatic steatosis by stimulating triglyceride and cholesterol accumulation in primary liver hepatocytes and lipid droplet formation (96) and acts on LSEC to promote liver inflammation by upregulating intercellular adhesion molecule



FIGURE 4 | IL-1 β , together with TNF α , mediates low-grade inflammation during NAFLD. Free fatty acids, acting as DAMP, are capable together with TLR ligands of activating NLRP3 and NLRP6 inflammasomes, thereby inducing caspase-1 activation and release of IL-1 α and IL-1 β in hepatocytes and Kupffer cells. Adipocytes could be an important source of IL-1 α and IL- β during NAFLD associated with obesity. Adipocyte-derived IL-1 β has been shown to directly induce insulin resistance in hepatocyte development of insulin resistance in adipocytes enabling accumulation of lipids in the liver. IL-1 β is also capable of reducing insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression dependently and independently of ERK activation and of inducing impairment in insulin signaling and action. IL-1 β is released by hepatocytes through inflammasome activation and, in turn, amplifies inflammasome activation, TNF α , and IL- β release in Kupffer cells. Increased IL-1 β and NLRP3 drive liver fibrosis in experimental models of NAFLD mice. IL-1 β acts on LSEC to promote liver inflammation by upregulating ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) expression, which stimulates neutrophil recruitment in the liver. IL-18 production negatively regulates NAFLD/NASH progression *via* modulation of the gut microbiota. NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease; KC, Kupffer cells; LSEC, liver sinusoidal endothelial cells.

1 expression, which stimulates neutrophil recruitment in the liver (100). Moreover, IL-1 β produced by the liver, together with pro-inflammatory IL-6 and TNF α , contributes to the activation of resident immune cells and the recruitment of other leucocytes to the damaged liver, leading to chronic inflammation (101). Accordingly, IL-1 β and/or IL-1 α -deficient mice have demonstrated less diet-induced inflammation and liver fibrosis, as attested by lower serum transaminases and serum amyloid alpha concentrations, as well as decreased expression of inflammatory and fibrosis transcripts such as *IL*-6, *TNF\alpha*, *P-Selectin*, *Cxcl1*, and *TGF\beta*, as compared to WT controls (102).

IL-1 α/β are upregulated in the adipose tissue of obese and insulin-resistant mice. Together with TNF α and IL-6, IL-1 α/β , in turn, contributes to the development of insulin resistance in adipocytes through downregulation of insulin receptor substrate-1 expression, thereby facilitating accumulation of lipids in the liver (103). Moreover, adipocyte-derived IL-1 β has been shown to directly induce, alone or in combination with TNF α , insulin resistance in hepatocytes *via* AMPK-ROS signaling and autophagy (104, 105). Accordingly, IL-1 α and IL-1 β -deficient mice have lower fasting glucose and insulin levels and improved insulin sensitivity (106).

Of note, IL-1 α deficiency increased both hepatic and systemic cholesterol levels, suggesting that liver fat storage and inflammation are not necessarily parallel events and that some hepatic lipids might support anti-inflammatory functions (102). IL-1Ra-deficient mice exhibited severe steatosis and pericellular fibrosis containing many inflammatory cells, as observed in steatohepatitis histological lesions in humans, following 20 weeks of feeding with an atherogenic diet (107). These different observations, particularly as regards the role of IL-1Ra in NAFLD, raise the question of the interest of therapeutic utilization of human recombinant IL-1Ra (Anakinra) in the natural history of NAFLD.

Henao-Mejia et al. (108) have reported that changes of gut microbiota linked to NLRP3 and NLRP6 inflammasome deficiency were associated with increased hepatic steatosis and inflammation. Interestingly, IL-18 production negatively regulates non-alcoholic steatohepatitis progression *via* modulation of the gut microbiota. This observation strongly highlights the role of the maintenance of digestive microbiome homeostasis in the genesis of "metabolic syndrome" and NAFLD (108).

Regarding new members of the IL-1 superfamily, IL-33 has not been widely explored. In a murine model, a high fat diet (HFD)-induced steatohepatitis was associated with upregulation of IL-33 but IL-33 deficiency did not affect severity of liver inflammation or liver fibrosis, suggesting that endogenous IL-33 has no effect on the progression of fibrosis during experimental steatohepatitis (109). Treatment with recombinant IL-33 in mice attenuated diet-induced hepatic steatosis but aggravated hepatic fibrosis in a ST2-dependent manner (110). The pro-fibrotic effect of pharmacological IL-33 treatment in HFD mice was confirmed in another study (111), where galectin-3 enabled upregulation of the IL-33/ST2 pathway and production of IL-13 by peritoneal macrophages.

Autoimmune Hepatitis

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory disease of the liver of which the pathogenic mechanisms have vet to be unraveled. Treatment relies mainly on lifelong immunosuppressive therapy and liver transplantation in the final stage. Acute hepatitis induced with ConA is the most widely used mouse model of AIH (Figure 5). In this model, massive activation of immune cells induces massive local production of cytokines such as IL-4, IFNy, and TNFa (112-114), which are directly implicated in hepatocyte death (113). iNKT lymphocytes are of major importance in acute hepatitis induced with Con-A, as is attested in works showing that iNKT lymphocytedeficient mice resist hepatitis induction (115). Aside from their cytokine production, the pathogenic effect of iNKT lymphocytes depends on their cytotoxic functions, which bring into play perforin and granzymes as well as FasL/Fas and TRAIL/DR5 interactions (115, 116). Depletion of KC prior to ConA treatment attenuates hepatic injury (117). Activation of iNKT lymphocytes may consequently depend on KC, thereby ensuring a role of auto-antigen presentation. Another pathogenic mechanism may consist in activation of KC by iNKT lymphocytes, leading to production by the KC of TNFa, ROS and IL-1ß depending on the activation by ROS of the NLRP3 inflammasome (118). On this subject, it is interesting to note that in this model, treatment of mice by human recombinant IL-1Ra (Anakinra) at least partially prevents hepatic lesions (118).

IL-33 is rapidly neosynthesized (6 hours) in the hepatocytes after treatment by ConA (116, 119) (**Figure 5**). Interestingly, this expression of IL-33 depends on the presence of iNKT lymphocytes and possibly on TRAIL/DR5 interactions between iNKT lymphocytes and hepatocytes (116). IL-33 production seems to moderate hepatitis severity, because: (i) IL-33-deficient mice have more heavily damaged livers than WT mice (52, 71, 116, 119, 120); (ii) injection of recombinant IL-33 renders less severe the hepatitis induced by ConA (120). Biologically, the increased severity of hepatitis lesions in IL-33-deficient mice is associated with pronounced expression of TNF α and IL-1 β and is accompanied by accumulation in the liver of activated NK cells (119).

The protective action of IL-33 in the model of ConAinduced hepatitis may be attributed to the induction of anti-apoptotic factors such as BAX or Bcl2 (120). Another element associated with the protective action of IL-33 may be the recruitment in the liver of Treg lymphocytes [TCR- $\alpha\beta(+)CD4(+)CD25(+)FoxP3(+)$] ST2(+) (119). One is tempted to suggest that these Treg ST2(+) cells contribute to hepatic repair by expression of trophic factors such as Areg, as previously described in other tissues (36, 121).

Viral Hepatitis B, C

According to the World Health Organization, 325,000,000 persons are currently living with a chronic infection of either hepatitis virus B (HBV) or hepatitis virus C (HCV). Infection with HBV rarely leads to acute liver failure. Chronic infections with both HBV and HCV are responsible for progressive fibrosis and cirrhosis, as well as development of hepatocellular carcinoma.



IL-1 β and IL-18 may play a role in liver inflammation in the setting of HCV infection. Monocyte-derived human macrophages and Kupffer cells (122) produce IL-1 β and IL-18 in response to HCV infection: HCV induces pro-IL-1 β and pro-IL-18 in macrophages *via* the NF- κ B signaling pathway. It has been shown that viral RNA can trigger MyD88/TLR7 pathway, thereby inducing IL-1 β expression. HCV concomitantly activates the NLRP3 inflammasome, leading to IL-1 β secretion (123).

It has been shown in humans that with their IFN γ production, iNKT lymphocytes inhibit the replication of HCV in hepatocytes (124) and that over the course of HBV infection, recruitment of iNKT lymphocytes occurs at the level of the liver (125–127). Lastly, in a model of HBV-transgenic mice, the authors showed that IL-18 induces repression of viral replication in a context depending on local recruitment of NK cells and iNKT lymphocytes (128). Interestingly, when infection becomes chronic, hepatic iNKT lymphocytes are progressively

reduced in number (127), conceivably resulting in a loss of sensitivity of iNKT lymphocytes to IL-18 and/or IL-33.

From this standpoint, IL-33 expression in LSEC significantly increases in patients with chronic HBV (CHB) infection, and is likewise highlighted in the hepatocytes of lesions/inflammatory foci in patients with the most severe form of hepatitis (129). Seric IL-33 and ST2s concentrations are highly elevated compared to those in healthy donors and, interestingly enough, they are correlated with the severity of hepatic cytolysis (129, 130). In HBV acute-on-chronic liver failure (ACLF) (129), seric IL-33 and ST2s concentrations are pronouncedly higher than the concentrations observed in CHB patients. The circulating monocytes in ACLF patients present a highly activated and pro-inflammatory phenotype, which is correlated with IL-33 increases inflammation and disease severity through monocyte activation, TNF α , IL-6, and IL-1 β secretion. Similarly, IL-33 levels in human patients correlate with HCV RNA and liver damage (131). Such IL-33 production, particularly in the early phases of infection, can act in synergy with IL-18 and IL-1 α/β in the recruitment of NK, iNKT, and T cytotoxic cells. And given the chronicity of its production, IL-33 is also liable to induce a state of systemic inflammation and, locally, a phenomenon of immuno-subversion through recruitment of Treg lymphocytes and ILC2 as opposed to recruitment and activation of NK and iNKT cells.

Fibrosis

Liver fibrosis, the final stage of most types of chronic liver diseases, characterized by the excessive accumulation of extracellular matrix proteins, including collagen, is a consequence of extracellular matrix hepatic stem cell activation. Gieling et al. (132) established that IL-1 activates hepatic stem cells that produce MMP-9 and control the progression from liver injury to fibrogenesis. Advanced liver fibrosis results in cirrhosis with progressive liver failure and development of portal hypertension.

Marvie et al. (133) showed that in chronic hepatitis, in the model induced by CCl₄, IL-33 and ST2 expression correlates with fibrosis (133). In humans suffering from chronic hepatitis, there also exists at the level of the liver a correlation between IL-33 cellular expression and fibrosis severity (133). In models of fibrosis induced by CCl₄, thioacetamide, and bile duct ligation, increased hepatic IL-33 expression in activated HSC has been confirmed. Remarkably, fibrosis lesions are absent or non-severe in IL-33 deficient mice, thereby underscoring the major role of IL-33 in the manifestations of fibrosis (134). Lastly, this study suggests that the profibrosis function of IL-33 depends on its action in the activation and expansion of liver ILC2 (134). In the absence of IL-13 produced by ILC2, CCl₄ does not induce hepatic fibrosis.

The fibrosis lesions described in the aforementioned works depend on the impact of environmental, chemical or physical stress. It may be the case that in the induction of hepatic fibrosis coming about during NAFLD, IL-33 is non-indispensable. This hypothesis is premised on the fact that in a model of hepatic fibrosis induced by HFD, there is no difference in fibrosis severity between WT and genetically IL-33-deficient mice (109).

Hepatocellular Carcinoma (See Figure 6)

As described in section Cytokines of the IL-1 Superfamily and Control of T Helper 1 Effectors and NK Cells, the IL-18/IL-18R axis is a checkpoint driven by the immunological components controlling carcinogenesis and hepatic metastases. In addition to NK lymphocytes, iNKT lymphocytes are of key importance in the censoring of hepatic metastases (135, 136). As a result, iNKT lymphocytes strongly express IL-18 and IL-33 receptors (38, 39, 137) and may consequently be implicated in the antitumoral effect of the IL-18/IL-18R axis. Moreover, influx in the liver of iNKT lymphocytes depends on the expression of CXCL16 by LSEC, that is to say cells of which another characteristic is nuclear expression of IL-33. The study by Ma et al. (135) shows that recruitment of anti-tumoral iNKT lymphocytes in the liver is indirectly controlled by the digestive microbiota and by the metabolites produced by the latter, metabolites that will induce CXCL16 expression by LSEC. From this standpoint, it should be pointed out that there exists an accumulation of iNKT CD4(+) cells with a type Th2 profile in HCC liver (138). Enriched with iNKT cells, its infiltration is correlated with HCC progression, attesting to the loss of effectiveness of the anti-tumoral activity of iNKT lymphocytes in a tumor niche during the natural history of HCC.

Several works in mouse models have shown that endogenous IL-33 is an adjuvant factor in anti-tumoral and anti-metastatic immunity, including at the level of the liver (139–141). The limitation of these studies resides in the utilization of metastasis models, some of which use HCC cell lines but do not reproduce the natural history of HCC.

Even though HCC may develop in healthy liver parenchyma, in most cases it develops in chronic inflammatory liver parenchyma in pathology secondary to the induction of trained immunity depending on IL-1 β production (NAFLFD, ALD, Viral chronic hepatitis, hepatic fibrosis). As we previously discussed, the liver possesses its own means of induction and control of oncogenesis. Consequently, the process of transformation/oncogenesis at the hepatic level is partially dependent on IL-1 β and will avail itself of amplification paths.

Recently, Zhang et al. (142) demonstrated in cell cultures, mouse models, and human samples the existence of a hypoxiainducible factor (HIF)-1 α /IL-1 β signaling loop between cancer cells and tumor-associated macrophages (TAM) in a hypoxic microenvironment, resulting in cancer cell epithelial-mesenchymal transition and metastasis. When exposed to moderate hypoxia, HIF-1 α accumulation upregulates IL-1 β secretion in TAM. IL-1 β increases inflammatory signaling and enhances epithelial-mesenchymal transition in cancer cells through the IL-1 β /HIF-1 α /COX2 axis, which promotes the invasive capacities of tumoral cells in a hypoxic microenvironment.

IL-37 is an anti-inflammatory cytokine, which in numerous models seems to block the deleterious effects of IL-1 α/β and IL-18. Schematically, this cytokine counteracts the induction of trained immunity. From this standpoint, it is altogether remarkable that hepatic expression of IL-37 decreases during HCC evolution and that it does so both in the tumor itself and the non-tumoral tissue adjacent to the tumor. Factors suggesting that IL-37 may possess an anti-tumoral effect are corroborated by the following points: (i) persistence of hepatic expression of IL-37 is associated during HCC with infiltration of NK CD57(+) cells. *In vitro*, the HCC cell lines expressing IL-37 attract NK CD57(+)cells which, in turn, are cytotoxic with regard to the HCC lines (143); (ii) the profusion of NK CD57(+) cells and the elevated level of hepatic expression of IL-37 are associated with improved overall survival (143); (iii) IL-37 has an anti-tumoral effect during HCC. While the JNK/pSmad3L/c-Myc pathway is associated with tumor growth during HCC, the signaling depending on IL-37 diverts pSmad3L from that platform and associates it with the suppressor of tumor p21 in a pSmad3C/p21 complex. The presence of pSmad3L is inversely correlated with overall survival (144); (iv) IL-37 is liable to induce autophagia in the HCC cell lines by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, thereby sensitizing HCC cells to apoptosis induction (145).



The patiodar choinal transformation. These cytokines induced by metabolic syndrome of PH-D/NAFLD leads to low-grade initiatini initiation linked to L-1 β and other cytokine (as TNF- α) production. These cytokines induced hepatic fibrosis, exposing hepatocytes to moderate hypoxia. HIF-1 α accumulation up-regulates IL-1 β secretion in TAM/KC. Locally produced IL-1 β induces or enhances epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. At that time, iNKT cells and CD8 T-cells maintain the immunosurveillance of the HCC. (B) *IL-37 driven-suppression of hepatocellular carcinoma.* Hepatocytes to moderate hypoxia. HIF-1 α accumulation up-regulates IL-37, a cytokine with several cell targets. IL-37 suppresses hepatocellular carcinoma growth by converting pSmad3 signaling from JNK/pSmad3L/c-Myc oncogenic signaling into pSmad3C/P21 tumor-suppressive signaling. IL-37 inhibits the PI3K/AKT/mTOR pathway, inducing autophagy in hepatocellular carcinoma cells. IL-37 recruits cytotoxic anti-tumoral NK cells harboring the terminal differentiation marker CD57. At that time, IL-33 neosynthesis by hepatocarcinoma cells and hepatocytes could maintain the immunosurveillance by maintaining iNKT1 cell and T CD8 T-cell activation. (C) *Immunosurveillance failure at the end-stage HCC*. Sustained IL-33 production by tumoral cells can recruit Treg lymphocytes and promote development of iNKT2 CD4(+) cells, both leading to anti-tumoral immunosurveillance failure. Areg, Amphiregulin; EMT, epithelial-mesenchymal transition; HCC, hepatocellular carcinoma; KC, Kupffer cells; TAM, tumor-associated macrophages; bounded arrows, presumably yes.

As regards IL-33, data from the natural history of HCC are available in humans. Yang et al. (146) detected IL-33 protein expression by immunohistochemistry in patients with HCC, liver cirrhosis, hepatitis, and normal livers. They showed that expression of IL-33 is increased in HCC and LC patients, as compared to healthy donors. In HCC patients, IL-33 is expressed by both tumoral cells and peri-tumoral tissue. Immunohistology results in this work are corroborated by quantitative RT-PCR data. A second study (147) likewise underlines IL-33 expression at the level of the tumor during HCC. IL-33 seric expression is particularly pronounced when the disease has evolved, whereas high seric concentrations of ST2s have been found to be associated with reduced overall survival of patients with HCC (148).

High expression of IL-33 could be a factor contributing to deregulation of local response, possibly increased by desensitization of iNKT and NK lymphocytes as well as the recruitment of Treg lymphocytes and ILC2 producers of AReg, a cytokine of which the function in transformation and progression of HCC has been documented (149).

THERAPEUTIC PERSPECTIVES

Although the role of some members of the IL-1 cytokine family in liver disease has been extensively studied (IL-1 α , IL-1 β , IL-33), leading to strong arguments favoring these molecules as potential therapeutic targets, the role of the other members (IL-36, IL-37, IL-38) remains to be elucidated. Furthermore, some members of the IL-1 family are pro-inflammatory and enhance tissue damage and inflammation, while other members are more protective/anti-inflammatory by promoting tissue regeneration and preventing tissue damage and inflammation. Hence, these cytokines represent crucial targets for liver disease therapies and could open new perspectives of potentially innovative therapeutic approaches aimed at controlling local immune response and at limiting liver injury.

Members of the IL-1 superfamily have multiple cellular sources and targets, as well as numerous natural inducers and inhibitors. The pharmacological agents that can either suppress cytokine production or block their biological actions may have potential therapeutic value against a wide variety of liver diseases. Moreover, several members of the IL-1 cytokine family can activate (or inhibit) the same receptors. For example, IL-1RAcP is shared by IL-1 α , IL-1 β , IL33, and IL-36, highlighting redundancy and compensatory actions. Since IL-1 α , IL-1 β , IL-33, and IL-36 are implicated *in vivo* during liver diseases, the efficiency of the therapeutic approaches based on targeting a cytokine by the other members may be affected. In other words, when targeting the shared receptors, in this case IL-1RAcP may be more effective. In addition to redundancy, some cytokines in the IL-1 superfamily are known for their duality of function. For example, IL-33 has shown both pathological and hepatoprotective functions and rIL-33-ST2 therapeutic possibilities seem to depend on the presence of different inflammatory conditions, which may require either activation or inhibition of this pathway.

Modulation of IL-1 β and IL-18 by Interference With Inflammasome

While some pharmacological agents against the NLRP3-caspase-1 pathway have been developed, their efficiency regarding cytokine inhibition and liver inflammation is moderate (106, 150, 151). This may be explained by the implication of additional mechanisms of extracellular activation of the cytokines. In addition to the classical NLRP3 inflammasome-caspase-1 cytokine activation pathway, serine proteases from immune cells (**Figure 1**) are also potent cytokine activators contributing to liver disease progression. The use of agents acting against those serine proteases, combined or not with anti-inflammasome-caspase-1 therapy, can be considered as a valuable therapeutic strategy and merits further investigation (152).

Manipulation of the IL-1/IL-1R Pathway in Chronic Inflammatory Hepatopathies

IL-1 β is a critical mediator of trained immunity and chronic inflammatory hepatopathies such as NASH and NAFLD, raising the question of the therapeutic targeting of the IL-1/IL-1R axis.

Anakinra is the recombinant form of IL-Ra used in treatment of chronic or acute inflammatory pathologies (Muckle-Wells, adult-onset Still's disease). It effectively treats macrophage activation syndrome (MAS), as regards both MAS associated with inflammatory pathologies such as Still's disease and MAS associated with septic shock (for a review, see 5, 63). Altogether remarkably, in the latter indication, Anakinra clearly improves survival of patients with disseminated intravascular coagulation or hepatobiliary injury (65).

Several studies have suggested that utilization of Anakinra in precancerous states slows evolution of the disease, particularly in cases of smoldering myeloma (associated with Dexametasone) (153). Moreover, it is a treatment that seems beneficial in management of some cancers, particularly metastatic colorectal cancer (154). It is also remarkably well-tolerated, with relatively few adverse effects, especially infectious [for a review, see (8)].

Blockage of the IL-1/IL-1R pathway can also be achieved with a neutralizing antibody directed against IL-1 β , Canakinumab, which seems beneficial in atherosclerosis prevention in high-risk patients (155). Most of these diseases involve inflammatory pathways depending on the bringing into play of trained immunity, of which we previously noted the role/implication in the genesis of different hepatopathies. While blockage of the IL-1/IL-R pathway is a therapeutic option that may be envisioned in cases of chronic inflammatory hepatopathies, conclusive demonstration of its effectiveness has yet to be provided.

IL-18BP in ALF and Acute Viral Hepatitis

Recent demonstration of the role of the IL-18/NK cell axis in ALF genesis, particularly in cases of viral origin (31), has underscored the critical role of negative regulatory signals characterizing the pathway: IL-1R8 and IL-18BP. From this standpoint, in terms of therapeutic manipulation, IL-18BP is an excellent candidate. A human recombinant form (Tradekinig Alfa, AB2 Bioltd) is currently under evaluation in treatment of Still's disease and hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome, that is to say a pathology in which the IL-18/IL-18R axis seems preponderant. It has also been suggested that IL-18BP can prevent acetaminophen-mediated hepatotoxicity (30, 68). These different studies raise the issue of pharmacological targeting of IL-18 in a wide range of ALF cases.

Recombinant IL-233

In situations of acute suffering due to IR injury, targeting of the IL-33/ST2 pathway is an option of genuine interest that nonetheless raises questions of intervention timing. Its application in organ preconditioning could represent a protective strategy, given that during an IR injury phase IL-33 is likely to be implicated in the appearance of lesions.

Another strategy aimed at favoring the recruitment of Treg lymphocytes during an IR injury sequence consists in the utilization of recombinant IL-233. This chimeric IL associates IL-2 and IL-33 functions: the N-terminal residues 21-169 of the IL-2 receptor are linked by 15 amino-acyl residues to C-terminal residues 109-266 of the IL-33 receptor (156). Recombinant IL-233 enables preferential recruitment of T lymphocytes and ILC2 at the expense of iNKT lymphocytes, NK cells and ILC1. Stremska et al. (156) have shown that in a renal IR injury model, recombinant IL-233 is "formidably effective" as a means of protecting mice at post-sequence IR injury. In addition to a modified balance of recruitment between pro-inflammatory effectors (iNKT/T/NK/PMN) and anti-inflammatory effectors (Treg lymphocytes/ILC2), it is altogether probable that in this model, IL-233 promotes rapid, and effective repair signals. It is consequently relevant to ask whether this molecule may be beneficially utilized in cases of acute hepatic inflammation, especially those associated with liver transplantation.

Even though it currently remains speculative, future therapeutic utilization of recombinant IL-233 in cases of chronic inflammatory hepatopathies merits consideration. A recent study highlighted the beneficial effects of IL-233 in prevention of diabetic nephropathy in an Ob type 2 diabetes (DT2) mouse model. In this mouse model of predisposition to obesity and DT2 on account of an Ob mutation of leptin rendering the latter non-functional, IL233 treatment during or after the appearance of DT2 provides protection from diabetic nephropathy (46). These results give rise to the question of the possible interest of a "humanized" form of this molecule in the prevention of long-term consequences of trained immunity, especially as regards the liver. However, other questions arise: Might there not ensue an effect stemming from loss of cancer censuring and, eventually, promotion of tumor growth depending on the Treg/ILC2 lymphocytes expressing Areg?

Conclusion Concerning Therapeutic Manipulation of Cytokines in the IL-1 Family

Further *in vivo* studies are needed to understand the potential benefits of targeting these shared receptors or simultaneously blocking multiple members of the IL-1 cytokine family.

Furthermore, these cytokines require enzymatic or proteolytic processing to become active, and their activators contribute to the process of liver inflammation and can therefore be potential therapeutic targets.

In conclusion, acute and chronic inflammations of the liver have various etiologies, ranging from toxic aggression (alcohol, fat diet, drugs) to viruses. Chronic liver inflammation leads to fibrosis and end-stage cirrhosis, and predisposes to the development of neoplasms such as hepatocellular carcinoma. The different members of the IL-1 superfamily of cytokines, which contribute to control of tissue homeostasis and help the liver to respond to damage and disease by promoting immune responses, have a major role in most

REFERENCES

- Menkin V. Studies on the isolation of the factor responsible for tissue injury in inflammation. *Science*. (1943) 97:165–7. doi: 10.1126/science.97.2511.165
- 2. Beeson PB. Temperature-elevating effect of a substance obtained from polymorphonuclear leucocytes. J Clin Invest. (1948) 27:524.
- Atkins E, Wood WB Jr. Studies on the pathogenesis of fever. II. Identification of an endogenous pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine. J Exp Med. (1955) 102:499–516. doi: 10.1084/jem.102. 5.499
- Dayer JM. From supernatants to cytokines: a personal view on the early history of IL-1, IL-1Ra, TNF and its inhibitor in rheumatology. *Arthritis Res Ther.* (2018) 20:1–6. doi: 10.1186/s13075-018-1607-y
- Dinarello CA. Interleukin-1. Cytokine Growth Factor Rev. (1997) 8:253–65. doi: 10.1016/S1359-6101(97)00023-3
- Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions. Eur J Immunol. (2010) 40:599–606. doi: 10.1002/eji.201040319
- Tsutsui H, Cai X, Hayashi S. Interleukin-1 family cytokines in liver diseases. Mediators Inflamm. (2015) 2015:630265. doi: 10.1155/2015/630265
- 8. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* (2018) 281:8–27. doi: 10.1111/imr.12621
- Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity. *Immunity*. (2019) 50:778–95. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.012
- Molgora M, Bonavita E, Ponzetta A, Riva F, Barbagallo M, Jaillon S, et al. IL-1R8 is a checkpoint in NK cells regulating anti-tumour and anti-viral activity. *Nature*. (2017) 551:110–4. doi: 10.1038/nature24293
- Molgora M, Supino D, Mantovani A, Garlanda C. Tuning inflammation and immunity by the negative regulators IL-1R2 and IL-1R8. *Immunol Rev.* (2018) 281:233–47. doi: 10.1111/imr.12609
- 12. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and

liver inflammatory diseases and may represent potential clinical targets.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AR, CS, and ES contributed to literature search and editing of the review. LB, MF, AB, J-MG, and AH contributed to literature search for the review and provided writing and editing of the review.

FUNDING

This study was supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Ligue contre le Cancer (Comités départementaux de la Vienne, de la Charente, de la Charente Maritime et des Deux-Sèvres), and the Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou-Charentes (ARIM-PC). MF and AB were supported by fellowships provided by INSERM, Région Poitou-Charentes, Octapharma, Fondation Brystol-Meyers Squibb, and Région Nouvelle Aquitaine, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Jeffrey Arsham, a professional American medical translator, who reviewed the manuscript. Figures used images from Sevier Medical Art (https://smart.servier.com/).

epithelial cells *in vivo*: a novel 'alarmin'? *PLoS ONE*. (2008) 3:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0003331

- Cayrol C, Girard J-P. Interleukin-33 (IL-33): a nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* (2018) 281:154–68. doi: 10.1111/imr.12619
- Bandara G, Beaven MA, Olivera A, Gilfillan AM, Metcalfe DD. Activated mast cells synthesize and release soluble ST2-a decoy receptor for IL-33. *Eur J Immunol.* (2015) 45:3034–44. doi: 10.1002/eji.201545501
- Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem.* (2007) 282:26369–80. doi: 10.1074/jbc.M704916200
- Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. J Clin Invest. (2007) 117:1538–49. doi: 10.1172/JCI30634
- Bessa J, Meyer CA, de Vera Mudry MC, Schlicht S, Smith SH, Iglesias A, et al. Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation. *J Autoimmun*. (2014) 55:33–41. doi: 10.1016/j.jaut.2014.02.012
- Cohen I, Rider P, Carmi Y, Braiman A, Dotan S, White MR, et al. Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2010) 107:2574–9. doi: 10.1073/pnas.0915018107
- Bekkering S, Arts RJW, Novakovic B, Kourtzelis I, van der Heijden CDCC, Li Y, et al. Metabolic induction of trained immunity through the mevalonate pathway. *Cell.* (2018) 172:135–46.e9. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.025
- Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, Chen L-S, Grzybek M, Grinenko T, et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell.* (2018) 172:147–61.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.034
- Moorlag SJCFM, Röring RJ, Joosten LAB, Netea MG. The role of the interleukin-1 family in trained immunity. *Immunol Rev.* (2018) 281:28–39. doi: 10.1111/imr.12617
- 22. Dupaul-Chicoine J, Arabzadeh A, Dagenais M, Douglas T, Champagne C, Morizot A, et al. The Nlrp3 inflammasome suppresses colorectal cancer

metastatic growth in the liver by promoting natural killer cell tumoricidal activity. *Immunity*. (2015) 43:751–63. doi: 10.1016/j.immuni.2015. 08.013

- Adams NM, O'Sullivan TE, Geary CD, Karo JM, Amezquita RA, Joshi NS, et al. NK cell responses redefine immunological memory. *J Immunol.* (2016) 197:2963–70. doi: 10.4049/jimmunol.1600973
- Madera S, Sun JC. Cutting edge: stage-specific requirement of IL-18 for antiviral NK cell expansion. J Immunol. (2015) 194:1408–12. doi: 10.4049/jimmunol.1402001
- Nabekura T, Girard J-P, Lanier LL. IL-33 receptor ST2 amplifies the expansion of NK cells and enhances host defense during mouse cytomegalovirus infection. *J Immunol.* (2015) 194:5948–52. doi: 10.4049/jimmunol.1500424
- Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood.* (2012) 120:4751–60. doi: 10.1182/blood-2012-04-419283
- Huang X, Hazlett LD, Du W, Barrett RP. SIGIRR promotes resistance against Pseudomonas aeruginosa keratitis by down-regulating type-1 immunity and IL-1R1 and TLR4 signaling. *J Immunol.* (2006) 177:548–56. doi: 10.4049/jimmunol.177.1.548
- Véliz Rodriguez T, Moalli F, Polentarutti N, Paroni M, Bonavita E, Anselmo A, et al. Role of Toll interleukin-1 receptor (IL-1R) 8, a negative regulator of IL-1R/Toll-like receptor signaling, in resistance to acute Pseudomonas aeruginosa lung infection. *Infect Immun.* (2012) 80:100–9. doi: 10.1128/IAI.05695-11
- Campesato LF, Silva APM, Cordeiro L, Correa BR, Navarro FCP, Zanin RF, et al. High IL-1R8 expression in breast tumors promotes tumor growth and contributes to impaired antitumor immunity. *Oncotarget*. (2017) 8:49470– 83. doi: 10.18632/oncotarget.17713
- Bachmann M, Pfeilschifter J, Mühl H. A prominent role of interleukin-18 in acetaminophen-induced liver injury advocates its blockage for therapy of hepatic necroinflammation. *Front Immunol.* (2018) 9:1–7. doi: 10.3389/fimmu.2018.00161
- Belkaya S, Michailidis E, Korol CB, Kabbani M, Cobat A, Bastard P, et al. Inherited IL-18BP deficiency in human fulminant viral hepatitis. *J Exp Med.* (2019) 216:1777–90. doi: 10.1084/jem.20190669
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med. (2005) 201:233–40. doi: 10.1084/jem.20041257
- Mills KHG, Dungan LS, Jones SA, Harris J. The role of inflammasomederived IL-1 in driving IL-17 responses. J Leukoc Biol. (2013) 93:489–97. doi: 10.1189/jlb.1012543
- 34. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med. (2006) 203:1685–91. doi: 10.1084/jem.20060285
- Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KHG. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. (2009) 31:331–41. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.001
- Arpaia N, Green JA, Moltedo B, Arvey A, Hemmers S, Yuan S, et al. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection. *Cell.* (2015) 162:1078–89. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.021
- Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran SV, Zaiss DMW, Artis D. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2015) 112:10762–7. doi: 10.1073/pnas.1509070112
- Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol.* (2009) 39:1046–55. doi: 10.1002/eji.200838575
- 39. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon B-RP, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* (2008) 20:1019–30. doi: 10.1093/intimm/dxn060
- 40. Kearley J, Silver JS, Sanden C, Liu Z, Berlin AA, White N, et al. Cigarette smoke silences innate lymphoid cell function and facilitates an exacerbated

type I interleukin-33-dependent response to infection. *Immunity*. (2015) 42:566–79. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.011

- Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. *Science*. (2012) 335:984–9. doi: 10.1126/science.1215418
- Bourgeois EA, Levescot A, Diem S, Chauvineau A, Bergès H, Milpied P, et al. A natural protective function of invariant NKT cells in a mouse model of innate-cell-driven lung inflammation. *Eur J Immunol.* (2011) 41:299–305. doi: 10.1002/eji.201040647
- Ferhat M, Robin A, Giraud S, Sena S, Goujon J-M, Touchard G, et al. Endogenous IL-33 contributes to kidney ischemia-reperfusion injury as an alarmin. J Am Soc Nephrol. (2018) 29:1272–88. doi: 10.1681/ASN.2017060650
- 44. Ferhat MH, Robin A, Barbier L, Thierry A, Gombert J-M, Barbarin A, et al. The impact of invariant NKT cells in sterile inflammation: the possible contribution of the alarmin/cytokine IL-33. *Front Immunol.* (2018) 9:2308. doi: 10.3389/fimmu.2018.02308
- 45. Thierry A, Giraud S, Robin A, Barra A, Bridoux F, Ameteau V, et al. The alarmin concept applied to human renal transplantation: evidence for a differential implication of HMGB1 and IL-33. *PLoS ONE*. (2014) 9:e88742. doi: 10.1371/journal.pone.0088742
- Sabapathy V, Stremska ME, Mohammad S, Corey RL, Sharma PR, Sharma R. Novel immunomodulatory cytokine regulates inflammation, diabetes, and obesity to protect from diabetic nephropathy. *Front Pharmacol.* (2019) 10:572. doi: 10.3389/fphar.2019.00572
- Mahlakõiv T, Flamar A-L, Johnston LK, Moriyama S, Putzel GG, Bryce PJ, et al. Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33. *Sci Immunol.* (2019) 4:eaax0416. doi: 10.1126/sciimmunol.aax0416
- 48. Spallanzani RG, Zemmour D, Xiao T, Jayewickreme T, Li C, Bryce PJ, et al. Distinct immunocyte-promoting and adipocyte-generating stromal components coordinate adipose tissue immune and metabolic tenors. *Sci Immunol.* (2019) 4:eaaw3658. doi: 10.1126/sciimmunol.aa w3658
- Green JA, Arpaia N, Schizas M, Dobrin A, Rudensky AY. A nonimmune function of T cells in promoting lung tumor progression. J Exp Med. (2017) 214:3565–75. doi: 10.1084/jem.20170356
- Christ A, Günther P, Lauterbach MAR, Duewell P, Biswas D, Pelka K, et al. Western diet triggers NLRP3-dependent innate immune reprogramming. *Cell*. (2018) 172:162–75.e14. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.013
- Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, Khan N, Mendonça LE, Pacis A, et al. BCG educates hematopoietic stem cells to generate protective innate immunity against tuberculosis. *Cell.* (2018) 172:176–90.e19. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.031
- Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, et al. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol.* (2011) 41:2341–8. doi: 10.1002/eji.201041332
- Matsukawa A, Fukumoto T, Maeda T, Ohkawara S, Yoshinaga M. Detection and characterization of IL-1 receptor antagonist in tissues from healthy rabbits: IL-1 receptor antagonist is probably involved in health. *Cytokine*. (1997) 9:307–15. doi: 10.1006/cyto.1996.0170
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol. (2009) 27:519–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612
- Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology*. (2012) 56:1468–78. doi: 10.1002/hep.25768
- Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. N Engl J Med. (2013) 369:2525–34. doi: 10.1056/NEJMra1208937
- Gotthardt D, Riediger C, Weiss KH, Encke J, Schemmer P, Schmidt J, et al. Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* (2007) 22(Suppl. 8):viii5–8. doi: 10.1093/ndt/gfm650
- 58. Sakurai T, He G, Matsuzawa A, Yu G, Maeda S, Hardiman G, et al. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and $IL-1\alpha$ release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver
tumorigenesis. Cancer Cell. (2008) 14:156-65. doi: 10.1016/j.ccr.2008. 06.016

- Chen C-J, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med.* (2007) 13:851–6. doi: 10.1038/nm1603
- 60. Sultan M, Ben-Ari Z, Masoud R, Pappo O, Harats D, Kamari Y, et al. Interleukin-1 α and interleukin-1 β play a central role in the pathogenesis of fulminant hepatic failure in mice. *PLoS ONE.* (2017) 12:e0184084. doi: 10.1371/journal.pone.0184084
- Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. J Clin Invest. (1997) 99:2930–40. doi: 10.1172/JCI119488
- Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, et al. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity*. (1999) 11:359–67. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80111-9
- Yan C, Zhou L, Han Y-P. Contribution of hepatic stellate cells and matrix metalloproteinase 9 in acute liver failure. *Liver Int.* (2008) 28:959–71. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01775.x
- 64. Shinoda M, Tilles AW, Kobayashi N, Wakabayashi G, Takayanagi A, Totsugawa T, et al. A bioartificial liver device secreting interleukin-1 receptor antagonist for the treatment of hepatic failure in rats. J Surg Res. (2007) 137:130–40. doi: 10.1016/j.jss.2006.08.009
- 65. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, et al. Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: reanalysis of a prior phase III trial*. *Crit Care Med.* (2016) 44:275–81. doi: 10.1097/CCM.00000000001402
- 66. Tsutsui H, Matsui K, Kawada N, Hyodo Y, Hayashi N, Okamura H, et al. IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol.* (1997) 159:3961–7.
- Finotto S, Siebler J, Hausding M, Schipp M, Wirtz S, Klein S, et al. Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis *in vivo. Gut.* (2004) 53:392–400. doi: 10.1136/gut.2003.018572
- Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA, Mahmood S, Mohamadnejad M, Sutterwala FS, et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. J Clin Invest. (2009) 119:305–14. doi: 10.1172/JCI35958
- Antunes MM, Araújo AM, Diniz AB, Pereira RVS, Alvarenga DM, David BA, et al. IL-33 signalling in liver immune cells enhances druginduced liver injury and inflammation. *Inflamm Res.* (2018) 67:77–88. doi: 10.1007/s00011-017-1098-3
- Scheiermann P, Bachmann M, Härdle L, Pleli T, Piiper A, Zwissler B, et al. Application of IL-36 receptor antagonist weakens CCL20 expression and impairs recovery in the late phase of murine acetaminophen-induced liver injury. *Sci Rep.* (2015) 5:1–7. doi: 10.1038/srep08521
- Arshad MI, Patrat-Delon S, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Genet V, et al. Pathogenic mouse hepatitis virus or poly(I:C) induce IL-33 in hepatocytes in murine models of hepatitis. *PLoS ONE*. (2013) 8:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0074278
- 72. Kamo N, Ke B, Ghaffari AA, Shen X, Busuttil RW, Cheng G, et al. ASC/caspase-1/IL-1β signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*.(2013) 58:351–62. doi: 10.1002/hep.26320
- Kim HY, Kim SJ, Lee SM. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. *FEBS J.* (2015) 282:259–70. doi: 10.1111/febs.13123
- Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui F, Kawashima A, Karasawa T, et al. NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemiareperfusion injury independently of inflammasomes. *J Immunol.* (2014) 192:4342–51. doi: 10.4049/jimmunol.1302039
- Sadatomo A, Inoue Y, Ito H, Karasawa T, Kimura H, Watanabe S, et al. Interaction of neutrophils with macrophages promotes IL-1β maturation and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* (2017) 199:3306–15. doi: 10.4049/jimmunol.1700717

- Yazdani HO, Chen H-W, Tohme S, Tai S, van der Windt DJ, Loughran P, et al. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. *J Hepatol.* (2017) 68:130–9. doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.010
- Arrenberg P, Maricic I, Kumar V. Sulfatide-mediated activation of type II natural killer T cells prevents hepatic ischemic reperfusion injury in mice. *Gastroenterology*. (2011) 140:646–55. doi: 10.1053/j.gastro.2010.10.003
- Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, et al. Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. J Gastroenterol Hepatol. (2012) 27:1609–16. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07187.x
- Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet.* (1988) 2:72–4. doi: 10.1016/S0140-6736(88)90006-2
- Sekiyama KD, Yoshiba M, Thomson AW. Circulating proinflammatory cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in fulminant hepatic failure and acute hepatitis. *Clin Exp Immunol.* (1994) 98:71–7. doi: 10.1111/j.1365-2249.1994.tb06609.x
- Roth GA, Faybik P, Hetz H, Hacker S, Ankersmit HJ, Bacher A, et al. Proinflammatory interleukin-18 and Caspase-1 serum levels in liver failure are unaffected by MARS treatment. *Dig Liver Dis.* (2009) 41:417–23. doi: 10.1016/j.dld.2008.09.021
- Roth GA, Zimmermann M, Lubsczyk BA, Pilz J, Faybik P, Hetz H, et al. Upregulation of interleukin 33 and soluble ST2 serum levels in liver failure. J Surg Res. (2010) 163:e79–83. doi: 10.1016/j.jss.2010.04.004
- Kim J, Chang D-Y, Lee HW, Lee H, Kim JH, Sung PS, et al. Innatelike cytotoxic function of bystander-activated CD8+ T cells is associated with liver injury in acute hepatitis A. *Immunity*. (2018) 48:161–73.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.025
- Iracheta-Vellve A, Petrasek J, Satishchandran A, Gyongyosi B, Saha B, Kodys K, et al. Inhibition of sterile danger signals, uric acid and ATP, prevents inflammasome activation and protects from alcoholic steatohepatitis in mice. *J Hepatol.* (2015) 63:1147–55. doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.013
- Petrasek J, Bala S, Csak T, Lippai D, Kodys K, Menashy V, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. J Clin Invest. (2012) 122:3476–89. doi: 10.1172/JCI60777
- Cui K, Yan G, Xu C, Chen Y, Wang J, Zhou R, et al. Invariant NKT cells promote alcohol-induced steatohepatitis through interleukin-1β in mice. J Hepatol. (2015) 62:1311–8. doi: 10.1016/j.jhep.2014.12.027
- Heo MJ, Kim TH, You JS, Blaya D, Sancho-Bru P, Kim SG. Alcohol dysregulates miR-148a in hepatocytes through FoxO1, facilitating pyroptosis via TXNIP overexpression. *Gut.* (2019) 68:708–20. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315123
- Sun Z, Chang B, Huang A, Hao S, Gao M, Sun Y, et al. Plasma levels of soluble ST2, but not IL-33, correlate with the severity of alcoholic liver disease. J Cell Mol Med. (2018) 23:887–97. doi: 10.1111/jcmm.13990
- Wang M, Shen G, Xu L, Liu X, Brown JM, Feng D, et al. IL-1 receptor like 1 protects against alcoholic liver injury by limiting NF-κB activation in hepatic macrophages. *J Hepatol.* (2018) 68:109–17. doi: 10.1016/j.jhep.2017. 08.023
- Maricic I, Sheng H, Marrero I, Seki E, Kisseleva T, Chaturvedi S, et al. Inhibition of type I natural killer T cells by retinoids or following sulfatidemediated activation of type II natural killer T cells attenuates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*. (2015) 61:1357–69. doi: 10.1002/hep.27632
- Mathews S, Feng D, Maricic I, Ju C, Kumar V, Gao B. Invariant natural killer T cells contribute to chronic-plus-binge ethanol-mediated liver injury by promoting hepatic neutrophil infiltration. *Cell Mol Immunol.* (2016) 13:206–16. doi: 10.1038/cmi.2015.06
- Bugianesi E, Rosso C, Cortez-Pinto H. How to diagnose NAFLD in 2016. J Hepatol. (2016) 65:643–4. doi: 10.1016/j.jhep.2016.05.038
- Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. (2017) 37:81–4. doi: 10.1111/liv.13299
- 94. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia*. (2016) 59:1121–40. doi: 10.1007/s00125-016-3902-y

- Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W, Wu C. The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: interplay between diet, gut microbiota, and genetic background. *Gastroenterol Res Pract.* (2016) 2016:2862173. doi: 10.1155/2016/2862173
- Negrin KA, Flach RJR, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, et al. IL-1 Signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. *PLoS ONE*. (2014) 9:e107265. doi: 10.1371/journal.pone.0107265
- Miura K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. *Hepatology*. (2013) 57:577–89. doi: 10.1002/hep.26081
- Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*. (2011) 54:133–44. doi: 10.1002/hep.24341
- Moschen AR, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler CF, Tilg H. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. *Mol Med Camb Mass.* (2011) 17:840–5. doi: 10.2119/molmed.2010.00108
- 100. Patrick AL, Rullo J, Beaudin S, Liaw P, Fox-Robichaud AE. Hepatic leukocyte recruitment in response to time-limited expression of TNF- α and IL-1 β . Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol. (2007) 293:G663–72. doi: 10.1152/ajpgi.00070.2007
- 101. Tilg H, Moschen AR, Szabo G. Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. (2016) 64:955–65. doi: 10.1002/hep.28456
- 102. Kamari Y, Shaish A, Vax E, Shemesh S, Kandel-Kfir M, Arbel Y, et al. Lack of interleukin-1 α or interleukin-1 β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *J Hepatol.* (2011) 55:1086–94. doi: 10.1016/j.jhep.2011.01.048
- 103. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. Interleukin-1β-induced insulin resistance in adipocytes through downregulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*. (2007) 148:241–51. doi: 10.1210/en.2006-0692
- 104. Nov O, Kohl A, Lewis EC, Bashan N, Dvir I, Ben-Shlomo S, et al. Interleukin-1beta may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation. *Endocrinology*. (2010) 151:4247–56. doi: 10.1210/en.2010-0340
- Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol.* (2011) 12:408–15. doi: 10.1038/ni.2022
- 106. Matsuki T, Horai R, Sudo K, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J Exp Med.* (2003) 198:877–88. doi: 10.1084/jem.20030299
- 107. Isoda K, Sawada S, Ayaori M, Matsuki T, Horai R, Kagata Y, et al. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist deteriorates fatty liver and cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice. *J Biol Chem.* (2005) 280:7002–9. doi: 10.1074/jbc.M412220200
- Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. (2012) 482:179–85. doi: 10.1038/nature10809
- 109. Vasseur P, Dion S, Filliol A, Genet V, Jean-philippe G, Silvain C, et al. Endogenous IL-33 has no effect on the progression of fibrosis during experimental steatohepatitis. *Oncotarget*. (2017) 8:48563–74. doi: 10.18632/oncotarget.18335
- 110. Gao Y, Liu Y, Yang M, Guo X, Zhang M, Li H, et al. IL-33 treatment attenuated diet-induced hepatic steatosis but aggravated hepatic fibrosis. *Oncotarget*. (2016) 7:1–13. doi: 10.18632/oncotarget.9259
- 111. Jeftic I, Jovicic N, Pantic J, Arsenijevic N, Lukic ML, Pejnovic N. Galectin-3 ablation enhances liver steatosis, but attenuates inflammation and IL-33-dependent fibrosis in obesogenic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Med Camb Mass.* (2015) 21:453–65. doi: 10.2119/molmed.2014.00178
- 112. Jaruga B, Hong F, Sun R, Radaeva S, Gao B. Crucial role of IL-4/STAT6 in T cell-mediated hepatitis: up-regulating eotaxins and IL-5 and recruiting leukocytes. J Immunol. (2003) 171:3233–44. doi: 10.4049/jimmunol.171.6.3233

- 113. Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. Suppression of concanavalin Ainduced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. J Immunol. (1997) 159:1418–28.
- 114. Zhu R, Diem S, Araujo LM, Aumeunier A, Denizeau J, Philadelphe E, et al. The Pro-Th1 cytokine IL-12 enhances IL-4 production by invariant NKT cells: relevance for T cell-mediated hepatitis. *J Immunol.* (2007) 178:5435–42. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5435
- 115. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2000) 97:5498–503. doi: 10.1073/pnas.040566697
- 116. Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S, Ezan F, et al. TRAIL but not FasL and TNF α , regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology*. (2012) 56:2353–62. doi: 10.1002/hep.25893
- 117. Schümann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, et al. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. Am J Pathol. (2000) 157:1671–83. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64804-3
- Luan J, Zhang X, Wang S, Li Y, Fan J, Chen W, et al. NOD-like receptor protein 3 inflammasome-dependent IL-1β accelerated ConA-induced Hepatitis. *Front Immunol.* (2018) 9:758. doi: 10.3389/fimmu.2018.00758
- 119. Noel G, Arshad MI, Filliol A, Genet V, Rauch M, Lucas-Clerc C, et al. Ablation of interaction between IL-33 and ST2+ regulatory T cells increases immune cell-mediated hepatitis and activated NK cell liver infiltration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2016) 311:G313–23. doi: 10.1152/ajpgi.00097.2016
- Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol.* (2012) 56:26–33. doi: 10.1016/j.jhep.2011.03.022
- Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell*. (2013) 155:1282–95. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.054
- 122. Shrivastava S, Mukherjee A, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus induces interleukin-1 (IL-1)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. J Virol. (2013) 87:12284–90. doi: 10.1128/JVI.01962-13
- 123. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DTY, Doehle B, Papic N, et al. IL-1β production through the NLRP3 Inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathog.* (2013) 9:1–13. doi: 10.1371/journal.ppat.1003330
- 124. Yanagisawa K, Yue S, van der Vliet HJ, Wang R, Alatrakchi N, Golden-Mason L, et al. *Ex vivo* analysis of resident hepatic pro-inflammatory CD1d-reactive T cells and hepatocyte surface CD1d expression in hepatitis C. *J Viral Hepat.* (2013) 20:556–65. doi: 10.1111/jvh.12081
- 125. Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. (2010) 138:682–93, 693.e1–4. doi: 10.1053/j.gastro.2009.09.052
- 126. Hofmann M, Thimme R. iNKT cells in chronic HBV: a balancing act. *Hepatol Int.* (2016) 10:535–7. doi: 10.1007/s12072-016-9739-0
- 127. Li M, Zhou Z-H, Sun X-H, Zhang X, Zhu X-J, Jin S-G, et al. The dynamic changes of circulating invariant natural killer T cells during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Int.* (2016) 10:594–601. doi: 10.1007/s12072-015-9650-0
- 128. Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. J Virol. (2002) 76:10702–7. doi: 10.1128/JVI.76.21.10702-10707.2002
- 129. Du XX, Shi Y, Yang Y, Yu Y, Lou HG, Lv FF, et al. DAMP molecular IL-33 augments monocytic inflammatory storm in hepatitis B-precipitated acuteon-chronic liver failure. *Liver Int.* (2018) 38:229–38. doi: 10.1111/liv.13503
- 130. Huan S-L, Zhao J-G, Wang Z-L, Gao S, Wang K. Relevance of serum interleukin-33 and ST2 levels and the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis.* (2016) 16:200. doi: 10.1186/s12879-016-1543-x
- Wang J, Zhao P, Guo H, Sun X, Jiang Z, Xu L, et al. Serum IL-33 levels are associated with liver damage in patients with chronic hepatitis C. *Mediators Inflamm.* (2012) 2012:819636. doi: 10.1155/2012/819636

- Gieling RG, Wallace K, Han Y-P. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol. (2009) 296:G1324–31. doi: 10.1152/ajpgi.90564.2008
- 133. Marvie P, Lisbonne M, L'helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, et al. Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med.* (2010) 14:1726–39. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00801.x
- Mchedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. (2013) 39:357–71. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.018
- Ma C, Han M, Heinrich B, Fu Q, Zhang Q, Sandhu M, et al. Gut microbiomemediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. *Science*. (2018) 360:eaan5931. doi: 10.1126/science.aan5931
- 136. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Suzuki T, Jinushi M, et al. CD1dmediated stimulation of natural killer T cells selectively activates hepatic natural killer cells to eliminate experimentally disseminated hepatoma cells in murine liver. *Int J Cancer*. (2003) 106:81–9. doi: 10.1002/ijc.11163
- 137. Leite-De-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, Machavoine F, Koezuka Y, Schneider E, et al. A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol.* (1999) 163:5871–6.
- 138. Bricard G, Cesson V, Devevre E, Bouzourene H, Barbey C, Rufer N, et al. Enrichment of human CD4 $^+$ V $\alpha 24/V\beta 11$ invariant NKT cells in intrahepatic malignant tumors. J Immunol. (2009) 182:5140–51. doi: 10.4049/jimmunol.0711086
- 139. Gao X, Wang X, Yang Q, Zhao X, Wen W, Li G, et al. Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8 ⁺ T and NK cells. J Immunol. (2015) 194:438-45. doi: 10.4049/jimmunol.1401344
- 140. Hollande C, Boussier J, Ziai J, Nozawa T, Bondet V, Phung W, et al. Inhibition of the dipeptidyl peptidase DPP4 (CD26) reveals IL-33-dependent eosinophil-mediated control of tumor growth. *Nat Immunol.* (2019) 20:257– 64. doi: 10.1038/s41590-019-0321-5
- 141. Villarreal DO, Wise MC, Walters JN, Reuschel EL, Choi MJ, Obeng-Adjei N, et al. Alarmin IL-33 acts as an immunoadjuvant to enhance antigen-specific tumor immunity. *Cancer Res.* (2014) 74:1789–800. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2729
- 142. Zhang J, Zhang Q, Lou Y, Fu Q, Chen Q, Wei T, et al. Hypoxia-inducible factor-1α/interleukin-1β signaling enhances hepatoma epithelialmesenchymal transition through macrophages in a hypoxic-inflammatory microenvironment. *Hepatology.* (2018). 67:1872–89. doi: 10.1002/ hep.29681
- 143. Zhao J-J, Pan Q-Z, Pan K, Weng D-S, Wang Q-J, Li J-J, et al. Interleukin-37 mediates the antitumor activity in hepatocellular carcinoma: role for CD57+ NK cells. *Sci Rep.* (2015) 4:5177. doi: 10.1038/srep05177
- 144. Liu R, Tang C, Shen A, Luo H, Wei X, Zheng D, et al. IL-37 suppresses hepatocellular carcinoma growth by converting pSmad3 signaling from JNK/pSmad3L/c-Myc oncogenic signaling to pSmad3C/P21 tumor-suppressive signaling. *Oncotarget*. (2016) 7:85079–96. doi: 10.18632/oncotarget.13196
- 145. Li T-T, Zhu D, Mou T, Guo Z, Pu J-L, Chen Q-S, et al. IL-37 induces autophagy in hepatocellular carcinoma cells by inhibiting

the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Mol Immunol.* (2017) 87:132-40. doi: 10.1016/j.molimm.2017.04.010

- 146. Yang Y, Wang JB, Li YM, Zhao Y, Wang R, Wu Q, et al. Role of IL-33 expression in oncogenesis and development of human hepatocellular carcinoma. Oncol Lett. (2016) 12:429–36. doi: 10.3892/ol.2016.4622
- 147. Zhang P, Liu X-K, Chu Z, Ye J, Li K-L, Zhuang W-L, et al. Detection of interleukin-33 in serum and carcinoma tissue from patients with hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *J Int Med Res.* (2012) 40:1654–61. doi: 10.1177/030006051204000504
- 148. Bergis D, Kassis V, Ranglack A, Koeberle V, Piiper A, Kronenberger B, et al. High serum levels of the interleukin-33 receptor soluble ST2 as a negative prognostic factor in hepatocellular carcinoma. *Transl Oncol.* (2013) 6:311–8. doi: 10.1593/tlo.12418
- 149. Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, Latasa MU, Prieto J, Avila MA. Inflammation and liver cancer: new molecular links. Ann N Y Acad Sci. (2009) 1155:206–21. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.03704.x
- Wu X, Dong L, Lin X, Li J. Relevance of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of chronic liver disease. *Front Immunol.* (2017) 8:1728. doi: 10.3389/fimmu.2017.01728
- 151. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* (2019) 10:128. doi: 10.1038/s41419-019-1413-8
- 152. Adkison AM, Raptis SZ, Kelley DG, Pham CTN. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J Clin Invest.* (2002) 109:363–71. doi: 10.1172/JCI0213462
- 153. Lust JA, Lacy MQ, Zeldenrust SR, Witzig TE, Moon-Tasson LL, Dinarello CA, et al. Reduction in C-reactive protein indicates successful targeting of the IL-1/IL-6 axis resulting in improved survival in early stage multiple myeloma. Am J Hematol. (2016) 91:571–4. doi: 10.1002/ajh.24352
- 154. Wu T-C, Xu K, Martinek J, Young RR, Banchereau R, George J, et al. IL1 receptor antagonist controls transcriptional signature of inflammation in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* (2018) 78:5243–58. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0413
- 155. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* (2017) 377:1119–31. doi: 10.1056/NEJMoa1707914
- 156. Stremska ME, Jose S, Sabapathy V, Huang L, Bajwa A, Kinsey GR, et al. IL233, A novel IL-2 and IL-33 hybrid cytokine, ameliorates renal injury. J Am Soc Nephrol. (2017) 28:2681–93. doi: 10.1681/ASN.2016121272

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

Copyright © 2019 Barbier, Ferhat, Salamé, Robin, Herbelin, Gombert, Silvain and Barbarin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





The Impact of Invariant NKT Cells in Sterile Inflammation: The Possible Contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33

Maroua Haroun Ferhat¹, Aurélie Robin¹, Louise Barbier², Antoine Thierry^{1,3}, Jean-Marc Gombert^{1,4}, Alice Barbarin¹ and André Herbelin^{1*}

¹ INSERM U1082 – IRATI Group, Poitiers, France, ² Service de Chirurgie Digestive, Oncologique, Endocrinienne et Transplantation Hépatique, CHU Trousseau, Université de Tours, Tours, France, ³ Service de Néphrologie, Hémodialyse et Transplantation Rénale, CHU de Poitiers, Poitiers, France, ⁴ Service d'Immunologie et d'Inflammation, CHU de Poitiers, Poitiers, France

Although the contribution of iNKT cells to induction of sterile inflammation is now well-established, the nature of the endogenous compounds released early after cellular stress or damage that drive their activation and recruitment remains poorly understood. More precisely, iNKT cells have not been described as being reactive to endogenous non-protein damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs). A second subset of DAMPs, called alarmins, are tissue-derived nuclear proteins, constitutively expressed at high levels in epithelial barrier tissues and endothelial barriers. These potent immunostimulants, immediately released after tissue damage, include the alarmin IL-33. This factor has aroused interest due to its singular action as an alarmin during infectious, allergic responses and acute tissue injury, and as a cytokine, contributing to the latter resolutive/repair phase of sterile inflammation. IL-33 targets iNKT cells, inducing their recruitment in an inflammatory state, and amplifying their regulatory and effector functions. In the present review, we introduce the new concept of a biological axis of iNKT cells and IL-33, involved in alerting and controlling the immune cells in experimental models of sterile inflammation. This review will focus on acute organ injury models, especially ischemia-reperfusion injury, in the kidneys, liver and lungs, where iNKT cells and IL-33 have been presumed to mediate and/or control the injury mechanisms, and their potential relevance in human pathophysiology.

Keywords: iNKT, sterile inflammatory response, alarmin IL-33, ischemia reperfusion, CD1d-restricted T cells, tissue repair

STERILE INFLAMMATION

Inflammation is an important biological process that represents a coordinated response of the innate immune system against specific molecular patterns present in pathogens or in the damaged tissues of the host. From protozoans to metazoans, the innate immune system, arising about \sim 1,000 million years ago (1), mediates inflammation as a physiological response to insult, infection, and biological stress in order to restore cellular/tissue integrity, maintain homeostasis and ensure host survival. In recent decades, significant advances have been made on endogenous non-pathogenic activators that trigger inflammation. Endogenous initiators of inflammation can act through the same receptors as pathogens and are referred to as damage-associated molecular patterns (DAMPs).

OPEN ACCESS

Edited by:

Luc Van Kaer, Vanderbilt University, United States

Reviewed by:

Jenny E. Gumperz, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, United States Jae B. Kim, Seoul National University, South Korea

> *Correspondence: André Herbelin andre.herbelin@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to T Cell Biology, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 05 July 2018 Accepted: 17 September 2018 Published: 15 October 2018

Citation:

Ferhat MH, Robin A, Barbier L, Thierry A, Gombert J-M, Barbarin A and Herbelin A (2018) The Impact of Invariant NKT Cells in Sterile Inflammation: The Possible Contribution of the Alarmin/Cytokine IL-33. Front. Immunol. 9:2308. doi: 10.3389/fimmu.2018.02308

1

During tissue injury, necrotic cells in response to stress signals (unfolded protein response, oxidative stress response or autophagy) release sterile stimuli, such as DAMPs and alarmins. Hence, in the absence of infection or any pathogenic trigger, sterile stimuli induce the recruitment of inflammatory cells, production of cytokines and chemokines, and induction of T cellmediated adaptive immune responses (2). This phenomenon is the so-called sterile inflammation response, which uses specific or common pathways to recognize pathogens. Indeed, some DAMPs and alarmins activate pathogen recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs) and the NLRP-3 inflammasome (3, 4), while other endogenous alarmins, such as interleukin (IL)-33, high-mobility group box 1 (HMGB1), and IL-1- α , signal directly via specific receptors that are not PRRs (4). Sterile inflammatory response is the initial step toward wound repair mechanisms mediated by macrophages that clear apoptotic neutrophils and produce factors enhancing the resolution of inflammation and the restoration of homeostasis. However, if not resolved, sterile inflammatory responses become pathological (3, 5, 6).

Sterile inflammation is initiated by mechanical, chemical, or metabolic *stimuli*. It occurs in acute conditions, such as ischemia reperfusion injury (IRI), crystal-induced arthritis, trauma, toxin exposure, labor, and with chronic illnesses, such as particleinduced lung diseases and atherosclerosis (3). The identification of the cellular factors and mechanisms of sterile inflammation represents a major issue in the elaboration of efficient therapeutic strategies in human diseases.

INKT CELLS IN STERILE INFLAMMATION: FROM CONCEPT TO IN VIVO COMPLETION

Concept

Invariant NKT (iNKT) cells, generally recognized as the archetypal cell subset of innate T-cell receptor (TCR)-ab lymphocytes, are activated during an early stage of inflammation and subsequently contribute to the development and regulation of innate and adaptive immune responses during infection. However, a major feature of iNKT cells is that their activation does not require the recognition of foreign antigens. Indeed, CD1d-restricted presentation of self-antigens to iNKT cells is induced by endogenous stress and may be stimulated by cytokines that are produced by activated dendritic cells (DCs). Depending on the mode of stimulation, activated iNKT cells rapidly secrete either T helper (Th)1 and Th17 cytokines, interferon (IFN)-y and IL-17A, respectively, to promote inflammatory responses, or Th2 cytokines, IL-4 and IL-10, to enable repair. iNKT cells therefore represent a unique cell population that is able to sense, trigger and resolve sterile inflammation.

iNKT Cells in the Initiation of Sterile Inflammation: The IRI Model

IRI represents a complex inflammatory immune response that generally occurs in a sterile environment and results in tissue damage. IRI has been well-documented in different animal

models and in different organs, including kidneys, liver, lungs, heart, and brain.

Furthermore, iNKT cells contribute to early events induced by IRI in different organs including the kidneys (7, 8), liver (9– 12), and lungs (13). In brain and heart, iNKT cell recruitment corroborates the severity of IRI, suggesting their implication in the inflammatory response (14, 15).

As a common feature, in all of these organs, IRI induces early iNKT cell activation and pro-inflammatory cytokine production, thereby sensing and relaying sterile danger. In the first 24 h following reperfusion, IFN-γ-, Tumor Necrosis Factor (TNF)-αand IL-17A- producing iNKT cells are closely associated with polymorphonuclear leukocyte (PMN) infiltration and tissue damage. Results have suggested that, once activated, iNKT lymphocytes play a key role in the early development and initiation of sterile inflammation, mainly by rapidly producing large amounts of cytokines contributing to PMN recruitment. Indeed, the use of NK1.1-depleting antibodies, iNKT celldeficient mice (Ja18 KO or CD1d KO) or reconstitution of iNKT cells by transfer experiments have definitively confirmed the role of iNKT cells in the initiation of IRI responses in kidney (7, 8) (Table 1, Figure 1A), liver (9, 11, 12, 16, 17) and lung (13) (Table 1, Figure 1B, upper panel). Taken together, these studies lead to the conclusion that activation of iNKT cells is a general mechanism for the initiation of IRI. However, the possible involvement of other cell types such as TCR-y8 cells (34-36) and NK cells (37), and their possible interactions with iNKT cells during IRI remain to be explored.

INKT CELLS IN THE INITIATION/PROPAGATION OF STERILE INFLAMMATION: MECHANISMS OF ACTION

Involvement of Stress-Induced-Endogenous, Self-Antigen Presentation and Cytokine-Driven Signals

The modes of activation and recruitment of iNKT cells in induction of sterile inflammation remain poorly understood. As innate immune system components, iNKT cells are expected to rapidly and efficiently respond to cell-stress and represent an obvious candidate to participate in endogenous pathways of inflammation, especially in sterile inflammation. However, iNKT cells have not been described as reactive to endogenous nonprotein DAMPs that include ATP, uric acid, heparin sulfate and DNA. Moreover, although iNKT cells express the adenosine 2A receptor (A2AR), their reactivity to ligands of this receptor has been described only under pharmacological conditions and has resulted in a downregulation rather than an induction of iNKT cell functions (11, 25) (**Table 1**).

Numerous studies have documented the involvement of TCR/CD1d interactions in iNKT cell activation during sterile inflammation induced by IRI. In most cases, the blockade of CD1d presentation with anti-CD1d antibodies has prevented iNKT cell-mediated renal and hepatic IRI (8, 11, 16, 17). However, further investigations are needed to characterize the endogenous lipids presented by CD1d and to identify the effective

Reference(s)	Model	Organ	Role of iNKT cells	Mode of action of iNKT cells	Role of IL-33	iNKT cell/IL-33 axis
Ferhat et al. (7) Li et al. (8)	IRI	Kidney	initiation (7, 8) Jα18 KO mice	IFN-γ, IL-17 CD1d-dependent	Initiation (7) IL-33 KO mice ST2 KO mice	IL-33-dependent iNKT cell recruitment/activation (7)
Lappas et al. (11) Arrenberg et al. (12) Richards et al. (16) Kuboki et al. (17) Yazdani et al. (18)	IRI	Liver	initiation (11, 12, 16, 17) NK1.1 depletion iNKT-cell adoptive transfer	IFN-γ, IL-17 CD1d-dependent	Initiation (18) IL-33 KO mice	Presumably yes
Arshad et al. (19) Arshad et al. (20)	ConA-induced injury	Liver	initiation (19, 20) iNKT-cell adoptive transfer	IL-4, IFN-γ	Resolution (20)	iNKT-cell-dependent regulation of IL-33 expression by hepatocytes
Cao et al. (21)	IRI	Liver	resolution (21) by iNKT-cell-targeted therapy (α-GalCer)	IL-13 A2AR	Unknown	Unpredictable
Lappas et al. (11)	IRI	Liver	resolution (11) by iNKT-cell-targeted therapy (A2AR agonist)	IFN-γ↓	unknown	Presumably not
Cheng et al. (22) Antunes et al. (23)	Drug-induced injury	Liver	initiation (22) CD1d KO mice	Not done	Initiation (23) ST2 KO mice	Presumably yes
Liew et al. (24)	Thermal injury	Liver	resolution (24) iNKT-cell adoptive transfer	IL-4	Unknown	Unpredictable
Sharma et al. (13, 25)	IRI	Lung	initiation (13, 25) Jα18 KO mice iNKT-cell adoptive transfer	NOX-2 IL-17	Unknown	Unpredictable
Sharma et al. (25)	IRI	Lung	resolution (25) by iNKT-cell-targeted therapy (A2AR agonist)	NOX-2 ↓ ê IL-17 ↓	Unknown	Unpredictable
Grabarz et al. (26) Kim et al. (27) Bourgeois et al. (28) Li et al. (29) Luzina et al. (30)	Bleomycin-induced fibrosis	Lung	resolution (26, 27)	IFN-γ	Initiation (29, 30)	Presumably yes (28)
Michaudel et al. (31) Pichavant et al. (32) Kubala et al. (33)	Ozone-induced fibrosis	Lung	initiation (32) Jα18 KO mice	IL-17	Initiation (31, 33) resolution (31) IL-33 KO mice	Presumably yes (32) presumably not

TABLE 1 | An overview in mouse of the contribution of the iNKT cell/IL-33 biological axis during acute sterile inflammation.

This table recapitulates the main models of acute sterile inflammation, especially IRI models, that involve iNKT cells in different target organs (kidney, liver, and lung). In parallel, when documented, the involvement of IL-33 is indicated; otherwise it is noted as unknown. The implication(s) of iNKT cells and/or IL-33 has (have) been classified according to their contribution to the initiation and/or resolution phase(s) of sterile inflammation, and accompanied by the relevant bibliography. The mode(s) of action of iNKT cells is (are) specified. In the last column, using the cited bibliography, the existence of an iNKT cell/IL-33 axis is shown, surmised (noted \ll presumably yes \gg) not surmised (noted \ll presumably not \gg) or difficult to predict (noted \ll unpredictable \gg). IRI, Ischemia-Reperfusion injury; A2AR, adenosine A2A receptor; α -GalCer, α -galactosylceramide; iNKT, invariant Natural Killer T; KO, transgenic knockout; IFN, interferon; IL, interfeukin; NOX-2, NADPH oxidase 2; \downarrow , decrease.

presenters of CD1d-relevant lipids. It also remains to determine the inducible role of non-protein DAMPs in their expression by CD1d-presenting APCs.

A specific feature of iNKT cells is their ability to be activated by cytokine-driven signals independently of TCR-engagement and CD1d recognition. During sterile inflammation, their innate IFN- γ producing capacity does not require continuous autoantigen recognition in mice (38, 39), corroborating the *in vitro* demonstration that the pro-inflammatory cytokine IL-12 (alone or in combination with IL-18) can activate iNKT cells to produce IFN- γ . Indeed, IL-12 and IL-18 amplify both Th1- and Th2-like iNKT cell responses upon TCR engagement (40–43). Accordingly, during renal IRI, we have documented an increase of plasma IL-12, while Marques et al. (44) have reported protection of IL-12-deficient mice. Moreover, in a model of sterile liver injury, Liew et al. (24) highlighted a biphasic mechanism of iNKT cell activation through selfantigen presentation and IL-12/IL-18-driven signals. Lastly, during experimental cerebral ischemia, where iNKT cells have been reported to accelerate brain infarction (14), early detrimental T-cell effects have not been associated with adaptive immunity (36). Taken together, these results from the literature demonstrate that iNKT cells mediate acute sterile inflammation, including IRI, through TCR-engagement and cytokine-driven signals (**Table 1**; **Figure 1A**; **Figure 1B**, upper panel).



FIGURE 1 | The paradigm of the iNKT cell/IL-33 biological axis in orchestration of acute sterile inflammation. A schematic overview of the potential involvement of iNKT cells in concert with IL-33 in sterile tissue damage (A,B, upper panel)) and repair (B, lower panel). (A,B, upper panel): Acute sterile organ injury leads to early iNKT cell activation through the passive release of the alarmin IL-33 that binds to the ST2 receptor constitutively expressed by iNKT cells. IL-33 acts as a requisite co-player leading to complete activation and recruitment of these cells. This mechanism could also involve IL-12 and CD1d-dependent presentation of self-ligands. During kidney IRI, IL-33 released by injured cells promotes iNKT cell activation, recruitment and pro-inflammatory cytokine (IFN-y, IL-17A) production. IFN-y- and IL-17A- expressing iNKT cells then contribute to the initiation of inflammation by amplifying neutrophil recruitment, and promoting their pro-inflammatory cytokine and reactive oxygen species (ROS) production, thereby resulting in tissue damage (A). This scenario can be applied to other organs such as liver and lung where both of iNKT cells and IL-33 have been shown separately to contribute to IRI or drug-induced organ injury (for details, see Table 1) (B, upper panel). (B, lower panel): Following acute sterile injury, the innate immune system initiates resolution of inflammation and tissue repair by inducing a shift from M1 to M2 macrophages. By their ability to express Th2-type cytokines, iNKT cells likely contribute to this shift. IL-33 might promote this phenomenon both by recruiting monocytes/macrophages expressing CD1d that in turn activate iNKT cells through their TCR engagement and by amplifying subsequent iNKT cell cytokine production. In this context, activated iNKT cells produce large amounts IL-4, but no IFN-γ. This critical step is a requisite for the transition of monocytes/macrophages from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory phenotype with IL-10 production. Th2-type cytokines produced by iNKT cells and monocytes/macrophages suppress inflammation and promote PMN apoptosis (B, lower left panel). Furthermore, IL-33 released shortly after injury could target dNKT (type II NKT) cells and regulatory T cells (Treg), that express ST2 receptor, to counteract IFN-\gamma-expressing iNKT cells and promote immuno-regulatory cytokine production contributing to the resolution of inflammation (B, lower left panel). In the particular case of lung injury, IL-33 promotes the recruitment of iNKT cells and their IFN-y production. IFN-y-expressing iNKT could in turn help to resolve inflammation by counteracting ILC2, eonisophils and neutrophils (B, lower right panel). In the liver, IL-33 can also act as an amplifying factor for ligand-activated iNKT cells, thereby contributing to a shift from the initial pro-inflammatory (pro-Th1) profile of iNKT cells into their (pro-Th2) resolutive profile. As a complementary mechanism, IL-33-driven iNKT cells may in turn sustain protective functions mediated by IL-33 in lung and liver due to their capacity to induce subsequent continuous neosynthesis and secretion of IL-33 by alveolar macrophages and hepatocytes, respectively (B, lower right panel). More precisely, in the liver, neosynthetized IL-33 may promote IL-4-producing iNKT cells that are implicated in the resolution of several sterile inflammatory responses, by suppressing PMN infiltration and enhancing hepatocyte proliferation, thereby preserving tissue function. In this scenario, IL-33 can also directly act on hepatocytes to elicit regeneration after tissue damage (B, lower right panel).

A Key Role for the Alarmin IL-33 in iNKT Cell Activation and Recruitment in Sterile Inflammation?

The Archetypal Alarmin/Cytokine IL-33

Alarmins, a second subset of DAMPs, are tissue-derived nuclear proteins, constitutively expressed at high levels in epithelial barrier tissues and endothelial barriers. These potent immunostimulants include defensins, cathelicidin, eosinophilderived neurotoxin, HMGB1, IL-1- α , IL-18, and IL-33. Once released by necrotic cells after tissue damage, they can activate TLRs or cytokine receptors, and serve as early warning signals to alert adjacent cells/tissues and to mobilize innate and adaptive immune systems.

Among alarmins, the newest member of the IL-1 super-family is IL-33, also called IL-1F11. IL-33 has aroused interest due to its singular action during infectious and allergic responses (45, 46), and acute tissue injury (31, 47). Indeed, IL-33 acts as an alarmin released by necrotic cells after tissue damage, and as a cytokine, due to its inducible expression and subsequent continuous secretion by hematopoietic cells like mastocytes and macrophages (31, 45). By interacting with the ST2/IL-1RAcP receptor complex, IL-33 targets adaptive immune cell subsets, namely conventional CD4 and CD8T cells and regulatory T cells (Treg). IL-33 also targets several innate immune cells including iNKT cells, NK cells, mastocytes, group 2 innate lymphoid cells (ILC2) and myeloid-derived suppressor cells, thereby influencing their functions and homeostasis (42, 48-50). IL-33 is therefore a crucial alarmin and an ubiquitous immune modulator, with a pivotal role in sterile inflammation.

The Alarmin IL-33 in Sterile Inflammation: Relevance to IRI Models

It is generally understood that mechanical, chemical, trauma injury and IRI to several organs, including kidney, liver, lung, and brain, lead to rapid release of IL-33, presumably by damaged cells, further supporting the role of IL-33 as an alarmin (7, 18, 29, 31, 47, 51, 52). However, except during brain trauma (47) and kidney IRI (7) (and section First Evidence of an iNKT Cell/IL-33 Biological Axis Mediating Inflammation During Renal IR: Relevance to Liver and Lung?), it remains to be demonstrated that full-length active IL-33 disappears from the nucleus of damaged cells and immediately increases in circulation. The immune effectors of inflammation and repair targeted by IL-33 also need to be identified. In most of these situations, it is well-recognized that IL-33 release precedes iNKT cell recruitment and/or local activation, opening the question of the role of IL-33 as an early warning signal to alert iNKT cells in sterile inflammation responses.

IL-33 Targets iNKT Cells

The existence of an iNKT cell/IL-33 biological axis is wellestablished. Indeed, even though IL-33 alone is not able to fully and completely activate iNKT cells, the alarmin can directly target them as an essential amplifying factor in both primary innate and adaptive immune responses. iNKT cells have an immediate biological reactivity to IL-33 because, like NK cells, they constitutively express on their surface the ST2 chain specific of the IL-33 receptor (42, 49). As a result, IL-33 contributes as a co-stimulatory factor to type 1 (IFN- γ), type 2 (IL-4, IL-10), and type 17 (IL-17A) iNKT cell cytokine production profiles upon TCR engagement (7, 42). Moreover, in combination with IL-12, IL-33 enhances IFN- γ production by iNKT cells. Along with recruitment and local activation of iNKT cells, these functions depend on endogenous IL-12 (28, 42). The same demonstration has been documented in other mammals such as humans (49, 53) and pigs (54). Taken together, these data support the conclusion that IL-33 can recruit iNKT cells and contribute as a co-stimulatory factor to pro-Th1-, pro-Th2-, and pro-Th17- iNKT cell responses in an IL-12-dependent manner.

First Evidence of an iNKT Cell/IL-33 Biological Axis Mediating Inflammation During Renal IR: Relevance to Liver and Lung?

Given that both iNKT cells and IL-33 have been shown to contribute to acute organ injury in both kidneys and liver, IRI seems to represent a suitable model of sterile inflammation to test the physiological significance of the iNKT cell/IL-33 biological axis. Therefore, we recently provided the first demonstration that endogenous IL-33 contributes as an alarmin to IRI in the kidneys. Indeed, we highlighted IL-33 rapid release (≤ 1 h) from its constitutively full-length form expressed at high levels in the nuclei of kidney cells and its transient presence in the extracellular space. Moreover, we further characterize a previously undefined mechanism where IL-33/ST2 engagement promotes iNKT cell recruitment, IFN- γ and IL-17A cytokine production, in the presence of IL-12 as a cofactor for IL-33, resulting in PMN infiltration and activation (7) (**Figure 1A**).

We presume that the coordinated action of IL-33 and iNKT cells will also apply to the liver, where they have been separately shown to contribute to IRI, and where, as in the kidneys, IRI severity depends on IFN- γ and IL-17A (11, 18) (**Figure 1B**, upper panel). Regarding lung IRI, an exacerbating role has been attributed to IL-17A-producing iNKT cells, but in this model, IL-33 release as an alarmin to amplify IL-17A expression by iNKT cells has not yet been addressed (**Figure 1B**, upper panel).

The iNKT Cell/IL-33 Biological Axis: A Paradigm Extended to Ozone- and Drug- Induced Organ Injury

The iNKT cell/IL-33 biological axis deserves particular attention when considering organ injury caused by chemical components such as ozone or drugs (**Table 1**, **Figure 1B**, upper panel). Indeed, ozone-driven lung inflammation that requires the presence of iNKT cells (32) is associated with IL-33 release by epithelial cells (33). Furthermore, iNKT cells have been shown to be involved in halothane-induced liver injury (22), while blockade of the IL-33/ST2 axis reduces acetaminophenmediated organ injury (23). It remains to determine whether iNKT cells and IL-33 act in a concerted manner to initiate sterile inflammation in response to liver-targeted drugs.

THE HYPOTHESIS OF A FUNCTIONAL AXIS BETWEEN INKT CELLS AND IL-33 IN THE RESOLUTION OF STERILE INFLAMMATION

Impact of iNKT Cells on the Resolution of Sterile Inflammation

Inflammation is a physiopathological and protective response of the organism (host) to infection or sterile tissue damage aimed at neutralizing and eliminating the causing agent/insult. Shortly after the beginning of the inflammatory response, a coordinated and active resolution program involving PMN apoptosis and clearance initiates in order to restore tissue integrity and organ function (6). The resolution of acute inflammation is crucial to ensure proper return to homeostasis and to avoid persistent chronic inflammation, including metabolic diseases and autoimmune syndromes.

Innate immune cells are key actors that orchestrate the switch from acute inflammation to resolution. As regards iNKT cells, one may presume that their functional malleability renders them capable of intervening not only in initiation but also in the resolution of sterile inflammation. However, few studies have described the role of iNKT cells in the resolution of sterile inflammation (24, 26, 27, 55) (Table 1). For example, in experimental models of acute liver injury (IRI (9, 10) and ConcanavalinA (ConA)-induced hepatitis (56, 57), iNKT cells display a pro-inflammatory deleterious phenotype. A resolutive role attributed to iNKT cells has only been documented in a drug-induced injury model (58), where iNKT cells have been shown to orchestrate a switch from inflammation to resolution of sterile injury. In response to thermal trauma in the liver, another underlying mechanism of resolution is iNKT cell-derived IL-4, which drives the shift from M1 to protective M2 macrophages (Figure 1B, lower left panel). Interestingly, this mechanism is similar to a reported model of sterile inflammation in the peritoneum (55). However, IFN-y-producing iNKT cells, rather than their IL-4-producing counterparts, are resolving in several models of sterile inflammation in the lung (26-28) (Table 1). Taken together, these data reveal that iNKT cell functions required to resolve sterile inflammation and to promote tissue repair strongly depend on the organ microenvironment.

In addition to their natural resolutive function, iNKT cells can orchestrate sterile inflammation in the liver when targeted by their pharmalogical ligand α -Galactosyl-Ceramide (α -GalCer). This pharmacological ligand appears to act by shifting the initial pro-inflammatory (pro-Th1) profile of iNKT cells into their resolutive (pro-Th2) profile (21) (**Table 1**).

Other evidence suggests that iNKT cells and type II NKT cells (also called dNKT cells due to their expression of oligoclonal TCRs and recognition of self-antigens, including sulfatide, in a CD1d-dependent manner) have opposing roles at an early stage of liver inflammation (59). Further studies are needed to determinate if the interactions between the two NKT cellsubsets constitute a general mechanism coordinating initiation and resolution of sterile inflammation. Indeed, it was recently reported that pharmacological activation of dNKT cells by the self-glycolipid antigen sulfatide led to reduced IFN- γ secretion by iNKT cells and prevented hepatic and renal IRI (12, 60) (**Figure 1B**, lower left panel).

Up until now, without pharmacological intervention, there has been no reported experimental model in which iNKT cells exercise their initiating and resolution functions in a coordinated manner. Indeed, the highlighting of two opposite functions of the same cell type in a given experimental model is a challenge. Furthermore, in most IRI models, iNKT cell-dependent tissue lesions are severe and render the resolution phase difficult to analyze.

Are iNKT Cells Involved in Concert With IL-33 to Promote Resolution and Repair in Sterile Inflammation?

Due to its ability to induce epithelial and endothelial cell proliferation (48, 61), the involvement of IL-33 as a factor promoting repair and tissue regeneration following stress has been proposed. Another element supporting the role of IL-33 in tissue repair is the targeting of Treg and ILC2, contributing to resolution of inflammation of the intestine (62), skeletal muscles (63) and skin/wound repair (64). Lastly, IL-33 counteracts pro-Th1 inflammatory responses by targeting the shift from M1 to M2 macrophages (51, 65, 66). Whether these protective IL-33-driven functions are influenced by iNKT cells is unknown because interactions between Treg and iNKT cells, or ILC2 and iNKT cells, have been described only under pharmacological intervention (67, 68).

However, the iNKT cell/IL-33 biological axis can function as an additional mechanism in several situations, like in the peritoneum and liver, where an IL-4-dependent macrophageiNKT cell circuit suppresses the sterile inflammation response (24, 55). As IL-33 can dramatically increase both IFN- γ and IL-4 productions by iNKT cells, it is unclear whether in this context it favors iNKT cell-mediated protection. We presume that this will occur at least during thermal-induced liver injury where iNKT cells produce IL-4 rather than IFN- γ (24) (**Figure 1B**, lower left panel).

In the lungs, IL-33 itself may be crucial for resolution of tissue injury by amplifying IFN-y expression by iNKT cells (Figure 1B, lower right panel). Indeed, when administered at pharmacological doses, IL-33 induces ILC2-mediated airway inflammation (69) and controls this response via a mechanism that involves IFN-γ-expressing iNKT cells (28). From these data, we propose that IL-33 not only targets ILC2 to promote pro-Th2 inflammatory response, but also contributes concomitantly to recruit iNKT cells and activate their production of IFN-y. In this way, IL-33 acts as a negative feedback loop to resolve lung inflammation, possibly by counteracting neutrophils (70) and/or ILC2 (71). Interestingly, in response to bleomycine, IL-33 potentiates lung injury (29, 30) whereas iNKT cells attenuate the deleterious response by down modulating the Th2 milieu (26) and producing IFN- γ (27). Taken together, these findings favor the hypothesis that IL-33-driven IFN-\gamma-expressing iNKT cells may represent a natural mechanism of resolution during sterile inflammation in lung (Figure 1B, lower right panel).

It should be emphasized that iNKT cells may also contribute in an indirect manner to protective responses driven by IL-33, by amplifying the inducible synthesis of the alarmin/cytokine (see Figure 1B, lower right panel). Indeed, iNKT cells themselves contribute to the subsequent transcriptional and protein synthesis of IL-33 by alveolar macrophages and hepatocytes during acute sterile inflammation responses in lung and liver, respectively (19, 69). Thus, in the above-mentioned ozoneinduced lung inflammation model where iNKT cells are requisite (32), a biphasic injury and inflammation controlled by IL-33 has been proposed (31), as previously shown in an antiparasitic response model (45). IL-33 is first released as an alarmin by epithelial cells and then its synthesis is relayed by alveolar macrophages (vs. mast cells in the anti-parasitic model), thereby triggering tissue protection/repair (vs. boosting a pro-Th2 protective antiparasitic response). It would be important to determine whether iNKT cells contribute to this biphasic function of IL-33. Lastly, during acute hepatic injury induced by ConA, iNKT cell-dependent IL-33 synthesis occurs precisely in hepatocytes (19). As IL-33 is recognized as hepatoprotective (20), one may hypothesize that iNKT cells, by increasing the synthesis of IL-33 in hepatocytes, contribute to the repair phase of hepatocyte damage (Figure 1B, lower right panel). This hypothesis can also be applied to hepatic IRI, where IL-33 synthesis is induced in hepatocytes from 4h after reperfusion (18).

THERAPEUTIC STRATEGIES TARGETING THE INKT CELL/IL-33 BIOLOGICAL AXIS

While recent studies have highlighted the pathogenic mechanisms of iNKT cell responses, the beneficial functions of iNKT cells are just beginning to be explored. Pharmacological and cell-based therapies influencing iNKT cell responses in experimental acute organ injury suggest that this is a promising approach for the preservation of organ function during sterile inflammation. We surmised that this approach should take into account the potential implication of IL-33.

Activation of iNKT cells by their pharmacological ligands during sterile inflammation, especially IR, can be protective or exacerbating, depending on the state of APCs (72) and the organ involved (14, 15, 21). IL-33 works as an amplifying factor for ligand-activated iNKT cells (7, 42) and as a protective factor by targeting Treg and ILC2 (50) or parenchymal cells like hepatocytes (73) and myocardiocytes (74, 75). As a result, it can be argued that protection driven by α -GalCer would be more robust if the iNKT cell ligand was co-administered with IL-33. Indeed, in liver and heart IR models, the delivery of either α -GalCer (74, 75) or exogenous IL-33 alone (15, 21) has shown protective effects (**Table 1; Figure 1B**, lower right panel). In this context, the contribution of IL-33 to the α -GalCer-driven iNKT cell/Treg cross-talk (67, 68) deserves particular attention.

Treatment with IL-33 alone would also be beneficial when sterile inflammation is accompanied by the natural protective effects of iNKT cells (24, 55). Conversely, in kidney IR models where initiation of inflammation depends on the iNKT cell/IL-33 biological axis, IRI would be counteracted by early blockade of IL-33 together with agonist A2AR treatment, known to attenuate IFN- γ -expressing iNKT cell activation (11, 25).

Taken as a whole, even though therapeutic strategies targeting the iNKT cell/IL-33 biological axis are promising, they might be complex to develop, given that the contribution of iNKT cells and IL-33 in inflammation to exacerbated illness *vs.* improved recovery, largely depends on the model.

CONCLUDING REMARKS

Focusing on recent advances in the understanding of the biology of iNKT cells and the alarmin IL-33 obtained from animal models, we propose that iNKT cells and IL-33 form a biological axis in alerting and controlling the immune cells involved in sterile inflammation associated with tissue damage.

The review shows that the involvement and the underlying mechanisms of the iNKT cell/IL-33 biological axis in sterile inflammation depend on the model, organ microenvironment, and the initiating *vs.* resolutive/repair phase of the inflammation response. Even though more work is required in this area, this review brings new evidence that the iNKT cell/IL-33 biological axis acts during sterile inflammation induced by IR in kidneys and liver and after chemical- or drug- induced acute tissue injury in the kidneys, liver and lungs.

At this stage, an important challenge is to determine how much of the current information in animal models can accurately be translated to human patients. Given the widely recognized deleterious action of the iNKT cell/IL-33 biological axis in renal IR in mice, an immediate challenge would be to improve understanding of the physiopathological impact of this biological axis during IR sequences in organ transplantation. As far as kidney transplantation is concerned, a pilot clinical study indicated a prompt release of IL-33 into the circulation early after organ reperfusion that could be responsible for the activation of iNKT cells (53). Moreover, IL-33 levels and IRI duration are correlated, supporting a close connection between kidney cell injury, IL-33 release and iNKT cell activation. That iNKT cells and IL-33 may also function in a coordinated manner after liver transplantation in humans is an attractive hypothesis and deserves further investigation in our opinion.

In fine, new therapeutic strategies targeting the iNKT cell/IL-33 biological axis could prove beneficial for the long-term survival of organs after acute organ injury. If so, the secondary "repair" functions of the iNKT/IL-33 biological axis, once identified, would need to be protected from treatment focused on the initial, deleterious phase.

More generally, exploration of the crucial and diverse roles of the iNKT cell/IL-33 biological axis during acute sterile inflammation settings may contribute to understanding the mechanisms that control the switch between healthy and pathological inflammation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LB, AT and J-MG contributed to literature search for the review. AB and AR contributed to literature search and writing for the review. MF and AH contributed to the literature search for the review, provided writing, and editing of the review.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are especially indebted to Jeffrey Arsham for editing the English of their manuscript. This study was

REFERENCES

- Buchmann K. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. Front Immunol. (2014) 5:459. doi: 10.3389/fimmu.2014.00459
- McDonald B, Kubes P. Innate immune cell trafficking and function during sterile inflammation of the liver. *Gastroenterology* (2016) 151:1087–95. doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.048
- Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of sterile inflammation. J Immunol. (2013) 191:2857–63. doi: 10.4049/jimmunol.1301539
- Lukens JR, Gross JM, Kanneganti T-D. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol.* (2012) 3:315. doi: 10.3389/fimmu.2012.00315
- Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol. (2010) 10:826–37. doi: 10.1038/nri2873
- Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: what controls its onset? *Front Immunol.* (2016) 7:160. doi: 10.3389/fimmu.2016.00160
- Ferhat M, Robin A, Giraud S, Sena S, Goujon JM, Touchard G, et al. Endogenous IL-33 contributes to kidney ischemia-reperfusion injury as an alarmin. J Am Soc Nephrol. (2018) 29:1272–88. doi: 10.1681/ASN.2017060650
- Li L, Huang L, Sung SJ, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* (2007) 178:5899–911. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5899
- Shimamura K, Kawamura H, Nagura T, Kato T, Naito T, Kameyama H, et al. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. *Cell Immunol.* (2005) 234:31–8. doi: 10.1016/j.cellimm.2005.04.022
- Zimmerman MA, Martin A, Yee J, Schiller J, Hong JC. Natural killer T cells in liver ischemia-reperfusion injury. J Clin Med. (2017) 6:41.: doi: 10.3390/jcm6040041
- Lappas CM, Day YJ, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. J Exp Med. (2006) 203:2639– 48. doi: 10.1084/jem.20061097
- Arrenberg P, Maricic I, Kumar V. Sulfatide-mediated activation of type II natural killer T cells prevents hepatic ischemic reperfusion injury in mice. *Gastroenterology* (2011) 140:646–55. doi: 10.1053/j.gastro.2010.10.003
- Sharma AK, LaPar DJ, Zhao Y, Li L, Lau CL, Kron IL, et al. Natural killer T cell-derived IL-17 mediates lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Respir Crit Care Med.* (2011) 183:1539–49. doi: 10.1164/rccm.201007-1173OC
- Wang ZK, Xue L, Wang T, Wang XJ, Su ZQ. Infiltration of invariant natural killer T cells occur and accelerate brain infarction in permanent ischemic stroke in mice. *Neurosci Lett.* (2016) 633:62–8. doi: 10.1016/j.neulet.2016.09.010
- Homma T, Kinugawa S, Takahashi M, Sobirin MA, Saito A, Fukushima A, et al. Activation of invariant natural killer T cells by α-galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. J Mol Cell Cardiol. (2013) 62:179–88. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.06.004
- Richards JA, Wigmore SJ, Anderton SM, Howie SEM. NKT cells are important mediators of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transpl Immunol.* (2017) 45:15–21. doi: 10.1016/j.trim.2017.08.002
- Kuboki S, Sakai N, Tschöp J, Edwards MJ, Lentsch AB, Caldwell CC. Distinct contributions of CD4+ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2009) 296:G1054–9. doi: 10.1152/ajpgi.90464.2008

supported by INSERM, CHU de Poitiers, Université de Poitiers, Association pour la Recherche en Immunologie-Poitou Charentes (ARIM-PC), FHU support and Ministère de la Recherche. MF and AB were supported by fellowships provided by INSERM, Région Poitou-Charentes and Octapharma, and Région Nouvelle Aquitaine, respectively.

- Yazdani HO, Chen HW, Tohme S, Tai S, van der Windt DJ, Loughran P, et al. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. *J Hepatol.* (2017) doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.010. [Epub ahead of print].
- Arshad MI, Rauch M, L'helgoualc'h A, Julia V, Leite-de-Moraes MC, Lucas-Clerc C, et al. NKT cells are required to induce high IL-33 expression in hepatocytes during ConA-induced acute hepatitis. *Eur J Immunol.* (2011) 41:2341–8. doi: 10.1002/eji.201041332
- Arshad MI, Piquet-Pellorce C, L'Helgoualc'h A, Rauch M, Patrat-Delon S, Ezan F, et al. TRAIL but not FasL and TNFα, regulates IL-33 expression in murine hepatocytes during acute hepatitis. *Hepatology* (2012) 56:2353–62. doi: 10.1002/hep.25893
- Cao Z, Yuan Y, Jeyabalan G, Du Q, Tsung A, Geller DA, et al. Preactivation of NKT cells with alpha-GalCer protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in mouse by a mechanism involving IL-13 and adenosine A2A receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2009) 297:G249–58. doi: 10.1152/ajpgi.00041.2009
- Cheng L, You Q, Yin H, Holt MP, Ju C. Involvement of natural killer T cells in halothane-induced liver injury in mice. *Biochem Pharmacol.* (2010) 80:255–61. doi: 10.1016/j.bcp.2010.03.025
- Antunes MM, Araújo AM, Diniz AB, Pereira RVS, Alvarenga DM, David BA, et al. IL-33 signalling in liver immune cells enhances druginduced liver injury and inflammation. *Inflamm Res.* (2018) 67:77–88. doi: 10.1007/s00011-017-1098-3
- Liew PX, Lee WY, Kubes P. iNKT Cells orchestrate a switch from inflammation to resolution of sterile liver injury. *Immunity* (2017) 47:752– 65.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.016
- 25. Sharma AK, LaPar DJ, Stone ML, Zhao Y, Mehta CK, Kron IL, et al. NOX2 activation of natural killer T cells is blocked by the adenosine A2A receptor to inhibit lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Respir Crit Care Med.* (2016) 193:988–99. doi: 10.1164/rccm.201506-1253OC
- Grabarz F, Aguiar CF, Correa-Costa M, Braga TT, Hyane MI, Andrade-Oliveira V, et al. Protective role of NKT cells and macrophage M2-driven phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Inflammopharmacology* (2018) 26:491–504. doi: 10.1007/s10787-017-0383-7
- Kim JH, Kim HY, Kim S, Chung JH, Park WS, Chung DH. Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon-gamma. *Am J Pathol.* (2005) 167:1231–41. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61211-4
- Bourgeois EA, Levescot A, Diem S, Chauvineau A, Bergès H, Milpied P, et al. A natural protective function of invariant NKT cells in a mouse model of innate-cell-driven lung inflammation. *Eur J Immunol.* (2011) 41:299–305. doi: 10.1002/eji.201040647
- Li D, Guabiraba R, Besnard AG, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. J Allergy Clin Immunol. (2014) 134:1422–32.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.011
- Luzina IG, Kopach P, Lockatell V, Kang PH, Nagarsekar A, Burke AP, et al. Interleukin-33 potentiates bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (2013) 49:999–1008. doi: 10.1165/rcmb.2013-0093OC
- Michaudel C, Mackowiak C, Maillet I, Fauconnier L, Akdis CA, Sokolowska M, et al. Ozone exposure induces respiratory barrier biphasic injury and inflammation controlled by IL-33. J Allergy Clin Immunol. (2018)142:942–58 doi: 10.1016/j.jaci.2017.11.044
- 32. Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, et al. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that

requires the presence of natural killer T cells and IL-17. J Exp Med. (2008) 205:385–93. doi: 10.1084/jem.20071507

- 33. Kubala S, Ge MQ, Redai I, Soni M, Chen B, Yang Q, et al. Ozone inhalation induces epithelial IL-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) and leads to eosinophilic airway inflammation. J Allergy Clin Immunol. (2014) 133:AB145. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.534
- Savransky V, Molls RR, Burne-Taney M, Chien CC, Racusen L, Rabb H. Role of the T-cell receptor in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* (2006) 69:233–8. doi: 10.1038/sj.ki.5000038
- Hochegger K, Schätz T, Eller P, Tagwerker A, Heininger D, Mayer G, et al. Role of alpha/beta and gamma/delta T cells in renal ischemiareperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2007) 293:F741–7. doi: 10.1152/ajprenal.00486.2006
- Kleinschnitz C, Schwab N, Kraft P, Hagedorn I, Dreykluft A, Schwarz T, et al. Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood* (2010) 115:3835–42. doi: 10.1182/blood-2009-10-249078
- Zhang ZX, Wang S, Huang X, Min WP, Sun H, Liu W, et al. NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* (2008) 181:7489–98. doi: 10.4049/jimmunol.181.11.7489
- Vahl JC, Heger K, Knies N, Hein MY, Boon L, Yagita H, et al. NKT Cell-TCR Expression activates conventional T Cells *in vivo*, but is largely dispensable for mature NKT cell biology. *PLOS Biol.* (2013) 11:e1001589. doi: 10.1371/journal.pbio.1001589
- Holzapfel KL, Tyznik AJ, Kronenberg M, Hogquist KA. Antigen-dependent versus -independent activation of iNKT cells during infection. J Immunol. (2014) 192:5490–8. doi: 10.4049/jimmunol.1400722
- Leite-de-Moraes MC, Hameg A, Arnould A, Machavoine F, Koezuka Y, Schneider E, et al. A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol.* (1999) 163:5871–6.
- Leite-De-Moraes MC, Hameg A, Pacilio M, Koezuka Y, Taniguchi M, Van Kaer L, et al. IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol.* (2001) 166:945–51. doi: 10.4049/jimmunol.166.2.945
- Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol.* (2009) 39:1046–55. doi: 10.1002/eji.200838575
- Zhu R, Diem S, Araujo LM, Aumeunier A, Denizeau J, Philadelphe E, et al. The Pro-Th1 cytokine IL-12 enhances IL-4 production by invariant nkt cells: relevance for t cell-mediated hepatitis. *J Immunol.* (2007) 178:5435–42. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5435
- Marques VP, Gonçalves GM, Feitoza CQ, Cenedeze MA, Fernandes Bertocchi AP, Damião MJ, et al. Influence of TH1/TH2 switched immune response on renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol.* (2006) 104:e48–56. doi: 10.1159/000093676
- 45. Shimokawa C, Kanaya T, Hachisuka M, Ishiwata K, Hisaeda H, Kurashima Y, et al. Mast cells are crucial for induction of group 2 innate lymphoid cells and clearance of helminth infections. *Immunity* (2017) 46:863–74.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.017
- Cayrol C, Duval A, Schmitt P, Roga S, Camus M, Stella A, et al. Environmental allergens induce allergic inflammation through proteolytic maturation of IL-33. Nat Immunol. (2018) 19:375–85. doi: 10.1038/s41590-018-0067-5
- Gadani SP, Walsh JT, Smirnov I, Zheng J, Kipnis J. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron* (2015) 85:703–9. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.013
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* (2005) 23:479–90. doi: 10.1016/j.immuni.2005.09.015
- 49. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BRP, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* (2008) 20:1019–30. doi: 10.1093/intimm/dxn060
- Liew FY, Girard JP, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. Nat Rev Immunol. (2016) 16:676–89. doi: 10.1038/nri.2016.95

- Luo Q, Fan Y, Lin L, Wei J, Li Z, Li Y, et al. Interleukin-33 protects ischemic brain injury by regulating specific microglial activities. *Neuroscience* (2018) 385:75–89. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.05.047
- Akcay A, Nguyen Q, He Z, Turkmen K, Won Lee D, Hernando AA, et al. IL-33 Exacerbates acute kidney injury. J Am Soc Nephrol. (2011) 22:2057–67. doi: 10.1681/ASN.2010091011
- 53. Thierry A, Giraud S, Robin A, Barra A, Bridoux F, Ameteau V, et al. The alarmin concept applied to human renal transplantation: evidence for a differential implication of HMGB1 and IL-33. *PLoS ONE* (2014) 9:e88742: doi: 10.1371/journal.pone.0088742
- 54. Thierry A, Robin A, Giraud S, Minouflet S, Barra A, Bridoux F, et al. Identification of invariant natural killer T cells in porcine peripheral blood. *Vet Immunol Immunopathol.* (2012) 149:272–9. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.06.023
- Zeng MY, Pham D, Bagaitkar J, Liu J, Otero K, Shan M, et al. An efferocytosisinduced, IL-4-dependent macrophage-iNKT cell circuit suppresses sterile inflammation and is defective in murine CGD. *Blood* (2013) 121:3473–83. doi: 10.1182/blood-2012-10-461913
- 56. Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, et al. Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med.* (2000) 191:105–14. doi: 10.1084/jem. 191.1.105
- Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2000) 97:5498–503. doi: 10.1073/pnas. 040566697
- Martin-Murphy BV, Kominsky DJ, Orlicky DJ, Donohue TM, Ju C. Increased susceptibility of natural killer T-cell-deficient mice to acetaminopheninduced liver injury. *Hepatology* (2013) 57:1575–84. doi: 10.1002/hep. 26134
- Kumar V. NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. J Hepatol. (2013) 59:618–20. doi: 10.1016/j.jhep.2013.02.032
- Yang SH, Lee JP, Jang HR, Cha R, Han SS, Jeon US, et al. Sulfatide-reactive natural killer T cells abrogate ischemia-reperfusion injury. J Am Soc Nephrol. (2011) 22:1305–14. doi: 10.1681/ASN.2010080815
- Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H, et al. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6mediated endothelial nitric oxide production. *Blood* (2009) 114:3117–26. doi: 10.1182/blood-2009-02-203372
- Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* (2014) 513:564–8. doi: 10.1038/nature13577
- Schiaffino S, Pereira MG, Ciciliot S, Rovere-Querini P. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. FEBS J. 284:517–24. doi: 10.1111/febs.13827
- Rak GD, Osborne LC, Siracusa MC, Kim BS, Wang K, Bayat A, et al. IL-33dependent group 2 innate lymphoid cells promote cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* (2016) 136:487–96. doi: 10.1038/JID.2015.406
- Yang Y, Liu H, Zhang H, Ye Q, Wang J, Yang B, et al. ST2/IL-33-Dependent microglial response limits acute ischemic brain injury. J Neurosci. (2017) 37:4692–704. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3233-16.2017
- Wicher G, Wallenquist U, Lei Y, Enoksson M, Li X, Fuchs B, et al. Interleukin-33 promotes recruitment of microglia/macrophages in response to traumatic brain injury. J Neurotrauma (2017) 34:3173–82. doi: 10.1089/neu.2016.4900
- La Cava A, Van Kaer L, Fu-Dong-Shi. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol.* (2006) 27:322–7. doi: 10.1016/j.it.2006.05.003
- Venken K, Decruy T, Aspeslagh S, Van Calenbergh S, Lambrecht BN, Elewaut D. Bacterial CD1d-restricted glycolipids induce IL-10 production by human regulatory T cells upon cross-talk with invariant NKT cells. *J Immunol.* (2013) 191:2174–83. doi: 10.4049/jimmunol.1300562
- Kim HY, Chang YJ, Subramanian S, Lee HH, Albacker LA, Matangkasombut P, et al. Innate lymphoid cells responding to IL-33 mediate airway hyperreactivity independently of adaptive immunity. J Allergy Clin Immunol. (2012) 129:216–27.e1–6. doi: 10.1016/j.jaci.2011.10.036
- Nandi B, Behar SM. Regulation of neutrophils by interferon-γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. J Exp Med. (2011) 208:2251–62. doi: 10.1084/jem.20110919

- Molofsky AB, Van Gool F, Liang HE, Van Dyken SJ, Nussbaum JC, Lee J, et al. Interleukin-33 and interferon-γ counter-regulate group 2 innate lymphoid cell activation during immune perturbation. *Immunity* (2015) 43:161–74. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.019
- Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* (2010) 120:331–42. doi: 10.1172/JCI38702
- Sakai N, Van Sweringen HL, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, et al. Interleukin-33 is hepatoprotective during liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology* (2012) 56:1468–78. doi: 10.1002/hep.25768
- 74. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhauser ML, Handa V, Gannon J, et al. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail.* (2009) 2:684–91. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.873240
- Rui T, Zhang J, Xu X, Yao Y, Kao R, Martin CM. Reduction in IL-33 expression exaggerates ischaemia/reperfusion-induced myocardial injury in mice with diabetes mellitus. *Cardiovasc Res.* (2012) 94:370–8. doi: 10.1093/cvr/cvs015

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

Copyright © 2018 Ferhat, Robin, Barbier, Thierry, Gombert, Barbarin and Herbelin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.