

Cytométrie en flux appliquée au parenchyme rénal murin : caractérisation dynamique de la réponse immunitaire innée à 24 heures et 7 jours après ischémie-reperfusion

A. Szedleski, R. Zahar, X. Sun, T. Pinto Coelho, J. Hanson and F. Jouret

INTRODUCTION

Ischémie-reperfusion (I/R) rénale, cause majeure d'insuffisance rénale aiguë

- I/R rénale → métabolisme **anaérobie**, programmes de **mort cellulaire**, libération d'**alarmines** et **cytokines**
- Réponse **inflammatoire innée** intra-rénale intense
- Compartiment **mono-macrophagique** déterminant : monocytes → MØ intermédiaires → MØ différenciés
- Continuum de **polarisation fonctionnelle M1** (CD86, pro-inflam.) vs **M2** (CD206, anti-inflam.)

La chronologie de la transition mono-macrophagique et de la polarisation fonctionnelle de ce compartiment de l'immunité innée reste mal établie dans le cadre de l'I/R rénale

Objectif

- Établir un **protocole de dissociation cellulaire** du parenchyme rénal murin + un **panel de cytométrie en flux**
- Isoler les **3 stades** mono-macrophagiques et leur **polarisation**
- L'appliquer à un modèle d'I/R rénale à **24 h** et **7 jours** de reperfusion

Difficultés techniques

- Suspension unicellulaire sans perte de **viabilité**
- Leucocytes minoritaires** dans le parenchyme rénal
- Rein = tissu riche en **débris** et **autofluorescent**

MÉTHODES

Design & Modèle chirurgical

- C57BL/6J, 8–12 sem. n = 8 / groupe (4 ♂ / 4 ♀).
- Clampage isolé de l'artère rénale G : 30 min. Reperfusion de 24 heures vs 7 jours.
- Rein droit = rein contrôle apparié ; Rein gauche = rein traité I/R

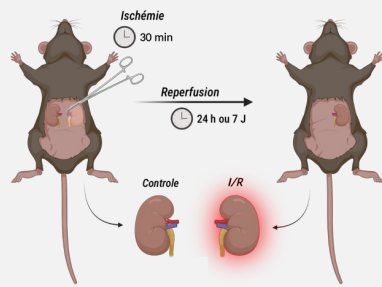


Figure 1 | Modèle murin d'I/R rénale

Cytométrie & analyse

- Dissociation mécanique + enzymatique du pôle rénal inférieur
- Panel 8 marqueurs** : viabilité, CD45, CD3/CD19, Ly6C/CD64, CMH-II, CD86/CD206
- Wilcoxon apparié (log₂ ratio G/D) · ANOVA 2x2 + Benjamini-Hochberg

Méthodologie détaillée à retrouver en scannant le QR code

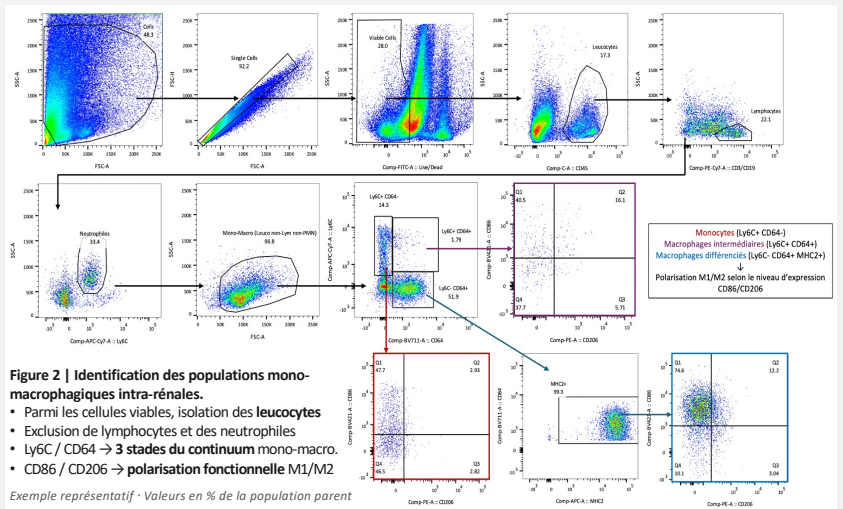


Figure 2 | Identification des populations mono-macrophagiques intra-rénales.

- Parmi les cellules viables, isolation des **leucocytes**
- Exclusion de lymphocytes et des neutrophiles
- Ly6C / CD64 → **3 stades du continuum** mono-macro.
- CD86 / CD206 → **polarisation fonctionnelle** M1/M2

Exemple représentatif · Valeurs en % de la population parent

RÉSULTATS — Réponse immunitaire innée intra-rénale après ischémie de 30' et reperfusion de 24 heures vs 7 jours

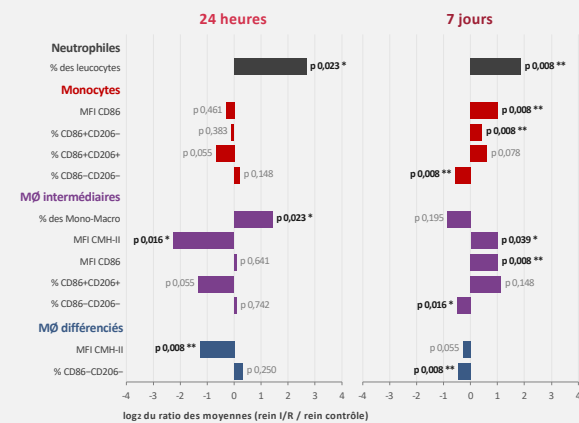


Figure 3 | Résultats d'analyse du parenchyme rénal en cytométrie en flux, différence rein I/R – rein contrôle : 24 heures de reperfusion et 7 jours de reperfusion

- Barre = log₂ du ratio rein I/R / rein contrôle apparié.
- 0 = pas de différence · +1 = doublement dans le rein I/R
- Wilcoxon apparié, n = 8 / groupe ; * p < 0,05 ; ** p < 0,01 (non corrigées)
- MFI, intensité moyenne de fluorescence ; MØ, macrophages

Population	Paramètre	Ratio G/D 24 h	Ratio G/D 7 J	p interact.	q (BH)	Sens 24 h → 7 J
Monocytes	MFI CD86	0,81	2,03	0,003	0,019	→ ↑
	% CD86+CD206-	0,93	1,35	<0,001	0,004	→ ↑
	% CD86+CD206+	0,62	1,53	0,014	0,038	→ ↑
	% CD86-CD206-	1,16	0,67	<0,001	0,004	→ ↓
MØ intermédiaires	% des Mono-Macro	2,68	0,55	0,004	0,025	↑ →
	MFI CMH-II	0,21	2,00	0,003	0,019	↓ → ↑
	MFI CD86	1,06	2,03	0,018	0,046	→ ↑
	% CD86+CD206+	0,40	2,20	0,011	0,038	→ ↑
MØ différenciés	% CD86-CD206-	1,07	0,71	0,006	0,027	→ ↓
	MFI CMH-II	0,41	0,82	0,013	0,038	↓ →
	% CD86-CD206-	1,26	0,73	0,007	0,028	→ ↓

Figure 4 | Résultats d'analyse du parenchyme rénal en cytométrie en flux, différence rein I/R – rein contrôle : Paramètres dont la réponse à l'I/R dépend de la durée de reperfusion

- Interaction I/R × durée significative après correction de la multiplicité (q < 0,05)
- Ratio > 1 = augmentation dans le rein I/R · La dernière colonne résume l'évolution des paramètres à 24 h et 7 J de reperfusion
- ANOVA 2x2 à mesures répétées, Benjamini-Hochberg sur 28 paramètres, n = 8 / groupe
- Paramètres non-significatifs** : % monocytes et % MØ différenciés, MFI CD206 et CMH-II monocytaires, MFI CD86 et CD206 des différenciés ; MFI CD206 des intermédiaires q = 0,078.
- MFI, intensité moyenne de fluorescence ; MØ, macrophages

CONCLUSION

Ces données confirment le caractère dynamique et séquentiel de la réponse mono-macrophagique intra-rénale après I/R

24 h – Phase initiale de recrutement

- Accumulation de MØ intermédiaires faiblement avancés dans leur différenciation (MFI CMH-II ↓)
- Faible niveau de polarisation : phénotype **CD86-/CD206-** dominant

7 jours – Phase subaiguë de maturation et polarisation fonctionnelle

- Normalisation du nombre de MØ intermédiaires, mais avancement dans leur différenciation (MFI CMH-II ↑)
- Polarisation fonctionnelle dans les 3 populations : **chute des CD86-/CD206-**
- Élévation de l'expression CD86 ↑ (monocytes, MØ intermédiaires) : **orientation M1**

CONTACT



alexandre.szedleski@uliege.be
ORCID 0009-0006-1543-0761