

Université Lille Nord de France
Ecole doctorale Biologie Santé

THESE
en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Corentin LASSEAUX

Le 26 septembre 2017

**Etude de la modulation des cellules myéloïdes murines au
cours de l'endotoxémie**

Jury :

Monsieur le Professeur Jean-Marc Cavaillon	Rapporteur
Madame le Docteur Elodie Segura	Rapporteur
Madame le Professeur Véronique Flamand	Examineur
Monsieur le Docteur Lionel POULIN	Directeur de thèse

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

INSERM U1019 CNRS UMR 8204 – Université Lille Nord de France

Laboratoire des Cellules Dendritiques en Infection et Immunité

Remerciements

Avant de commencer, je souhaite remercier ceux qui, directement ou non, ont contribué à rendre possible la réalisation de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le conseil régional de la région Hauts de France, l'INSERM et la fondation ARC pour la recherche sur le cancer pour avoir financé cette thèse.

Je remercie tout particulièrement les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de prendre le temps d'évaluer mes travaux. Merci infiniment au Dr. Elodie Segura d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse et d'endosser le rôle de rapporteur. Merci au Pr. Jean-Marc Cavaillon pour le temps consacré à l'évaluation de mes travaux et pour les remarques pertinentes ayant permis d'améliorer ce mémoire. Merci au Pr. Véronique Flamand pour avoir accepté d'endosser le rôle de président du jury.

J'adresse toute ma gratitude au Dr. Lionel Poulin pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour le temps qu'il m'a consacré, et pour m'avoir donné les moyens de réaliser ces travaux de recherche.

Merci au Dr. Mathias Chamailard de m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour ses conseils et son soutien.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe que j'ai eu le plaisir de côtoyer au cours de ces années. Un grand merci à Camille, Marie-Pierre, Myriam, Anne, Emilie, Ghaffar, Jonathan, Marie, Claudine, Olivier et Richard pour tout ce que vous m'avez apporté.

Sachant qu'il est difficile d'établir une liste exhaustive, je tiens à adresser un grand merci général à toutes les personnes que j'ai eu l'opportunité de rencontrer au cours de ces années à l'Institut Pasteur de Lille et qui ont fait de cette thèse une aventure riche.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour leur soutien inconditionnel et sans qui rien n'aurait été possible.

Table des matières

Abréviations	1
Introduction	2
Chapitre 1. Sepsis, endotoxémie et LPS : Pathologies et modèles d'études.....	3
I. Le sepsis : de la tempête cytokinique à l'immunorégulation	3
I.1. Le syndrome de réponse inflammatoire systémique	4
I.2. Le syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire.....	5
I.3. Les modèles animaux du sepsis.....	9
II. Les LPS : molécules ubiquitaires et hétérogènes	12
Chapitre 2. Signalisation des LPS.....	16
I. Le système du complément	16
I. 1. La voie classique du complément.....	16
I. 2. La voie des lectines et la voie alterne	17
I. 3. Régulation du complément.....	19
II. Les récepteurs de type Toll.....	20
II. 1. Structure et localisation des TLR.....	20
II. 2. Signalisation du TLR4	22
II. 3. Subversion et régulation des TLR.....	26
III. Les inflammasomes	28
III. 1. L'inflammasome canonique NLRP3	29
III. 2. L'inflammasome non canonique.....	35
III. 3. Subversion et régulation des inflammasomes.....	38
Chapitre 3. Les phagocytes mononucléés : entre immunité innée et adaptative.	40
I. Les macrophages	40
I. 1. Rôles des macrophages.....	40
I. 2. Plasticité des macrophages.	41
II. Les monocytes	43
II. 1. Populations et fonctions des monocytes.	43
II. 2. Impact du sepsis sur les monocytes.....	44
III. Les cellules dendritiques	45
III. 1. Populations et fonctions des cellules dendritiques.....	46
III. 2. Impact du sepsis sur les DC.....	53

Chapitre 4. Hématopoïèse et développement des phagocytes mononucléés.	56
I. Les cytokines et facteurs de croissance	56
I. 1. Le facteur de croissance M-CSF.	56
I. 2. Le facteur de croissance Flt3-L.	57
I. 3. Le facteur de croissance GM-CSF.....	57
II. Ontogénie des macrophages	58
III. Développement des monocytes et DC.....	61
III. 1. Développement des monocytes.....	63
III. 2. Développement des cellules dendritiques.	64
III. 3. Homologie chez l’homme.....	65
IV. Développement des phagocytes en contexte infectieux.	65
Objectifs de la thèse	70
Résultats	73
Chapitre 1. Conditionnement des phagocytes mononucléés par les LPS	74
Génération de cellules présentatrices d’antigènes d’origine monocyttaire dans la	
rate et la moelle osseuse de souris endotoxémiques.	74
Diminution des cDC et de leurs précurseurs dans la rate et la moelle osseuse de	
souris endotoxémiques.....	78
L’injection intraveineuse des LPS induit un processus de monopoïèse	
dépendamment des IFN de type I.	80
Les IFN de type I favorisent la différenciation des précurseurs de macrophages	
et DC (MDP) en Mo-APC.	83
Résultats complémentaires à l’article	87
Chapitre 2. Etude des voies de reconnaissance intracellulaire des LPS	92
Validation du protocole de criblage.....	92
Résultats du criblage.....	93
Identification et validation d’un potentiel régulateur de la pyroptose induite par	
l’inflammasome non canonique.....	97
Rôles du GzmB dans la liaison des LPS et le clivage de l’IL-1 β et de la Caspase-	
1.	98
Discussion	101
Chapitre 1. Conditionnement des phagocytes mononucléés par les LPS	102

Comment expliquer la diminution des nombres de cDC au profit des monocytes en cas d'endotoxémie ?	104
Comment expliquer les résultats concernant les nombres de monoblastes et promonocytes chez les souris déficientes pour IFNAR ?	107
Quelles sont les sources et les cibles de ces IFN de type I produits suite à l'injection intraveineuse de LPS ?	109
L'injection des LPS <i>in vivo</i> a-t-elle des effets à long terme sur la génération des cellules myéloïdes ?	110
Quels sont les rôles des Mo-APC produits suite à l'injection intraveineuse de LPS ?	111
Ces données observées chez la souris pourraient-elles s'appliquer chez l'homme ?	112
Chapitre 2. Etude des voies de reconnaissance intracellulaire des LPS	114
L'expression de GzmB nécessite-t-elle une activation des cellules ?	115
A quel niveau le GzmB pourrait-il être impliqué dans la production des cytokines pro-inflammatoires suite à la transfection des LPS ?	116
Matériel & Méthodes	119
Souris et modèle d'endotoxémie	120
Préparation des cellules pour la cytométrie en flux et marquage des molécules extracellulaires	120
Incorporation du BrdU et marquage intra-cellulaire	122
Culture <i>in vitro</i> de DC dérivés de la moelle osseuse murine	122
Culture <i>in vitro</i> de Mo-DC dérivés de monocytes humains	123
Culture <i>in vitro</i> de macrophages dérivés de la moelle osseuse murine	123
Transfection de siRNA et activation de l'inflammasome non canonique	123
Mesure de la cytotoxicité par dosage de la LDH	124
Criblage	125
Western Blot	125
ELISA	126
Bibliographie	128
Annexes	161

Abréviations

APC : Cellules présentatrices d'antigènes	hPré-cDC : Pré-cDC humain
ARNm : Acide ribonucléique messenger	HSC : Cellule souche hématopoïétique
ASC : <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>	IFN : Interférons
ATP : adénosine triphosphate	IFNAR : Récepteur aux IFN α et β
BDCA : <i>Blood Dendritic Cells Antigen</i>	IKK : Inhibiteur des kinases κ B
CARD : Domaine de recrutement des caspases	IL : Interleukine
CARS : Syndrome de Réponse Anti-inflammatoire compensatoire	IRF : Facteurs de transcription régulant la production des IFN
CCL : Chimiokines de type CC	LPS : Lipopolysaccharides
CCR : Récepteurs aux chimiokines de type CC	LPSi : LPS intracellulaires
CD : <i>Cluster of differentiation</i>	M-CSF : <i>Macrophages colony stimulating factor</i>
cDC : Cellules dendritiques conventionnelles	M-CSF-R : <i>Macrophages colony stimulating factor receptor</i>
CDP : Progéniteur des cDC	MDP : Précurseur des monocytes et cDC
CLP : Ligature et ponction caecale	MHC : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CLP* : Progéniteur lymphoïde commun	Mo-APC : Cellules présentatrices d'antigènes d'origine monocytaire
cMoP : Progéniteur commun des monocytes	MoDC : Cellules dendritiques d'origine monocytaire
CMP : Progéniteur myéloïde commun	MyD88 : <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
CXCL : Chimiokine de type CXC	NBD : <i>nucleotide binding domain</i>
CXCR : Récepteur aux chimiokine de type CXC	NLRP : <i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein</i>
DAMP : Motifs moléculaires associés aux dommages tissulaires	PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes
DC : Cellules dendritiques	pDC : Cellules dendritiques plasmacytoïdes
FcR : Récepteurs aux fragments cristallisables des anticorps	Pré-pDC : Progéniteur de pDC
Flt3 : <i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>	Pré-cDC : Progéniteur circulant des cDC
Flt3-L : <i>Fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i>	poly(I:C) : Acide polyinosinique-polycytidylique
G-CSF : <i>Granulocyte colony stimulating factor</i>	PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
GM-CSF : <i>Granulocyte and macrophages colony stimulating factor</i>	PYD : Domaine Pyrine
GM-CSF-R : <i>Granulocyte and macrophages colony stimulating factor receptor</i>	ROS : Espèces réactives de l'oxygène
GSDMD : Gasdermine D	Sca-1 : <i>Stem cell Antigen 1</i>
GzmB : Granzyme B	SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique
hCDP : CDP humain	siRNA : Petits ARN interférents
HLA : Antigènes de leucocytes humains	TLR : Récepteurs de type Toll
HIF : Facteurs de transcription induits par l'hypoxie	TNF : Facteur de Nécrose Tumorale
hMDP : MDP humain	WB : Western blot
	WT : Génotype sauvage

Introduction

Chapitre 1. Sepsis, endotoxémie et LPS : Pathologies et modèles d'études

Le sepsis, dérivant du mot « putréfaction » en grec ancien, est défini par la réponse de l'organisme à la présence de particules infectieuses nocives dans le sang, induisant une activation massive et exacerbée du système immunitaire pouvant mener à la détérioration des tissus ou organes puis à la mort de l'organisme lui-même. Ce syndrome est actuellement un problème clinique majeur responsable d'un grand nombre de décès, notamment dans les unités de soins intensifs. Le système immunitaire a la capacité de détecter des micro-organismes et particules potentiellement délétères afin de prémunir l'organisme contre d'éventuelles invasions. Cette détection passe par la reconnaissance de molécules très conservées exprimées par de nombreux germes microbiens appelés PAMP (« *Pathogen Associated Molecular Patterns* ») par des récepteurs nommés PRR (« *Pattern Recognition Receptors* »). Les PRR peuvent aussi reconnaître des molécules témoignant de dommages tissulaires nommées DAMPS (« *Damages Associated Molecular Patterns* »). Ces récepteurs sont exprimés de manière ubiquitaire sur les cellules hématopoïétiques mais aussi sur certaines cellules structurelles, leur permettant ainsi de surveiller l'intégrité des tissus et de réagir promptement en cas de danger. L'activation d'un PRR par un ligand qui lui est spécifique conduit à l'inflammation et à l'activation du système immunitaire afin d'endiguer l'infection. Ce mécanisme est, dans une très grande majorité des cas, bénéfique pour contrer l'invasion par un organisme pathogène et permettre la réparation tissulaire et le retour à l'homéostasie. Cependant, s'il est dérégulé, il peut être à l'origine de maladies inflammatoires chroniques ou auto-immunes.

I. Le sepsis : de la tempête cytokinique à l'immunorégulation

Le sepsis touche très majoritairement les personnes aux extrêmes de l'âge ou sévèrement affaiblies. Ce syndrome, qui représente une part importante de la mortalité dans les unités de soin intensif, est en fait un diagnostic clinique imprécis utilisé pour les patients présentant une infection (suspectée ou prouvée) associée à des anomalies dans certaines fonctions physiologiques, notamment la température corporelle, les rythmes cardiaque et respiratoire ou encore le nombre de cellules immunitaires circulantes. Un consensus d'experts

s'est récemment réuni afin d'améliorer la définition et le diagnostic du sepsis. Ces études ont suggéré que les scores attribués en fonction des atteintes aux organes SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) et la version simplifiée qSOFA (*quick SOFA*), associés à une infection suspectée ou prouvée, pourraient permettre de diagnostiquer plus efficacement les patients susceptibles de développer les complications associées au sepsis. Le terme « choc septique » est quant à lui utilisé pour les patients présentant un sepsis associé à une hypotension persistante et une défaillance cardiovasculaire grave avec un taux élevé de mortalité. (Seymour, Liu et al. 2016, Shankar-Hari, Phillips et al. 2016, Singer, Deutschman et al. 2016). D'une manière générale, nous verrons ici le sepsis comme un état potentiellement mortel induit par une réponse systémique exacerbée de l'organisme à une menace, lésant ses propres tissus et organes. Cette réaction se définit plus par une réponse générale à un danger systémique plutôt que par une réponse spécifique à une infection.

Compte tenu du vieillissement de la population, de l'amélioration du support aux fonctions vitales et des traitements antibiotiques, plusieurs études ont prédit que l'incidence du sepsis devrait significativement croître au cours des prochaines années, augmentant ainsi les dépenses associées aux soins et à la prise en charge des patients, déjà très élevées (Coopersmith, Wunsch et al. 2012, Kaukonen, Bailey et al. 2014, Kahn, Le et al. 2015). Malgré cela, et en dépit des nombreux essais cliniques réalisés, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique au sepsis et la prise en charge des patients consiste à administrer des antibiotiques et leur fournir les supports nécessaires à leurs fonctions vitales. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques du sepsis afin d'améliorer la prise en charge de ces patients et de mettre au point de nouveaux traitements.

I.1. Le syndrome de réponse inflammatoire systémique

La majorité des recherches sur la pathogenèse du sepsis s'est rapidement focalisée sur l'activation exacerbée de l'immunité innée lors du choc septique. Au cours des années 80, une étude a montré que l'administration d'anticorps monoclonaux bloquant le *Tumor Necrosis Factor* (TNF), une importante cytokine pro-inflammatoire, empêchait le développement d'un choc septique par des babouins infectés par la bactérie à Gram négatif *E. coli*, malgré la présence de bactéries vivantes dans le sang (Tracey, Beutler et al. 1986, Tracey, Fong et al. 1987). De plus, l'injection des cytokines TNF α ou interleukine-1 β (IL-1 β) à des animaux de laboratoire induit des effets très similaires à ceux du sepsis (Okusawa, Gelfand et al. 1988, Tewari, Buhles et al. 1990, Dinarello 1991, Bhatia and Mochhala 2004). Ces recherches ont

mené au concept de tempête cytokinique, où les cellules effectrices de l'immunité innée libèrent massivement des cytokines pro-inflammatoires afin de mobiliser les défenses de l'hôte. Ce phénomène est aussi connu sous le nom de *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS). D'autres études ont aussi évoqué une tempête génomique en cas de blessures, de traumatismes graves ou de la présence de toxines bactériennes dans la circulation. Ces différents stress induisent l'expression de certains facteurs de transcription spécifiques, les SRTF (*stress-responsive transcription factor*), qui induisent la fièvre, l'instabilité des endothéliums et d'autres dysfonctions physiologiques observées au cours d'un sepsis (Xiao, Mindrinos et al. 2011, DiGiandomenico, Veach et al. 2014).

La découverte que des médiateurs biochimiques comme le TNF ou l'IL-1 β , et non directement la bactérie, sont nécessaires et suffisants pour induire un choc septique a engendré l'idée que cibler ces médiateurs pourrait former un traitement efficace pour les patients septiques. Argumentant dans ce sens, une étude utilisant deux modèles murins différents de sepsis a montré que l'inhibition simultanée et prolongée des deux cytokines TNF α et IL-1 β permettait une amélioration significative de la survie (Remick, Call et al. 2001). Plus d'une centaine d'essais cliniques ont alors été faits afin de valider l'hypothèse qu'inhiber la réponse immunitaire innée permettrait d'améliorer la survie des patients. Bien que ces stratégies semblaient prometteuses, la très grande majorité de ces essais cliniques, neutralisant par exemple le TNF ou l'IL-1 β , a échoué (Marshall 2014). Ceci pourrait être expliqué par une faible relevance des modèles murins, par la très grande diversité des patients impliqués dans ces essais cliniques, ou encore parce que la réponse de l'organisme à un danger est très complexe et que l'inhibition de la signalisation d'une seule molécule n'est certainement pas suffisante pour avoir des effets bénéfiques sur la survie. C'est d'ailleurs une explication suggérée par l'étude réalisée chez les rongeurs et présentée précédemment, où l'inhibition simultanée du TNF et de l'IL-1 β était nécessaire à l'amélioration de l'état des souris dans les deux modèles murins utilisés (Remick, Call et al. 2001).

I.2. Le syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire

Les améliorations constantes dans les protocoles de prise en charge clinique ont significativement réduit la mortalité à court terme des patients septiques. Au siècle dernier, la létalité du sepsis se répartissait en deux pics correspondant aux décès précoces, arrivant au cours des premiers jours du syndrome et dus aux dysfonctions cardiaques ou pulmonaires. Le second pic, entre 20 et 30 jours après la déclaration du sepsis, correspond aux décès plus

tardifs associés aux dysfonctions persistantes, notamment rénales ou hépatiques (Figure 1A). L'amélioration de la prise en charge des patients a amené à une modification de la répartition de la mortalité due au sepsis. En effet l'espérance de vie au delà de 30 jours après l'établissement du syndrome a significativement augmenté, laissant place à un pic de mortalité bien plus tardif, commençant après 2 à 3 mois et augmentant avec le temps, jusqu'à plusieurs années après l'apparition du sepsis (Figure 1B) (Leibovici 2013, Delano and Ward 2016).

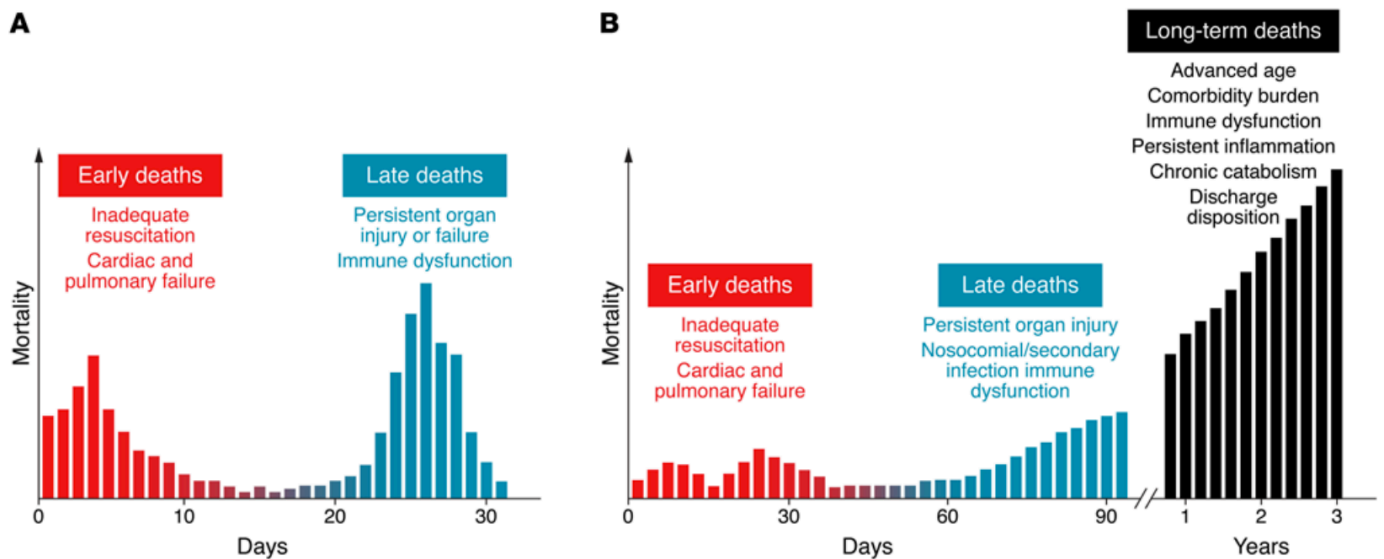


Figure 1 : Répartition historique et actuelle de la mortalité attribuée au sepsis. A. Historiquement, la mortalité due au sepsis était répartie en deux pics et l'espérance de vie des patients septiques dépassait rarement un mois. **B.** Avec l'amélioration des soins survenue au cours des dernières décennies, la mortalité lors du premier mois a significativement diminué, laissant place à un pic de mortalité très tardif et dont les causes sont complexes (Delano and Ward 2016).

Les causes de cette mortalité à long terme ainsi que les mécanismes empêchant le rétablissement des patients sont encore mal connus. Les survivants du sepsis sont nombreux et leur effectif est amené à augmenter avec le vieillissement de la population et l'amélioration de la prise en charge des patients dans les unités de soins intensifs. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes induits par une infection généralisée et expliquant la mortalité à long terme sera grandement bénéfique pour l'amélioration de l'accompagnement de ces patients.

Au cours des deux dernières décennies, il a été montré par différentes études chez l'homme comme les animaux de laboratoire, que le sepsis peut induire des anomalies quantitatives et fonctionnelles des cellules de l'immunité, aboutissant à une immunosuppression. Ces dysfonctions immunitaires seraient impliquées dans la susceptibilité des patients aux infections secondaires ou nosocomiales et à leur incapacité à contrer

l'infection initiale, expliquant ainsi la mortalité tardive. Ce phénomène est connu sous le nom de *compensatory anti-inflammatory response syndrom* (CARS). Chez l'homme, un grand nombre de patients septiques ou victimes de brûlures graves présentent une réactivation de virus latents comme le cytomégalovirus, dont la réactivation peut-être corrélée à la mortalité chez les patients septiques (Limaye, Kirby et al. 2008), ou encore herpes simplex virus (Luyt, Combes et al. 2007). De plus, des cas d'aspergillose pulmonaire invasive, infection opportuniste touchant exclusivement les patients sévèrement immunodéprimés, ont été rapportés chez des patients septiques (Hartemink, Paul et al. 2003, Meersseman, Vandecasteele et al. 2004). Ces données, parmi d'autres, suggèrent que le sepsis pourrait induire une altération profonde du système immunitaire, empêchant ainsi les patients de se prémunir contre des infections normalement bien contrôlées et causées par des micro-organismes opportunistes peu virulents (Hotchkiss, Monneret et al. 2013). Une étude post-mortem a montré que les lymphocytes comme d'autres cellules immunitaires présentes dans la rate et les poumons de patients septiques présentaient une expression significativement plus haute de récepteurs inhibiteurs et de leurs ligands, comme le récepteur *programmed cell death receptor 1* (PD-1) et son ligand PD-L1, exprimés à la surface de différentes populations de cellules immunitaires. L'activation de PD-1 par PD-L1 induit la phosphorylation de la partie intracellulaire de PD-1 comprenant un domaine *immunoreceptor tyrosine based inhibitory* (ITIM), ceci pouvant conduire à un défaut d'activation des cellules immunitaires et leur apoptose (Boomer, To et al. 2011). D'autres études ont mis en évidence l'apoptose de cellules immunitaires, comme les lymphocytes ou les cellules dendritiques, chez les patients septiques comme chez les animaux de laboratoire, déplaçant ainsi un nombre non négligeable de cellules effectrices. De plus l'inhibition de la mort de ces cellules, via l'inhibition de médiateurs apoptotiques comme Fas, FasL, *B cell lymphoma-2* (Bcl-2) ou la caspase-8, permet d'améliorer la résistance des souris dans différents modèles murins de sepsis (Hotchkiss, Tinsley et al. 1999, Hotchkiss and Nicholson 2006). Les corps apoptotiques peuvent être phagocytés par certaines cellules immunitaires, induisant la production de cytokines immunosuppressives comme l'interleukine 10 (IL-10), dont une haute concentration circulante est corrélée à une mortalité élevée chez les patients septiques (van Dissel, van Langevelde et al. 1998, Albert 2004). Un argument supplémentaire en faveur de l'immunosuppression des patients septiques est que les cellules isolées des rates de ces patients rapidement après leur décès présentent une diminution significative de la production de cytokines autant pro- qu'anti-inflammatoires (Boomer, To et al. 2011). Les preuves de

l'immunosuppression des patients ayant survécu à la phase initiale du sepsis sont donc nombreuses et il est important de les prendre en compte lors du traitement.

En fait, ce paradigme voyant le sepsis comme un syndrome diphasique, comportant une phase initiale pro-inflammatoire évoluant ensuite en une phase immunosuppressive, est maintenant remis en questions. Selon le modèle actuel, les phases pro-inflammatoires et immunosuppressives pourraient en fait être concomitantes, bien que l'effet initial net de ces processus soit généralement manifesté par une phase pro-inflammatoire dominante caractérisée par une forte fièvre, des dysfonctions de certains systèmes et le choc septique. L'amplitude de cette phase initiale pro-inflammatoire dépendrait donc de différents facteurs comme la charge microbienne ainsi que la virulence des pathogènes ou encore la comorbidité et l'état général des patients (Figure 2) (Cavaillon, Adib-Conquy et al. 2001, Hotchkiss, Monneret et al. 2013).

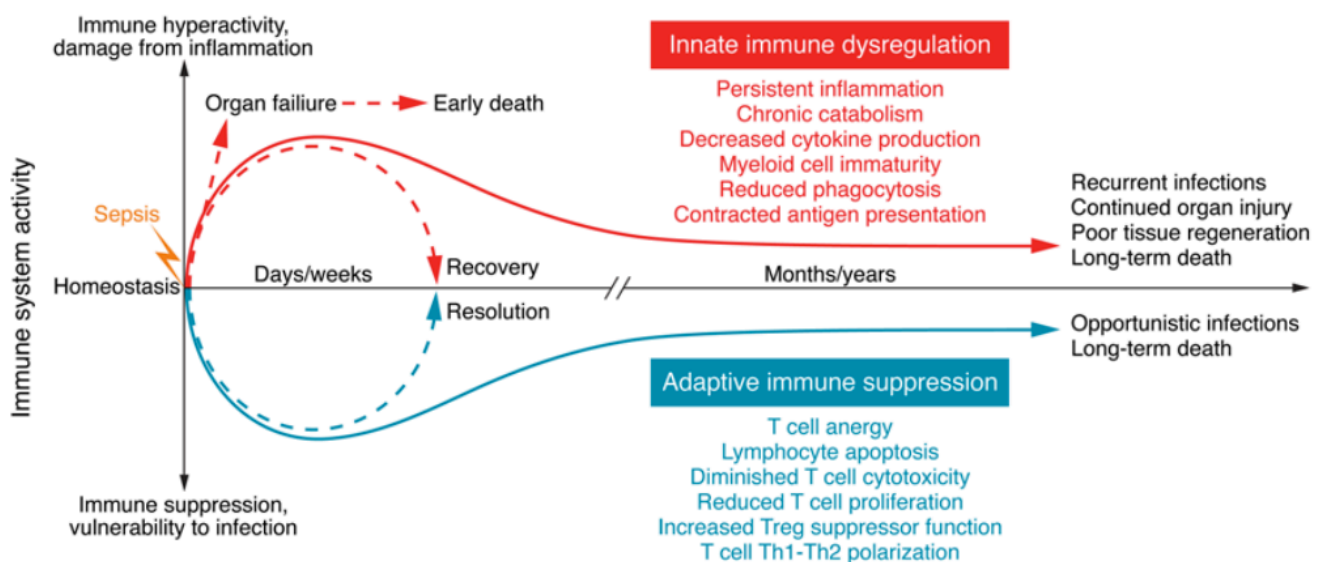


Figure 2 : Dérégulations immunitaires au cours du sepsis. Les récentes études montrent que les patients septiques présentent une inflammation non contrôlée associée à une forte diminution de l'efficacité du système immunitaire adaptatif. Ces dérégulations persistantes dans les fonctions cellulaires innées et adaptatives du système immunitaire pourraient être impliquées dans la mortalité à long terme des patients septiques (Delano and Ward 2016).

L'analyse de l'expression génique des leucocytes circulants chez des patients victimes de blessures et brûlures graves a montré que ces phases n'étaient pas forcément mutuellement exclusives. En effet les gènes régulant l'immunité innée et l'inflammation étaient significativement surexprimés par ces leucocytes alors que ceux régulant l'immunité adaptative étaient inhibés (Xiao, Mindrinos et al. 2011). Néanmoins, cette étude ne s'est

focalisée que sur l'expression des gènes sans mesurer les niveaux des différentes protéines, pouvant être impactés par différentes régulations post-transcriptionnelles (Xiao, Mindrinos et al. 2011). Il existe donc à l'heure actuelle un débat sur la simultanéité et l'importance des phases pro-inflammatoires et immunosuppressives concernant la physiopathologie de ce syndrome. Cependant, de nombreux experts s'accorde à dire que la manipulation de l'immunité innée et adaptative améliorer la prise en charge et du traitement des patients septiques. L'application réussie de telles thérapies nécessite néanmoins que l'agent pro- ou anti-inflammatoire soit administré à un stade approprié de manière à ne pas être délétère au patient. Le traitement idéal pour ce syndrome devrait donc être adapté individuellement à l'intensité et aux biais connus de l'état inflammatoire et immunitaire de chaque patient. Cependant, une telle approche thérapeutique individualisée reste à l'heure actuelle un objectif inatteignable, et nécessiterai une étude détaillée des biomarqueurs au cours de la progression du sepsis.

I.3. Les modèles animaux du sepsis

Pour des raisons éthiques et méthodologiques évidentes, l'étude poussée du système immunitaire chez les patients septiques est impossible. Les recherches sur le sepsis humain sont souvent focalisées sur les cellules circulantes de patients en unité de soins intensifs ou l'analyse de tissus prélevés sur des patients récemment décédés. En plus de l'accès difficile aux échantillons, la très grande hétérogénéité des patients, le fait qu'ils soient sous médication, et la présence possible de comorbidités rendent très difficile l'étude des anomalies immunitaires induites par ce syndrome. C'est pourquoi les modèles animaux sont nécessaires aux chercheurs pour améliorer leur compréhension des bases fonctionnelles des dérégulations immunitaires induites par le sepsis. Ces modèles de sepsis ont souvent servi de terrain d'essai préliminaire pour les agents thérapeutiques avant les essais cliniques chez l'homme.

Avec leur petite taille, leur reproduction rapide, leur faible coût d'élevage et la disponibilité de lignées génétiquement homogènes et de nombreuses souches génétiquement modifiées, les souris sont les animaux de laboratoire les plus utilisés. Deux catégories majoritaires de modèles murins de sepsis ou d'inflammation aiguë sont utilisés par les chercheurs : injection de toxines purifiées ou altération des barrières protectrices permettant la translocation bactérienne. Ces modèles ont contribué à notre compréhension des mécanismes de défenses au cours d'une infection et du rôle des médiateurs pro- et anti-inflammatoires

dans la pathogenèse du sepsis. Cependant, l'application de ces découvertes au développement de thérapies chez l'homme est encore sujette à controverses.

Un modèle murin simple d'inflammation aiguë consiste en l'injection de molécules purifiées d'endotoxines par voie intra-péritonéale (i.p.) ou intra-veineuse (i.v.). Ce modèle permet de contrôler finement les paramètres de l'expérience, cependant, la molécule injectée ne reproduit pas la réponse physiologique complexe observée au cours de la progression d'un sepsis causée par un pathogène viable à la signature moléculaire complète. Les endotoxines, ou lipopolysaccharides (LPS), sont de puissants immuno-adjuvants présents dans la paroi des bactéries à Gram négatif. L'injection de LPS par voie i.p. ou i.v. conduit au développement de différents symptômes comparables à ceux retrouvés chez les patients septiques. Cette molécule induit l'activation systémique de l'immunité innée et une libération de cytokines pro-inflammatoires, une hypotension artérielle systémique, ou encore des dysfonctions dans la contractilité du muscle cardiaque (Fink 2014). De plus, dans certaines conditions, il peut induire un phénomène d'immunosuppression comparable au CARS (Gautier, Huby et al. 2008). Aussi, l'injection de faibles doses de LPS à des volontaires humains induit des altérations pathophysiologiques proches de celles retrouvées chez les patients septiques, appuyant la légitimité de l'endotoxémie pour l'étude des mécanismes du sepsis (Fink and Heard 1990). Cependant, la pertinence de l'injection de LPS comme modèle expérimental de sepsis clinique humaine est parfois remise en question à cause, entre autres, de la différence de réponse au niveau de divers paramètres, notamment de la réponse hémodynamique. En effet, l'injection de LPS à des souris induit un état cardiovasculaire hypodynamique, sans présenter l'état initial hyperdynamique observé chez les patients septiques (Wichterman, Baue et al. 1980, Buras, Holzmann et al. 2005). De plus, les souris semblent bien moins sensibles aux effets toxiques des LPS que l'homme. En effet, la dose nécessaire pour induire la fièvre et une concentration en IL-6 plasmatique de l'ordre de 1 ng/ml en quelques heures est de 2 ng/kg chez l'homme et de 500 ng/kg chez la souris, soit une dose 250 fois plus importante (Copeland, Warren et al. 2005). Cependant, dans cette étude, le LPS a été injecté aux volontaires humains par voie intraveineuse, alors que les souris ont reçu une injection intra-péritonéale. Il serait intéressant de comparer la réponse des souris et de l'homme dans des conditions similaires. Enfin, une étude récente a comparé la réponse génomique de patients présentant un syndrome septique associé à des brûlures graves, des traumatismes, ou une endotoxémie aiguë, à celle de souris dans des conditions correspondantes. Pour cela, ils ont analysé le contenu en ARN messager extrait de leucocytes isolés du sang humain ou murin

dans les différentes conditions. Bien que les profils d'expression génique obtenus à partir des leucocytes humains isolés dans les trois conditions présentent un haut degré de similarité, les auteurs n'ont trouvé que peu de gènes en commun dont l'expression fluctue de la même façon chez la souris (Seok, Warren et al. 2013). Quelques critiques peuvent être apportées à cette étude, notamment le fait qu'au moins certaines différences observées entre l'homme et la souris pourraient refléter l'hétérogénéité et l'impact de l'intervention thérapeutique sur les patients humains plutôt que la stricte différence de réponse inter-espèce. De plus, en analysant différemment les mêmes lots de données, en ne se focalisant plus sur les gènes significativement modulés seulement chez l'homme mais en comparant ceux dont l'expression a significativement changé chez l'homme et la souris, une autre équipe a tiré des conclusions différentes. Sachant que les souris n'imiteraient qu'une part des aspects de la pathologie humaine, les auteurs ont montré qu'une partie des gènes dont l'expression est significativement augmentée dans ces trois conditions sont communs entre l'homme et la souris (Takao and Miyakawa 2015). Le modèle murin n'est donc pas parfait mais semble tout de même partiellement corrélé avec ce qui est observé chez l'homme. Cependant, ces différentes données incitent les chercheurs à être suffisamment critiques quant au choix du modèle utilisé ainsi qu'à l'analyse et l'extrapolation des résultats obtenus avec des modèles murins au problème du sepsis clinique humain.

L'autre modèle de sepsis murin le plus couramment utilisé est la ligature et ponction caecale (CLP). Ce procédé chirurgical induit la translocation de bactéries intestinales dans la cavité péritonéale, générant un foyer infectieux et une inflammation massive. Ce modèle est plus compliqué à mettre en place que l'injection d'endotoxines mais il est autant reproductible s'il est bien exécuté. L'avantage de ce modèle de sepsis polymicrobien est qu'il permet de suivre la complexité de la progression d'un sepsis induite par différentes souches de micro-organismes entériques viables et à la signature moléculaire complète. La CLP reproduit les modifications dynamiques dans la fonction cardio-vasculaire observées chez l'homme mais aussi dans les dysfonctions immunitaires, avec une inflammation excessive (SIRS) et une immunosuppression persistante (CARS) (Wichterman, Baue et al. 1980, Nemzek, Hugunin et al. 2008, Pastille, Didovic et al. 2011). Bien que le modèle de la CLP ait plusieurs avantages, ce modèle ne reproduit pas la principale porte d'entrée des pathogènes impliqués dans le sepsis humain que représentent les poumons. Dans leur ensemble, les modèles murins du sepsis présentent également quelques limitations. D'abord, les patients septiques reçoivent de nombreux soins comme la respiration mécanique, la dialyse, l'administration d'agents

vasopresseurs, d'antibiotiques et de nutriments, pouvant avoir un impact sur la pathophysiologie du syndrome. Aussi, chez l'homme, ce syndrome touche très majoritairement des personnes affaiblies ou aux extrêmes de l'âge. Or les études faites sur les modèles murins emploient très souvent de jeunes adultes sans co-morbidités. Pour conclure, les modèles murins du sepsis peuvent être très utiles pour améliorer notre compréhension des mécanismes pathophysiologiques induits au cours du syndrome, bien qu'ils ne montrent qu'une corrélation partielle avec ce qui est observé chez l'homme. Il faut cependant rester vigilant quant à l'application chez l'homme des résultats obtenus chez la souris.

II. Les LPS : molécules ubiquitaires et hétérogènes

Les lipopolysaccharides bactériens (LPS), parfois appelés endotoxines, sont les composants majoritaires de la paroi des bactéries à Gram négatif et sont de très puissants activateurs du système immunitaire. Les termes LPS et endotoxines ne sont pas strictement synonymes, bien qu'ils soient parfois utilisés de manière interchangeable. Le LPS désigne la molécule glycolipidique purifiée alors que le terme endotoxine suggère souvent la présence d'autres molécules de la paroi bactérienne comme des protéines, des lipides ou encore des polysaccharides. Les molécules de LPS sont abondamment présentes dans notre environnement immédiat et notre flore commensale. En cas de présence de ces molécules dans le sang, notamment suite à une infection systémique, on parle d'endotoxémie. Le LPS est une molécule amphiphile composée d'une partie polysaccharidique hydrophile (l'antigène O et le noyau) et d'une région lipidique hydrophobe (le lipide A) (Figure 3c). Ces glycolipides contribuent à l'intégrité structurelle et à l'imperméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ce sont des molécules très répandues, notamment au niveau de notre flore commensale. L'antigène O, élément le plus distal de la bactérie, est un polymère de glycanes qui confère la spécificité antigénique des souches et permet leur sérotypage en fonction de sa composition. Il est composé d'unités de un à huit résidus répétés jusqu'à 50 fois. Une chaîne courte ou absente donnera aux colonies bactériennes un aspect rugueux alors qu'une longue chaîne induit un aspect plus lisse. Le noyau est un oligosaccharide au minimum composé d'un résidu d'acide 3 deoxy-D-manno-octulosonique (Kdo) qui est un sucre caractéristique du LPS. Il permet la liaison entre le lipide A et l'antigène O. Enfin, le lipide A permet l'ancrage des LPS dans la membrane externe de la bactérie. Cette partie est la plus conservée et est responsable de l'effet immunostimulant des LPS. Elle est constituée d'un disaccharide relié à plusieurs chaînes d'acides gras. Le nombre et la taille de ces

groupements acylés ainsi que la phosphorylation du disaccharide sont des déterminants majeurs de l'immunogénicité des LPS. Par exemple, le lipide A hexa-acylé d'*Escherichia coli* est un puissant immunostimulant alors que son précurseur, le lipide IVa, et l'analogue synthétique eritoran, tous deux tétra-acylés, ne sont pas pyrogènes (Figure 4). De plus, le lipide A de *Salmonella enterica* serovar *Minnesota*, très proche de celui d'*E. coli* auquel il manque un groupement phosphate, est lui aussi non pyrogène (Figure 4a et 4c) (Bryant, Spring et al. 2010) (Beutler and Rietschel 2003).

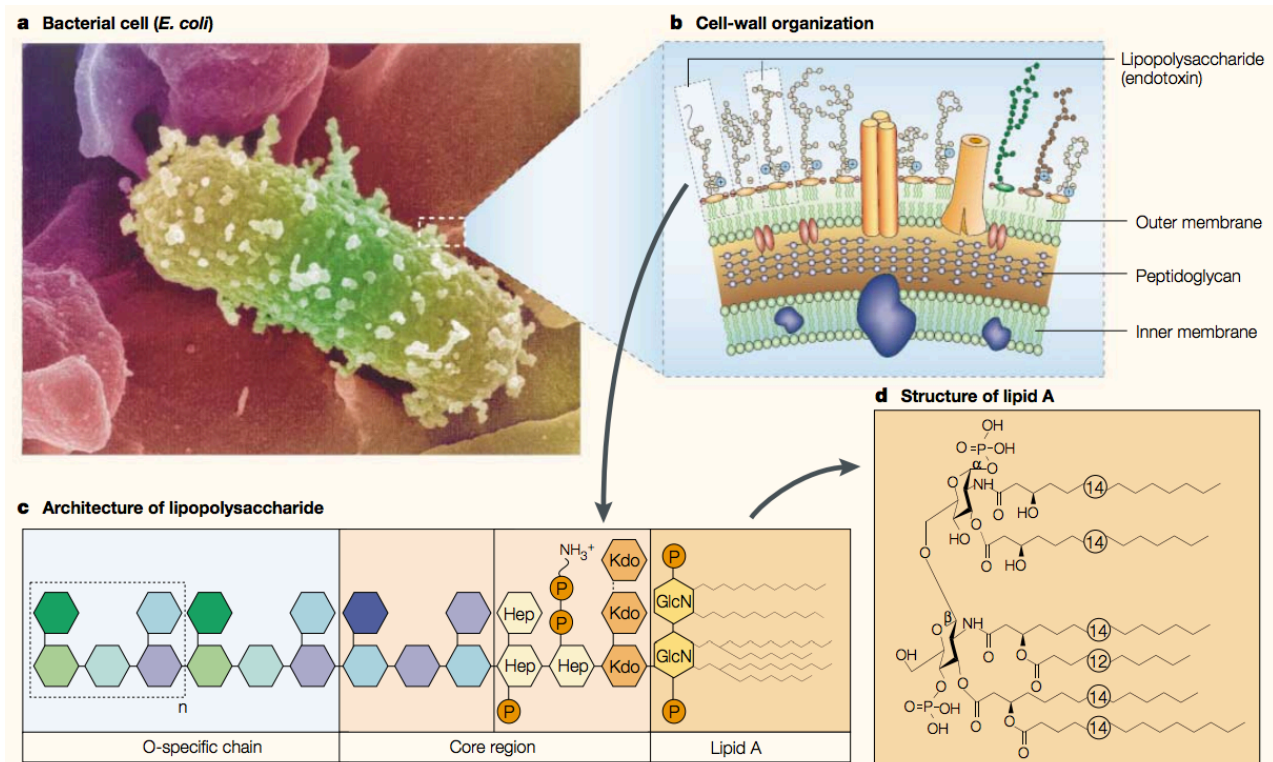
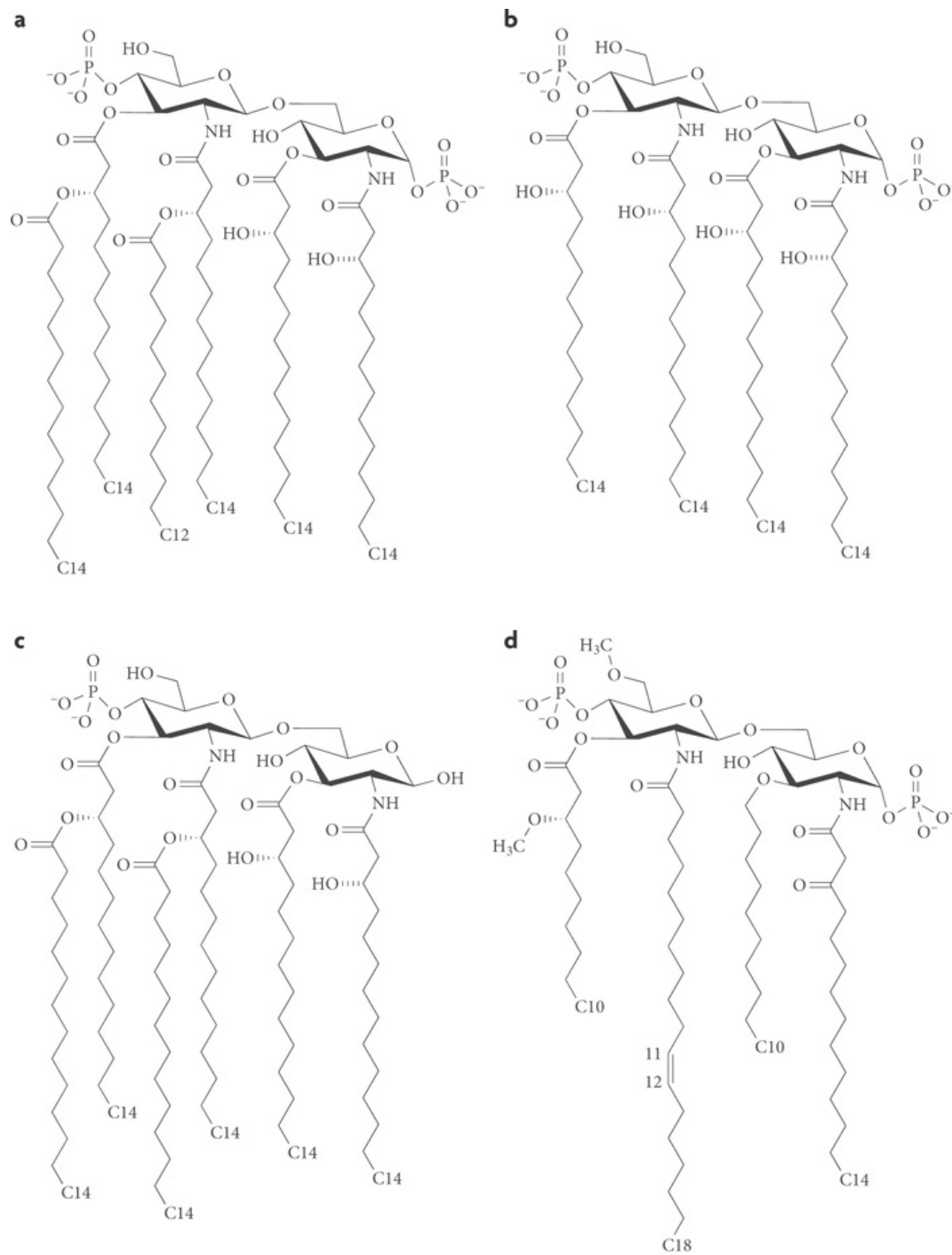


Figure 3 : Structure pariétale d'une bactérie à Gram négatif. a. Image d'une bactérie à Gram négatif (*Escherichia coli*) obtenue par microscopie électronique. **b.** Architecture schématique de la membrane externe de la bactérie. **c.** Structure schématique des LPS. **d.** Structure schématique du lipide A. (Beutler and Rietschel 2003).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 4 : Structures des lipides A. a. Lipide A d'*Escherichia coli*. b. Précurseur du lipide A d'*Escherichia coli* (Lipide IVa). c. Lipide A de *Salmonella enterica* serovar Minnesota. d. Analogue synthétique du lipide A eritoran (E5564). (Bryant, Spring et al. 2010).

Avec la pression de sélection due au système immunitaire, il est facilement imaginable que les bactéries pathogènes aient mis en place des mécanismes d'échappement via l'altération de la biosynthèse des LPS grâce à diverses phosphatases et acyltransférases. En effet la stratégie de modification structurelle du lipide A est parfois nécessaire à l'infection par diverses bactéries à Gram négatif : afin d'échapper au système immunitaire, *Helicobacter pylori* possède un lot d'enzymes capables d'enlever un groupement phosphate du disaccharide de son lipide A. Ceci conduit à diminuer les charges négatives des LPS et donc la susceptibilité de ces bactéries face aux peptides antimicrobiens cationiques. Cette déphosphorylation du lipide A induit également une forte diminution de l'activité immunostimulante des LPS et donc de leur détection par le système immunitaire de l'hôte. L'importance de ce mécanisme dans la virulence d'*Helicobacter pylori* est soulignée par le fait que les mutants déficients pour les enzymes impliquées dans cette déphosphorylation sont incapables de coloniser la muqueuse gastrique, contrairement à leurs homologues Wild Type (WT) (Cullen, Giles et al. 2011). *Shigella flexneri* a aussi la capacité de modifier son lipide A pour diminuer son immunogénicité. Au cours de sa réplication intracellulaire au sein des cellules épithéliales, les LPS produits par *S. flexneri* sont hypo-acylés et sont beaucoup moins immunogènes par rapport aux formes produites par la bactérie extracellulaire (Paciello, Silipo et al. 2013). Enfin, *Yersinia pestis* modifie également ses LPS en fonction de son environnement. Selon la température, son lipide A est plus ou moins acylé et donc plus ou moins immunogène. À 37°C, la température corporelle de son hôte, *Y. pestis* produit un LPS hypo-acylé par rapport à celui produit à une température proche de 20°C, qui lui est hexa-acylé. *Y. pestis* produit donc un LPS ayant une immunogénicité plus faible lorsqu'il infecte son hôte, lui permettant de ne pas être reconnu par le système immunitaire. Une forme mutante de *Y. pestis* produisant un LPS hexa-acylé à 37°C induit une forte réponse immunitaire et conduit à une perte considérable de virulence (Montminy, Khan et al. 2006). Ces exemples ne sont pas exhaustifs mais suggèrent l'importance de la détection des LPS dans l'activation du système immunitaire en réponse à l'infection par une bactérie à Gram négatif.

Chapitre 2. Signalisation des LPS

Comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, les LPS sont de puissants activateurs du système immunitaire impliqués en cas d'infection par des bactéries à Gram négatif. Leurs effets pyrogènes sont induits dès leur reconnaissance par divers récepteurs impliqués dans différentes voies de signalisation. Les conséquences majeures de l'endotoxémie sont les suivantes :

- Activation du système du complément aboutissant à la formation du Complexe d'Attaque Membranaire (MAC) et d'anaphylatoxines favorisant le chimiotactisme et l'inflammation.
- Activation du *Toll Like Receptor 4* (TLR4) qui aboutit à l'expression de nombreux gènes immunitaires et pro-inflammatoires.
- Activation de l'inflammasome non canonique provoquant la mort cellulaire et la libération de nombreux composants pro-inflammatoires.

Toutes ces voies de signalisation sont interconnectées et permettent le couplage de la détection des LPS, ou plus généralement de PAMP, à l'inflammation et l'activation du système immunitaire inné et adaptatif afin de contrer l'infection.

I. Le système du complément

Le système du complément est une partie centrale de l'immunité innée qui forme l'une des premières lignes de défense contre les organismes étrangers ou les cellules altérées de l'hôte. Ce système emploie différentes protéines plasmatiques circulant normalement sous forme inactive et pouvant former une cascade protéolytique aboutissant à la destruction directe d'un pathogène invasif par lyse osmotique, à l'activation de la phagocytose par opsonisation et au recrutement de cellules immunitaires par chimiotactisme. La cascade du complément peut-être activée par trois voies distinctes : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. (Merle, Church et al. 2015) (Figure 5).

I. 1. La voie classique du complément

La voie classique est activée lors de la présence de complexes entre le PRR versatile C1q et un antigène (Ag). Cette molécule C1q a une forme en bouquets de fleurs présentant six extrémités pouvant chacune lier un antigène parmi plus de cent ligands identifiés, dont les

complexes immuns ou des PAMP comme les LPS (Kishore, Ghai et al. 2004, Roumenina, Popov et al. 2008) (Figure 5). C1q est retrouvé sous forme de complexe impliquant une molécule C1q liée à deux molécules de chaque zymogène (précurseur d'une enzyme) C1r et C1s. Une fois C1q lié à ses ligands, le complexe acquiert une activité protéase à serine et C1s clive alors C4 en C4a et C4b. C4a est une anaphylatoxine, médiatrice de l'inflammation et du chimiotactisme, alors que C4b a un rôle d'opsonine. Le clivage de C4 près de la surface où s'est fixé C1q induit l'exposition d'un groupement thioester de C4b lui permettant de s'ancrer de manière covalente dans la membrane à proximité immédiate du site de liaison de C1q, participant à l'opsonisation de la cible. C2 se lie alors à C4b et est ainsi clivé par C1s, induisant la formation d'un complexe membranaire C4b2b (ou C4b2a suivant l'ancienne nomenclature basée sur la taille des fragments) qui est en fait une *C3 convertase*. Ce complexe C4b2b clive le composant majeur du complément C3, en l'anaphylatoxine C3a et l'opsonine C3b qui rejoint le complexe C4b2b afin de former la *C5 convertase* C4b2b3b (Kishore, Ghai et al. 2004, Wallis, Mitchell et al. 2010, Merle, Church et al. 2015). Ce complexe clive alors C5 en l'anaphylatoxine C5a et le fragment C5b. Ce fragment C5b peut ensuite s'associer aux protéines C6, C7, C8 et C9 formant ainsi le complexe d'attaque membranaire (MAC) induisant la rupture de la membrane cible (Müller-Eberhard 1985, Serna, Giles et al. 2016) (Figure 5). Bien que la lyse des cellules ou des pathogènes cibles soit souvent vue comme le rôle principal du MAC, beaucoup de pathogènes sont protégés de cette lyse grâce à leur architecture pariétale (comme les bactéries à Gram positif) ou en employant des stratégies d'évasion interférant avec sa formation (Lambris, Ricklin et al. 2008). Cependant, le MAC a aussi un rôle dans la signalisation « non létale », induisant l'activation des phagocytes et la libération de médiateurs de l'inflammation comme le TNF, les prostaglandines E2 (PGE2) ou les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Hänsch, Seitz et al. 1984).

I. 2. La voie des lectines et la voie alterne

La voie des lectines a un fonctionnement similaire à la voie classique. Les protéines *mannose-binding lectin* (MBL) et ficolines agissent en tant que PRR reconnaissant des carbohydrates. Ces PRR sont associés avec les protéines *MBL-associated serine proteases* (MASP) montrant des similarités structurales avec les protéines C1r et C1s. Suite à l'activation de ces lectines, MASP-2 clive C4 puis C2, aboutissant ainsi à la formation des opsonines, des anaphylatoxines et du MAC, comme pour la voie classique (Rawal, Rajagopalan et al. 2008) (Figure 5).

La voie alterne, représente, malgré son nom, jusqu'à 80% de l'activation totale du complément, même en condition infectieuse (Harboe and Mollnes 2008). La protéine plasmatique C3 peut se cliver spontanément au niveau d'un groupement thioester et de petites quantités de $C3_{H2O}$ sont produites continuellement. Ce $C3_{H2O}$, tout comme le C3b, peut se lier au facteur B pour former le complexe C3bB. Le facteur D clive alors le facteur B pour ne garder que le fragment Bb, formant ainsi le complexe C3bBb ayant une activité *C3 convertase* homologue à celle du complexe produit avec les voies classiques et des lectines. Ce complexe C3bBb peut alors cliver d'autres protéines C3 formant de nouveaux complexes avec le facteur B et aboutissant à de nouvelles *C3 convertase* : c'est la boucle d'amplification. Si les niveaux de C3b restent élevés, celui-ci peut alors se fixer au complexe C3bBb formant ainsi une *C5 convertase* permettant la formation de l'anaphylatoxine C5a et du MAC (Nilsson and Nilsson Ekdahl 2012) (Figure 5).

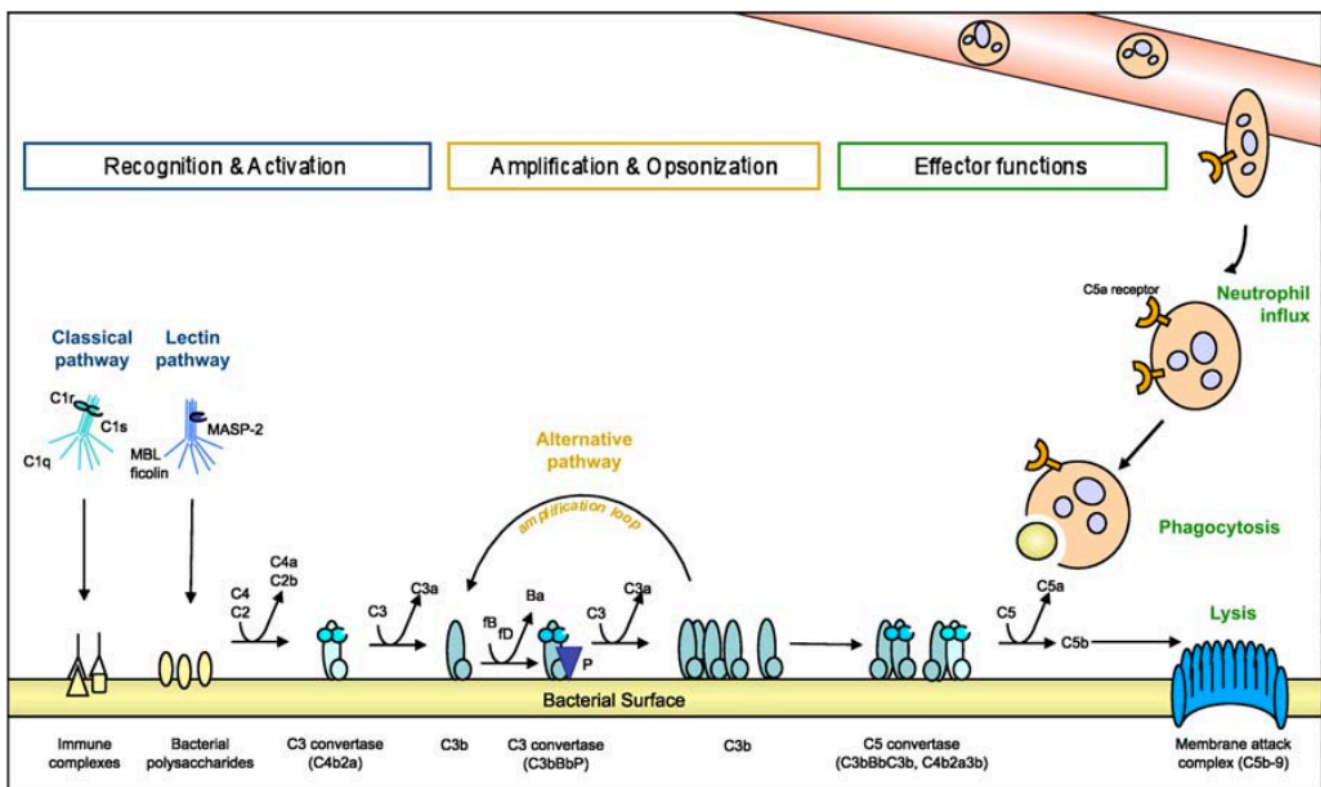


Figure 5 : Représentation schématique du système du complément. L'activation des molécules C1 ou MASP par leurs ligands respectifs induit le clivage de la molécule C3 par la formation d'une *C3 convertase* sur la membrane cible, accéléré par la boucle d'amplification. Le fragment C3b se fixe alors sur le complexe *C3 convertase* qui acquiert alors une activité *C5 convertase* qui permet la formation du Complexe d'Attaque Membranaire (MAC) et la lyse osmotique de la cible. D'autre part, le clivage de C5 induit la génération de la puissante anaphylatoxine C5a permettant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires et la phagocytose. (Laarman, Milder et al. 2010).

I. 3. Régulation du complément

Afin de ne pas activer continuellement la production de ces effecteurs terminaux, le facteur H plasmatique se lie au C3b en compétition avec le facteur B. Ce facteur H est l'un des cofacteurs du facteur I permettant la dégradation de C3b inactif et l'inhibition de la boucle d'amplification (Rodríguez de Córdoba, Esparza-Gordillo et al. 2004). Nécessitant une fine régulation, le système du complément est parfois impliqué dans le développement de maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaque (Storch, Piddlesden et al. 1998, Linton and Morgan 1999). Aussi certaines bactéries ont mis en place des voies de subversion pour contrer l'activation du complément (Potempa and Pike 2009). Par exemple, les bactéries à Gram négatif *Neisseria meningitidis* peuvent recruter le facteur H de l'hôte au niveau de leur membrane, les protégeant ainsi de la phagocytose et du MAC (Schneider, Prosser et al. 2009).

Il semble que les voies du complément soient directement impliquées dans la pathogenèse du sepsis. En effet, la déficience en C3, empêchant la grande majorité des fonctions du complément, augmente significativement la mortalité dans des modèles murins de sepsis polymicrobien. A l'inverse, l'inhibition de C5a améliore la survie des animaux septiques (Markiewski, DeAngelis et al. 2008, Rittirsch, Flierl et al. 2008). Ceci suggère que le complément pourrait avoir différents rôles dans la progression du sepsis, autant dans la défense de l'organisme contre les agents infectieux que dans l'exacerbation de la réponse immune. De plus, dans le cas de patients atteints de sepsis à bactéries à Gram négatif, une étude a mis en évidence que la cascade du complément est activement initiée par la lectine MBL reconnaissant les LPS. Dans le cas de sepsis à bactéries à Gram positif, la cascade est initiée par C1q pouvant se lier aux complexes immuns ou à la surface bactérienne (Dumestre-Pérard, Doerr et al. 2007). Enfin, le complément semble permettre l'amplification de l'activation de l'inflammasome non canonique dépendant de la caspase-11 (dont nous discuterons dans le Chapitre 2 III.2.), augmentant ainsi la susceptibilité à l'endotoxémie (Napier, Brubaker et al. 2016). L'activation des voies du complément semble donc être impliquée dans la défense de l'organisme envers les micro-organismes pathogènes mais elle pourrait aussi l'être dans les différents symptômes observés au cours d'un sepsis.

II. Les récepteurs de type Toll

Les *Toll Like Receptors* (TLR) forment la classe de PRR transmembranaires la mieux caractérisée à ce jour, exprimés par un grand nombre de types cellulaires hématopoïétiques ou structuraux. La molécule Toll fut initialement décrite pour être impliquée dans le développement de l'axe dorso-ventral chez la drosophile. C'est en 1996 que l'équipe de Jules Hoffman découvre que ces molécules possèdent également des propriétés anti-fongiques (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Cette étude aura contribué à la description de récepteurs homologues chez l'homme, les TLR, impliqués dans l'immunité innée et la reconnaissance des PAMP (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Ces récepteurs permettent la reconnaissance de divers motifs moléculaires et induisent l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation et l'activation des cellules immunitaires.

II. 1. Structure et localisation des TLR

Le domaine extracellulaire des TLR est formé de motifs répétitifs riches en Leucine (LRR) permettant l'interaction avec leurs différents ligands. Le domaine cytoplasmique, nommé domaine *Toll-Interleukin Receptor* (TIR), permet quant à lui la signalisation intracellulaire. Du fait de la grande homologie de leur domaine intracellulaire, les TLR font partie d'une superfamille incluant les récepteurs à l'interleukine-1 (IL-1R) (Figure 6).

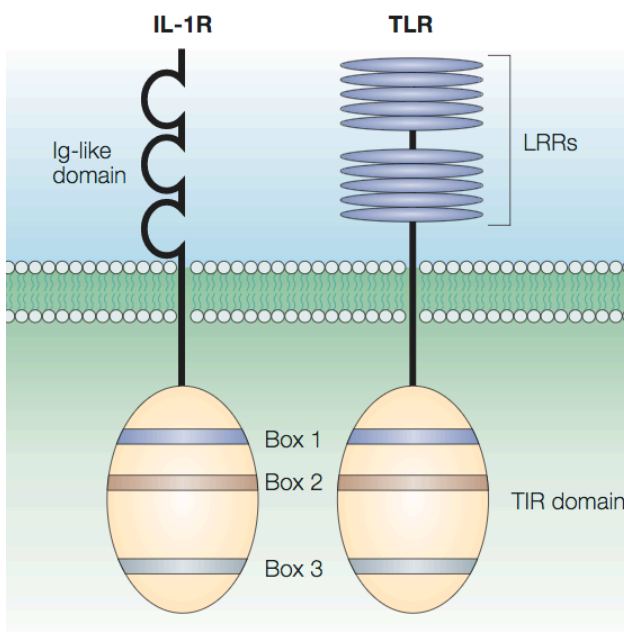
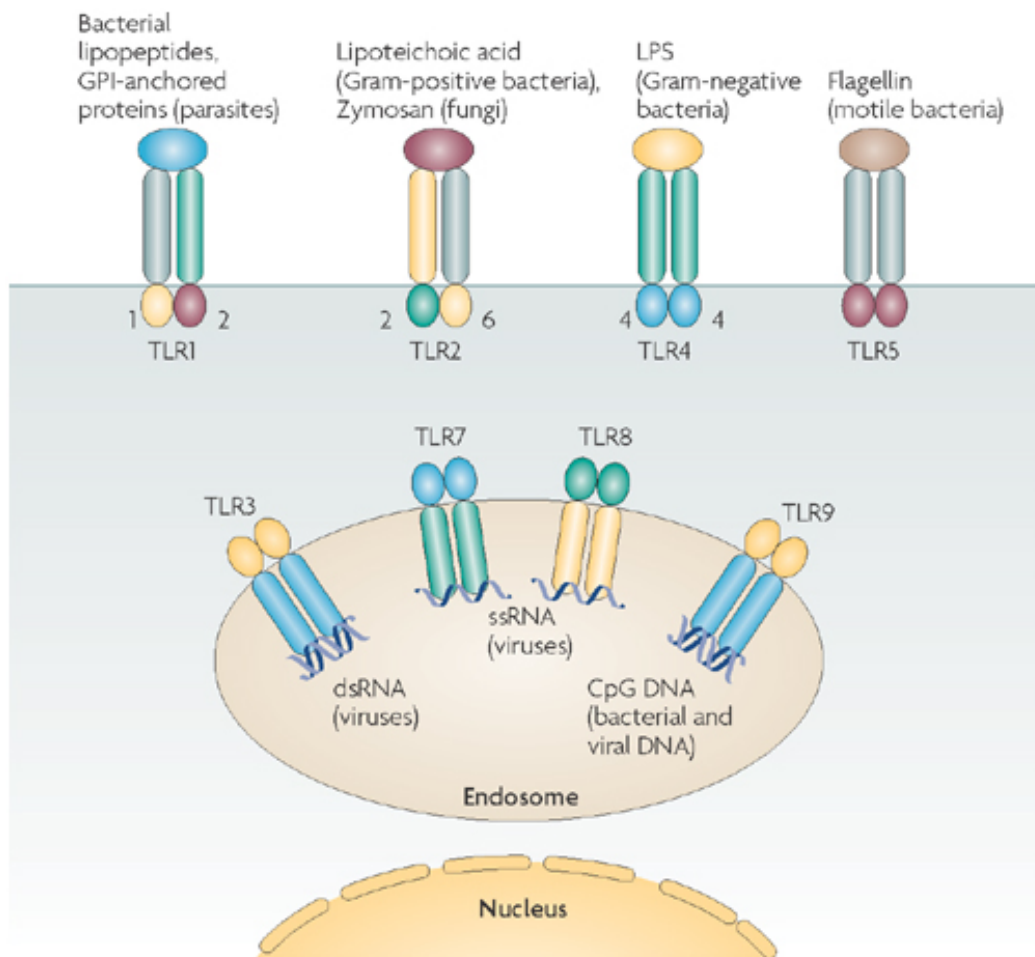


Figure 6 : Structure des TLR. La partie extracellulaire du TLR est appelée *Leucine Rich Repeat* (LRR) et reconnaît les différents ligands. La partie cytoplasmique est partagée avec les récepteurs à l'interleukine de type I et sert à la transduction du signal. (Akira and Takeda 2004).

Chaque TLR présente une spécificité propre pour des DAMP ou des PAMP bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires et reconnaît certains ligands bien définis (Figure 7). Par exemple, le TLR2 détecte des composants de la paroi des bactéries à Gram positif et des champignons comme les zymosanes ou l'acide lipotéichoïque, alors que le TLR4 est impliqué dans la reconnaissance des LPS, composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Takeuchi, Hoshino et al. 1999). Ces deux récepteurs cités précédemment sont localisés au niveau de la membrane cellulaire afin de scanner le microenvironnement, cependant il existe aussi des TLR intracellulaires. Par exemple, le TLR3, localisé au niveau des endosomes, reconnaît la présence d'ARN double brins, retrouvé dans certaines familles de virus (Alexopoulou, Holt et al. 2001).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figure 7 : Représentation schématique des TLR et leurs ligands. Ces récepteurs transmembranaires sont localisés au niveau de la membrane plasmique ou des endosomes. Les ligands spécifiques sont notés au niveau de la région LRR de chaque TLR. (Borden, Sen et al. 2007).

II. 2. Signalisation du TLR4

L'importance du TLR4 dans la reconnaissance des LPS bactériens a été mise en évidence par des études sur des lignées murines mutantes, notamment les lignées C3H/HeJ et C57BL/10ScCr qui n'expriment pas de TLR4 fonctionnel. Ces souris présentent une résistance accrue aux endotoxines ainsi qu'une susceptibilité plus élevée aux infections par les bactéries à Gram négatif (Poltorak, He et al. 1998, Qureshi, Larivière et al. 1999, Beutler 2000).

La liaison du LPS au TLR4 n'est pas directe et passe par l'action ordonnée de quatre protéines extracellulaires et membranaires. Ces protéines ont pour rôle d'altérer sa présentation physique et de le transférer au TLR4. D'abord, la protéine soluble *LPS-binding protein* (LBP) a la capacité d'interagir efficacement avec des interfaces riches en LPS, notamment les membranes externes des bactéries à Gram négatif ou des agrégats d'endotoxines. Celle-ci subit alors un changement de conformation lui permettant d'extraire des monomères individuels de LPS et de les transférer à la protéine CD14 qui est retrouvée sous forme soluble ou exprimée à la membrane de certaines cellules (Gioannini, Zhang et al. 2002, Gioannini, Teghanemt et al. 2007). Le LPS est ensuite transféré au complexe MD-2/TLR4 ce qui induit alors la formation d'un homodimère. Ceci conduit à un changement de conformation de la partie intracellulaire TIR du TLR qui aboutit à l'activation de ce domaine (Figure 8) (Maeshima and Fernandez 2013).

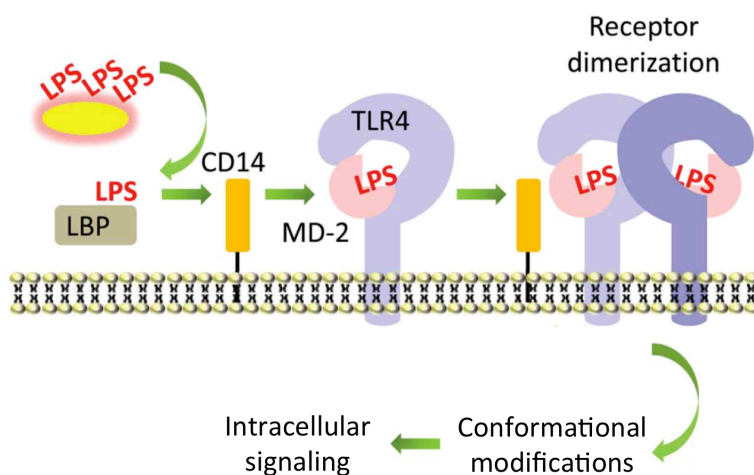


Figure 8 : Activation du TLR4. Le LPS est extrait de la membrane bactérienne par la protéine LBP qui le transfère au complexe MD2/TLR4 via CD14. Ceci conduit à la dimérisation de TLR4 et à son activation (Maeshima and Fernandez 2013).

L'activation des domaines TIR du dimère conduit à la formation d'une plate-forme de signalisation et au recrutement de différentes molécules adaptatrices qui partagent toutes ce domaine TIR. Deux adaptateurs majoritaires sont caractérisés : *Myeloid differentiation*

primary response 88 (MyD88) et *TIR domain containing adaptator inducing IFN β* (TRIF). MyD88 est recruté par tous les TLR excepté TLR3, qui recrute exclusivement TRIF. La particularité du TLR4 est qu'il peut recruter à la fois MyD88 et TRIF (Figure 9) (Scanga, Aliberti et al. 2002, Fitzgerald, Rowe et al. 2003).

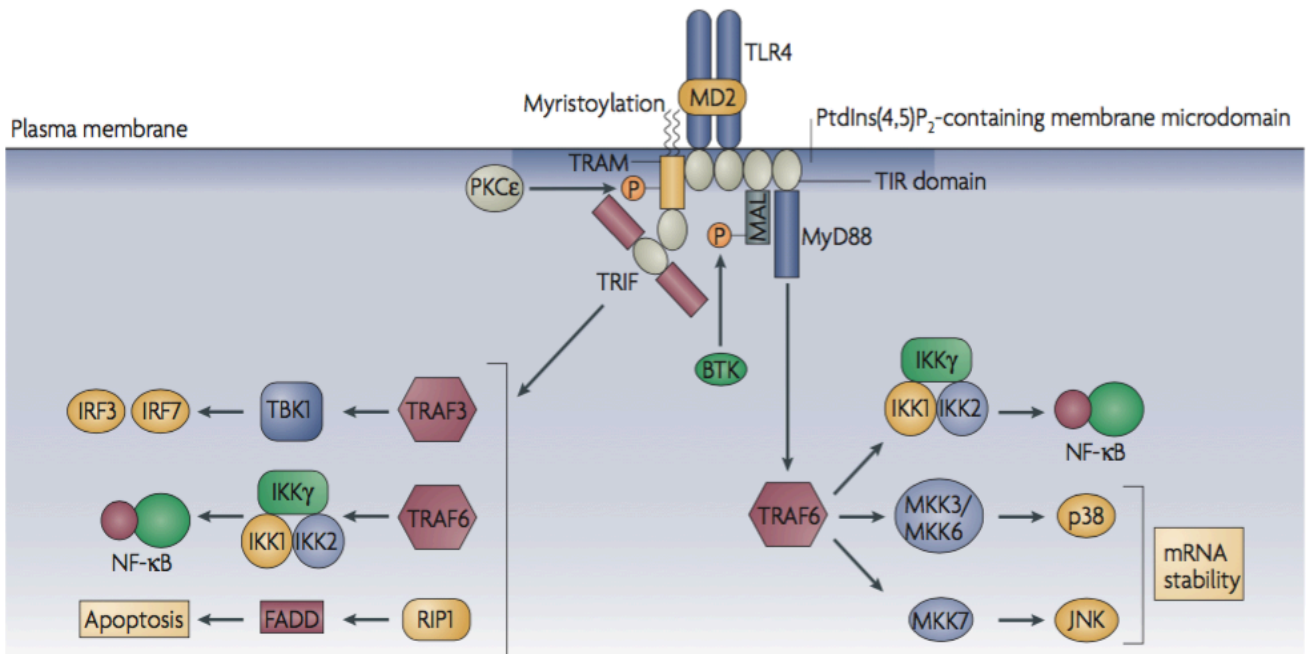


Figure 9 : Signalisation du TLR4. L'activation du TLR4 induit la formation d'une plateforme de signalisation au niveau du domaine TIR. Le recrutement de MyD88 induit l'activation de NF κ B et des voies MAPK p38 et JNK. Le recrutement de TRIF induit l'activation de NF κ B, la production d'interférons de type I et l'apoptose. Adapté de (O'Neill and Bowie 2007)

MyD88 peut directement être recruté au niveau des domaines TIR des TLR activés. Cependant, pour les TLR2 et 4, une protéine adaptatrice supplémentaire est nécessaire. Celle-ci, nommée MyD88-adaptator-like (MAL), fait le lien entre le domaine TIR activé du TLR et celui de MyD88 (Fitzgerald, Palsson-McDermott et al. 2001, Yamamoto, Sato et al. 2002). Pour être recruté et recruter MyD88, MAL doit être activé par la kinase *Bruton's tyrosine kinase* (BTK) (Gray, Dunne et al. 2006) (Figure 9). MyD88 permet ensuite via sa partie *Death Domain* (DD) le recrutement des protéines membres de la famille IRAK (*IL-1R associated kinase*), IRAK4 puis IRAK1/2, eux mêmes recrutant la protéine *Tumour necrosis-factor* (*TNF*)-*Receptor-Associated Factor 6* (TRAF6). Le recrutement de l'ubiquitine ligase TRAF6 permet l'activation des kinases IKK (*I κ B kinases*) qui phosphorylent la protéine I κ B. Cette dernière masque les signaux de localisation nucléaire des facteurs de transcription NF κ B, les séquestrant ainsi sous forme inactive dans le cytoplasme. La phosphorylation d'I κ B par les kinases IKK induit la libération des protéines NF κ B, alors libres de migrer dans le noyau et d'activer l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la survie cellulaire, la

différenciation, la prolifération, l'inflammation et l'immunité (Israël 2010, Newton and Dixit 2012). Le recrutement de TRAF6 conduit aussi à l'activation des voies *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38, ERK et JNK. Ces kinases affectent principalement la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire mais aussi la production de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires (Kim, Sano et al. 2008, Das, Sabio et al. 2009) (Figure 9).

L'adaptateur TRIF, recruté lui aussi par les domaines TIR du TLR4 activé, contrôle la voie de signalisation indépendante de MyD88 et est responsable de la production d'interférons (IFN) de type I et de l'activation tardive de NF κ B. Cet adaptateur peut-être directement recruté au niveau du domaine TIR du TLR activé, c'est le cas pour la signalisation du TLR3. Cependant, tout comme MyD88, TRIF nécessite un adaptateur supplémentaire pour être recruté par le TLR4 : *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM). Cet adaptateur fait le lien entre le domaine TIR activé et TRIF et doit être phosphorylé par la kinase *Protein Kinase C ϵ* (PKC ϵ). (Yamamoto, Sato et al. 2003, McGettrick, Brint et al. 2006). TRIF recrute ensuite TRAF6 et RIP1 afin d'activer les facteurs de transcription NF κ B. En plus d'être impliqué dans l'activation de NF κ B, RIP1 a un rôle direct dans l'induction de l'apoptose via un mécanisme dépendant des protéines FADD et Caspase-8 (Han, Su et al. 2004) (Figure 9). TRIF permet aussi le recrutement de la kinase *TANK-binding kinase-1* (TBK1) activant les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 et la production subséquente d'IFN de type I (Sato, Sugiyama et al. 2003, Han, Su et al. 2004, Cusson-Hermance, Khurana et al. 2005) (Figures 9 et 10).

Pour des cellules déficientes pour le gène MyD88, l'activation de NF κ B est retardée suite à l'activation du TLR4. Par contre la production d'interférons reste inchangée (Covert, Leung et al. 2005, Werner, Barken et al. 2005). Avec des cellules déficientes à la fois pour MyD88 et TRIF, l'activation de TLR4 n'induit plus du tout l'activation des voies NF κ B et IRF3 et les gènes normalement induits par la stimulation aux LPS ne le sont majoritairement plus (Hirotsani, Yamamoto et al. 2005). Il semble donc que les deux adaptateurs fonctionnent de manière séquentielle. La première partie du signal aurait lieu au niveau de la membrane plasmique suite à l'activation du TLR4. L'adaptateur MAL serait alors recruté, permettant le recrutement de MyD88, initiant l'activation de la voie NF κ B (Kagan and Medzhitov 2006). Le TLR4 serait ensuite endocyté et le second signal aurait lieu au niveau des endosomes où TRIF serait recruté via TRAM et induirait l'activation tardive de NF κ B et la production d'IFN de type I (Kagan, Su et al. 2008).

Les IFN de type I sont des cytokines impliquées dans divers processus immunologiques au cours d'infections virales ou bactériennes, contribuant à l'activation comme à la régulation du système immunitaire. La famille des IFN de type I est hétérogène et comprends les IFN β et une vingtaine d'IFN α . Ces cytokines sont produites par de nombreux types cellulaires, notamment les cellules immunitaires mais aussi les fibroblastes et les cellules épithéliales. Cependant, une distinction importante est à faire entre les cellules produisant une faible quantité d'IFN et affectant l'immunité locale à celles ayant une capacité de production très élevée et induisant une réponse systémique (Levy 2002, Bogdan, Mattner et al. 2004, Prakash, Smith et al. 2005). La production d'IFN de type I suite à l'activation de TRIF conduit à l'activation autocrine et paracrine des récepteurs *interferon- α/β receptor* (IFNAR). Ces récepteurs sont composés des sous unités IFNAR-1 et -2, constamment associées dans leurs parties cytoplasmiques avec les membres de la famille des *Janus kinases Tyrosine Kinase 2* (TYK2) et *Janus Kinase 1* (JAK1), respectivement (Figure 10). La liaison d'un ligand aux récepteurs IFNAR induit une phosphorylation dans leur partie cytoplasmique, permettant de recruter les protéines *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-1 et STAT2. Ceux-ci sont alors phosphorylés par TYK2 et JAK1, ce qui permet l'activation de leurs fonctions de facteurs de transcription après le recrutement d'IRF9, formant ainsi le complexe *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3). Ce complexe formé des protéines STAT1 et 2 phosphorylées et d'IRF9 peut alors se fixer sur des séquences d'ADN contenues dans les promoteurs de différents gènes induits par les IFN et nommées *IFN-stimulated response element* (ISRE). L'activation de ces promoteurs permettra alors l'expression d'un grand nombre de gènes de l'immunité innée et adaptative mais aussi la production de nouveaux IFN de type I via l'expression et la phosphorylation d'IRF7, induisant ainsi une boucle d'amplification du signal (Figure 10) (Barchet, Cella et al. 2002, Dalod, Salazar-Mather et al. 2002, Prakash, Smith et al. 2005).

Pendant longtemps, les IFN de type I étaient connus pour être de puissants anti-viraux, cependant, leur rôle crucial dans l'endotoxémie a récemment été mis en évidence. Parmi les indices de leur implication, nous pouvons noter que les souris déficientes pour l'IFN β , IFNAR-1, TRIF, ou encore IRF3 sont résistantes au choc endotoxique létal (Mahieu and Libert 2007). De plus, la déficience en IFNAR augmente la résistance à l'endotoxémie létale, bien que ces souris soient plus sensibles au modèle de CLP, certainement à cause de la plus faible capacité à combattre l'infection (Kelly-Scumpia, Scumpia et al. 2010). Enfin, il semble que les IFN de type I soient des régulateurs cruciaux du choc endotoxique induit par le

TNF et les LPS, au moins chez la souris (Karaghiosoff, Steinborn et al. 2003, Huys, Van Hauwermeiren et al. 2009, Samarajiwa, Mangan et al. 2014).

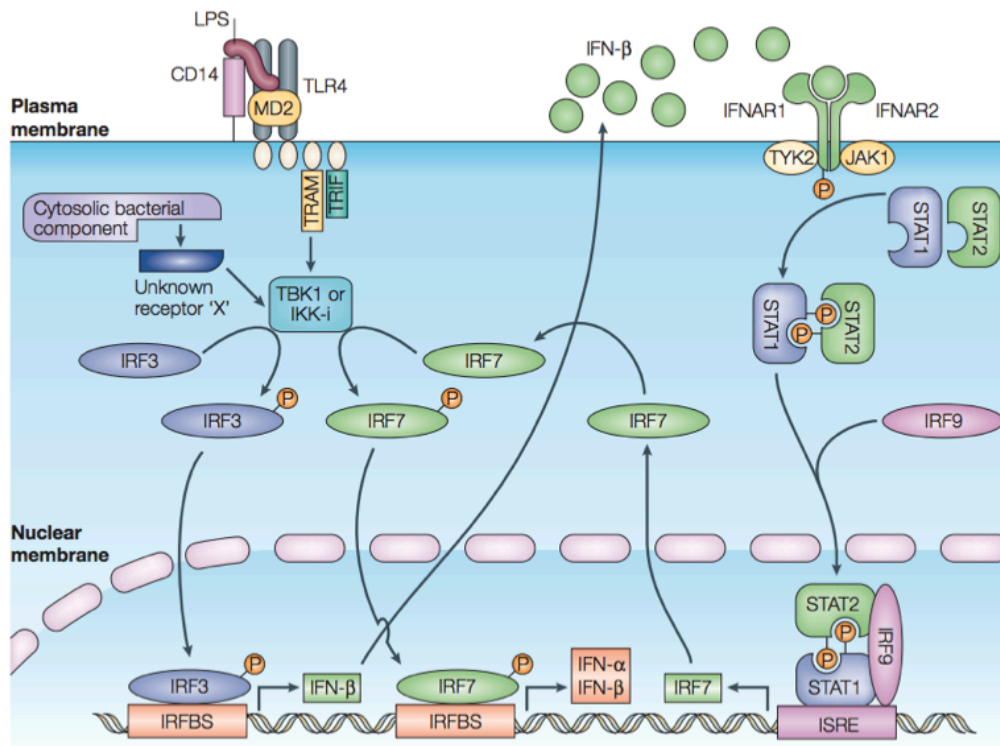


Figure 10 : Activation de la signalisation des IFN de type I par le LPS. La détection des LPS par le TLR4 induit l'activation des facteurs de transcription IRF3 et la production des IFN de type I, ligands des récepteurs IFNAR. L'activation de ces récepteurs mène à la phosphorylation de STAT1 et -2, permettant l'expression des gènes inducibles par les IFN. Parmi ces gènes, STAT7 forme une boucle d'amplification en activant de nouveau la production d'IFN de type 1 (Decker, Muller et al. 2005).

II. 3. Subversion et régulation des TLR

Les TLR permettent donc de coupler la détection de pathogènes à la mise en place de l'immunité innée puis adaptative, via la régulation de l'expression de nombreux gènes et la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I. Il n'est alors pas étonnant que certains micro-organismes aient mis en place des mécanismes de subversion afin de perturber la transduction des signaux. Par exemple, certaines bactéries à Gram négatif pathogènes, comme le genre *Yersinia* utilisent un système de transport protéique nommé *Type Three Secretion System* (TTSS) afin d'injecter des facteurs de virulence dans le cytoplasme d'une cellule cible (Costa, Felisberto-Rodrigues et al. 2015). Parmi ces protéines effectrices est par exemple injectée la *serine/threonine acetyl transferase* YopJ qui greffe un groupement acyl aux protéines IKK et MAP kinases, empêchant ainsi leur activation et bloquant la transduction du signal via les voies MAPK et NF κ B (Orth, Palmer et al. 1999, Orth, Xu et al.

2000). L'avantage pour les pathogènes de cibler les voies de signalisation en aval d'un récepteur est qu'il est possible de contrer la détection par plusieurs TLR et autres récepteurs convergeant vers l'activation de ces voies.

La capacité des TLR à mobiliser le système immunitaire pourrait les rendre néfastes pour l'hôte s'ils n'étaient pas finement contrôlés. Il a été montré que les TLR7 et 9 pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse du Lupus Erythémateux Disséminé (Marshak-Rothstein 2006), ou encore que le TLR4 peut-être impliqué dans l'exacerbation de la réponse immune Th2 aux antigènes inhalés (Dabbagh, Dahl et al. 2002, Eisenbarth, Piggott et al. 2002, Hammad, Chieppa et al. 2009). De plus, comme cela a été mentionné précédemment, les IFN de type I sont impliqués dans la susceptibilité à l'endotoxémie (Mahieu and Libert 2007). Les TLR pourraient donc avoir un rôle à double tranchant, pouvant autant être bénéfiques que délétères pour l'hôte. Pour éviter une réponse inflammatoire exacerbée et dangereuse, la signalisation des TLR est régulée par différents mécanismes, impliquant un grand nombre de régulateurs négatifs caractérisés au cours des deux dernières décennies. Il en existe différentes catégories comme les récepteurs solubles ou les régulateurs négatifs intracellulaires.

Bien que le gène du TLR4 ne soit présent qu'en un exemplaire dans le génome des mammifères, différents ARNm ont été décrits, suggérant l'existence de différents transcrits (Qureshi, Larivière et al. 1999). Une isoforme soluble du TLR4 (sTLR4) a été identifiée à l'aide d'un criblage réalisé sur une banque de cDNA provenant de macrophages murins. Ce sTRL4 présente un domaine LRR identique au TLR4 usuel mais le reste des acides aminés a une séquence homologue à 73% à celle de l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Son expression augmente après stimulation des macrophages au LPS et il est retrouvé dans le milieu extracellulaire. Transfecté dans une lignée de macrophages, ce sTLR4 induit un défaut d'activation de NF κ B et de la production de TNF α 8h après une stimulation au LPS (Iwami, Matsuguchi et al. 2000). Les mécanismes d'action de ces récepteurs solubles sont encore peu connus, l'hypothèse la plus simple étant qu'ils agiraient en compétition avec les récepteurs membranaires.

Une autre voie de régulation de l'activation des TLR passe par l'expression de régulateurs de la signalisation intracellulaire. Comme indiqué dans les paragraphes précédents, MyD88 est un adaptateur crucial dans la signalisation des TLR. Un variant d'épissage de cet adaptateur, MyD88s a été détecté dans la rate et le cerveau humain et son expression est induite par les LPS dans la lignée de monocytes humains THP-1. De plus, sa surexpression réprime la réponse aux LPS due à MyD88 (Burns, Janssens et al. 2003).

L'expression de MyD88s entraîne en fait la formation de complexes MyD88-MyD88s au lieu de l'homodimère normalement recruté. Cet hétérodimère est incapable de recruter et activer les protéines IRAK, la voie de signalisation en aval de MyD88 en est donc abolie (Burns, Janssens et al. 2003, Andrews, Miyata et al. 2015). L'ARNm de MyD88s est retrouvé chez les monocytes isolés de patients septiques. Ce mécanisme pourrait donc au moins en partie expliquer la différence de réponse entre des monocytes sains et septiques (Adib-Conquy, Adrie et al. 2006).

Un autre niveau de régulation de la signalisation des TLR passe par la réduction de l'expression de ces récepteurs. La protéine de la famille *RING-finger E3 ligases* TRIAD3A a la capacité de se lier au domaine cytoplasmique du TLR4 et de permettre son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Chuang and Ulevitch 2004). Sa surexpression induit une inhibition de l'activation des voies NF κ B suite à l'activation du TLR4 alors que son *knock down* par siRNA exacerbe la réponse aux LPS *in vitro* (Chuang and Ulevitch 2004). L'expression du TLR4 peut aussi être inhibée par des cytokines anti-inflammatoires comme le TGF β , qui induit en plus la dégradation de MyD88 par le protéasome (McCartney-Francis, Jin et al. 2004, Naiki, Michelsen et al. 2005).

Il existe donc de nombreuses voies de régulation de la signalisation du TLR4, différenciellement activées en fonction du contexte et du type cellulaire. Celles-ci suggèrent les conséquences importantes que peut avoir une activation non contrôlée de ces récepteurs. Il est cependant important de noter que certaines voies de régulations pourraient être différentes entre l'homme et la souris et que certaines réponses TLR pourraient être spécifiques à l'espèce (Rehli 2002).

III. Les inflammasomes

Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques permettant la détection d'un danger cytoplasmique, par exemple une bactérie à tropisme intracellulaire, et induisant la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation dont des cytokines et des DAMP. Divers inflammasomes ont été découverts depuis le début des années 2000, leur assemblage dépendant de l'activation de différents PRR dans le cytoplasme des cellules immunitaires ou structurelles. L'activation de ces PRR par une large gamme de ligands très divers conduit à leur oligomérisation permettant ainsi l'assemblage d'un complexe protéique et l'activation de la caspase-1. L'activité protéolytique de la caspase-1 activée induit alors la maturation des

cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 et le suicide cellulaire pro-inflammatoire nommé pyroptose, afin de faciliter la résolution de l'infection (Guo, Callaway et al. 2015).

Jusqu'à présent, cinq PRR cytoplasmiques ont été bien caractérisés pour induire l'assemblage des inflammasomes : les protéines de la famille *nucleotide binding oligomerization domain (NOD)*, *leucine-rich repeat (LRR)-containing protein (NLR) family pyrin domain-containing protein (NLRP)* NLRP1 et NLRP3, la protéine *NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC)* NLRC4, et les protéines pyrine et *absent in melanoma 2 (AIM2)*. A ces PRR formant les inflammasomes dits canoniques s'ajoute la voie non canonique récemment caractérisée qui cible la caspase-11 pour les cellules murines et les caspase-4 et 5 chez l'homme (Broz and Monack 2013, von Moltke, Ayres et al. 2013). Nous discuterons ici des inflammasomes NLRP3 et non canonique qui sont impliqués dans la détection des LPS cytoplasmiques.

III. 1. L'inflammasome canonique NLRP3

NLRP3 (aussi appelé NALP3 ou cryopyrine) est le mieux caractérisé des inflammasomes à ce jour. Il est activé par une impressionnante diversité de stimuli (Figure 11). Son activation se fait en deux étapes clés : le premier signal, que nous appellerons « *priming* » ou « activation », permet d'induire l'expression des gènes codant pour les composants de l'inflammasome, comme NLRP3 ou la pro-IL-1 β , via l'activation des TLR ou de récepteurs de cytokines induisant l'activation de NF κ B (Bauernfeind, Horvath et al. 2009). Le second signal concerne l'activation de NLRP3, induisant l'assemblage de l'inflammasome et la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18, et la pyroptose (Figure 12).

Différents composants bactériens et viraux peuvent activer l'assemblage de cet inflammasome, mais aussi des DAMP et certains composés environnementaux (Franchi, Muñoz-Planillo et al. 2012, Abderrazak, Syrovets et al. 2015) (Figures 11). Parmi les pathogènes induisant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 on peut citer les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, les streptocoques du groupe B (Mariathasan, Weiss et al. 2006, Costa, Gupta et al. 2012), ou encore les champignons comme *Candida albicans* (Hise, Tomalka et al. 2009, Joly, Ma et al. 2009). De récentes études ont également mis en évidence l'activation de NLRP3 en cas d'infection virale comme pour le virus influenza ou le virus de l'encéphalomyocardite (Ichinohe, Pang et al. 2010, Ito, Yanagi et al. 2012). L'activation de NLRP3 n'est pas restreinte aux pathogènes et de nombreux signaux

endogènes peuvent induire l'assemblage de cet inflammasome, comme les cristaux d'acide urique, normalement éliminés par les reins, ou encore l'ATP libéré lors de la nécrose (Mariathasan, Weiss et al. 2006, Martinon, Pétrilli et al. 2006). NLRP3 est également activé par certains composants environnementaux, notamment les structures cristallines ou particulières formées par la silice ou l'adjuvant hydroxyde d'aluminium (Dostert, Pétrilli et al. 2008, Eisenbarth, Colegio et al. 2008). En raison de la diversité des très nombreux stimuli induisant l'assemblage de l'inflammasome NLRP3, il semble peu probable que l'ensemble de ces ligands puisse directement se lier à NLRP3 pour induire la formation du complexe. Une question importante se pose alors sur les mécanismes exacts induisant l'activation de cet inflammasome. Malgré les récentes avancées, cette question est encore débattue.

Activator class	Activator	Disease associations
Whole pathogen	<i>Candida albicans</i>	Infection
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	Infection
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Infection
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Infection
	Influenza virus	Infection
	Sendai virus	Infection
	Adenovirus	Infection
Pathogen-associated molecules	Bacterial pore-forming toxins	Infection
	Hemozoin	Cerebral malaria
Environmental insults	Silica	Silicosis
	Asbestos	Asbestosis
	Skin irritants	Contact hypersensitivity reactions
	Ultraviolet light	Sunburn
Endogenous danger signals	ATP	Injury or necrotic cell death
	Glucose	Metabolic syndrome
	MSU	Gout
	Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)	Pseudogout
	Amyloid β	Alzheimer's disease
	Hyaluronan	Injury
Adjuvant	Alum	

*Viable (52) but not heat-killed (53) *S. cerevisiae* activates the NLRP3 inflammasome.

Figure 11 : Liste non exhaustive d'activateurs de l'inflammasome NLRP3. (Schroder, Zhou et al. 2010).

Afin d'expliquer comment ces stimuli très divers induisent l'assemblage de l'inflammasome, différents modèles d'activation qui pourraient ne pas être mutuellement exclusifs sont suggérés dans la littérature.

Dans le cas des ligands particuliers ou des structures cristallisées, comme l'alun ou l'acide urique (MSU pour *Monosodium urate*), l'inhibition de la phagocytose conduit à un défaut d'activation de NLRP3 (Franchi, Warner et al. 2009). Il semble que l'internalisation de ces composés par les phagocytes conduit à la rupture des lysosomes, induisant la libération dans le cytoplasme de ces composés et d'enzymes, comme les cathepsines, qui pourront activer directement ou non NLRP3 (Halle, Hornung et al. 2008, Hornung, Bauernfeind et al. 2008, Heid, Keyel et al. 2013).

Un autre modèle proposé implique la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), induites par de nombreux activateurs de NLRP3. Par exemple, les particules d'amiante et de silice activent cet inflammasome dépendamment de la production de ROS après leur phagocytose (Dostert, Pétrilli et al. 2008). De plus, l'ADN mitochondrial oxydé pourrait se lier directement à NLRP3 au cours de l'apoptose (Nakahira, Haspel et al. 2011, Shimada, Crother et al. 2012). Aussi, la protéine thioredoxin-interaction protein (TXNIP) a été décrite par Zhou et ses collaborateurs comme permettant de faire le lien entre les ROS et l'activation de NLRP3 (Zhou, Tardivel et al. 2010). Cette équipe a ensuite montré que l'inhibition des chaînes respiratoires mitochondriales par le roténone et l'antimycine A est suffisante pour induire l'activation de NLRP3 (Zhou, Yazdi et al. 2011). Cependant une étude précédente n'avait pas pu mettre en évidence d'activation de NLRP3 suite au traitement avec le roténone (Dostert, Pétrilli et al. 2008).

Il semble que l'efflux de potassium (K^+) soit un mécanisme majeur induisant l'activation de l'inflammasome NLRP3. La libération de K^+ dans le milieu extracellulaire est un évènement commun à de nombreux activateurs de NLRP3 et une haute concentration extracellulaire en K^+ empêche cet efflux et l'activation subséquente de l'inflammasome (Pétrilli, Papin et al. 2007). De plus, la diminution de la concentration en K^+ intracellulaire peut à elle seule induire l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (Muñoz-Planillo, Kuffa et al. 2013). Cet efflux d'ions pourrait donc être l'un des points de convergence reliant les différents stimuli à l'activation de l'inflammasome NLRP3. De récentes études ont montré que la protéine *NIMA-related kinase 7* (NEK7) pourrait jouer un rôle dans l'activation de NLRP3 via l'efflux de K^+ . NEK7 est requise pour l'activation de NLRP3 en réponse à divers stimuli et agit en aval de l'efflux de K^+ . Cette protéine semble se lier directement à NLRP3 et contrôler son oligomérisation (He, Zeng et al. 2016, Schmid-Burgk, Chauhan et al. 2016, Shi,

Wang et al. 2016) (Figure 12A). NLRP3 agirait donc comme un intégrateur de signaux cellulaires associés aux dommages tissulaires ou aux infections.

La protéine NLRP3 est composée de 3 domaines distincts. Les domaines *C-terminal leucine-rich repeat* (LRR), *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NBD) et le *N-terminal pyrin domain* (PYD). L'assemblage de l'inflammasome NLRP3 est encore très largement incompris. L'hypothèse actuelle est que le domaine *Leucine Rich Repeat* (LRR) est impliqué dans la détection des différents signaux et maintiendrait la protéine NLRP3 dans une conformation inactive (Mayor, Martinon et al. 2007). Une fois activé, NLRP3 subit un changement de conformation, permettant son assemblage via l'exposition des domaines NBD et PYD. La disponibilité du domaine NBD permet l'oligomérisation de plusieurs molécules NLRP3 via des interactions homotypiques NBD-NBD. Les protéines *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) sont ensuite recrutées via leur domaine PYD et s'oligomérisent alors en longs filaments (Lu, Magupalli et al. 2014). Le domaine CARD des protéines ASC permet alors le recrutement des zymogènes pro-caspase-1 via des interactions homotypiques CARD-CARD. Celles-ci, proches les unes des autres, peuvent alors procéder à leur auto-activation protéolytique. Les caspases-1 activées clivent ensuite les zymogènes pro-IL-1 β et pro-IL-18 en leurs formes matures (IL-1 β et IL-18), et la protéine Gasdermine D (GsdmD) dont le fragment N-terminal conduit à la pyroptose cellulaire (Figure 12). La pyroptose est un type de mort cellulaire pro-inflammatoire à la morphologie proche de la nécrose, restreinte à l'activation des inflammasomes et associée à la libération de l'IL-1 β et IL-18. L'activation de la caspase-1 induit la formation de pores membranaires permettant un flux d'ions et un influx d'eau, induisant le gonflement cellulaire puis la lyse osmotique. Cette rupture membranaire induit le déversement du contenu intracellulaire dans le microenvironnement, induisant un contexte pro-inflammatoire (Figure 13) (Bergsbaken, Fink et al. 2009, He, Wan et al. 2015). Il a récemment été montré que la formation de ces pores membranaires induits par la caspase-1 requiert le clivage de la protéine GsdmD, dont le fragment N-terminal a la capacité de s'oligomériser dans la membrane (Shi, Zhao et al. 2015, Liu, Zhang et al. 2016). Les pores ainsi formés pourraient contribuer à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires maturées par l'inflammasome, bien que les mécanismes passifs ou actifs de leur libération soient encore à étudier plus finement (Bergsbaken, Fink et al. 2009). Cependant, il se pourrait que la formation des pores et la pyroptose ne soient, dans certains cas, pas requis pour la libération des cytokines maturées par l'inflammasome (Yang, He et al. 2015). Récemment, Shi J., Gao W. et leurs collaborateurs ont proposé une définition

plus générale de la pyroptose en tant que nécrose programmée dépendante de l'activité des gasdermines (Shi, Gao et al. 2017).

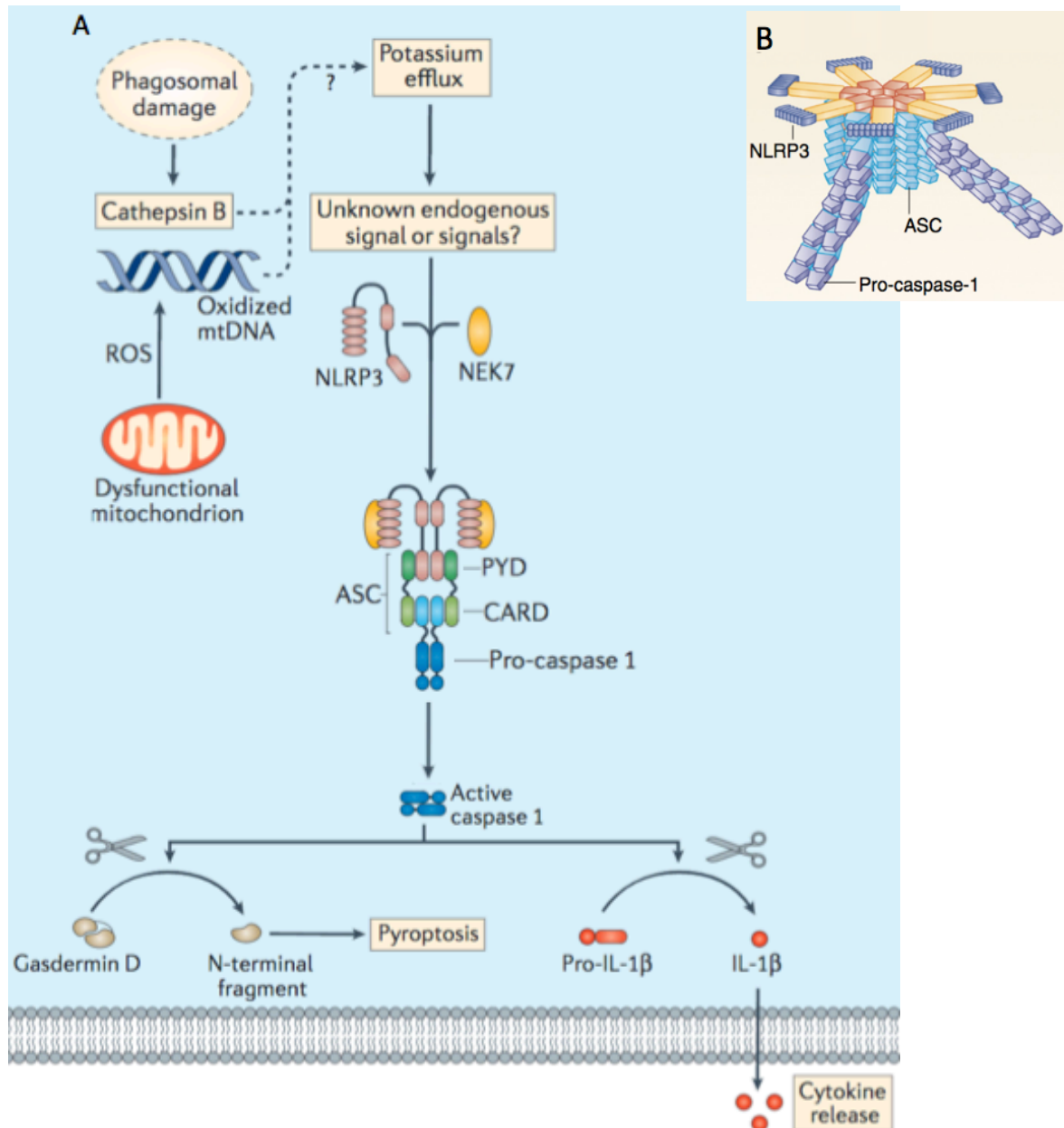


Figure 12 : Assemblage et structure de l'inflammasome NLRP3. **A.** NLRP3 peut-être activé, directement ou non, par une rupture phagosomale, des ROS, ou un efflux de potassium. Ceci entraîne le recrutement de NEK7, l'oligomérisation de NLRP3, puis le recrutement d'ASC et de la pro-caspase-1 induisant la formation du complexe. Celle-ci est clivée en sa forme mature et clive d'une part GsdmD pour induire la pyroptose et d'autre part les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. **B.** Structure de l'inflammasome NLRP3 (Guo, Callaway et al. 2015, Broz and Dixit 2016).

La mort pro-inflammatoire programmée des cellules infectées permet la destruction de niches intracellulaires protectrices des pathogènes, empêchant leur multiplication, les rendant sensibles à la destruction par phagocytose, et servant d'alarme afin de mettre en garde le système immunitaire. Cependant, les cytopénies, et notamment les leucopénies, sont observées très rapidement au cours de la progression du sepsis et sont généralement associées avec un mauvais pronostic (Crocker, O'Donnell et al. 2014). Ce mécanisme pourrait donc être délétère dans certaines conditions, privant l'organisme de certaines cellules immunitaires cruciales pour la défense de l'hôte. Le fait que la déficience en caspase-1 protège plus du sepsis dans des modèles murins que la neutralisation de l'IL1 β et de l'IL18, appuie l'importance des rôles additionnels de cette caspase inflammatoire, en plus de la maturation des cytokines (Bergsbaken, Fink et al. 2009).

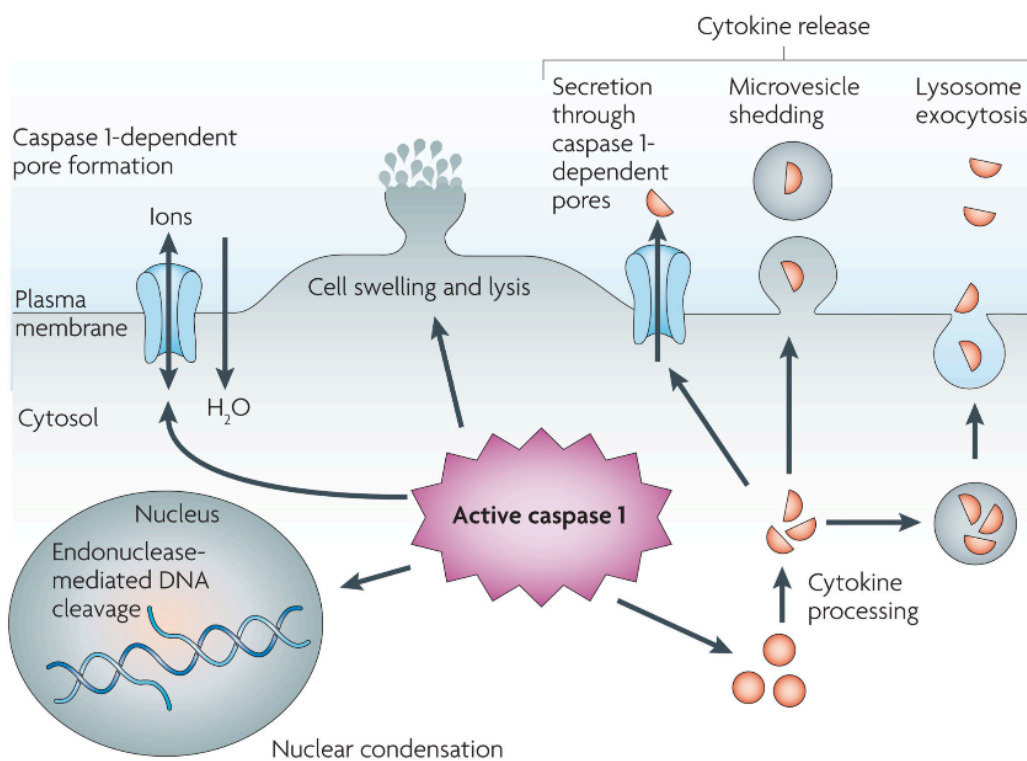


Figure 13 : Fonctions de la caspase-1. Une fois activée par les inflammasomes, la caspase-1 induit la formation de pores membranaires permettant le passage des ions et un influx d'eau induisant la lyse osmotique de la cellule. En parallèle, la caspase-1 clive les cytokines pro-inflammatoires qui seront libérées selon un mécanisme encore mal connu. La caspase-1 induit aussi l'activation d'une endonucléase permettant le clivage de l'ADN aboutissant à la condensation du noyau. Le fait que la caspase-1 soit activée par différents inflammasomes suggère l'importance de son activation en tant que mécanisme général de l'immunité innée (Bergsbaken, Fink et al. 2009).

III. 2. L'inflammasome non canonique

Jusqu'à récemment, beaucoup d'études focalisées sur l'inflammasome et la pyroptose ont utilisé une lignée murine déficiente pour la caspase-1. Cependant, il s'est avéré que ces souris portent en plus une mutation rendant non fonctionnelle la caspase-11 à cause d'un codon stop prématuré (Kayagaki, Warming et al. 2011). Les conclusions des expériences ayant utilisé ces souris et attribuant des rôles à la caspase-1 sont donc à analyser avec précaution. L'analyse de souris déficientes pour la caspase-11, mais exprimant une caspase-1 fonctionnelle, a montré son rôle crucial dans la production des cytokines pro-inflammatoires et la pyroptose en réponse à diverses bactéries à Gram négatif comme *E. coli* ou *Citrobacter rodentium*. De plus, les souris déficientes pour la caspase-11 seule sont résistantes à une injection létale de LPS et ne produisent pas de niveau détectable d'IL-1 β et d'IL18 (Kayagaki, Warming et al. 2011).

L'expression de la caspase-11 est induite par l'activation du récepteur aux IFN de type I IFNAR, conséquence notamment de l'activation de la voie TLR4-TRIF par les LPS des bactéries à Gram négatif (cf chapitre 2 paragraphe II. 2.) (Rathinam, Vanaja et al. 2012). Son expression est également amplifiée par la voie du complément, via la reconnaissance d'un produit modifié du clivage de C3 (Napier, Brubaker et al. 2016). Des études récentes ont permis de montrer que la caspase-11 a un rôle direct dans la reconnaissance des LPS intracellulaires, agissant à la manière d'une sentinelle intracellulaire exprimée en cas de la présence de PAMP, DAMP ou de cytokines pro-inflammatoires dans le micro-environnement. Cette caspase inflammatoire a la capacité de lier des molécules intracellulaires de LPS via la partie lipide A, initiant la formation d'un inflammasome non canonique induisant la pyroptose et la maturation des cytokines. Ces études ont montré que, contrairement à la libération des cytokines pro-inflammatoires, la pyroptose est indépendante de l'inflammasome NLRP3 et la caspase-1 mais dépend du clivage de GsdmD directement par la caspase-11 (Figure 14). Ce sont ces effets indépendants de la caspase-1 qui lui ont valu l'adjectif non canonique (Hagar, Powell et al. 2013, Kayagaki, Wong et al. 2013, Shi, Zhao et al. 2014, Shi, Zhao et al. 2015, Liu, Zhang et al. 2016). Cet inflammasome est initié par les LPS intracellulaires au sein de macrophages et cellules de lignées épithéliales murines mais aussi humaines. Cependant l'homme a deux homologues de la caspase-11, nommées caspases-4 et -5 (Shi, Zhao et al. 2014, Shi, Zhao et al. 2015).

Meunier et ses collaborateurs ont montré que des GTPases induites par les IFN, nommées *Guanylate-binding proteins* (GBP), permettent la lyse des vacuoles contenant des bactéries à Gram négatif, induisant la libération de LPS dans le cytoplasme et l'activation de la caspase-11 (Meunier, Dick et al. 2014). Une autre étude a montré que la protéine induite suite à l'activation d'IFNAR, IRGB10, est requise pour l'activation de la caspase-11 par les LPS. Celle-ci est recrutée au niveau de GBP fixées à la surface bactérienne et induit la lyse du micro-organisme, pour permettre la libération des PAMP (Man, Karki et al. 2016). Dans le cas de bactéries extracellulaires, une étude a récemment montré que celles-ci peuvent produire des vésicules de membrane externe (OMV). Ces vésicules sont endocytées par les cellules immunitaires et les LPS peuvent s'échapper des endosomes, activant ainsi la caspase-11 et l'inflammasome non canonique (Vanaja, Russo et al. 2016).

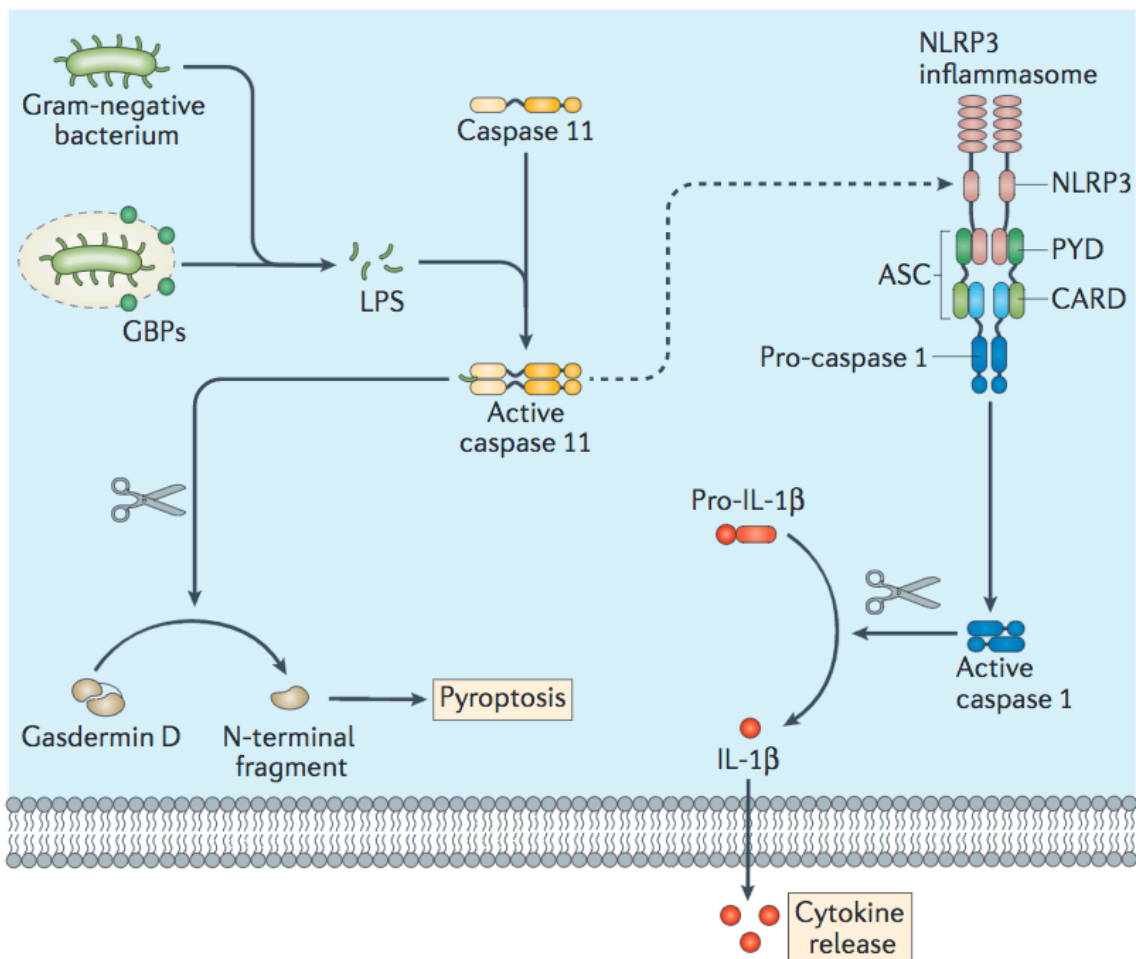


Figure 14 : L'inflammasome non canonique. Les LPS de bactéries cytoplasmiques sont détectés par la caspase-11. Des protéines de type *Guanylate-binding proteins* (GBP) permettent de faciliter l'interaction de la caspase-11 avec le LPS provenant de bactéries vacuolaires comme *Salmonella enterica* (Meunier, Dick et al. 2014). La caspase-11 activée par les LPS peut alors cliver GsdmD pour induire la pyroptose et activer NLRP3 pour induire la maturation des cytokines (Broz and Dixit 2016).

Une étude récente a proposé un mécanisme expliquant les étapes initiales de l'activation de NLRP3 et de la pyroptose indépendante de la caspase-1, suite à la détection du LPS intracellulaire. Selon Yang et ses collaborateurs, l'activation de la caspase-11 par le LPS induit le clivage du canal membranaire Pannexine 1 (Panx1), le rendant ainsi actif en éliminant son domaine inhibiteur C-terminal. Ceci induirait l'ouverture du pore permettant d'une part un efflux de potassium activant l'inflammasome NLRP3 et d'autre part une libération d'ATP. Cet ATP serait alors détecté de manière autocrine par le récepteur purinergique P2X7, permettant ainsi la formation des pores membranaires (Figure 15) (Yang, He et al. 2015). P2X7 répond normalement à des concentrations plus élevées d'ATP, cependant la présence de LPS dans le cytoplasme induirait une diminution significative du seuil d'activation de ce récepteur (Yang, He et al. 2015). Les mécanismes via lesquels P2X7 permet l'ouverture restent cependant à étudier plus précisément.

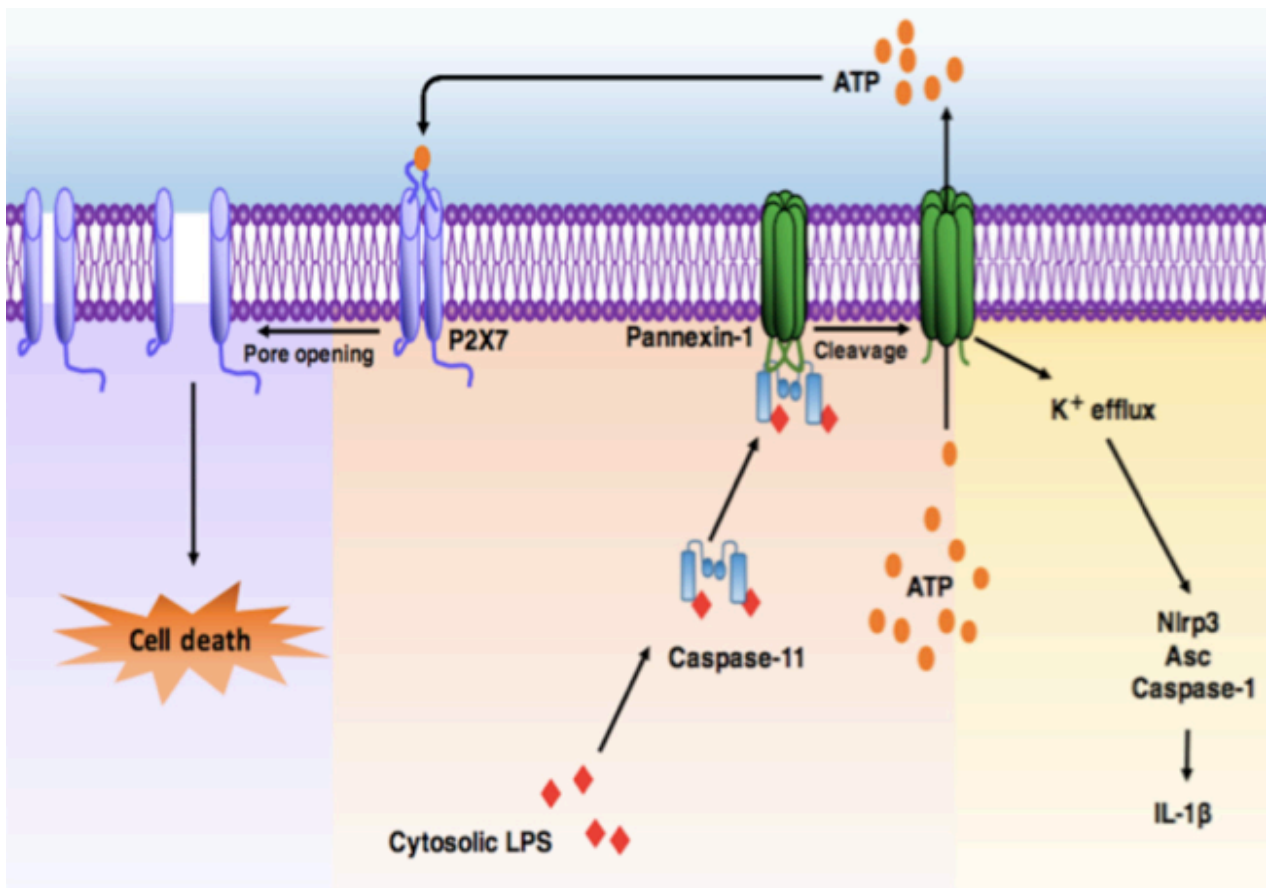


Figure 15 : Mécanismes de l'inflammasome non canonique proposé par Yang et al. L'activation de la caspase-11 par le LPS intracellulaire induit le clivage du canal Panx1. Ceci entraîne d'une part un efflux de potassium activant l'inflammasome NLRP3 et la maturation de l'IL1 β . Ceci induit d'autre part la libération d'ATP et l'activation autocrine des récepteurs P2X7, menant à l'ouverture des pores membranaires et à la pyroptose (Yang, He et al. 2015).

Dans cette étude, Yang et ses collaborateurs ont montré que les souris déficientes pour Panx1 ou P2X7 résistent à un choc endotoxique léthal induit par injection de LPS, alors que la déficience pour NLRP3 n'a aucun effet significatif sur la survie (Yang, He et al. 2015). Ceci montre encore le rôle crucial de la pyroptose *in vivo* dans la susceptibilité à l'endotoxémie, par rapport aux cytokines pro-inflammatoires maturées par l'inflammasome dont le rôle semble plus modeste. Toutefois, dans un autre modèle d'endotoxémie, la déficience en Panx1, n'a pas permis d'augmenter la résistance, contrairement à la déficience en caspase-11 (Vanden Berghe, Hulpiau et al. 2015). Ces deux études ont utilisé la même souche de souris, cependant, Yang et ses collaborateurs ont d'abord injecté une dose non létale de PAMP avant d'injecter la dose létale de LPS aux souris (Yang, He et al. 2015). Ces résultats apparemment contradictoires semblent indiquer que, dépendamment du contexte, différents programmes d'initiation pourraient mener à la pyroptose en réponse aux LPS intracellulaires.

III. 3. Subversion et régulation des inflammasomes

La pression de sélection exercée par les inflammasomes envers les pathogènes à tropisme intracellulaire suggère que certains d'entre eux aient évolué en mettant au point des mécanismes de subversion, afin de ne pas déclencher l'assemblage de ces complexes. Par exemple, lors de l'infection de lignées cellulaires humaines, *Shigella flexneri* secrète la protéine OspC3 ayant la capacité de se lier à une sous-unité de la caspase-4, empêchant ainsi l'activation de cette caspase et la formation de l'inflammasome non canonique (Kobayashi, Ogawa et al. 2013).

Le fait que l'activation de l'inflammasome dépende de deux signaux rend peu probable son activation hors contexte. Cependant, son activation prolongée ou exacerbée pourrait être délétère pour l'organisme, induisant une inflammation incontrôlée. C'est pourquoi il est important que l'activité de ces complexes soit bien régulée.

Comme pour les TLR, il existe différents mécanismes de régulation des inflammasomes. Nous ne rentrerons pas dans les détails ici et ne verrons que quelques exemples. Entre autres, la quantité d'ARN messager (ARNm) de NLRP3 est régulée par le microARN miR-223, ce qui permet le contrôle du niveau d'expression de NLRP3 et ainsi du seuil d'activation de l'inflammasome. Cependant, les signaux inflammatoires ne semblent pas influencer l'expression de ce microARN, son niveau d'expression varie plutôt selon le type cellulaire. Ces données pourraient expliquer pourquoi certaines cellules, comme les cellules

dendritiques ont des seuils d'activation de l'inflammasome plus bas par rapport à d'autres cellules immunitaires comme les neutrophiles (Bauernfeind, Rieger et al. 2012).

Aussi, les IFN de type I semblent avoir des rôles opposés dans la régulation de ces complexes. Nous avons vu qu'ils permettent l'expression de certains composants de l'inflammasome, néanmoins, ce n'est pas toujours le cas. Si ces IFN sont détectés par la cellule avant que celle-ci ait été « primée » via un TLR, alors l'expression et le clivage des pro-formes de l'IL-1 β et de l'IL-18 seront inhibés (Guarda, Braun et al. 2011). Un autre exemple de régulation des inflammasomes est la production de variants d'épissages des protéines ASC, inhibant leur assemblage (Latz, Xiao et al. 2013). Enfin, la kinase IKK α , présentée dans le chapitre sur les TLR, a la capacité de phosphoryler ASC après le priming de macrophages. Ceci induit sa séquestration sous forme inactive dans le noyau, jusqu'à ce qu'un second signal active certaines phosphatases permettant l'activation d'ASC et l'assemblage de l'inflammasome (Martin, Wang et al. 2014). Ces exemples, parmi d'autres (Latz, Xiao et al. 2013, Pedraza-Alva, Pérez-Martínez et al. 2015), montrent que les inflammasomes peuvent être régulés à différents niveaux et que l'activation ou l'inhibition de ces complexes résultent de la convergence de différentes voies de signalisation.

Beaucoup de questions sont encore ouvertes sur les mécanismes moléculaires des inflammasomes. Cependant, l'inflammation induite par la pyroptose semble jouer un rôle important dans la physiopathologie du sepsis. De plus, il semble que, au moins dans certains cas, l'inhibition de l'inflammasome pourrait permettre l'amélioration de l'immunité protectrice en augmentant les nombres et la fonctionnalité des cellules immunitaires effectrices (Gentile, Cuenca et al. 2015). Une étude clinique récente a également montré que l'anakinra, antagoniste des récepteurs à l'IL-1, améliore la survie de certains patients septiques, atteints de coagulation intravasculaire disséminée associée à un dysfonctionnement hépatobiliaire (Shakoory, Carcillo et al. 2016). De nombreuses études sont encore nécessaires pour mieux évaluer l'implication des inflammasomes dans les différentes phases du sepsis, mais la perspective de la manipulation thérapeutique de ces processus semble prometteuse.

Chapitre 3. Les phagocytes mononucléés : entre immunité innée et adaptative.

Les phagocytes mononucléés forment un réseau de cellules disséminées dans l'organisme, caractérisées par leur activité phagocytaire et leurs rôles dans l'orchestration du système immunitaire. Ces cellules permettent la capture et la dégradation de débris cellulaires, de poussières ou de micro-organisme et le maintien de l'homéostasie tissulaire. De plus, leur forte capacité à produire des cytokines et présenter des antigènes aux lymphocytes T naïfs confère à ces cellules un rôle important de sentinelles au sein des tissus. Ce système est composé des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques (DC).

Historiquement, les cellules du système des phagocytes mononucléés étaient vues comme des dérivés des monocytes sanguins, produits dans la moelle osseuse à partir de leurs précurseurs médullaires nommés promonocytes. Selon ce modèle, ces monocytes sanguins sont ensuite constamment recrutés au niveau des tissus où ils se différencient en macrophages ou en DC. Cependant, de récentes découvertes ont redéfini notre compréhension de ce système des phagocytes mononucléés et de leurs précurseurs.

I. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules larges et granuleuses présentes dans la quasi-totalité des tissus de l'organisme. Elles se caractérisent par la présence de granules phagocytaires, la formation de pseudopodes impliqués dans la migration ou la phagocytose, et une demi-vie relativement longue, allant de quelques semaines à plusieurs mois. Depuis leur découverte à la fin du XIX^{ème} siècle par Elie Metchnikoff, de nombreuses études ont mis en évidence la plasticité et l'hétérogénéité de ces cellules.

I. 1. Rôles des macrophages.

Les macrophages ne sont pas seulement de simples effecteurs du système immunitaire. Ils jouent de nombreux rôles au sein de l'organisme. Comme l'indique leur nom, la caractéristique principale des macrophages est leur activité phagocytaire. Ils jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie, la réparation tissulaire et l'organogenèse, en ingérant et en éliminant les débris et les cellules apoptotiques ou sénescents. En fonction du tissu dans lequel ils résident, les macrophages peuvent avoir des fonctions spécifiques. Par

exemple, les macrophages alvéolaires des poumons sont impliqués dans l'élimination des particules inhalées. Les cellules de Kupffer, qui sont les macrophages du foie, participent à la neutralisation des toxines de la circulation. Les ostéoclastes sont quant à eux impliqués dans le remodelage osseux. En tant que cellules du système immunitaire inné, les macrophages permettent la destruction directe de certains pathogènes via leur activité phagocytaire. La détection d'un PAMP par l'un des nombreux PRR exprimés par les macrophages induit l'ingestion rapide du micro-organisme invasif et sa capture dans un compartiment phagosomal. Ce phagosome fusionne ensuite avec un lysosome, induisant la libération de nombreuses enzymes, une acidification du pH et la dégradation de son contenu. La capture et la destruction des micro-organismes permettent, en plus de contribuer directement à l'élimination du pathogène, de présenter certains antigènes aux lymphocytes présents dans les tissus, activant ainsi le versant adaptatif de l'immunité. Enfin, les macrophages participent également à la régulation locale de l'immunité innée et adaptative par la libération de nombreux médiateurs chimiques, comme des cytokines pro- et anti-inflammatoires ou des chimiokines. Ces cellules jouent donc un rôle crucial à l'homéostasie comme en cas d'infection ou inflammation. En conséquence, elles sont impliquées dans différentes pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la polyarthrite rhumatoïde ou encore la progression tumorale (Murray and Wynn 2011, Davies, Jenkins et al. 2013, Wynn, Chawla et al. 2013).

I. 2. Plasticité des macrophages.

Les macrophages expriment à leur surface de nombreux récepteurs reconnaissant de multiples médiateurs biochimiques, telles que des cytokines, des complexes immuns, des PAMP ou des facteurs de croissance. Ces cellules extrêmement plastiques subissent un processus de maturation dans les tissus en réponse à une combinaison de stimuli, induisant ainsi l'acquisition d'un phénotype et de fonctions spécialisés.

Le paradigme de la polarisation M1-M2 est un modèle simplifié de l'activation des macrophages, dans lequel M1 et M2 représentent les deux extrêmes d'un continuum de phénotypes. Selon ce modèle, une polarisation de type M1 représenterait un macrophage pro-inflammatoire à forte activité microbicide alors que la polarisation M2 représenterait un macrophage impliqué dans la régulation immunitaire, la cicatrisation et le remodelage tissulaire. Les stimuli induisant une polarisation vers un phénotype de type M1 sont les PAMP comme les LPS, les cytokines comme l'IFN γ , ou l'activation des récepteurs du

complément ou des fragments cristallisables des anticorps, permettant ainsi la reconnaissance directe et indirecte des pathogènes. L'activation de type M1 est dite classique et induit une augmentation de la présentation des antigènes et l'expression de molécules de co-stimulation comme CD40 et CD86, permettant l'activation des lymphocytes T. Elle induit aussi la production de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Figure 16). Le phénotype de type M2 est, quant à lui, observé au cours de la cicatrisation et du remodelage tissulaire, et peut être amplifié par des cytokines comme l'IL-4 ou l'IL-13. L'activation de type M2 est parfois dite alternative et induit une augmentation de l'expression des récepteurs *scavengers* (comme CD36, CD163 et CD206) et de la phagocytose. Elle induit également la production de cytokines Th2 et immunosuppressives comme l'IL-10 ou le TGF- β (Figure 16). Les signatures génétiques M1 et M2 ne sont pas mutuellement exclusives et les phénotypes résultants dépendent de la balance des signaux reçus par les macrophages dans leurs microenvironnements (Martinez and Gordon 2014, Wang, Liang et al. 2014). Cette dichotomie M1-M2 fut cependant faite sur la base de quelques marqueurs exprimés à la surface des macrophages et de certaines fonctions biologiques. L'arrivée de l'ère génomique et transcriptomique permettra certainement d'améliorer la classification des macrophages à l'homéostasie comme en conditions pathologiques (Gautier, Shay et al. 2012, Villani, Satija et al. 2017).

À l'heure actuelle, la polarisation des macrophages au cours du développement du sepsis est peu renseignée. De récentes études, utilisant des stimulations *in vitro* avec des LPS ou le modèle murin de ligature et ponction caecale, ont montré que les macrophages péritonéaux présentent rapidement un profil immunorégulateur de type M2 (Porta, Rimoldi et al. 2009, Watanabe, Suzuki et al. 2016). Il est cependant probable que le phénotype des macrophages évolue au cours du développement de ce syndrome. La manipulation thérapeutique de ces cellules permettrait la restauration de leurs activités microbicides et immunostimulantes en cas d'immunosuppression persistante et d'infections secondaires. Elle permettrait également une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires en cas d'inflammation délétère.

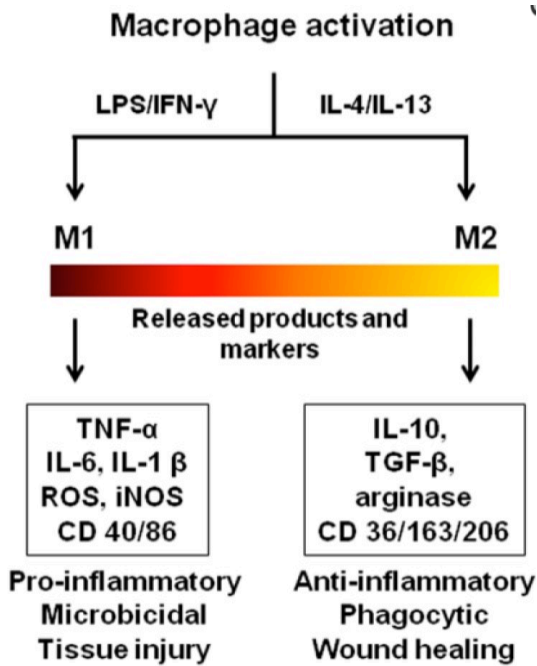


Figure 16 : Paradigme M1-M2 : phénotypes et fonctions des macrophages activés. L'activation des macrophages par les stimuli comme les LPS ou l'IL-4 conduisent à une polarisation de type M1 ou M2, respectivement. La barre colorée représente le continuum de phénotypes entre les deux extrêmes M1 et M2. (Patel and Janjic 2015).

II. Les monocytes

Historiquement, les monocytes étaient vus comme les précurseurs circulants des macrophages et des cellules dendritiques (DC) tissulaires. Cependant, la découverte récente que certaines populations de ces cellules sont maintenues indépendamment de l'influx de monocytes a redéfini notre compréhension de leur biologie.

II. 1. Populations et fonctions des monocytes.

Les monocytes sont des cellules hématopoïétiques circulantes générées dans la moelle osseuse, à la demi-vie très courte ne dépassant pas quelques jours. Ils sont généralement divisés en deux sous-populations décrites sur la base de l'expression de molécules de surface et de leurs fonctions (Geissmann, Jung et al. 2003).

Chez la souris, la première population se distingue par l'expression de Ly6C, de l'intégrine CD11b (marqueur de la lignée myéloïde), du récepteur de chimiokines *CC-chemokine receptor 2* (CCR2) et par une faible expression du récepteur de chimiokines *CX₃C-chemokine receptor 1* (CX₃CR1). Ces monocytes, appelés Ly6C^{hi} ou monocytes inflammatoires, sont rapidement recrutés au niveau des sites d'infection et d'inflammation de manière dépendante de CCR2, suggérant le rôle crucial de ce récepteur de chimiokines dans la mobilisation des monocytes à partir de la moelle osseuse. Une fois dans les tissus, la diversité des signaux du microenvironnement pourra induire une augmentation de la

phagocytose, de la production de cytokines, de l'activité antimicrobienne et de la présentation antigénique par ces cellules, induisant un phénotype parfois très proche des macrophages ou des DC (Shi and Pamer 2011, Ginhoux and Jung 2014). La seconde population de monocytes chez la souris exprime aussi CD11b mais a un niveau plus faible de Ly6C. Contrairement à la première population, ces monocytes Ly6C^{low} expriment de hauts niveaux de CX₃CR1 et peu de CCR2. Ces monocytes sont moins fréquents que les monocytes inflammatoires et ont des rôles différents. Il semble que leur fonction principale soit de veiller à l'intégrité endothéliale, en patrouillant dans la lumière des vaisseaux sanguins le long de l'endothélium. Ces cellules seraient le fruit de la différenciation des monocytes sanguins Ly6C^{hi} à l'homéostasie. Les monocytes Ly6C^{low} pourraient donc être vus comme les macrophages du système vasculaire (Shi and Pamer 2011, Ginhoux and Jung 2014).

Chez l'homme, deux populations monocytaires ont également été observées et corrélées avec celles retrouvées chez la souris. Ils n'expriment cependant pas les mêmes marqueurs de surface que chez la souris et sont distingués par l'expression du corécepteur au LPS CD14 et du récepteur aux fragments cristallisables (Fc) des anticorps (partie constante des anticorps) CD16. Les monocytes humains CD14⁺CD16⁻ semblent être les homologues de la population murine Ly6C^{hi} alors que la population CD14⁺CD16⁺ semble proche de la population murine Ly6C^{low} (Shi and Pamer 2011, Ginhoux and Jung 2014).

II. 2. Impact du sepsis sur les monocytes.

La capacité des monocytes et de leurs dérivées à produire des cytokines pro et anti-inflammatoires pourrait leur conférer un rôle important dans les phases pro- (SIRS) comme anti-inflammatoires (CARS) du sepsis. Les monocytes isolés du sang de patients septiques ont souvent été décrits pour leur production de niveaux significativement plus faibles des cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 α ou IL-12, après stimulation aux LPS. Cependant, leur capacité à produire des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 n'est pas diminuée et est parfois augmentée, sa concentration élevée étant associée à un mauvais pronostic pour les patients septiques (Hotchkiss, Monneret et al. 2013). Ces résultats témoignent de la tolérance aux endotoxines mise en place au cours du développement du syndrome, pouvant expliquer l'immunosuppression et la susceptibilité aux infections des patients septiques (Cavaillon and Adib-Conquy 2006, Biswas and Lopez-Collazo 2009). Une autre caractéristique des monocytes isolés du sang des patients septiques est l'expression diminuée des molécules *human leukocytes antigens* – *antigen D related* HLA-DR, homologue du

MHC-II murin permettant la présentation des Ag aux lymphocytes T et l'activation de l'immunité adaptative (Monneret, Finck et al. 2004). Les monocytes des patients septiques semblent donc avoir une capacité réduite à activer le système immunitaire adaptatif, contribuant ainsi à l'immunosuppression et à la susceptibilité de ces patients aux infections nosocomiales. Cette diminution de l'expression des molécules HLA-DR par les monocytes est en effet prédictive de mauvais pronostic (Hotchkiss, Monneret et al. 2013). Il semble donc que les monocytes aient subi un processus de reprogrammation au cours du syndrome, conformément à leur grande plasticité (Cavaillon, Adrie et al. 2005). Cette hypothèse fut renforcée dans une récente étude comparant le transcriptome de monocytes sains, septiques et post-septiques. Dans cette étude, les monocytes des patients aux tous premiers stades du sepsis présentent un phénotype pro-inflammatoire cohérent avec leur rôle dans la tempête cytokinique. Au cours du développement du syndrome, les monocytes expriment alors le facteur de transcription *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α), permettant l'expression du régulateur négatif de la signalisation des TLR IRAK-M, présenté dans le paragraphe II.3 du chapitre 2. L'expression d'IRAK-M induit alors la reprogrammation des monocytes vers un phénotype immunosuppresseur (Shalova, Lim et al. 2015). Les monocytes pourraient donc jouer un rôle délétère, autant dans la tempête cytokinique que dans l'immunosuppression persistante observées lors d'un sepsis.

III. Les cellules dendritiques

Les lymphocytes T (LT) sont à la base du versant adaptatif de l'immunité et sont cruciaux pour la défense de l'organisme contre les pathogènes invasifs. Ils possèdent un immense répertoire de récepteurs aux ligands extrêmement divers et illimités, leur permettant de reconnaître et d'éliminer leurs cibles par différents moyens. Ces récepteurs sont générés de manière aléatoire grâce à des réarrangements somatiques et certains d'entre eux sont réactifs à des ligands endogènes. Des mécanismes doivent alors être mis en place afin d'éviter toute réaction auto-immune délétère. Au cours des années 1970, différentes études ont permis l'émergence de la notion de cellules accessoires, nécessaires à l'activation des LT. Il a été montré que l'activation des lymphocytes par les antigènes (Ag) qui leur sont spécifiques nécessite la reconnaissance simultanée de molécules du soi nommées complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) chez la souris ou HLA chez l'homme pour *human leukocyte antigen* (Zinkernagel and Doherty 1974). La découverte de l'importance du MHC dans l'activation des lymphocytes a valu à Rolf Zinkernagel et Peter Doherty l'obtention du prix

Nobel de médecine en 1996. Toujours au cours des années 1970, Ralph Steinman et Zanvil Cohn mirent en évidence dans la rate la présence d'une population cellulaire très faiblement représentée à la morphologie étoilée inhabituelle. Ils les nommèrent cellules dendritiques (DC), du grec *dendron* qui signifie arbre, en référence à leur morphologie (Steinman and Cohn 1973). Ces cellules expriment les molécules du MHC et leur très forte capacité de stimulation des lymphocytes T naïfs fut ensuite démontrée dans des expériences de co-culture avec diverses populations triées à partir de la rate sur la base de leur adhérence, de leur morphologie et de leur densité (Nussenzweig and Steinman 1980). Dès lors, les cellules dendritiques devinrent un champ d'investigation très dynamique. Leurs capacités d'activation et d'orchestration du système immunitaire confèrent aux DC un rôle crucial qui pourrait être exploité artificiellement. La manipulation de ces cellules pourrait ainsi permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les infections, les tumeurs, ou les maladies auto-immunes. Pour sa découverte des DC, l'étude de leurs rôles et leurs potentielles nombreuses implications thérapeutiques, Ralph Steinman reçut le prix Nobel de médecine en 2011.

III. 1. Populations et fonctions des cellules dendritiques.

Les DC sont les principales cellules présentatrices d'antigènes (APC) de l'organisme. Elles se caractérisent par l'expression du MHC-II, de l'intégrine CD11c et par l'expression du facteur de transcription Zbtb46 (parfois appelé zDC) (Meredith, Liu et al. 2012, Satpathy, Kc et al. 2012, Satpathy, Wu et al. 2012). Cependant, ces marqueurs sont aussi exprimés par certains macrophages ou certaines cellules dérivant de monocytes. Les DC agissent à la manière de sentinelles stratégiquement localisées au niveau des organes lymphoïdes et des interfaces avec l'extérieur, notamment les muqueuses et la peau. Elles surveillent l'intégrité et la stérilité tissulaire et font le lien entre l'immunité innée et adaptative en couplant la phagocytose de particules à l'activation des lymphocytes. Il est maintenant clairement établi que les DC sont hétérogènes en terme d'ontogénie, de localisation et de fonction. Les différentes sous-populations peuvent présenter certaines spécialisations et des implications diverses dans les processus immunologiques. On distingue généralement les DC conventionnelles (cDC) et plasmacytoïdes (pDC), présentes à l'état basal, des DC dérivant de monocytes (MoDC), massivement recrutées en cas d'inflammation (Merad, Sathe et al. 2013).

III. 1. 1. Les DC conventionnelles (cDC)

Le terme « conventionnelles » fait référence aux DC non plasmacytoïdes et ne dérivant pas de monocytes mais d'un précurseur restreint à ces cellules. Leur ontogénie sera discutée dans un prochain chapitre (Chapitre 4 paragraphe III). Les cDC sont retrouvées dans la grande majorité des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Elles ont la capacité d'y détecter des lésions tissulaires ou des micro-organismes via leurs nombreux PRR, d'internaliser et dégrader des particules environnementales et d'en présenter des fragments aux lymphocytes T. Une fois l'environnement échantillonné en périphérie, les cDC migrent au niveau des ganglions lymphatiques ou des organes lymphoïdes, dans la zone occupée par les LT. Cette migration dépend de l'activation des récepteurs de chimiokines CCR7 sur les cDC, qui permet de les guider jusqu'aux organes lymphatiques. Pendant leur migration, les cDC subissent un processus de maturation, induisant l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices ou activatrices en fonction du contexte et de leur microenvironnement. Les particules phagocytées par les cDC ne sont que partiellement dégradées dans le lysosome, ce qui permet la présentation de petits fragments (Ag) à la surface des cDC, grâce aux molécules du MHC-II. Lors de l'interaction entre les cDC et les LT spécifiques des Ag présentés, les cDC envoient des signaux activateurs ou inhibiteurs aux LT, en fonction des molécules de co-stimulation exprimées. De cette façon, les cDC induisent l'immunité ou la tolérance envers ces Ag (Figure 17) (Merad, Sathe et al. 2013). On distingue généralement deux populations de cDC, semblant avoir des implications spécifiques dans les processus immunologiques. Afin de simplifier les nomenclatures, Martin Guillems et ses collaborateurs ont récemment proposé de nommer ces populations cDC1 et cDC2 (Satpathy, Wu et al. 2012, Merad, Sathe et al. 2013, Guillems, Ginhoux et al. 2014).

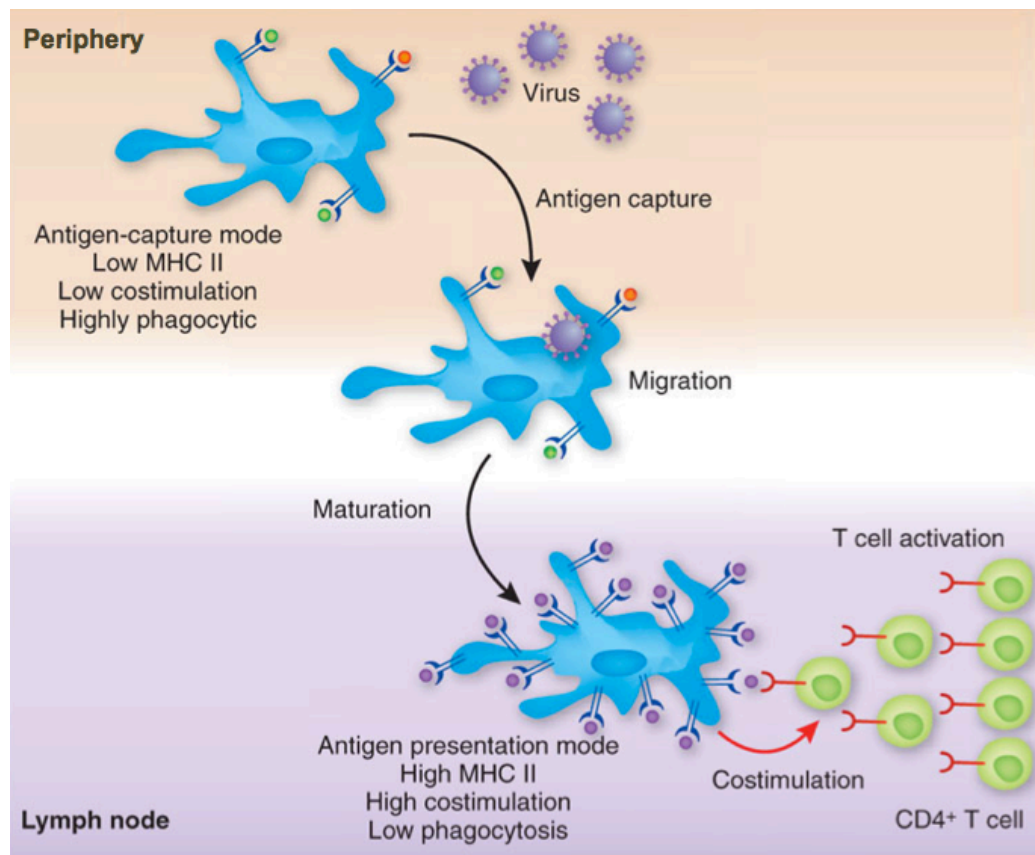


Figure 17 : Paradigme des cellules dendritiques. Dans les tissus non lymphoïdes, les DC ont une haute activité phagocytaire et un rôle de capture d'Ag. Après la détection d'un pathogène, les DC migrent vers les ganglions lymphatiques et mûrissent en exprimant des molécules de co-stimulation et des complexes MHC-II – Ag pour interagir avec les LT (Heath and Carbone 2009).

III. 1. 1. 1. Les cDC1

L'hétérogénéité des DC a d'abord été mise en évidence dans les organes lymphoïdes de souris, où une sous-population exprime à sa surface le co-récepteur au MHC de classe I (MHC-1) CD8 α . Cette population représente environ 20% des DC de la rate (Crowley, Inaba et al. 1989, Vremec, Zorbas et al. 1992). L'expression de CD8 α est restreinte à certaines cDC des organes lymphoïdes et n'est pas retrouvé sur les DC présentes dans les tissus non lymphoïdes. Ce n'est que 15 ans plus tard que les homologues des cDC CD8 α ⁺ furent décrites dans les tissus non lymphoïdes. Bien qu'elles n'expriment pas CD8 α , elles se distinguent des autres DC par l'expression de l'intégrine CD103. Malgré cette différence phénotypique, les cDC CD8 α ⁺ et les cDC CD103⁺, des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, respectivement, sont maintenant considérées comme faisant partie de la même lignée de cDC. Cette étroite relation est basée sur de fortes similarités dans les fonctions immunologiques, leurs phénotypes comme leurs transcriptomes, ainsi que leur dépendance pour certains

facteurs de transcription (Sung, Fu et al. 2006, Bursch, Wang et al. 2007, del Rio, Rodriguez-Barbosa et al. 2007, Ginhoux, Liu et al. 2009, Edelson, Kc et al. 2010).

Les cDC CD8 α + et CD103+ ont en commun l'expression de certains récepteurs membranaires, comme CD24, le récepteur de chimiokines XCR1 (Crozat, Tamoutounour et al. 2011) et le récepteur Clec9a. Ce dernier reconnaît les filaments d'actine, composant du cytosquelette, permettant à ces DC la reconnaissance des cellules endommagées ayant perdu leur intégrité cellulaire (Caminschi, Proietto et al. 2008, Sancho, Joffre et al. 2009, Zhang, Cardinal et al. 2012). Dans un souci de simplification, nous appellerons ces cellules cDC1 (Guilliams, Ginhoux et al. 2014).

Les caractéristiques des cDC1 sont l'expression de TLR3, reconnaissant de l'ARN viral, et une forte capacité de sécrétion de la cytokine IL-12p70 suite à leur activation. Cette cytokine permettant la différenciation de LT helper 1 (LTh1) impliqués dans l'immunité cytotoxique anti-virale et anti-tumorale (Hochrein, Shortman et al. 2001, del Rio, Bernhardt et al. 2010, Edelson, Kc et al. 2010). Cette sous-population de cDC a également été décrite comme étant la plus efficace pour un mécanisme particulier de présentation antigénique nommé « présentation croisée ». Comme nous l'avons vu précédemment, les molécules de MHC de classe II (MHC-II) permettent la présentation des Ag exogènes, provenant de particules micro-environnementales phagocytées. A l'inverse, le MHC de classe I (MHC-I) permet la présentation d'Ag endogènes, produits au sein même des cellules. L'altération des Ag présentés par le MHC-I, induite par l'infection des cellules ou par une transformation maligne, permet l'activation des LT spécifiques aux cellules infectées ou tumorales. La présentation croisée permet aux DC de phagocyter des débris cellulaires ou des cellules mortes ou mourantes et de présenter les Ag exogènes via le MHC-I. Ce mécanisme permet alors l'activation directe des LT CD8+ par des DC non infectées ou non tumorales, amplifiant ainsi la réponse des LT cytotoxiques envers les Ag présentés. Les cDC1 ont rapidement été décrites pour être spécialisées dans la présentation croisée des Ag et l'activation des LT CD8+ cytotoxiques (den Haan and Bevan 2002, Hildner, Edelson et al. 2008).

Les facteurs de transcription *interferon regulatory factor 8* (IRF8) et *inhibitor of DNA binding 2* (Id2) sont cruciaux dans la différenciation des cDC1. En effet, les souris déficientes pour l'un de ces facteurs de transcription présentent des nombres très réduits des DC CD8 α + des organes lymphoïdes et des DC CD103+ circulantes, alors que les autres cDC ne sont pas affectées (Aliberti, Schulz et al. 2003, Taylor, Tamura et al. 2008, Ginhoux, Liu et al. 2009).

Un autre facteur de transcription crucial pour le développement de ces cellules est *basic leucine zipper ATF-like 3 transcription factor* (BATF3). Sa déficience induit une perte significative des cDC1 circulantes et des organes lymphoïdes, sans affecter les autres cDC (Hildner, Edelson et al. 2008, Edelson, Kc et al. 2010).

Chez l'homme, une population très similaire a été décrite dans le sang et la rate, exprimant Clec9a comme leurs homologues murines. Ces cellules sont souvent caractérisées par leur expression de CD141 (aussi appelé BDCA-3). Leurs profils d'expression géniques et leurs fonctions immunologiques semblent très similaires à celles observées chez la souris (Robbins, Walzer et al. 2008, Bachem, Guttler et al. 2010, Poulin, Salio et al. 2010, Haniffa, Shin et al. 2012, Poulin, Reyat et al. 2012). Cependant, leur supériorité dans la présentation croisée des Ag semble remise en question et cette capacité semble intrinsèquement partagée entre les différents sous-types de DC. Cette fonction pourrait dépendre de différentes variables, comme le type d'Ag, des différences dans les mécanismes d'internalisation, ou encore des facteurs environnementaux et de l'état de maturation et d'activation des DC (Nierkens, Tel et al. 2013, Segura, Durand et al. 2013).

A l'égard de leurs rôles cruciaux dans l'activation des LT cytotoxiques, ces cellules constituent une cible de choix quant à l'utilisation des cDC dans le développement de stratégies thérapeutiques anti-tumorales et anti-virales.

III. 1. 1. 2. Les cDC2

La seconde population de cDC, qui n'exprime ni CD103 ni CD8 α , est souvent caractérisée par son expression de l'intégrine CD11b et de SIRP α (aussi appelée CD172 α). Martin Williams et ses collaborateurs ont récemment proposé d'appeler ces cellules cDC2 (Williams, Ginhoux et al. 2014). Elles sont retrouvées dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes et prédominent sur la population de cDC1 dans la quasi-totalité de ces tissus.

Le développement et la maintenance des cDC2 semblent dépendants des facteurs de transcription IRF4 (Gao, Nish et al. 2013, Schlitzer, McGovern et al. 2013, Williams, Tjota et al. 2013) et de l'activation des récepteurs Notch-2 (Lewis, Caton et al. 2011). Cette population de cDC semble plus efficace que les cDC1 dans l'interaction avec les LT CD4+ et la polarisation des LT helper, notamment en LTh2 et LTh17, qui sont impliqués dans les réponses immunitaires envers les pathogènes extracellulaires et la régulation de l'immunité (Sun, Hall et al. 2007, Gao, Nish et al. 2013, Persson, Uronen-Hansson et al. 2013, Plantinga,

Guilliams et al. 2013). Cependant, l'hétérogénéité des cellules CD11b⁺ a fortement compliqué l'étude de cette population. En effet, les cDC2 sont difficilement distinguables des macrophages et des cellules dérivant de monocytes, qui peuvent exprimer de nombreux marqueurs communs. Il a donc été difficile jusqu'à présent de leur attribuer des spécialisations immunologiques ainsi que d'établir leur dépendance à des facteurs de transcription spécifiques. De nouveaux marqueurs ont récemment été décrits pour faciliter la discrimination entre les cDC2 et les macrophages et les cellules dérivées de monocytes dans différents tissus, comme les poumons, les muscles, et les intestins. A l'avenir, ces marqueurs devraient permettre de mieux délimiter les rôles de ces différentes populations dans les processus immunologiques (Gautier, Shay et al. 2012, Langlet, Tamoutounour et al. 2012, Tamoutounour, Henri et al. 2012, Plantinga, Guilliams et al. 2013, Schlitzer, McGovern et al. 2013)

Chez l'homme, une population similaire a été décrite, exprimant CD11b et SIRP α comme leurs homologues murines. Ces cellules sont souvent caractérisées par leur expression de CD1c. Tout comme leurs équivalentes chez la souris, ces cDC semblent très efficaces pour la polarisation des LT CD4⁺ en LTh17 (Robbins, Walzer et al. 2008, Schlitzer, McGovern et al. 2013).

Au regard de leurs rôles dans l'orchestration des réponses Th2 et Th17, la manipulation de ces cellules pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les maladies infectieuses ou auto-immunes.

III. 1. 2. Les DC plasmacytoïdes

Les DC plasmacytoïdes (pDC) ont une morphologie allongée particulière, proche des plasmocytes, d'où elles tirent leur nom. Elles expriment des niveaux plus faibles de CD11c et MHC-II par rapport aux autres DC et peuvent se caractériser par les marqueurs Siglec-H chez la souris ou *blood dendritic cells antigen 2* (BDCA-2) chez l'homme (Reizis, Bunin et al. 2011). Les pDC sont retrouvées dans le sang et les tissus périphériques lymphoïdes et non lymphoïdes. Le rôle des pDC dans la présentation antigénique est bien plus restreint que celui des cDC (See, Dutertre et al. 2017, Villani, Satija et al. 2017). La fonction principale des pDC est la libération rapide et massive d'IFN de type I en cas d'infection virale, conséquence de l'activation des TLR7 et 9 par les acides nucléiques viraux, et de l'expression constitutive du facteur de transcription IRF7 (Reizis, Bunin et al. 2011).

Le rôle crucial des IFN de type I dans l'activation du système immunitaire et le développement de pathologies auto-immunes comme le lupus systémique érythémateux n'est plus à prouver (Panda, Kolbeck et al. 2016). C'est pourquoi les pDC, qui sont les sources majeures de ces IFN, constituent une cible de choix pour le développement de stratégies thérapeutiques dans le cadre de maladies auto-immunes.

III. 1. 3. Les DC dérivées de monocytes

A l'homéostasie dans certains tissus comme l'intestin, ou en cas d'infection ou d'inflammation dans les autres, de nombreuses études ont mis en évidence la génération de cellules ressemblant à des DC à partir de monocytes. En cas d'infection ou d'inflammation, la production des chimiokines CCL2 et CCL7 mène au recrutement de monocytes au sein des tissus, grâce à l'activation du récepteur CCR2. Conformément à la grande plasticité des monocytes, la différenciation de ces cellules dépend des médiateurs locaux comme les cytokines, les PAMP ou les DAMP (Dominguez and Ardavin 2010, Segura and Amigorena 2013). Tout comme les cDC, les cellules dérivées de monocytes peuvent exprimer MHC-II, CD11c et CCR7 et présenter efficacement des Ag aux LT (Tamoutounour, Williams et al. 2013). Certaines études ont aussi montré leur efficacité pour la présentation croisée des Ag, bien que ces cellules semblent utiliser une machinerie différente de celle des cDC1 pour y parvenir (Segura, Albiston et al. 2009, Cheong, Matos et al. 2010, Langlet, Tamoutounour et al. 2012, Briseno, Haldar et al. 2016). Comme le suggère leur activité de présentation croisée, les DC dérivées de monocytes (MoDC) ont été impliquées dans les réponses cytotoxiques Th1 comme les cDC1 (Leon, Lopez-Bravo et al. 2007, Ji, Castelli et al. 2013). Cependant, les MoDC ont aussi été décrites pour induire des réponses de type Th2 et Th17, comme les cDC2 (Siddiqui, Laffont et al. 2010, Plantinga, Williams et al. 2013, Segura and Amigorena 2013). Il semble donc qu'en fonction du contexte, les MoDC pourraient développer des fonctions similaires à celles des différentes populations de cDC. Cependant, le manque de marqueurs pour discriminer ces cellules des cDC, des macrophages ou des monocytes activés complique fortement l'étude des MoDC.

Une étude a montré la présence de cellules CMH II⁺ CD11c⁺ dérivant de monocytes dans les muscles squelettiques en condition homéostatique. L'administration intramusculaire de l'adjuvant alun induit une très forte augmentation de la représentation de ces cellules et l'administration simultanée de LPS augmente fortement leur capacité à migrer dans les ganglions lymphatiques. Ces cellules sont capables de présenter des Ag aux LT naïfs via la

présentation normale mais aussi via la présentation croisée. Elles sont retrouvées dans la rate après administration du LPS et sont caractérisées par l'expression du Fc récepteur CD64 (Fc γ RI), qui n'est pas exprimé par les cDC (Langlet, Tamoutounour et al. 2012). De plus, le marqueur CD64 peut servir à discriminer les cellules dérivant de monocytes au niveau de l'intestin et de la peau en condition homéostatique ou inflammatoire chez la souris (Tamoutounour, Henri et al. 2012, Tamoutounour, Guilliams et al. 2013). Le récepteur aux immunoglobulines Fc ϵ RI fut aussi récemment décrit pour permettre la distinction des MoDC chez la souris, mais aussi chez l'homme (Plantinga, Guilliams et al. 2013, Segura, Touzot et al. 2013). Il semble que la forte expression des récepteurs Fc soit restreinte aux phagocytes d'origine monocyttaire, facilitant ainsi leur identification (Guilliams, Bruhns et al. 2014). L'amélioration de la caractérisation de ces cellules permettra d'améliorer nos connaissances sur leur biologie et leurs implications immunologiques. La diversité des réponses immunitaires dans lesquelles elles semblent impliquées ainsi que les grands nombres de monocytes disponibles suggèrent qu'à terme, ces cellules pourraient être facilement utilisées dans le cadre d'immunothérapies anti-cancéreuses, anti-infectieuses ou encore contre des pathologies auto-immunes.

III. 2. Impact du sepsis sur les DC.

De nombreuses études ont mis en évidence une diminution drastique des DC au cours du sepsis. L'intégrine CD11c est souvent utilisée comme marqueur de DC, bien qu'elle soit également exprimée par certaines populations cellulaires comme certains macrophages, neutrophiles ou lymphocytes. Une diminution drastique des cellules CD11c⁺ dans la rate est observée au cours des premiers jours d'un modèle murin de sepsis polymicrobien (Tinsley, Grayson et al. 2003, Ding, Chung et al. 2004, Wen, Hogaboam et al. 2006, Wen, Dou et al. 2008, Pene, Courtine et al. 2009, Courtine, Pene et al. 2011). Afin d'évaluer l'impact du sepsis sur les différentes populations de DC de cet organe lymphoïde, Flohé et ses collaborateurs ont divisé les cellules CD11c⁺ sur la base de l'expression de CD8 (exprimé par les cDC1) et de CD4 (exprimé par les cDC2), les cellules double-négatives étant un mix de cDC2 n'exprimant pas CD4, de MoDC et de contaminants non DC. Il se trouve alors que la perte des DC observée est due aux populations CD8⁺ et CD4⁺, le nombre total de cellules double-négatives étant lui-même augmenté dans ce modèle (Flohe, Agrawal et al. 2006). Une autre étude a également mis en évidence la déplétion des DC des ganglions lymphatiques, avec une perte préférentielle des cDC1 exprimant CD8 (Efron, Martins et al. 2004). Donc il semble que, chez la souris, le sepsis polymicrobien induit une déplétion spécifique de

certaines populations de DC des organes lymphoïdes. La déplétion d'une population pourrait d'ailleurs se faire en faveur d'une autre, comme cela a été observé dans la rate avec l'augmentation de la population CD4-CD8- (Flohe, Agrawal et al. 2006).

Chez les patients septiques, les DC classiques et plasmacytoïdes circulantes du sang sont significativement moins nombreuses par rapport aux contrôles sains. Cette diminution des DC est souvent associée à un mauvais pronostic (Guisset, Dilhuydy et al. 2007, Grimaldi, Louis et al. 2011, Elsayh, Zahran et al. 2013). En plus de nombres réduits, les DC des patients septiques présentent aussi des anomalies fonctionnelles. Comme les monocytes, les DC des patients septiques présentent une diminution de l'expression de HLA-DR, diminuant leur capacité d'interaction avec les LT (Poehlmann, Schefold et al. 2009). Chez la souris septique, une diminution de l'expression du MHC-II est aussi observée sur les DC (Pastille, Didovic et al. 2011). De plus, de nombreuses études ont mis en évidence, chez l'homme comme la souris, une forte diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 ou le TNF par les DC septiques stimulées par des PAMP. A l'inverse, leur capacité de production des cytokines anti-inflammatoire IL-10 et TGF- β est significativement augmentée (Benjamim, Lundy et al. 2005, Flohe, Agrawal et al. 2006, Wen, Dou et al. 2008, Poehlmann, Schefold et al. 2009). Il semble que, chez la souris, l'interaction entre des DC septiques et des LT CD4+ induise la polarisation préférentielle de ces derniers vers un profil de type Th2 ou T régulateur (Treg) (Wen, Dou et al. 2008, Pastille, Didovic et al. 2011, Faivre, Lukaszewicz et al. 2012). Il est possible que la perte de la capacité d'induire des réponses Th1 soit due, au moins en partie, à une perte spécifique des cDC1 qui semblent cruciales pour le développement de telles réponses (den Haan and Bevan 2002, Efron, Martins et al. 2004, Flohe, Agrawal et al. 2006, Hildner, Edelson et al. 2008, Strother, Danahy et al. 2016). Aussi, une étude a montré que les DC générées par des souris post-septiques dans un modèle de CLP produisent significativement moins d'IL-12 que celles de souris saines, jusqu'à au moins six semaines après l'opération. Ce défaut de production d'IL-12 semble dû à des modifications épigénétiques induites au niveau des promoteurs des gènes codants pour cette cytokine et expliquant en partie l'immunosuppression à long terme observée chez les patients septiques (Wen, Dou et al. 2008).

De nombreuses études ont mis en évidence la mort de cellules immunitaires contribuant à l'immunosuppression observée durant le développement du sepsis (Pinheiro da Silva and Nizet 2009). L'apoptose semble expliquer au moins partiellement la perte des DC observée

dans un modèle murin de sepsis (Peck-Palmer, Unsinger et al. 2009). Cette mort cellulaire programmée est en partie due à l'activation des TLR (Pene, Courtine et al. 2009, Zhang, Cardinal et al. 2012). De plus, la phagocytose de cellules apoptotiques par les DC les rend tolérogènes. Donc, l'augmentation des cellules apoptotiques en cas de sepsis pourrait contribuer à l'immunosuppression via, d'une part, la perte de cellules effectrices, et, d'autre part, l'induction de la tolérance (Kushwah, Wu et al. 2010). L'expression d'une protéine anti-apoptotique par les DC, ou l'augmentation de leur nombre et de leur état d'activation avec un traitement au Flt3L, permettent d'atténuer l'immunosuppression induite par un choc endotoxique (Wysocka, Montaner et al. 2005, Gautier, Huby et al. 2008, Strother, Danahy et al. 2016). Ces résultats suggèrent donc que des stratégies thérapeutiques visant à maintenir les nombres de DC et favoriser leur survie et leurs fonctions, permettraient de limiter l'immunosuppression induite par le sepsis.

Chapitre 4. Hématopoïèse et développement des phagocytes mononucléés.

Les phagocytes mononucléés sont dérivés de la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques, produits constitutivement dans la moelle osseuse tout au long de la vie. L'hématopoïèse permet un apport suffisant de cellules sanguines et immunitaires à courte demi-vie. Différents facteurs de croissance permettent d'orienter la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques vers les différentes lignées, induisant l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques permettant le développement de certaines populations. Cependant, le développement et le maintien des macrophages sont plus complexes et semblent, dans certains cas, indépendants de l'hématopoïèse adulte.

I. Les cytokines et facteurs de croissance

I. 1. Le facteur de croissance M-CSF.

Le facteur de croissance *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) est crucial au développement, à la prolifération et à la survie des monocytes et des macrophages. Il est produit par de nombreuses cellules stromales et endothéliales et son récepteur, M-CSF-R (aussi appelé CD115), est exprimé par les monocytes, macrophages et leurs précurseurs hématopoïétiques (Pixley and Stanley 2004). Des études chez les souris *op/op*, qui ont une forme mutante non fonctionnelle de la cytokine M-CSF, ont révélé un déficit majeur dans la lignée des monocytes et macrophages. Ceci induit de nombreuses anomalies squelettiques ou neurologiques mais semble induire relativement peu de défauts immunologiques (Cecchini, Dominguez et al. 1994, Pixley and Stanley 2004). Cependant, le M-CSF n'est pas le seul ligand de M-CSF-R et il semble que ses autres ligands aient également un rôle dans le développement et le maintien de ces cellules. En effet, la perte des monocytes et macrophages est encore plus marquée chez les souris déficientes pour le récepteur M-CSF-R, par rapport aux souris déficientes pour la cytokine M-CSF seule (Dai, Ryan et al. 2002). L'IL-34 est un ligand récemment caractérisé de CD115. Il semble induire des réponses différentes par rapport au M-CSF en se liant à leur récepteur commun. Tout comme le M-CSF, l'IL-34 permet la survie des monocytes/macrophages, cependant, leur capacité à induire la production de cytokines et la migration des cellules myéloïdes semble différente. Ces différences de

réponse pourraient s'expliquer par la liaison de ces cytokines à des régions différentes du récepteur (Chihara, Suzu et al. 2010, Ma, Lin et al. 2012).

I. 2. Le facteur de croissance Flt3-L.

La cytokine *Fms-like tyrosine kinase 3-ligand* (Flt3-L) est cruciale au développement et au maintien des DC. Ce facteur de croissance est produit de manière ubiquitaire par un grand nombre de cellules différentes comme les cellules endothéliales ou les lymphocytes. Son récepteur, Flt3 (ou CD135), est exprimé par diverses cellules hématopoïétiques et notamment certaines HSC et les progéniteurs communs myéloïdes et lymphoïdes, CMP et CLP*, respectivement. Alors que les cellules hématopoïétiques se différencient progressivement pour donner les diverses lignées hématopoïétiques, l'expression de Flt3 se perd. Ce récepteur n'est ensuite retrouvé que sur les précurseurs des DC, comme le *macrophage and dendritic cells progenitor* (MDP) (présenté dans le paragraphe III du chapitre 4), et sur les pDC et cDC différenciées (Adolfsson, Borge et al. 2001, Onai, Obata-Onai et al. 2007, Schmid, Kingston et al. 2010, Merad, Sathe et al. 2013). Il est intéressant de noter que la perte de l'expression de Flt3 par les progéniteurs hématopoïétiques semble corrélée avec la perte du potentiel de générer des DC (Karsunky, Merad et al. 2003). A l'inverse, l'expression forcée de Flt3 par des progéniteurs ayant perdu leur potentiel de générer les DC semble restaurer cette capacité via l'expression de facteurs de transcription cruciaux pour le développement des cDC et pDC (Onai, Obata-Onai et al. 2006). De plus, Flt3 semble de nouveau exprimé par certains monocytes ayant la capacité de se différencier en MoDC (Menezes, Melandri et al. 2016). L'injection ou la surexpression de Flt3-L induit une augmentation drastique du nombre de pDC, cDC et de leurs progéniteurs chez l'homme comme chez la souris. Le phénotype inverse est observé chez les souris déficientes en Flt3 ou Flt3-L. La déplétion des cDC ou l'inhibition de Flt3 induisent également une augmentation du taux de Flt3-L dans le sang, pouvant suggérer une boucle de rétrocontrôle permettant d'adapter la production de DC (Bigley, Haniffa et al. 2011, Merad, Sathe et al. 2013). Enfin, la culture *in vitro* de cellules de moelle osseuse murine en présence de Flt3L permet le développement des diverses populations de DC semblables aux cDC et pDC de la rate (Naik, Proietto et al. 2005). Ces données mettent donc en évidence l'importance de la signalisation Flt3 pour le développement des DC.

I. 3. Le facteur de croissance GM-CSF.

Le *granulocyte and macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) est un facteur de croissance impliqué dans la différenciation des précurseurs hématopoïétiques des cellules de

la lignée myéloïde et dans la régulation de certaines fonctions immunologiques comme la phagocytose ou la présentation des antigènes. Il est produit par divers types de cellules immunitaires et structurelles. Son récepteur, GM-CSF-R (CD116), est exprimé par les phagocytes mononucléés et leurs précurseurs (Francisco-Cruz, Aguilar-Santelises et al. 2014). Le GM-CSF fut la première cytokine décrite pour permettre le développement de DC *in vitro*, à partir de monocytes murins ou humains. Cependant, chez la souris, l'absence de GM-CSF ne semble pas se répercuter sur l'hématopoïèse à l'homéostasie (Dranoff, Crawford et al. 1994) et la déficience en GM-CSF ou son récepteur ne provoque que des réductions mineures du développement des DC (Vremec, Lieschke et al. 1997). Seules certaines populations de la peau, des intestins et des poumons sont significativement impactées par la déficience en GM-CSF (Kingston, Schmid et al. 2009, King, Kroenke et al. 2010, Greter, Helft et al. 2012). Cependant, les DC restantes chez les souris déficientes pour le GM-CSF présentent une augmentation de leur apoptose dans les tissus non lymphoïdes, suggérant que cette cytokine pourrait être impliquée dans la survie des DC en périphérie (Greter, Helft et al. 2012). Cette cytokine permet également l'expression de CD103 par les cDC1 des organes non lymphoïdes et semble être impliqué dans la maturation des DC, et notamment l'acquisition de la fonction de présentation croisée (Edelson, Bradstreet et al. 2011, Sathe, Pooley et al. 2011, Zhan, Carrington et al. 2011, Greter, Helft et al. 2012).

II. Ontogénie des macrophages

Historiquement, les macrophages étaient vus comme le produit de la différenciation des monocytes dans les tissus (Geissmann, Manz et al. 2010). Cependant, bien qu'ils puissent effectivement générer des macrophages dans certaines conditions, il semble que les monocytes circulants ne soient pas la source principale de ces cellules.

Au cours du XX^{ème} siècle, différentes études ont suggéré l'origine monocyttaire des macrophages. Des études *in vitro* et des transferts adoptifs ont montré la génération de ces cellules à partir de monocytes ou de précurseurs de la moelle osseuse, lieu très majoritaire de l'hématopoïèse adulte (Ginhoux and Guilliams 2016). Cependant, au début du XXI^{ème} siècle, plusieurs études ont redéfinis ce dogme. Chez la souris, différentes populations de macrophages, comme les cellules de Langerhans (macrophages de l'épiderme), ou les cellules de la microglie (macrophages du système nerveux central), résistent à de hautes doses de radiations et sont générées à partir de cellules de l'hôte dans des chimères de moelle osseuse, suite à la reconstitution avec de la moelle osseuse d'une souris donneuse (Merad, Manz et al.

2002, Ajami, Bennett et al. 2007, Ginhoux, Greter et al. 2010). De plus, dans des expériences de souris parabiotiques partageant leur circulation sanguine, les cellules de Langerhans, les microglies et les macrophages alvéolaires ne se mélangent pas entre les souris, à l'inverse des populations de macrophages des intestins, du cœur et du derme. Ceci suggère la contribution de cellules dérivées de la moelle osseuse pour ces dernières populations mais pas pour les cellules de Langerhans, les microglies et les macrophages alvéolaires (Ginhoux and Williams 2016). Ces données suggèrent donc que la maintenance des populations de macrophages pourrait être différente en fonction du tissu de résidence et qu'au moins certaines populations de macrophages chez l'adulte seraient maintenues sans la contribution de cellules de la moelle osseuse.

Chez la souris, des macrophages sont retrouvés dans le cerveau en développement et la peau des embryons dès le 10^{ème} jour de gestation, avant l'établissement de l'hématopoïèse et des premières cellules souches hématopoïétiques multipotentes (HSC) (Ginhoux and Williams 2016). Ces macrophages sont produits à partir de précurseurs erythro-myéloïdes présents dans la vésicule vitelline puis le foie fœtal entre les jours 7 et 9 de gestation (Bertrand, Jalil et al. 2005, Hoeffel, Chen et al. 2015). Les jours suivants, des HSC multipotentes colonisent le foie fœtal, devenant ainsi l'organe hématopoïétique majeur de l'embryon et permettant l'émergence du système immunitaire (Cumano and Godin 2007, Orkin and Zon 2008). La contribution de l'hématopoïèse embryonnaire et adulte dans la maintenance des macrophages tout au long de la vie est un sujet d'étude très dynamique et l'amélioration de nos connaissances dans ce domaine est favorisée grâce aux nouvelles avancées technologiques. De récentes études ont montré que la majorité des macrophages résidents du cerveau, du foie, des poumons, ou encore de la rate dérive de ces précurseurs embryonnaires de la vésicule vitelline et du foie fœtal. Ces macrophages se disséminent dans les tissus une fois la circulation sanguine établie et s'y maintiennent en proliférant localement tout au long de la vie (Naito, Hasegawa et al. 1997, Alliot, Godin et al. 1999, Aziz, Soucie et al. 2009, Ginhoux, Greter et al. 2010, Schulz, Gomez Perdiguero et al. 2012, Williams, De Klerk et al. 2013, Yona, Kim et al. 2013, Zigmund, Samia-Grinberg et al. 2014). A l'inverse des autres tissus, les macrophages de l'intestin d'origine embryonnaire sont remplacés par la différenciation de monocytes sanguins recrutés dans les tissus quelques semaines après la naissance (Bain, Bravo-Blas et al. 2014) (Figure 18).

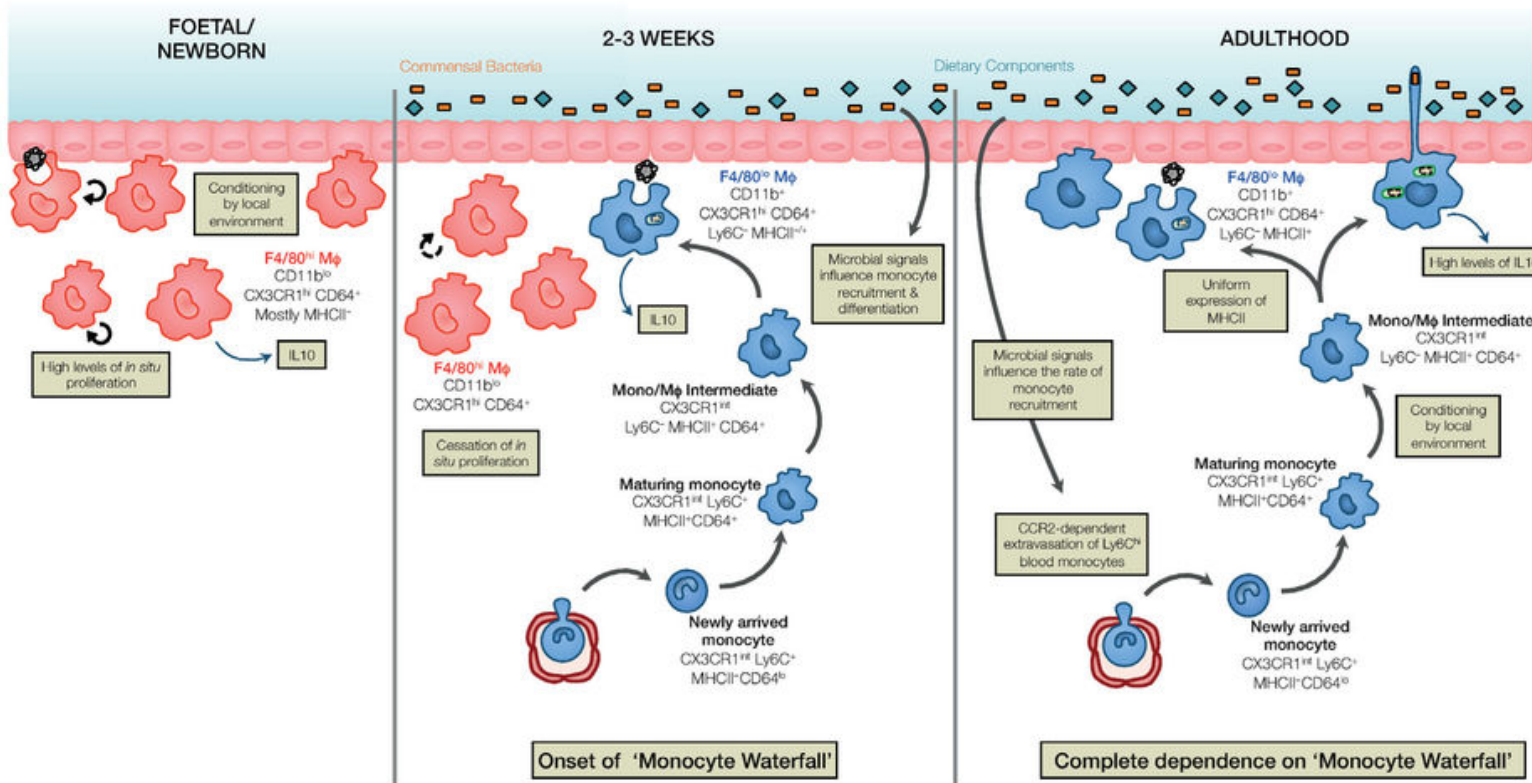


Figure 18 : Ontogénie et différenciation des macrophages murins dans le côlon en fonction de l'âge. Selon ce modèle, les macrophages du côlon des fœtus et nouveau-nés dérivent de la vésicule vitelline et du foie fœtal (cellules rouges). Ces macrophages expriment de hauts niveaux de *F4/80* et faiblement l'intégrine *CD11b*. Ils ont une activité phagocytaire active et produisent constitutivement de l'*IL-10* mais n'expriment pas le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (*MHC-II*), qui permet la présentation des

antigènes exogènes aux lymphocytes. Contrairement aux macrophages produits chez l'adulte, leurs nombres sont maintenus dans les tissus de manière indépendante de *CCR2*, grâce à leur capacité de prolifération *in situ*. Le rôle principal de ces macrophages semble être le remodelage tissulaire et l'élimination des débris cellulaires, leurs propriétés leur étant conditionnées par l'ensemble des facteurs de leur microenvironnement. A partir de la 2^{ème} ou 3^{ème} semaine après la naissance, la capacité proliférative de ces cellules diminue. Ceci est corrélé avec le développement de la flore et l'initiation de la « cascade monocytaire ». Cette « cascade » correspond à la différenciation de monocytes *Ly6C*^{hi} recrutés dans la muqueuse intestinale suite à l'activation du récepteur de chimiokines *CCR2*. Le recrutement de ces monocytes est en partie dû aux signaux émis par le microbiote. Ces monocytes se différencient en cellules au phénotype très proche aux macrophages embryonnaires via différents intermédiaires à courte demi-vie. Les cellules qui résultent de ce processus de différenciation sont *CX3CR1*^{hi} *F4/80*^{hi} *MHC-II*⁺ *CD64*⁺ *CD11c*⁺, ont une activité phagocytaire active et produisent constitutivement de l'*IL-10*. L'apport continu de monocytes se différenciant sous l'influence de leur microenvironnement permet aux macrophages intestinaux de remplir leurs fonctions physiologiques de remodelage tissulaire, d'élimination des débris et de détection de pathogènes invasifs, sans déclencher d'inflammation délétère (Bain, Bravo-Blas et al. 2014).

Chez l'homme, les patients portant une mutation de GATA2, facteur de transcription requis pour le développement des DC et monocytes, n'ont pas de déficits de macrophages dans la peau et les poumons (Bigley, Haniffa et al. 2011). Ceci suggère que le maintien de ces cellules est indépendant de l'influx de monocytes. De plus, dans des cas de greffes de peau, les cellules de Langerhans sont encore d'origine du donneur 10 ans après la transplantation. Ceci montre la capacité d'auto-renouvellement de ces populations (Kanitakis, Morelon et al. 2011). Donc, comme pour la souris, au moins certaines populations de macrophages chez l'homme seraient maintenues sans l'apport de monocytes au sein des tissus.

Dans un souci de simplification des nomenclatures, Martin Williams et ses collaborateurs ont récemment proposé que le terme « macrophage » soit restreint aux phagocytes mononucléés d'origine embryonnaire (Williams, Ginhoux et al. 2014).

III. Développement des monocytes et DC.

Le développement des monocytes et DC chez l'adulte a lieu dans la moelle osseuse, où des cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient progressivement en précurseurs myéloïdes puis en cellules matures. L'hématopoïèse est un système organisé hiérarchiquement, où toutes les cellules dérivent des HSC. Via la maintenance, l'expansion et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, l'hématopoïèse permet la génération de toutes les cellules sanguines et immunitaires nécessaires au cours de la vie de l'organisme. Les cellules hématopoïétiques matures ont pour la plupart une courte durée de vie, atteignant souvent quelques jours tout au plus. La majorité de ces cellules a aussi une capacité de prolifération très réduite, c'est pourquoi ces populations doivent être constamment régénérées dans la moelle osseuse. Le système hématopoïétique a également la capacité de s'adapter à un stress comme une hémorragie ou une infection sévère, en augmentant fortement la production cellulaire afin de répondre aux besoins de l'organisme (Orkin and Zon 2008, Manz and Boettcher 2014). La majorité des HSC sont quiescentes à l'homéostasie mais leur très fort potentiel prolifératif leur confère la capacité de s'auto-renouveler continuellement afin de maintenir leur effectif. Ces cellules peuvent se différencier en progéniteurs multipotents comme le progéniteur myéloïde commun (CMP), qui est à la base de la génération de l'ensemble des cellules de la lignée myéloïde (= myélopoïèse), comprenant les granulocytes, les macrophages, les monocytes et les DC (Figure 19).

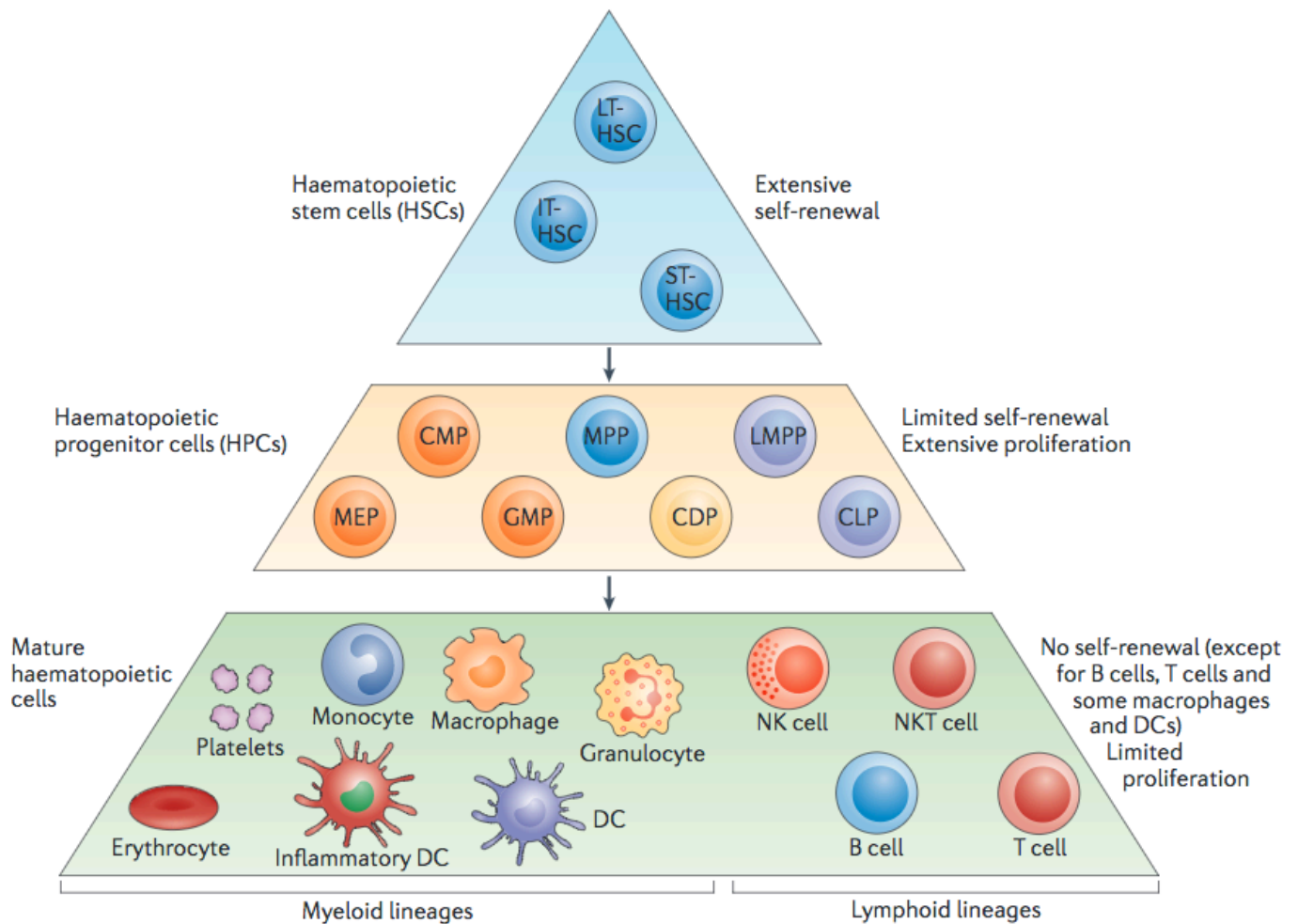


Figure 19 : Hiérarchie du système hématopoïétique. Les HSC permettent le maintien du système hématopoïétique via leur activité proliférative qui leur permet de s'auto-renouveler. Trois populations sont décrites en fonction de leur capacité dans le temps à maintenir le spectre complet des cellules matures de ce système : *long-term* (LT-), *intermediate-term* (IT-) and *short-term* (ST-) HSC. Ces HSC génèrent constamment divers précurseurs hématopoïétiques qui ont perdu leur capacité d'auto-renouvellement, comme les *multipotent progenitors* (MPP), *lymphoid-primed multipotent progenitors* (LMPP), *common lymphoid progenitors* (CLP), *common myeloid progenitors* (CMP), *granulocyte-macrophage progenitors* (GMP), *megakaryocyte-erythrocyte progenitors* (MEP) et *common dendritic cells progenitors* (CDP). Finalement, ces progéniteurs se différencient en cellules des différentes lignées hématopoïétiques comme les érythrocytes, les lymphocytes B et T, les cellules *natural killer* (NK), les lymphocytes NKT ou encore les cellules dendritiques (DC) (Manz and Boettcher 2014).

Différents progéniteurs restreints à certaines sous populations ont été identifiés et classés hiérarchiquement selon leur potentiel de différenciation. Cependant, il est difficile d'établir une véritable hiérarchie entre eux. En effet, il existe vraisemblablement plusieurs voies menant à la génération d'une même population. De plus, grâce à la culture de progéniteurs hématopoïétiques isolés, de récentes études ont suggéré que l'engagement vers une lignée se fait dès le stade des HSC, qui ont majoritairement un développement biaisé chez

l'homme comme chez la souris (Naik, Perie et al. 2013, Yamamoto, Morita et al. 2013, Paul, Arkin et al. 2015, Lee, Zhou et al. 2017). De nombreuses études sont encore nécessaires afin d'améliorer notre compréhension du système hématopoïétique, à l'homéostasie comme dans différentes conditions de stress (Manz and Boettcher 2014).

Notre compréhension de l'ontogénie des phagocytes mononuclées a été grandement améliorée par la découverte il y a une décennie d'un précurseur commun aux monocytes et DC dans la moelle osseuse murine. Ce précurseur, nommé MDP pour *macrophage and dendritic cells progenitor*, génère des monocytes, des macrophages et des DC *in vitro* ou dans différents tissus lorsqu'il est transféré dans la moelle osseuse de souris receveuses ayant été préalablement irradiées. Le MDP n'exprime pas les marqueurs de lignée lymphoïde ou érythroïde et est positif pour les récepteurs au *stem cell factor* c-kit (aussi nommé CD117), M-CSF-R (ou CD115) et le récepteur Flt3 (CD135) (Fogg, Sibon et al. 2006, Auffray, Fogg et al. 2009). Dès lors, de nombreux efforts ont été faits pour identifier des précurseurs restreints aux DC ou à la lignée monocyttaire.

Il est probable que la différenciation du MDP vers la lignée monocyttaire ou des DC conventionnelles soit faite en fonction de la balance entre les signaux liés à l'activation des récepteurs Flt3 ou M-CSF-R, importants pour le développement des DC ou des monocytes, respectivement (Schmid, Kingston et al. 2010). Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'expression de M-CSF-R diminue sur les précurseurs des cDC et pDC et n'est plus retrouvé sur les cellules matures. A l'inverse, Flt3 n'est pas retrouvé sur les précurseurs restreints à la lignée monocyttaire (Hettinger, Richards et al. 2013, Merad, Sathe et al. 2013). La signalisation de ces facteurs de croissance pourrait induire des modifications des niveaux d'expression de certains facteurs de transcription. Par exemple, les facteurs de transcription PU.1 et MAFB sont cruciaux pour le développement des DC ou des monocytes, respectivement, et pourraient être impliqués dans l'engagement dans une de ces deux lignées (Bakri, Sarrazin et al. 2005).

III. 1. Développement des monocytes.

Un progéniteur restreint aux monocytes et dérivant directement du MDP fut récemment identifié, nommé cMoP pour *common monocyte progenitor*. Celui-ci diffère phénotypiquement du MDP par la perte de l'expression de Flt3, important pour le développement et l'homéostasie des DC. En conséquence, les cMoP se différencient en monocytes et leurs descendants mais ne génèrent pas de DC conventionnelles, indépendantes

des monocytes (Hettinger, Richards et al. 2013). Le développement des cMoP en monocytes passe aussi par les stades monoblastes puis pro-monocytes, qui sont caractérisées par leur expression de *stem cell antigen 1* (Sca-1) et qui ont un turn-over très rapide dans la moelle osseuse (Takahashi, Naito et al. 1996, Serbina, Hohl et al. 2009). Les monocytes ainsi différenciés migrent ensuite de la moelle osseuse vers les tissus de manière dépendante du récepteur de chimiokines CCR2, et s'y différencient en fonction du microenvironnement (Ginhoux and Jung 2014).

III. 2. Développement des cellules dendritiques.

Le développement des MoDC a déjà été en grande partie discuté dans les paragraphes précédents, où nous avons vu que les monocytes et DC partageaient un progéniteur commun restreint à ces deux lignées, nommé MDP (Fogg, Sibon et al. 2006, Auffray, Fogg et al. 2009). Une fois recrutés dans les tissus via l'activation de CCR2, les monocytes peuvent acquérir les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des DC, bien que les facteurs influençant cette différenciation soient encore inconnus. Il semble que l'activation d'IRF4 permette aux monocytes de se différencier en MoDC et que seuls les monocytes ré-exprimant Flt3 puissent générer des MoDC (Briseno, Haldar et al. 2016, Menezes, Melandri et al. 2016).

En parallèle des cMoP pour la génération de la lignée monocyttaire, un progéniteur restreint aux cDC et pDC et incapable de donner des monocytes est généré à partir du MDP. Ce précurseur fut nommé CDP pour *common dendritic cells progenitor*. Comme le MDP, il exprime M-CSF-R et Flt3 mais se distingue du MDP par son expression réduite du récepteur c-kit (Naik, Metcalf et al. 2006, Naik, Sathe et al. 2007, Onai, Obata-Onai et al. 2007). Ce CDP peut ensuite générer d'une part les pré-pDC générant les pDC dans la moelle osseuse, et d'autre part les pré-cDC, qui sont les précurseurs circulants directs des cDC dans les tissus (Onai, Kurabayashi et al. 2013). Les pré-cDC quittent la moelle osseuse via la circulation sanguine puis pénètrent dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes afin de s'y différencier en cDC (Naik, Metcalf et al. 2006, Naik, Sathe et al. 2007, Onai, Obata-Onai et al. 2007). Les facteurs influençant la différenciation des pré-cDC vers les cDC1 ou les cDC2 restent encore inconnus. Cependant, il semble que la décision soit prise dès le stade du CDP, ceux-ci pouvant déjà présenter une signature transcriptionnelle proche des cDC1 ou des cDC2. De plus, la population des pré-cDC semble être hétérogène, contenant un mix de pré-cDC1 et pré-cDC2 chez la souris (Schlitzer, Sivakamasundari et al. 2015) comme chez l'homme (See, Dutertre et al. 2017).

Enfin, certaines études ont montré la différenciation de DC à partir de progéniteurs lymphoïdes. Ces données ont suggéré que les différentes populations de DC pourraient avoir différentes origines. Cependant, il semble que la différenciation de DC à partir de progéniteurs lymphoïdes soit un processus très marginal, restreint à certaines conditions et aux DC du thymus (Manz, Traver et al. 2001, Corcoran, Ferrero et al. 2003, Welner, Pelayo et al. 2008).

III. 3. Homologie chez l'homme

L'ontogénie des DC et monocytes chez l'homme est bien moins renseignée que chez la souris. Cependant, de récentes études ont permis de faire un lien avec ce qui est observé avec les modèles animaux. En effet, un homologue du MDP murin a été mis en évidence à partir de la différenciation de cellules souches hématopoïétique humaines CD34+ *in vitro*. Comme son homologue murin, ce *human macrophages and dendritic cells progenitor* (hMDP) a la capacité de générer des monocytes ou le *human common dendritic cells progenitor* (hCDP), qui a son tour génère les pDC et cDC (Lee, Breton et al. 2015). En parallèle, d'autres équipes ont montré que la génération des cDC1 et cDC2 par les hCDP passait, comme chez la souris, par la production d'un progéniteur circulant, le hPré-cDC, incapable de générer les pDC. Comme leurs homologues murins, les hPré-cDC sont hétérogènes et comportent différentes fractions déjà engagées pour devenir cDC1 ou cDC2 (Breton, Lee et al. 2015, Breton, Zheng et al. 2016, See, Dutertre et al. 2017). Aussi, une récente étude a démontré que la génération des monocytes humains par les hMDP passe par la production de précurseurs restreints nommés cMoP, comme chez la souris (Kawamura, Onai et al. 2017).

IV. Développement des phagocytes en contexte infectieux.

L'hématopoïèse est un processus dynamique et sensible au stress. Nous avons vu que chaque population de phagocytes pouvait avoir des implications diverses dans les processus immunologiques. De plus, ces populations peuvent exprimer certains PRR de manière mutuellement exclusive, par exemple les cDC1 expriment spécifiquement le TLR3 alors que l'expression de TLR7 est restreinte aux pDC. L'activation spécifique de certains récepteurs pourrait donc permettre la production de cellules effectrices en accord avec les types de pathogènes détectés et leur signature moléculaire. Une meilleure compréhension de ces processus hématopoïétiques en contexte infectieux pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans différents cadres pathologiques.

Les infections locales bénignes n'ont qu'un impact très limité sur les processus hématopoïétiques. Cependant, chez l'homme comme la souris, des études ont montré une augmentation significative du taux sanguin des facteurs de croissance impliqués dans la myélopoïèse, comme le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) ou le GM-CSF et le Flt3, au cours d'infections bactériennes systémiques. Ces facteurs de croissance atteignent des concentrations dans le sang jusqu'à 100 fois supérieures à celles observées à l'état basal. Ces infections systémiques induisent la prolifération des précurseurs myéloïdes dans la moelle osseuse et une augmentation considérable de la production de phagocytes, notamment de granulocytes neutrophiles massivement recrutés dans ces conditions. Ceci se fait au détriment de la production de lymphocytes (lymphopoïèse), qui ont une capacité proliférative bien plus élevée. Ce processus permet la génération rapide de cellules effectrices lorsqu'elles sont massivement sollicitées et est parfois appelé « myélopoïèse d'urgence » (Manz and Boettcher 2014). L'injection intraveineuse de molécules purifiées de LPS chez la souris est suffisante pour induire cette myélopoïèse d'urgence. Des expériences de chimères de moelles osseuses ont cependant montré que la détection des LPS par les cellules hématopoïétiques murines n'est pas nécessaire pour induire ce phénomène. Afin d'induire cette myélopoïèse d'urgence, le TLR4 doit être exprimé par des cellules radio-résistantes de l'hôte. Ces cellules produisent alors le facteur de croissance G-CSF, suffisant pour induire ce phénomène (Boettcher, Ziegler et al. 2012). Le G-CSF peut aussi être produit suite à l'activation des inflammasomes, dépendamment des cytokines IL-1 β et l'IL-1 α , induisant ainsi la myélopoïèse d'urgence (Suzuki, Takahashi et al. 1992, Dubois, Neta et al. 1993). Une étude récente a aussi permis de mettre en évidence la production d'IL-3 par les lymphocytes B dans un modèle murin de sepsis. Cet IL-3 permet une augmentation significative de la production de monocytes et neutrophiles, impliqués dans le SIRS et la « tempête cytokinique ». De plus, chez les patients septiques, une concentration élevée en IL-3 dans le sérum est prédictif d'un mauvais pronostic (Weber, Chousterman et al. 2015). Les progéniteurs hématopoïétiques peuvent donc être activés indirectement en cas d'infection sévère afin de réorienter la production de cellules vers la lignée myéloïde.

De récentes études ont montré que les progéniteurs hématopoïétiques eux-mêmes expriment également des PRR, dont les TLR (Nagai, Garrett et al. 2006, Schmid, Takizawa et al. 2011). Ils peuvent donc théoriquement détecter directement des PAMP et réagir en conséquence. Des expériences de culture *in vitro* de HSC murines et humaines stimulées avec des agonistes des TLR ont montré leur différenciation préférentielle en phagocytes, au

détriment des cellules de la lignée lymphoïde (Nagai, Garrett et al. 2006, Sioud, Floisand et al. 2006, Sioud and Floisand 2007, De Luca, Frances-Duvert et al. 2009). De plus, des expériences de parabiotés ont montré qu'un faible nombre de HSC pénètre continuellement dans la circulation sanguine avant de retourner dans la moelle osseuse (Wright, Wagers et al. 2001). Ce phénomène pourrait permettre aux HSC de générer des cellules effectrices localement, directement après la rencontre avec un micro-organisme, et de manière adaptée à la signature moléculaire des pathogènes rencontrés (Massberg, Schaerli et al. 2007). Une étude a montré qu'en cas d'infection bactérienne systémique, des HSC migrent vers la rate afin de mettre en place un second foyer de l'hématopoïèse. Ce phénomène dépend de la synergie entre les signaux induits par l'activation des TLR et des récepteurs NOD. L'activation concomitante de ces PRR conduit à la diminution de la chimiokine CXCL12 dans la moelle osseuse, ligand de *CXC-chemokine receptor 4* (CXCR4) et impliqué dans la rétention des cellules dans cet organe. Cependant, là aussi la signalisation TLR4-NOD est cruciale sur les cellules non-hématopoïétiques et l'activation des cellules hématopoïétiques est indirecte. Ce phénomène permet donc la génération d'une nouvelle niche hématopoïétique et la différenciation de phagocytes contribuant au contrôle de l'infection (Burberry, Zeng et al. 2014).

Les IFN de type I peuvent avoir un effet sur l'hématopoïèse *in vivo*, notamment en induisant la prolifération des HSC quiescentes suite à l'injection d'acide polyinosinique : polycytidylique (poly I:C) à des souris, agoniste de TLR3 (Essers, Offner et al. 2009). Cependant, la signalisation excessive des IFN de type I, induite par exemple par la déficience pour le régulateur négatif de cette signalisation IRF-2, conduit à terme à l'affaiblissement de la prolifération des HSC, comme en témoigne la faible capacité de repopulation après transplantation de ces cellules hématopoïétiques (Sato, Sugiyama et al. 2003, Passegue, Wagers et al. 2005). Aussi, l'administration chronique de poly I:C induit une déplétion sélective des HSC WT dans des souris chimères de moelle osseuse WT : IFNAR1^{-/-}. La prolifération excessive pourrait en effet induire un état d'affaiblissement de la fonction de cellules souche via la différenciation, la sénescence ou encore l'apoptose, diminuant ainsi les risques de transformation maligne et de perturbation de l'architecture tissulaire (Orford and Scadden 2008, Essers, Offner et al. 2009). Il semble donc que les IFN de type I aient un rôle important dans l'hématopoïèse, en augmentant la prolifération des HSC dans un contexte infectieux. Cependant une signalisation excessive pourrait être délétère pour la prolifération

des HSC à plus long terme, induisant une déplétion de ces cellules pouvant provoquer des leucopénies et des anomalies hématopoïétiques.

L'influence du contexte infectieux sur le potentiel de différenciation des précurseurs myéloïdes est encore peu documentée. En plus de leurs rôles sur les HSC, les IFN de type I sont impliqués dans la différenciation des précurseurs communs myéloïdes (CMP) en macrophages, suite à l'activation directe sur ces cellules du TLR7 par le R848 (Buechler, Akilesh et al. 2016). Aussi, une étude a montré que le précurseur de DC murin, le CDP, exprime certains TLR, dont le TLR4. L'activation *in vitro* de ces TLR induit une diminution de l'expression du récepteur aux chimiokines CXCR4, impliqué dans la rétention des CDP dans la moelle osseuse comme expliqué précédemment. L'activation *in vitro* des TLR du CDP induit également l'augmentation de l'expression du récepteur aux chimiokines CCR7, impliqué dans la migration des DC vers les organes lymphoïdes. Lorsque ces CDP activés furent transférés à des souris, ils ont été retrouvés préférentiellement au niveau des ganglions lymphatiques riches en agonistes de TLR où ils se sont différenciés. Les différentes populations de DC n'ont pas été étudiées dans les détails dans cette étude, il n'est donc pas possible de conclure sur le biais potentiel de différenciation des CDP stimulés (Schmid, Takizawa et al. 2011). Cependant, une étude a montré que la différenciation de cellules hématopoïétiques issues de souris septiques *in vitro*, avec la cytokine GM-CSF, induit la génération de DC au phénotype immunosuppresseur, aggravant la susceptibilité aux infections secondaires lorsque celles-ci sont injectées à des souris septiques. A l'inverse, l'injection de DC dérivées *in vitro* de moelle osseuse de souris saines améliore considérablement la résistance des souris septiques aux infections secondaires (Pene, Zuber et al. 2008). Il semble donc que les DC générées au cours du sepsis aient des effets différents par rapport à celles générées en conditions homéostatiques, et qu'elles soient impliquées dans l'immunosuppression observée chez les patients septiques.

Dans différents modèles d'infection bactérienne, la mobilisation de monocytes dépendante du récepteur de chimiokines CCR2 est cruciale pour le contrôle de la pathologie (Serbina and Pamer 2006, Serbina, Jia et al. 2008). Pasquevich et ses collaborateurs ont récemment montré que l'infection de souris avec le bacille à Gram négatif *Yersinia enterocolitica* induit une différenciation biaisée des progéniteurs myéloïdes vers la lignée monocyttaire (monopoïèse) au détriment des DC conventionnelles. Ce processus est dépendant de l'activation du TLR4 et de la production et la détection de l'IFN- γ par des cellules non

hématopoïétique (Pasquevich, Bieber et al. 2015). La génération de monocytes au détriment des DC pourrait augmenter la disponibilité de cellules effectrices de l'immunité innée afin de contrer l'infection. Cependant, ce processus pourrait être impliqué dans l'immunosuppression observée chez les animaux et les patients septiques.

Pour conclure, l'ensemble des données actuelles suggère que les précurseurs hématopoïétiques expriment des PRR et sont équipés pour la détection directe des pathogènes. Cependant, *in vivo*, la détection directe des pathogènes par les HSC semble plus marginale que leur activation indirecte. Ceci est suggéré par plusieurs études utilisant des systèmes de chimère de moelles osseuses, permettant la délétion d'un TLR spécifiquement dans les compartiments hématopoïétiques ou structurels. La compréhension des mécanismes par lesquels le système hématopoïétique répond au stress afin de produire les types cellulaires adéquats permettrait le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de différents syndromes ou pathologies.

Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le sepsis est un syndrome se définissant comme la réponse exacerbée de l'organisme à une infection. C'est une cause majeure de mortalité dans les unités de soins intensifs et un problème clinique crucial de ces dernières années. La prise en charge des patients ayant été grandement améliorée au cours des dernières années, la mortalité précoce des patients septiques a significativement baissé, laissant place à une majorité de morts tardives liées à des dysfonctions de certains organes et une immunosuppression menant au développement de maladies secondaires ou nosocomiales (Delano and Ward 2016). Avec le vieillissement de la population, l'amélioration du support aux fonctions vitales et les traitements antibiotiques, plusieurs études ont prédit que l'incidence du sepsis devrait significativement croître au cours des prochaines années, augmentant ainsi les dépenses associées aux soins et à la prise en charge des patients, déjà très élevées (Coopersmith, Wunsch et al. 2012, Kaukonen, Bailey et al. 2014, Kahn, Le et al. 2015). Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement spécifique, les patients ne recevant que le support à leurs fonctions vitales et des antibiotiques. Il est donc nécessaire d'améliorer notre connaissance de ce syndrome afin de permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces.

Afin d'expliquer au moins en partie l'immunosuppression des patients septiques, de nombreuses études ont rapporté une diminution du nombre de cellules immunitaires chez ces patients, affectant aussi bien les lignées myéloïdes et lymphoïdes. Ces leucopénies ont par ailleurs été plusieurs fois corrélées à un mauvais pronostic pour les patients septiques (Croker, O'Donnell et al. 2014). Comme cela a été suggéré dans différentes études chez la souris, des stratégies visant à rétablir les nombres et la fonction normale des DC pourraient permettre de contrer l'immunosuppression induite par le sepsis.

L'activation des inflammasomes par divers stimuli conduit à la libération des cytokines IL-1 β et IL-18 et à la mort cellulaire pro-inflammatoire de type pyroptose. L'IL-1 β peut induire la production de G-CSF, suffisant pour induire l'hématopoïèse d'urgence (Suzuki, Takahashi et al. 1992, Dubois, Neta et al. 1993). Le traitement avec l'*IL-1 receptor antagonist* recombinant améliore l'hématopoïèse et la survie de souris à une chimiothérapie (Zhang, Xiang et al. 2009, Qian, Xiang et al. 2013). De plus, le traitement au G-CSF induit l'augmentation de l'expression de l'*IL-1 receptor antagonist* et améliore la greffe de cellules

souches hématopoïétiques (Schwabe, Hartert et al. 2004). Les DAMP libérés lors de la pyroptose peuvent aussi avoir des effets au niveau de l'hématopoïèse. Par exemple, la présence dans le microenvironnement d'ADN mitochondrial ou des protéines nucléaires HMGB1 induisent la production d'IFN de type I, impliqués dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques mais aussi dans leur déplétion et dans les cytopénies associées à certaines infections (Yanai, Ban et al. 2009, Zhang, Raoof et al. 2010, Smith, Kanwar et al. 2016). En plus de ces effets indirects, la pyroptose pourrait toucher directement les cellules matures, les cellules souches ou les progéniteurs hématopoïétiques, induisant ainsi des cytopénies et l'immunosuppression observées chez les patients. Par exemple, au cours d'une chimiothérapie ou d'une infection virale, les cellules souches ou progéniteurs hématopoïétiques sont sensibles à la pyroptose, de manière dépendante de NLRP1. La mort de ces cellules par pyroptose induit alors une défaillance profonde de l'hématopoïèse, une cytopénie et une immunosuppression (Masters, Gerlic et al. 2012). De plus, Gentile *et al* ont récemment montré que la déficience en caspase-1 et 11 améliore la survie de souris néonatales à une infection bactérienne. Cette augmentation de la survie étant associée à des nombres plus élevés de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Gentile, Cuenca et al. 2015). Il semble donc que l'activation des inflammasomes pourrait être, directement ou non, corrélée au développement de l'immunosuppression et des cytopénies observée chez les patients septiques.

La majorité des études intéressées par la diminution des DC au cours du sepsis n'a pas examiné en détail le phénotype des cellules analysées. Les phénotypes utilisés pour caractériser les DC dans ces études peuvent très souvent englober différentes populations de DC et autres phagocytes. Les macrophages, DC et cellules dérivées de monocytes ont des phénotypes parfois très proches et la distinction entre ces différentes populations est souvent difficile. Ces cellules ayant des implications relativement spécialisées dans les processus immunologiques, il est possible que les diminutions rapportées des DC soient en fait la résultante d'un mécanisme plus complexe. Certaines études ont montré qu'une simple injection intraveineuse de LPS chez des souris induit une diminution des nombres de DC dans les tissus et de la production des cytokines immunostimulatrices (Gautier, Huby et al. 2008). La présence systémique de LPS permet également le développement rapide de phagocytes tolérogènes au détriment des cDC. Ces phagocytes sont retrouvés dans la rate dès 24h après l'injection du LPS et permettent le développement de LT régulateurs produisant de l'IL-10 (Wong and Rodriguez 2008). Donc, des populations spécifiques de phagocytes pourraient être

favorisées au détriment d'autres, biaisant ainsi la réponse du système immunitaire à différents stimuli. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreuses avancées ont été faites récemment concernant notre compréhension et la caractérisation des différentes populations de phagocytes mononucléés et de leurs précurseurs hématopoïétiques. Nous avons vu que les cellules dérivées de monocytes et les macrophages peuvent se distinguer des cDC par l'expression de récepteurs aux fragments cristallisables (Fc) des anticorps, et notamment CD64 (FcγRI).

L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier la diversité des phagocytes mononucléés et de leurs précurseurs hématopoïétiques dans la rate et la moelle osseuse en utilisant un modèle simple et reproductible d'endotoxémie murine réalisé par injection intraveineuse de LPS. Pour cela nous avons tiré partie des dernières avancées concernant le phénotype des cellules et la distinction des différentes populations. Nous avons ensuite évalué l'importance de l'inflammasome et de la signalisation des IFN de type I dans les phénotypes observés et avons cherché à évaluer si ce phénomène pouvait être reproduit *in vitro*.

En parallèle, alors que l'inflammasome non canonique était encore une découverte toute récente au début de ma thèse, nous avons souhaité tirer partie de la plate-forme de criblage à haut-débit présente sur le campus de l'Institut Pasteur de Lille. J'ai pu développer un criblage de siRNA représentatifs du génome murin dans son intégralité afin de découvrir de manière non biaisée de potentiels régulateurs de l'inflammasome non canonique activé par le LPS intracellulaire.

Dans leur ensemble, ces travaux ont pour objectif de contribuer à l'amélioration de notre compréhension des effets de l'endotoxémie sur les populations de phagocytes mononucléés et de leurs précurseurs. A terme, la manipulation thérapeutique des différentes populations de phagocytes mononucléés pourrait permettre le développement de nouveaux traitements afin de limiter ou au contraire d'induire l'immunosuppression dans différents cadres pathologiques.

Résultats

Chapitre 1. Conditionnement des phagocytes mononucléés par les LPS

Génération de cellules présentatrices d'antigènes d'origine monocyttaire dans la rate et la moelle osseuse de souris endotoxémiques.

Afin d'évaluer l'impact de la présence systémique d'endotoxines sur les différentes populations de phagocytes mononucléés, nous avons injecté une solution de LPS 0111 :B4 par voie intraveineuse à des souris C57BL/6 (25µg/souris) et avons analysé leur contenu splénique en phagocytes mononucléés par cytométrie en flux (Figure 20 A.). En analysant les singlets viables et en excluant les cellules exprimant les marqueurs de lignée sélectionnés (CD3, CD19, NK1.1, Ly6G, Ter119), nous avons ainsi observé l'augmentation d'une population splénique $\text{Lin}^- \text{CD64}^+ \text{CD11b}^+ \text{CD135}^-$, dont l'expression de CD64 suggère une origine monocyttaire. Cette population est peu représentée à l'état basal, cependant les LPS induisent une augmentation importante du nombre de ces cellules dans la rate, dont le pic est atteint 24h après l'injection (Figure 20 A.). Dans un souci de simplification, nous appellerons cette population « cellules présentatrices d'antigènes d'origine monocyttaire » (Mo-APC), sans entrer dans les détails de leur fonction. Dans le but de déterminer si l'inflammasome ou les IFN de type I sont impliqués dans la génération de ces Mo-APC, des souris déficientes pour IFNAR (IFNAR-KO) ou pour la Caspase-1 (Caspase-1-KO) ont reçu des LPS par injection intraveineuse. Les contenus spléniques de ces souris ont été analysés 24h après l'injection par cytométrie en flux. Il apparaît alors que les nombres des Mo-APC générées suite à l'injection de LPS sont très considérablement plus faibles chez les souris IFNAR-KO, par rapport aux souris WT ou Caspase-1-KO. Comme en témoigne la concentration sérique en IL-18, l'inflammasome semble bien activé chez les souris WT et IFNAR-KO 24h après l'injection des LPS, contrairement, aux souris Caspase-1-KO (Figure 20 A.). Les nombres de Mo-APC spléniques obtenus suite à l'injection des LPS aux souris Caspase-1-KO sont, cependant, similaires à ceux obtenus avec les souris *wild type* (WT) (C57BL/6) (Figure 20 A.). Nous pouvons donc en conclure que, contrairement à l'activation des inflammasomes, la signalisation des IFN de type I semble cruciale pour la génération des Mo-APC spléniques en condition d'endotoxémie.

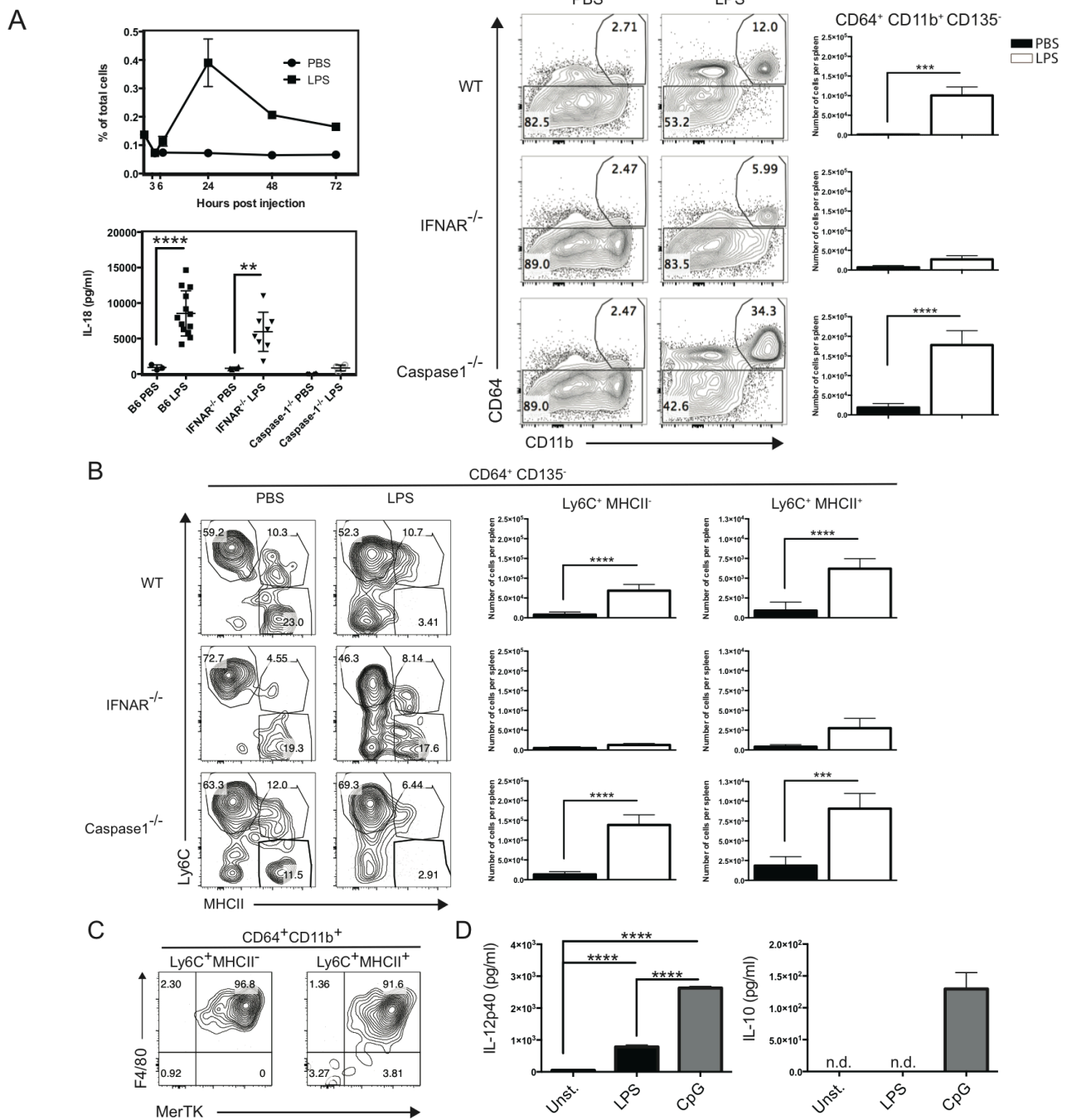


Figure 20 : Induction de Mo-APC spléniques dépendamment des IFN de type I au cours de l'endotoxémie induite par les LPS. Des souris WT, IFNAR-KO et Caspase-1-KO ont reçu une injection intraveineuse de LPS ou de PBS. Les cellules de la rate ont ensuite été analysées par cytométrie en flux en cinétique (A. panel du haut à gauche) ou 24h après l'injection du LPS (A. panel du bas et de la droite, B et C.). L'ELISA IL-18 a été réalisé sur le sérum collecté 24h après l'injection du LPS (A.). Les Mo-APC ont été analysées comme étant Lin⁻ CD11b⁺ CD64⁺ CD135⁻ (A.) et l'expression par ces cellules de Ly6C et MHC-II (B.) et de F480 et MerTK (C.) a été évaluée par cytométrie en flux. (D.) Les Mo-APC spléniques Lin⁻ CD11b⁺ CD64⁺ CD135⁻ ont été triées par cytométrie en flux 24h après l'injection de LPS et mises en culture *in vitro* avec du milieu de culture complet supplémenté ou non avec des LPS (100 ng/ml) ou de l'ADN CpG (5µM). Les ELISA IL-12p40 et IL-10 ont ensuite été réalisés sur les surnageants récupérés 48h après la stimulation. Ces résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes (n=2-5). Les barres indiquent la moyenne ± l'écart-type. Les statistiques ont été calculées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney. P<0,01 (**), P<0,001 (***) et P<0,0001 (****) ont été considérés comme statistiquement significatifs.

Pour étudier plus en détails le phénotype des Mo-APC⁺ induites par les LPS, nous avons déterminé leur expression de Ly6C, MHC-II témoignant de la différenciation des monocytes. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le recrutement des monocytes au sein des tissus induit un processus de maturation parfois appelé «cascade monocyttaire». Brièvement, les monocytes acquièrent l'expression de MHC-II tout en diminuant l'expression de Ly6C au cours de leur maturation tissulaire (Tamoutounour, Henri et al. 2012). Nous avons alors observé une augmentation significative des populations exprimant Ly6C, indépendamment de l'expression de MHC-II, chez les souris WT et Caspase-1-KO 24h après l'injection des LPS (Figure 20 B). De plus, afin d'étudier plus précisément le phénotype de ces cellules, nous avons évalué l'expression des marqueurs de macrophages F4/80 et MerTK. Ces deux marqueurs sont effectivement exprimés par les cellules Lin⁻ CD64⁺CD11b⁺ CD135⁻ Ly6C⁺ MHCII⁻ et Ly6C⁺ MHC-II⁺ (Figure 20 C). Lorsque les cellules Lin⁻CD64⁺C11b⁺CD135⁻ ont été triées par cytométrie en flux et remises en culture *in vitro*, nous avons alors observé que celles ci produisaient de l'IL-10 après stimulation avec de l'ADN CpG, ligand du TLR9. Ces cellules produisent également de l'IL-12p40 suite à une stimulation avec des LPS ou avec l'ADN CpG. Cependant, leur production d'IL-12p40 en réponse aux LPS est significativement plus faible par rapport à la quantité produite suite à une stimulation avec l'ADN CpG (Figure 20 D).

Ces populations cellulaires de Mo-APC Ly6C⁺ MHC-II⁻ et Ly6C⁺ MHC-II⁺ ont également été retrouvées dans la moelle osseuse, 24h après l'injection des LPS. Comme pour celles de la rate, ces cellules sont significativement générées chez les souris WT et Caspase-1-KO mais pas chez les souris IFNAR-KO (Figure 21). Donc, la présence systémique de molécules purifiées de LPS induit la génération rapide dans la rate et la moelle osseuse d'une population de phagocytes CD64⁺ CD135⁻, vraisemblablement d'origine monocyttaire. La génération de ces cellules est indépendante de l'activation des inflammasomes mais elle nécessite la signalisation des IFN de type I, comme le suggèrent les données obtenues avec les souris IFNAR-KO.

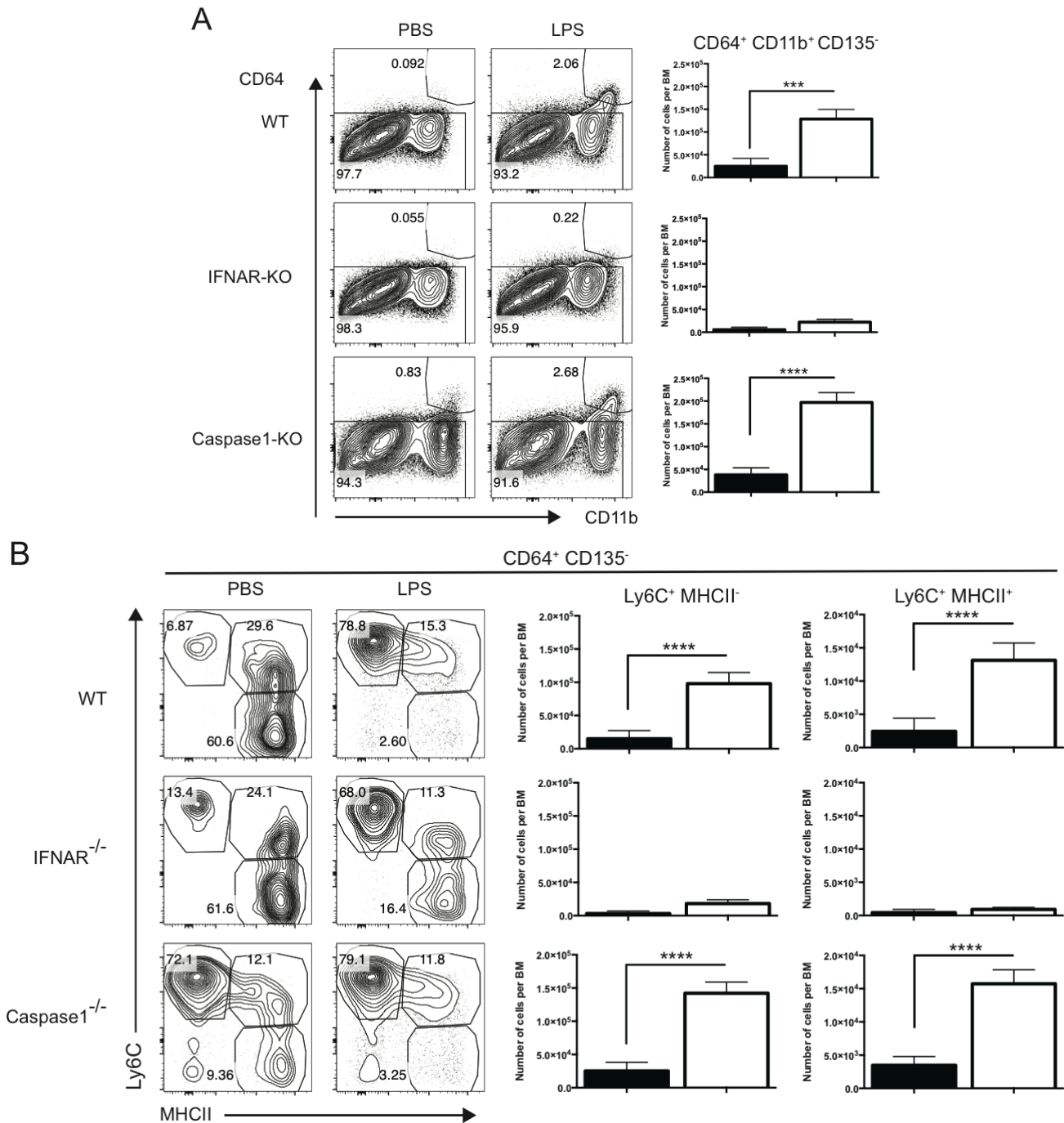


Figure 21 : Induction de Mo-APC médullaires dépendamment des IFN de type I au cours de l'endotoxémie induite par les LPS. Des souris WT, IFNAR-KO et Caspase-1-KO ont reçu une injection intraveineuse de LPS ou de PBS. Les cellules de la moelle osseuse ont ensuite été analysées par cytométrie en flux 24h après l'injection du LPS. Les Mo-APC ont été analysées comme étant Lin⁻ CD11b⁺ CD64⁺ CD135⁻ (A.) et l'expression de Ly6C et MHC-II par cette population cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux (B.). Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes (n=2-5). Les barres indiquent la moyenne ± l'écart-type. Les statistiques ont été calculées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney. P<0,001 (***) et P<0,0001 (****) ont été considérés comme statistiquement significatifs.

Diminution des cDC et de leurs précurseurs dans la rate et la moelle osseuse de souris endotoxémiques.

En parallèle de l'induction des Mo-APC, nous avons évalué l'impact de l'endotoxémie sur les nombres de DC conventionnelles (cDC) dans la rate. Pour cela, nous avons analysé le contenu splénique des souris endotoxémiques WT ou IFNAR-KO 24h après l'injection des LPS par cytométrie en flux. Les cDC ont été identifiées comme étant Lin⁻ CD64⁻ CD135⁺ MHC-II⁺ CD11c⁺ et les cDC2 ont été distinguées des cDC1 par leur expression de l'intégrine CD11b (Figure 22A.). Cette analyse nous a montré que, 24h après l'injection des LPS, les nombres de cDC1 et de cDC2 dans la rate sont significativement réduits chez les souris WT. En revanche, les nombres de cDC dans la rate de souris IFNAR-KO ne sont pas impactés par la présence systémique de LPS. Il est cependant intéressant de noter qu'à l'état basal, les cDC spléniques sont significativement moins nombreuses chez les souris IFNAR KO que chez les souris WT.

Nous avons également évalué l'impact de l'endotoxémie sur les nombres de pré-DC dans la moelle osseuse chez les souris WT et IFNAR-KO. Les pré-DC ont été identifiés comme étant Lin⁻ MHC-II⁻ CD11c⁺ CD135⁺ CD11b⁻ (Figure 22A). Cette expérience a montré que, indépendamment du phénotype, les nombres de pré-DC dans la moelle osseuse sont significativement diminués 24h après l'injection de LPS (Figure 22B.). Donc, chez les souris WT, l'augmentation des Mo-APC spléniques est concomitante avec une diminution des cDC spléniques et une diminution des pré-DC dans la moelle osseuse. Cette diminution des nombres des pré-DC pourrait s'expliquer par une migration accrue pour restaurer une quantité suffisante de cDC dans les tissus. Une autre explication pourrait être la réorientation des précurseurs restreints aux deux lignées, les MDP, vers la lignée monocyttaire au détriment de celle des cDC, comme cela a été décrit en cas d'infection par *Yersinia enterocolitica* (Pasquevich, Bieber et al. 2015). Chez les souris IFNAR-KO endotoxémiques, la diminution des cDC n'est plus observée mais leurs nombres à l'état basal sont aussi plus faibles. Néanmoins, la diminution des pré-DC dans la moelle osseuse en réponse aux LPS systémiques est toujours retrouvée chez ces souris (Figure 22A et B.).

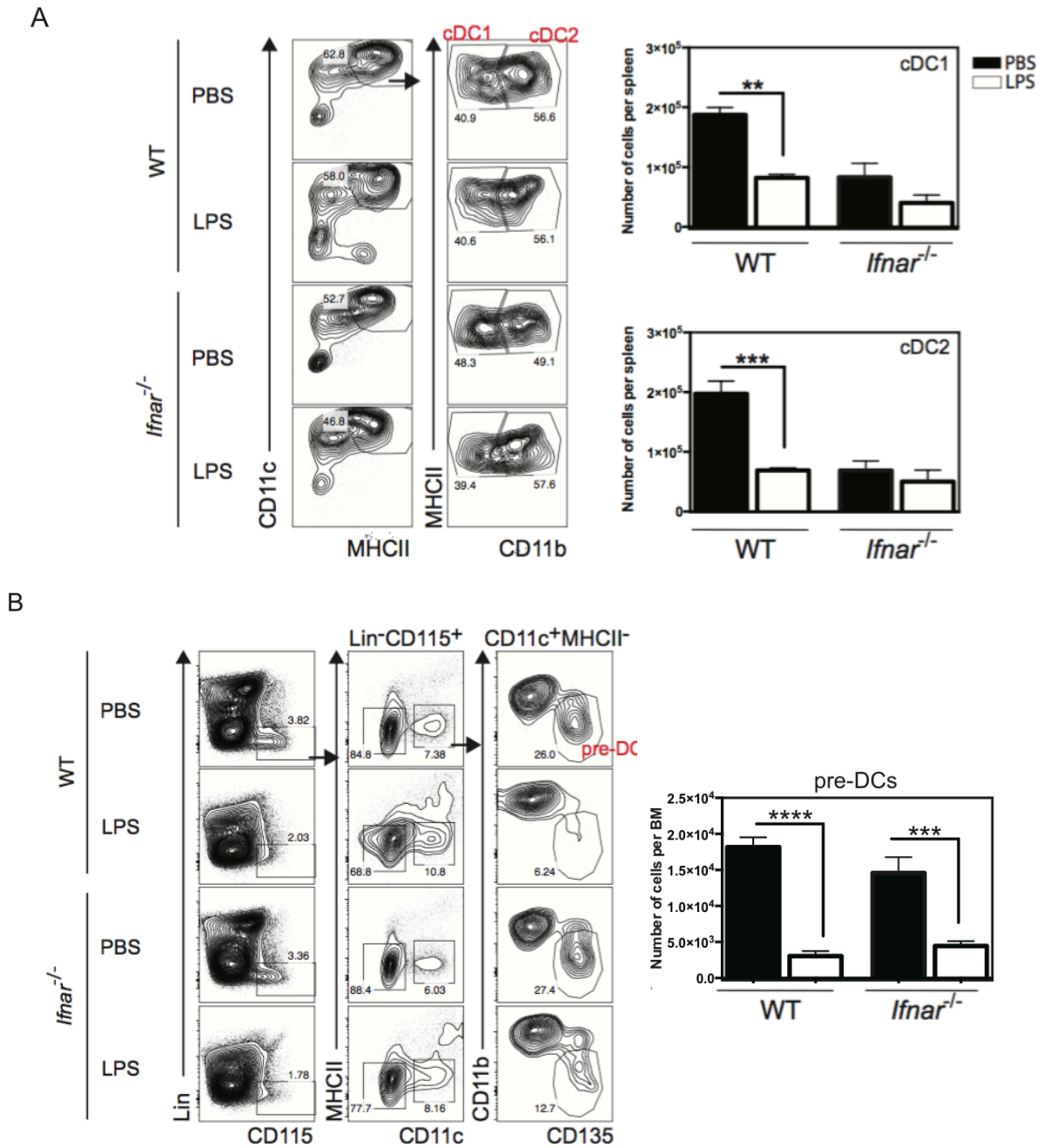


Figure 22 : Diminution des cDC spléniques et de leurs précurseurs médullaires au cours de l'endotoxémie. Des souris WT et IFNAR-KO ont reçu une injection intraveineuse de LPS ou de PBS. La rate (A.) et la moelle osseuse (B.) ont été collectées 24h après l'injection de LPS et analysées par cytométrie en flux. Afin d'identifier les cDC dans la rate, les cellules CD11c⁺ MHC-II⁺ ont été sélectionnées parmi les cellules Lin⁻ CD64⁻ CD135⁺. Les cDC2 ont été distinguées des cDC1 par leur expression de CD11b (A.). Dans la moelle osseuse, les Pré-DC ont été analysés comme étant Lin⁻ CD115⁺ CD11c⁺ MHC-II⁻ CD135⁺ CD11b⁻ (B.). Les barres indiquent la moyenne ± l'écart-type de 3 expériences indépendantes (n=2-5). Les statistiques ont été calculées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney. P<0,01 (**), P<0,001 (***) et P<0,0001 (****) ont été considérés comme statistiquement significatifs.

L'injection intraveineuse des LPS induit un processus de monopoïèse dépendamment des IFN de type I.

La présence systémique de LPS induisant la génération d'une population de Mo-APC dans la rate dépendamment des IFN de type I et au détriment des cDC, nous avons ensuite cherché à évaluer l'impact de l'endotoxémie sur les monocytes et leurs précurseurs chez les souris WT ou IFNAR-KO. Dans le sang périphérique, les nombres de monocytes sont significativement réduits chez les souris WT mais aussi chez les souris IFNAR-KO, 24h après l'injection des LPS (Figure 23). Ceci est cohérent avec un recrutement accru des ces cellules au sein des tissus et des organes périphériques, où ils pourront subir un processus de maturation. Concernant les précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, nous avons observé une diminution significative des cMoP ($\text{Lin}^- \text{CD115}^+ \text{CD11c}^- \text{MHC-II}^- \text{Ly6C}^+ \text{CD135}^- \text{CD117}^+ \text{CD11b}^- \text{Sca-1}^-$) et des monocytes ($\text{Lin}^- \text{CD115}^+ \text{CD11c}^- \text{MHC-II}^- \text{Ly6C}^+ \text{CD135}^- \text{CD117}^- \text{CD11b}^+ \text{Sca-1}^+$), indépendamment du génotype WT ou IFNAR-KO suite à l'injection des LPS (Figure 24A et B). Ces diminutions pourraient s'expliquer par la différenciation massive des cMoP en monocytes et par leur mobilisation vers les tissus. Nous avons également dénombré les précurseurs monocytaires que sont les monoblastes et pro-monocytes dans la moelle osseuse, qui se distinguent phénotypiquement des cMoP et des monocytes, respectivement, par leur expression de Sca-1. Ces cellules ont une demi-vie très courte et ne sont pas (ou très peu) présents à l'état basal. Les nombres de ces précurseurs sont significativement augmentés chez les souris WT, 24h après l'injection intraveineuse des LPS. Ceci suggère l'induction d'une monopoïèse active qui passe par l'induction de l'expression de Sca-1 par les cMoP en réponse à l'endotoxémie. Cependant, les nombres des monoblastes et pro-monocytes dans la moelle osseuse des souris IFNAR-KO 24h après l'injection de LPS ne sont pas augmentés (Figure 24C). La signalisation des IFN de type I semble donc être un mécanisme crucial pour la monopoïèse induite par les LPS.

Nous savons que l'expression de Sca-1, marqueur utilisé pour étudier les monoblastes et pro-monocytes, peut être directement régulée par la signalisation des IFN de type I via STAT-1 et qu'elle est cruciale pour la prolifération des cellules souches hématopoïétique (Essers, Offner et al. 2009). Donc, l'absence apparente d'augmentation des nombres de monoblastes et pro-monocytes chez les souris IFNAR-KO 24h après l'injection des LPS pourrait venir de l'incapacité de ces cellules à exprimer Sca-1 ou d'un défaut de prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Pour vérifier cela, nous avons analysé le contenu en cellules LSK ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$) ainsi que leur prolifération dans la moelle osseuse des souris WT et

IFNAR-KO 24h après l'injection de LPS (Figure 25). Les cellules LSK forment un mix de précurseurs hématopoïétiques contenant des cellules souches hématopoïétiques à court et long terme (LT- et ST-HSC) ainsi que des progéniteurs multipotents (Wilson and Trumpp 2006). Chez les souris WT comme IFNAR-KO, le nombre de cellules LSK dans la moelle osseuse est significativement augmenté 24h après l'injection de LPS (Figure 25). De même, les LPS induisent une augmentation significative de la prolifération de ces cellules chez les souris WT comme IFNAR-KO (Figure 25). Donc, le défaut de monopoïèse observé chez les souris IFNAR-KO suite à l'injection de LPS ne semble pas dû à un défaut d'expression de Sca-1 ni à une diminution de la capacité de prolifération des cellules souches hématopoïétiques.

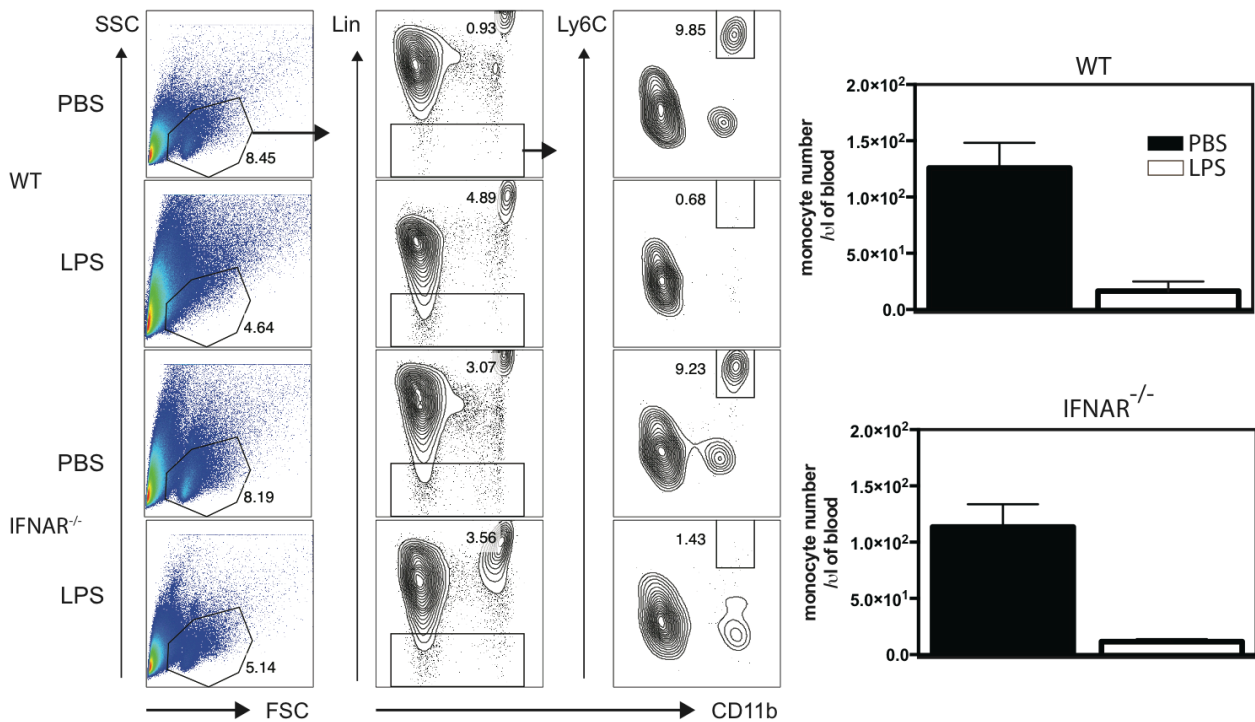


Figure 23 : Diminution du nombre des monocytes sanguins au cours de l'endotoxémie.

Des souris WT et IFNAR-KO ont reçu une injection intraveineuse de LPS ou de PBS. Le sang a été collecté 24h après l'injection de LPS et analysé par cytométrie en flux. Les monocytes ont été analysés comme étant SSC^{low} FSC^{low} Lin⁻ Ly6C⁺ CD11b⁺. Les barres indiquent la moyenne ± l'écart-type.

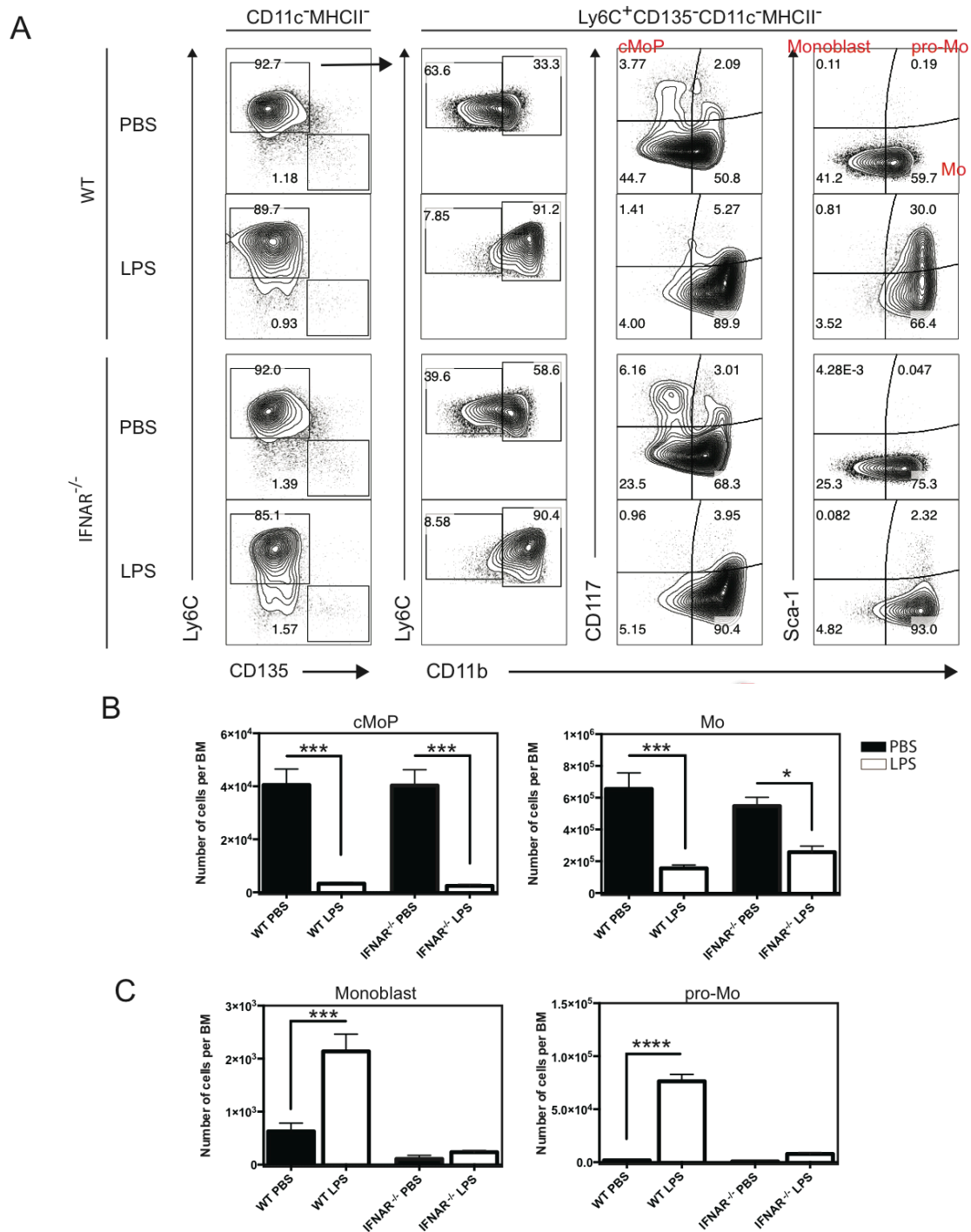


Figure 24 : La monopoïèse induite par l'endoxémie dépend des IFN de type I. Des souris WT et IFNAR-KO ont reçu une injection intraveineuse de LPS ou de PBS. La moelle osseuse a été collectée 24h après l'injection de LPS et analysé par cytométrie en flux. Parmi les cellules $Lin^- CD115^+ CD11c^- MHC-II^-$, les cMoP ont été analysées comme étant $Ly6C^+ CD135^- CD11b^- CD117^+$, les monoblastes comme $Ly6C^+ CD135^- CD11b^- Sca1^+$, les promonocytes (pro-Mo) comme $Ly6C^+ CD135^- CD11b^+ Sca1^+$, les monocytes (Mo) comme $Ly6C^+ CD135^- CD11b^+ Sca1^-$ (A.) et leurs nombres par organe ont été calculés (B.). Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes (n=2-5). Les barres indiquent la moyenne \pm l'écart-type. Les statistiques ont été calculées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney. $P < 0,001$ (***) et $P < 0,0001$ (****) ont été considérés comme statistiquement significatifs.

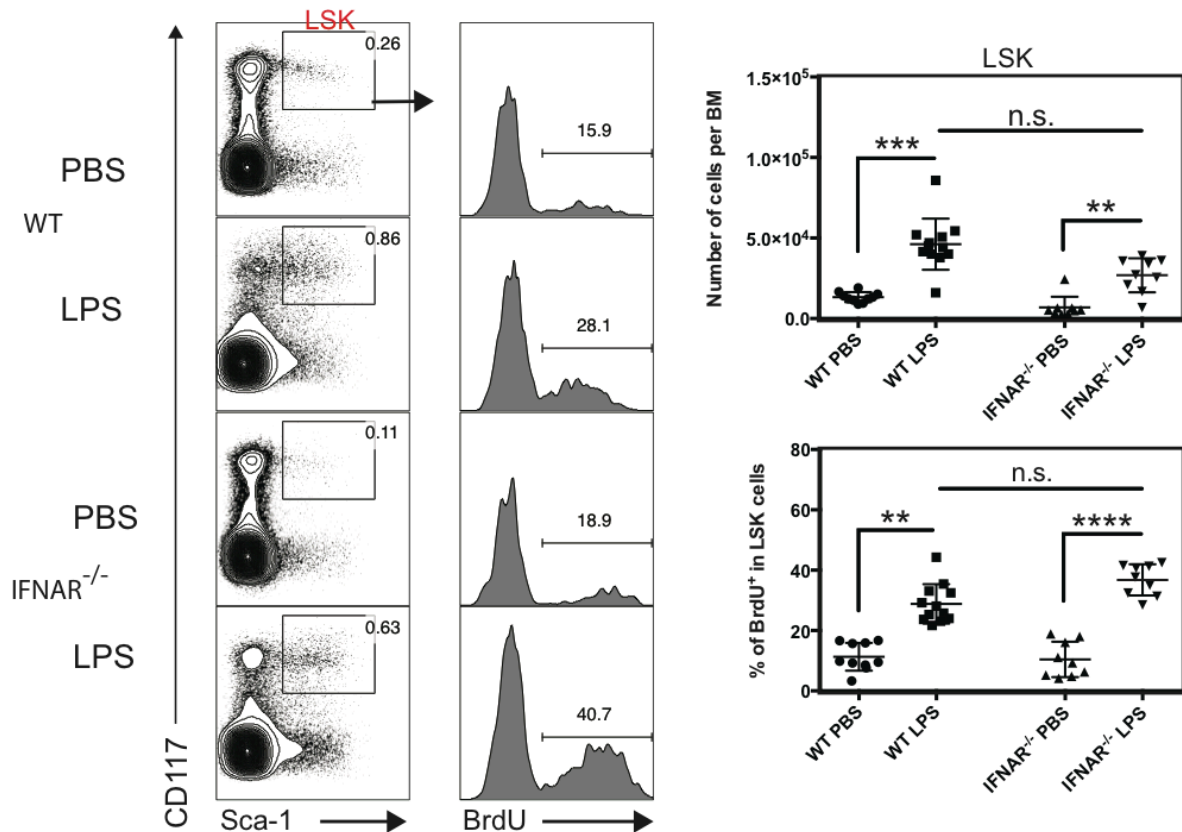


Figure 25 : La déficience en IFNAR n’empêche pas la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et l’expression de Sca1. Des souris WT et IFNAR-KO ont reçu une injection intraveineuse de LPS ou de PBS. La moelle osseuse a été collectée 24h après l’injection de LPS et analysée par cytométrie en flux. Les cellules LSK ont été analysées comme étant Lin⁻ CD135⁻ Ly6C⁻ CD11b⁻ MHC-II⁻ CD11c⁻ Sca-1⁺ CD117⁺. Leur prolifération a été mesurée par incorporation *in vitro* de BrdU. Les barres indiquent la moyenne ± l’écart-type de 3 expériences indépendantes (n=2-5). Les statistiques ont été calculées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney. P<0,01 (**), P<0,001 (***) et P<0,0001 (****) ont été considérés comme statistiquement significatifs.

Les IFN de type I favorisent la différenciation des précurseurs de macrophages et DC (MDP) en Mo-APC.

Des cellules homologues aux cDC1, cDC2 et pDC spléniques peuvent être obtenues *in vitro* en cultivant des cellules de moelle osseuse murine en présence de la cytokine Flt3-L (Naik, Proietto et al. 2005). En utilisant ce type de culture de DC, nous avons observé que l’ajout précoce de LPS permet le développement de cellules MHC-II⁺ CD11c⁺ CD64⁺ qui ne sont pas générées sans l’ajout de LPS (Figure 26A.). Le développement de ces Mo-APC se fait proportionnellement à la concentration de LPS et au détriment des cDC, et notamment des cDC1, (MHC-II⁺ CD11c⁺ CD64⁻ CD24⁺ CD172α) qui voient leur fréquence significativement réduite (Figure 26B.).

Afin de s'assurer de l'ontogénie différente de la population que nous avons appelé « Mo-APC » et des cDC, nous avons trié par cytométrie en flux des précurseurs CD45.2⁺ restreints aux DC (CDP), restreints aux monocytes (cMoP) ou les précurseurs bipotents restreints à ces deux lignées (MDP). Ces précurseurs ont été mis en co-culture avec de la moelle osseuse totale CD45.1⁺ et la cytokine Flt3-L avec ou sans LPS. A la fin de la culture, les cDC1, cDC2 et Mo-APC ont été identifiés à partir des cellules CD45.2⁺, correspondant à la descendance des précurseurs triés et cultivés (Figure 26B.). Comme attendu, le MDP génère les deux populations de cDC avec le Flt3-L mais pas les Mo-APC. L'ajout de LPS diminue le rendement en cDC et augmente significativement la production de Mo-APC par les MDP (Figure 26B.). Concernant les cMoP, leur culture avec du Flt3-L seul ne permet la génération ni des cDC, ni des Mo-APC. L'ajout de LPS induit la production des Mo-APC, mais pas des cDC, comme cela était attendu. Dans le cas des CDP, ces précurseurs génèrent les deux populations de cDC avec le Flt3-L mais pas les Mo-APC. Avec l'ajout de LPS, le rendement en cDC diminue significativement mais les Mo-APC ne sont pas générées (Figure 26B.). Nous pouvons donc conclure que, contrairement aux cDC, les Mo-APC ont bien une origine monocyttaire, au moins *in vitro* (Figure 26B.).

Lorsque les cellules de moelle osseuse IFNAR-KO ont été mises en culture *in vitro* en présence de Flt3-L et de LPS, la production des cellules CD64⁺ a été bien plus faible que pour les cellules WT. Cependant, de manière intéressante, la capacité très diminuée des cellules hématopoïétiques IFNAR-KO à générer la population de Mo-APC dans ces conditions n'impacte pas l'effet des LPS sur les cDC1. En effet, la diminution de la fréquence des cDC1 dans les cultures avec les LPS est toujours observée avec la stimulation des cultures de cellules hématopoïétiques IFNAR-KO (Figure 27A.). Donc, la signalisation des IFN de type I semble cruciale pour générer la population de Mo-APC induite par les LPS *in vitro*. Cependant les effets des LPS sur la fréquence des cDC1 *in vitro* ne semblent pas régulés par les IFN de type I.

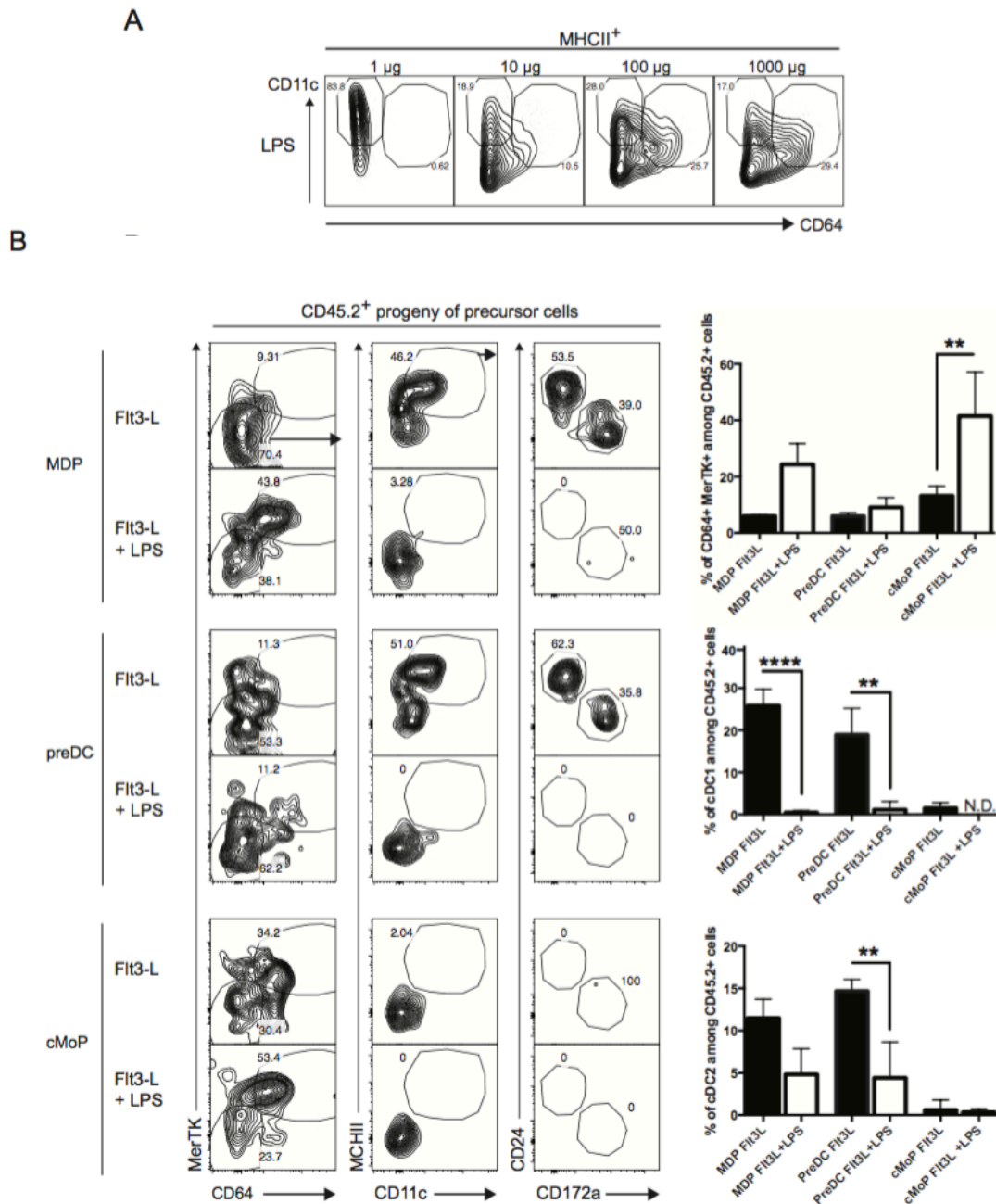


Figure 26 : Les Mo-APC induites par les LPS *in vitro* dérivent des précurseurs monocytaires mais pas de la lignée des cDC. **A.** Des doses croissantes de LPS ont été ajoutées à des cultures *in vitro* de cDC à partir de la moelle osseuse de souris naïves. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux après 7j de culture. Les Mo-APC ont été analysées comme étant MHC-II⁺ CD11c⁺ CD64⁺ et les cDC comme étant MHC-II⁺ CD11c⁺ CD64⁻. **B.** Des cMoP (Lin⁻ MHCII⁻ CD11c⁻ CD115⁺ CD135⁻ CD117⁺ Ly6C⁺ CD11b⁻), Pré-DC (Lin⁻ MHCII⁻ CD11c⁻ CD115⁺ CD135⁻ CD117⁺ Ly6C⁺ CD11b⁻) et des MDP (Lin⁻ MHCII⁻ CD11c⁻ CD115⁺ CD135⁺ CD117⁺ Ly6C⁻ CD11b⁻) CD45.2⁺ ont été triés par cytométrie en flux et mis en co-culture avec de la moelle osseuse de souris CD45.1⁺ et la cytokine FIt3-L avec ou sans LPS. Après 7j de culture, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux afin d'évaluer la composition en Mo-APC (CD64⁺ MerTK⁺), en cDC1 (CD64⁻ MerTK⁻ MHCII⁺ CD11c⁺ CD24⁺ CD172a⁻) et cDC2 (CD64⁻ MerTK⁻ MHCII⁺ CD11c⁺ CD24⁻ CD172a⁺). Ces résultats ont été obtenus en triplicats. Les barres indiquent la moyenne ± l'écart-type. Les statistiques ont été calculées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney. P<0,01 (**) et P<0,0001 (****) ont été considérés comme statistiquement significatifs.

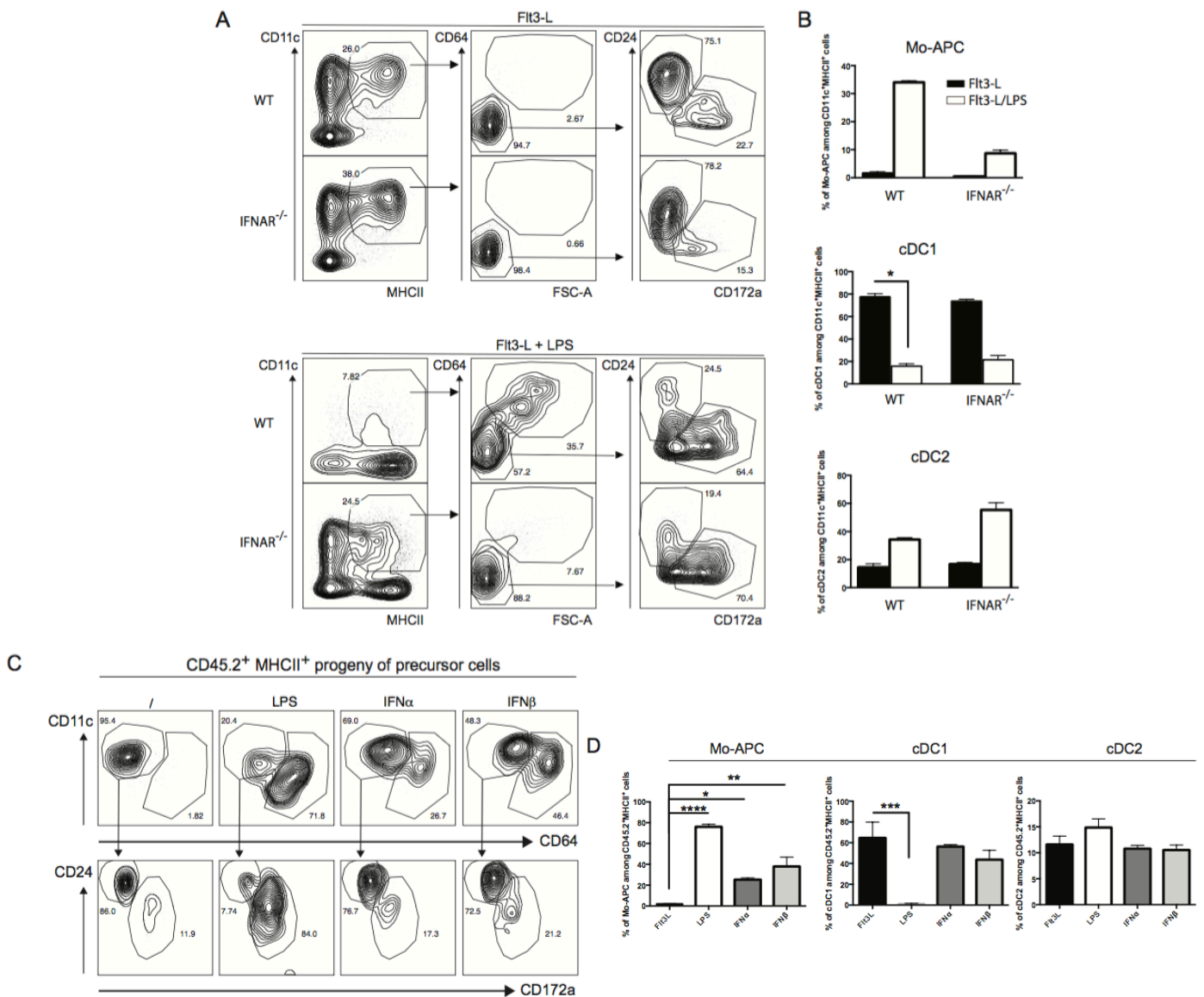


Figure 27 : Les IFN α et β favorisent le développement des progéniteurs de macrophages et DC vers la production de Mo-APC. A et B. Des cultures de cDC *in vitro* avec la cytokine Flt3-L générées à partir de moelle osseuse de souris WT ou IFNAR-KO ont été supplémentées ou non avec des LPS. Après 7j, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux afin d'évaluer la composition en Mo-APC (MHC-II⁺ CD11c⁺ CD64⁺), en cDC1 (MHC-II⁺ CD11c⁺ CD64⁻ CD24⁺ CD172a⁻) et cDC2 (CD64⁻ MerTK⁻ MHC-II⁺ CD11c⁺ CD24⁻ CD172a⁺) (A.) et leurs fréquences par rapport aux cellules MHC-II⁺ CD11c⁺ ont été calculées (B.). C et D. Des MDP CD45.2⁺ (triés comme dans la figure 26B.) ont été mis en co-culture avec de la moelle osseuse de souris CD45.1⁺ et la cytokine Flt3-L. Les cultures ont été stimulées avec des LPS, des IFN α , des IFN β , ou du milieu seul. La composition des cellules dérivées des MDP en Mo-APC, cDC1 et cDC2 CD45.2⁺ a ensuite été analysée par cytométrie en flux après 7j de culture (C.) et leurs fréquences par rapport aux cellules CD45.2⁺ MHC-II⁺ ont été calculées (D.). Les résultats sont représentatifs de deux expériences réalisées en quadruplicats. Les barres indiquent la moyenne \pm l'écart-type. Les statistiques ont été calculées avec le test one-way ANOVA/Bonferroni posttest. P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***) and P<0.0001 (****) ont été considérés comme statistiquement significatifs.

Afin de mieux comprendre l'impact des IFN de type I sur la différenciation des précurseurs restreints aux monocytes et DC, des MDP CD45.2⁺ ont été triés par cytométrie en flux et remis en culture avec des cellules de moelle osseuse totale CD45.1⁺ et la cytokine Flt3-L. Les cultures ont été stimulées ou non avec des IFN α , des IFN β ou des LPS et les cDC1, les cDC2 et les Mo-APC CD45.2⁺ (donc dérivées des MDP triés) ont été identifiées par cytométrie en flux après culture. Parmi les cellules MHC-II⁺ CD45.2⁺ différenciées à partir des MDP lors de la culture avec du Flt3-L, la majorité sont des cDC1, environ 10% sont des cDC2 et les Mo-APC ne sont pas (ou très peu) générées (Figure 27 C et D.). Lors de la culture avec des LPS en plus du Flt3-L, les Mo-APC deviennent alors la population dominante MHC-II⁺ CD45.2⁺ différenciées à partir des MDP, les cDC2 restent à environ 10% et les cDC1 ne sont plus (ou très peu) générées (Figure 27 C et D.). Lorsque les IFN α ou les IFN β sont ajoutés au Flt3-L au début de la culture des DC, la population de Mo-APC, absente dans les conditions avec la cytokine Flt3-L seule, est générée. Cependant, la diminution des cDC1 observée avec les LPS n'est pas retrouvée avec les IFN de type I (Figure 27 C et D.). Ainsi, le LPS induit la génération d'une population de Mo-APC à partir des MDP, au détriment des cDC1. Contrairement à la diminution des cDC1, la génération des Mo-APC est dépendante au moins en partie de la signalisation des IFN de type I.

Résultats complémentaires à l'article

La diminution des cDC observée suite à l'injection systémique de LPS ne semble pas dépendre de l'inflammasome non canonique.

Nous savons que les macrophages et certaines lignées de cellules épithéliales murines et humaines activent le processus pyroptotique en réponse aux LPS intracellulaire. Afin d'évaluer si la pyroptose induite par l'inflammasome non canonique est impliquée dans la diminution des cDC en cas d'endotoxémie, nous avons d'abord souhaité savoir si cette voie était active au sein de ces cellules. Pour cela, nous avons différencié des DC à partir de moelle osseuse de souris ou de monocytes humains afin de leur transférer des LPS et d'évaluer leur viabilité. La transfection de LPS sur les DC générées à partir de moelle osseuse murine avec du Flt3L n'a pas significativement augmenté leur mortalité. Cependant, des études préliminaires avec des siRNA fluorescents nous ont suggéré que ces DC générées avec du Flt3-L pourraient être réfractaires à la transfection avec des lipofectants (données non présentées). A l'inverse, les DC WT générées avec la cytokine GM-CSF sont sensibles à la

pyroptose induite par la transfection des LPS, contrairement à celles générées à partir de la moelle osseuse de souris 129S2/SvPasCrl (129), déficientes pour la caspase-11 (Figure 28A.). Cependant, par rapport aux cultures Flt3-L, ce type de culture de DC avec le GM-CSF génère des populations hétérogènes dont la pertinence physiologique est débattue (Xu, Zhan et al. 2007, Helft, Bottcher et al. 2015). De plus, la transfection de LPS sur les Mo-DC humaines a significativement augmenté leur mortalité (Figure 28B.). Ces données suggèrent donc qu'au moins certaines populations de DC pourraient être susceptibles à la pyroptose induite par les LPS, chez l'homme comme chez la souris. Cependant, les données obtenues avec l'analyse des contenus de cDC spléniques de souris endotoxémiques Caspase-1-KO (déficientes également pour la Caspase-11 (Kayagaki, Warming et al. 2011) ou 129 suggèrent que l'inflammasome non canonique ne serait pas impliqué dans la diminution des cDC suite à l'injection intraveineuse de LPS. En effet, la diminution des cDC induite par l'endotoxémie est bien retrouvée chez les souris WT, 129 et Caspase-1-KO (Figure 28C.). Cependant, nous pouvons observer que les nombres de cDC spléniques observés chez les souris Caspase-1-KO sont bien plus faibles que pour les souris WT et 129 ici. Ces résultats proviennent de deux expériences indépendantes, ces différences pourraient donc venir des conditions expérimentales. Par exemple, les rates lors de l'expérience avec les souris Caspase-1-KO on peut être été moins bien infusées et/ou digérées avec la collagénase D. Pour palier à ces différences, nous avons calculé un pourcentage de perte des cDC dans la rate suite à l'injection des LPS. Pour cela, nous avons calculé la moyenne du nombre de cDC pour chaque condition afin de mesurer un pourcentage de perte induit par les LPS pour chaque génotype. Nous avons alors observé que l'injection des LPS induit en 24h une perte d'environ 60% des cDC spléniques présentes chez les contrôles PBS, indépendamment de l'expression d'une caspase-11 fonctionnelle (Figure 28D.). Ces données suggèrent donc que la diminution des cDC observée au cours du choc endotoxique ne serait pas due à la pyroptose induite par l'inflammasome non canonique.

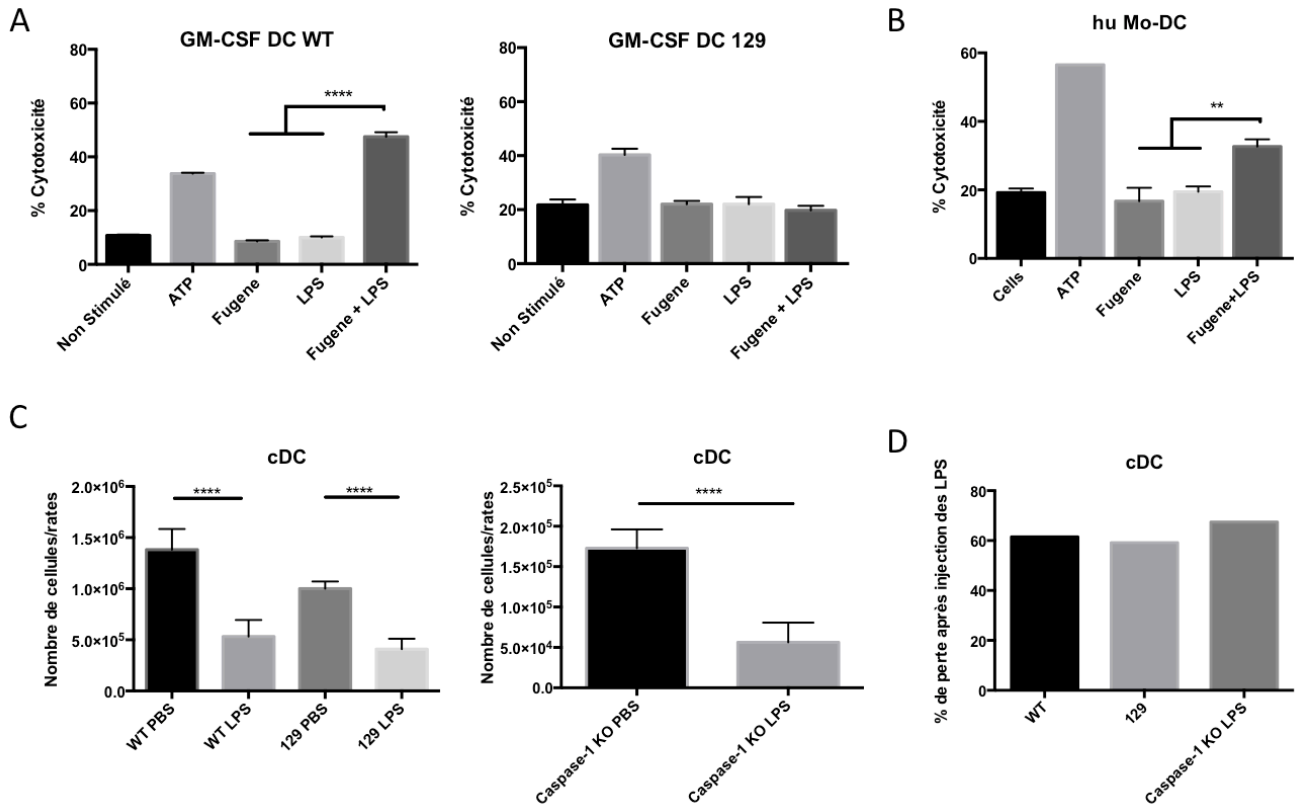


Figure 28 : Les DC sont susceptibles à la pyroptose induite par les LPS mais elle ne semble pas impliquée dans leur diminution observée au cours du choc endotoxique. Des DC générées *in vitro* à partir de moelle osseuse de souris WT ou 129 (A.) ou à partir de monocytes humains (B.) ont été activées avec du LPS. Les DC ont ensuite été stimulées avec de l'ATP, du Fugene (réactif de transfection) et/ou des LPS, ou laissées non stimulées. La cytotoxicité a été mesurée par dosage de la LDH libérée dans le milieu de culture 24h après la stimulation. C et D. Des souris WT, 129 ou caspase-1-KO ont reçu une injection intraveineuse de LPS puis leurs contenus spléniques ont été analysés pour la présence de cDC par cytométrie en flux 24h après l'injection des LPS. Les nombres de cDC par rates (C.) ainsi que le pourcentage de perte des cDC calculé à partir de la moyenne pour chaque condition (D.) ont alors été évalués. Ces résultats ont été obtenus au moins en quintuplicats (excepté pour le contrôle positif ATP en B où n=1). Les barres indiquent la moyenne \pm l'écart-type représentatifs d'une expérience parmi deux (pour les souris caspase-1-KO) ou d'une seule expérience (pour les souris 129 et les A. et B.). Les statistiques ont été calculées avec le test non-paramétrique de Mann-Whitney. $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) et $P < 0,0001$ (****) ont été considérés comme statistiquement significatifs.

Les souris endotoxémiques ont une capacité réduite à générer les Mo-APC induites *in vitro* par les agonistes de TLR.

Comme nous l'avons vu, la culture de cellules de moelle osseuse avec la cytokine Flt3-L permet le développement de DC homologues à celles de la rate. Nous avons également vu que l'ajout de LPS à ce type de cultures permet le développement de Mo-APC qui ne sont pas (ou peu) générées sans stimulation, de manière similaire à ce que nous avons observé dans la rate. Nous avons alors souhaité savoir si les populations de DC générées *in vitro* dans ce type de cultures à partir de la moelle osseuse de souris endotoxémiques seraient différentes de celles générées par celles de souris saines, au moins du point de vue de leur phénotype. Pour cela, nous avons récupéré la moelle osseuse des souris endotoxémiques ou saines 24h après l'injection intraveineuse du LPS ou du PBS et les avons mises en culture avec la cytokine Flt3-L et stimulées ou non avec des LPS ou de l'ADN CpG en tant que contrôle. Il semble que, avec le Flt3-L seul, la culture de DC à partir de la moelle osseuse de souris endotoxémiques ou saines génèrent les populations de cDC et Mo-APC dans des proportions relativement similaires (Figure 29 A et B). Cependant, lorsque ces cultures sont stimulées avec des LPS (100 ng/ml) ou des ADN CpG ligands du TLR9 (5 μ M), la population de Mo-APC est générée à partir de la moelle de souris saines mais pas (ou beaucoup moins) avec la moelle osseuse de souris endotoxémique (Figure 29 A.). De même, la diminution des cDC induites par la stimulation avec les LPS ou les CpG est moins observée avec la moelle osseuse de souris endotoxémique (Figure 29 B.). Donc, la diminution des cDC au profit des Mo-APC induite par les PAMP dans ce type de culture *in vitro* n'est pas (ou bien plus faiblement) retrouvée lorsque ces cultures sont réalisées avec la moelle osseuse de souris endotoxémiques. Ce phénomène témoignerait de la tolérance et de la cross-tolérance des cellules souches hématopoïétiques aux endotoxines.

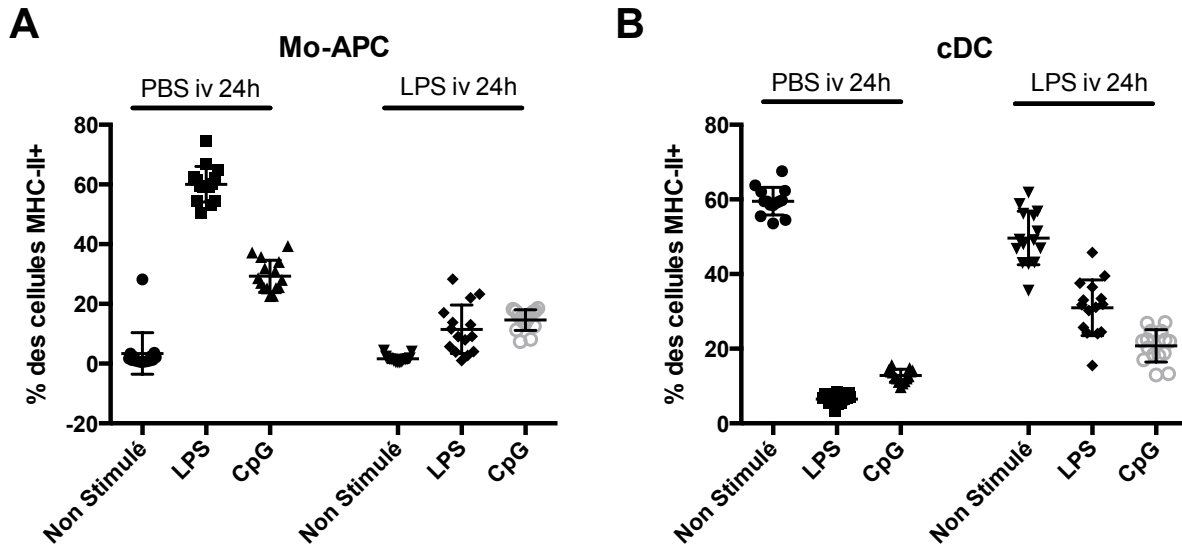


Figure 29 : L'effet des PAMP *in vitro* sur la culture de DC à partir de la moelle osseuse de souris endotoxémique est réduit par rapport aux souris saines. Des souris WT ont reçu une injection intraveineuse de LPS ou de PBS. La moelle osseuse a été collectée 24h après l'injection de LPS et celle-ci a été mise en culture *in vitro* avec la cytokine Flt3-L. Les cultures ont été stimulées ou non avec des LPS ou de l'ADN CpG et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux après 7j de culture. Les pourcentages de Mo-APC (A.) et de cDC (B.) au sein des cellules MHC-II+ ont ensuite été calculés. Les Mo-APC ont été identifiées comme étant MHC-II⁺ CD11c^{+/int} CD64⁺ et les cDC comme étant MHC-II⁺ CD11c^{+high} CD64⁻. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes réalisées en quintuplicats. Les barres indiquent la moyenne ± l'écart-type.

Chapitre 2. Etude des voies de reconnaissance intracellulaire des LPS

Comme cela a été discuté dans l'introduction, de récentes études ont montré l'existence d'une voie de reconnaissance intracellulaire des LPS, indépendante du TLR4, chez des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse (Hagar, Powell et al. 2013, Kayagaki, Wong et al. 2013). Cette voie est également active dans des lignées de macrophages et de cellules épithéliales humaines et dépend de l'activité de la caspase-11 chez la souris et des caspases 4 et 5 chez l'homme (Shi, Zhao et al. 2014, Shi, Zhao et al. 2015). Ces caspases inflammatoires permettent la reconnaissance directe des LPS intracellulaires (LPSi), induisant la formation d'un inflammasome non canonique permettant la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et l'IL-18, et la nécrose programmée nommée pyroptose. Cette voie de signalisation est notamment impliquée dans la létalité du choc endotoxique aux LPS chez la souris (Hagar, Powell et al. 2013) et pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients septiques.

Dans le but de mieux caractériser les voies de signalisation induisant la pyroptose suite à la reconnaissance du LPSi, nous avons mis au point un criblage à haut débit d'une banque de siRNA représentatifs du génome murin dans son intégralité.

Validation du protocole de criblage.

Pour le criblage, des macrophages murins dérivés de la moelle osseuse ont été transfectés avec différents ARN puis activés avec une faible dose de LPS 48h plus tard afin d'induire l'expression de la caspase-11 et des divers composants de l'inflammasome. Les LPS ont ensuite été transfectés pour activer la caspase-11 et induire la formation de l'inflammasome non canonique. La pyroptose a alors été évaluée à l'aide de deux méthodes différentes. La première est le dosage biochimique de l'enzyme lactate déhydrogenase (LDH), libérée dans le surnageant au cours de la pyroptose. La seconde méthode est l'utilisation de l'intercalant de l'ADN iodure de propidium (PI), qui pénètre dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire et dont la fluorescence a été mesurée au microscope confocal. Le ratio entre le marquage du PI et du Hoechst (HO), ce dernier marquant toutes les cellules indépendamment de leur viabilité, nous a permis de calculer un pourcentage de mortalité témoignant de la pyroptose cellulaire. Un petit volume de surnageant a été prélevé dans les

puits 4h après la transfection du LPS, afin d'évaluer la mortalité précoce par dosage de la LDH. Si un siRNA cible un gène important pour la régulation négative de l'inflammasome non canonique, alors nous pourrions nous attendre à ce que son inhibition induise une augmentation de la mortalité précoce en réponse au LPSi. A l'inverse, si un siRNA cible un gène important pour l'activation de cet inflammasome, alors la mortalité 24h après la transfection du LPS, mesurée par dosage LDH et microscopie à fluorescence, sera significativement augmentée.

Les siRNA de la banque correspondent à trois lots. Les deux premiers sont les gènes dits « *drug target* » qui sont ciblés par un médicament et les gènes dits « *druggable* » dont l'activité suggère qu'ils pourraient être des cibles de médicaments. Le troisième lot correspond au reste du génome. Les 19061 siRNA de la banque ont été repartis sur 70 plaques de 384 puits, utilisées en 5 séries de 14 plaques. L'étape finale de lecture au microscope à fluorescence prenant environ 15 minutes pour une plaque, 4 heures environ s'écouleront entre la première et la dernière plaque de la série au cours du criblage. Afin de valider le protocole, nous avons donc fait une expérience test avec nos contrôles positifs et négatifs sur deux plaques dans les conditions du criblage. La seconde plaque a été traitée 4h après la première, avec les mêmes réactifs restés sur la plate-forme. Les résultats sont similaires entre les deux plaques et les réactifs ne semblent pas se dégrader au cours du temps. La figure 30A montre les résultats obtenus avec la première plaque lors de cette expérience faite dans les conditions du criblage. Nous observons que, comme attendu, la transfection du siRNA caspase-11 (contrôle positif) diminue significativement la perte d'intégrité membranaire en réponse au LPSi. A l'inverse, la transfection de siRNA n'ayant aucunes cibles impliquées dans l'inflammasome non canonique (Scramble 1 et 2, CD86 ou NOD2) n'empêche pas la pyroptose cellulaire suite à la transfection des LPS (Fig. 30A). Afin de pouvoir fixer des seuils lors du criblage, des siRNA contrôles (positifs et négatifs) ont été disposés de part et d'autre des siRNA de la banque sur chaque plaque utilisée lors du criblage (Fig. 30B).

Résultats du criblage.

Lors du criblage, les contrôles positifs ayant reçu un siRNA caspase-11 ont en moyenne 759 noyaux cellulaires détectés par puits et la cytotoxicité calculée avec le ratio PI/HO est de 2,4%, 24h après la transfection du LPS. En revanche, pour les contrôles négatifs (siRNA n'ayant aucune cible ou ciblant un gène non impliqué dans l'inflammasome non canonique), le nombre de cellules détectées descend à 191 (plus ou moins 98), la cytotoxicité monte à

environ 60% et les valeurs d'absorbance pour le dosage de la LDH doublent par rapport aux contrôles positifs (Fig. 31A). Ces résultats laisseraient donc une fenêtre d'analyse très correcte afin d'identifier les potentiels régulateurs positifs de la voie.

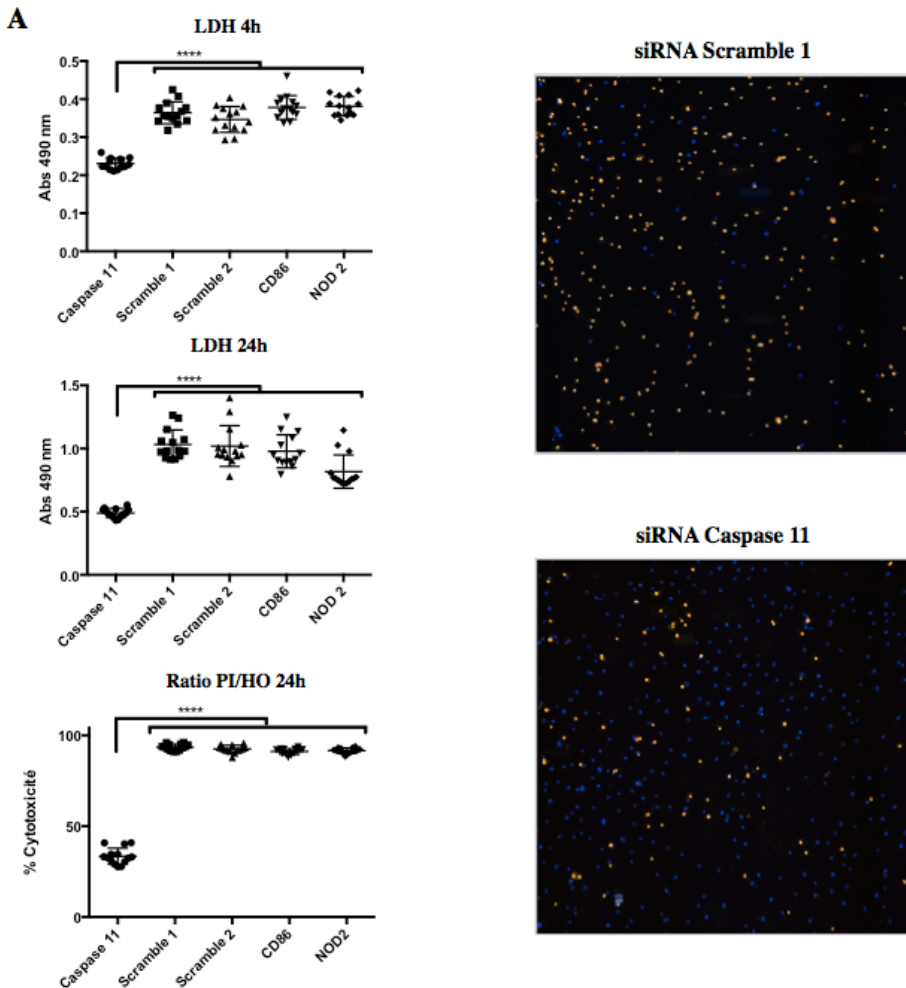
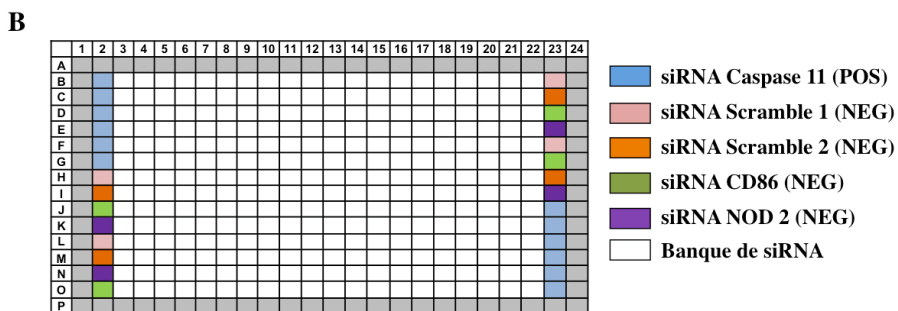


Figure 30 : Validation du protocole du criblage et plan de plaques. A. Absorbance à 490 nm pour le dosage de la LDH et % de cytotoxicité calculés avec le ratio PI/HO obtenus pour la première plaque de l'expérience de validation du protocole, suite à la transfection de LPS. A droite : images obtenues en microscopie à fluorescence : Le PI apparaît en orange et le Hoechst en bleu. B. Plan de plaque utilisé pour chaque plaque du criblage



Pour fixer de manière plus fiable des seuils permettant d'identifier les hits, nous avons souhaité prendre en compte les valeurs obtenues pour les contrôles internes, qui sont des gènes connus pour être impliqués dans l'inflammasome non canonique et ciblés par certains siRNA de la banque. Parmi ces contrôles internes se trouvent la caspase-11, GSDMD, PANX1, P2X7 ou encore le TLR4 (Kayagaki, Stowe et al. 2015, Shi, Zhao et al. 2015, Yang,

He et al. 2015). Malheureusement, les résultats obtenus avec ces siRNA de la banque sont difficilement comparables à ceux obtenus avec les contrôles positifs ne faisant pas partie de la banque de siRNA. Par exemple, les siRNA Caspase-11 de la banque donnent une cytotoxicité de 30% après transfection du LPS, soit plus de 10 fois plus élevée que les valeurs moyennes pour ces mêmes siRNA de même séquence, ayant été reconstitués et déposés dans les plaques séparément de la banque. De plus la LDH libérée pour ces siRNA de la banque est supérieure à la moyenne de l'ensemble des puits de la banque pour cette plaque (Fig. 31B). Il est donc très difficile de fixer des seuils de cytotoxicité et d'absorbance afin d'identifier les régulateurs de cette voie.

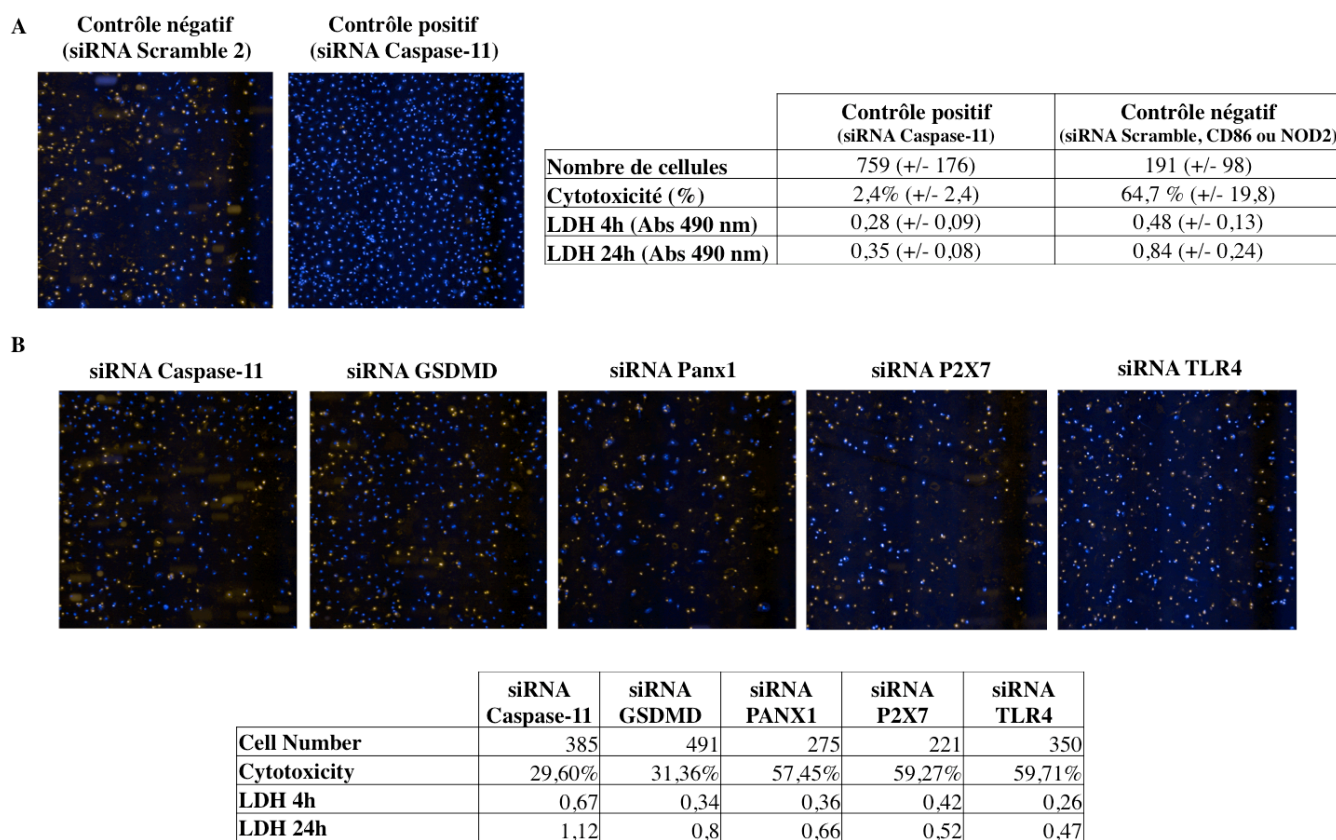


Figure 31: Résultats obtenus pour les contrôles du criblage. **A.** Résultats obtenus suite à la transfection de LPS pour l'ensemble des contrôles positifs et négatifs disposés de part et d'autres de la banque pour chaque plaque du criblage. A gauche : images représentatives obtenues par microscopie à fluorescence pour les contrôles (Hoechst en bleu, PI en orange). Le tableau représente les valeurs moyennes obtenues pour l'ensemble des contrôles des 70 plaques du criblage. L'écart-type est noté entre parenthèses à côté de la valeur moyenne **B.** Images obtenues pour les siRNA d'intérêt de la banque par microscopie à fluorescence (Hoechst en bleu, PI en orange). Le tableau présente les différentes valeurs obtenues pour ces points.

Afin d'homogénéiser les résultats des différentes plaques et séries du criblage, nous avons procédé à une normalisation des données obtenus pour les dosages de la LDH et la cytotoxicité calculée à partir du marquage PI. Cette normalisation a été faite avec le score Z

selon la formule $(x - \mu) / \sigma$ où x est la valeur de cytotoxicité pour le puits, μ est la moyenne pour les puits de la banque sur cette plaque et σ est l'écart-type. Si la valeur est négative, alors la cytotoxicité mesurée est plus faible dans ce puits par rapport aux autres points de la banque, et plus la valeur négative est faible, plus la mortalité est faible.

Les résultats normalisés sont représentés en figure 32. Comme pour les résultats bruts, les contrôles négatifs et positifs ont des valeurs normalisées très cohérentes. Cependant, les contrôles internes ne montrent toujours pas les profils attendus après normalisation (Fig 32A).

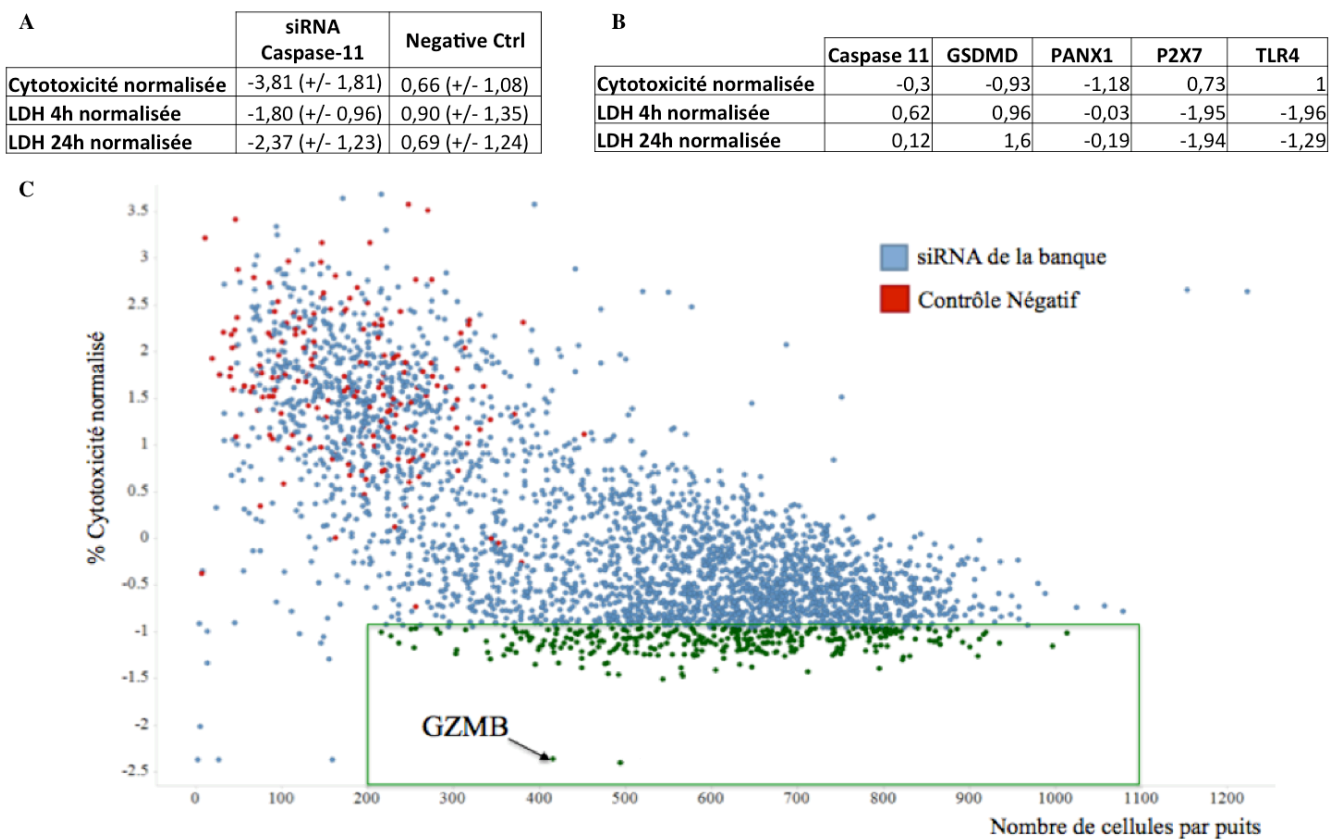


Figure 32 : Résultats du criblage après normalisation. **A.** Résultats normalisés obtenus pour l'ensemble des contrôles positifs et négatifs disposés de part et d'autres de la banque. Le tableau représente les valeurs moyennes normalisées obtenues pour l'ensemble des contrôles des 70 plaques du criblage. L'écart-type est noté entre parenthèses à côté de la valeur moyenne. **B.** Valeurs normalisées de la cytotoxicité et du dosage de la LDH pour les contrôles internes de la banque. L'écart-type est noté entre parenthèses. **C.** Représentation de la cytotoxicité normalisée calculée à partir du ratio PI/HO, par rapport au nombre de cellules par puits évalué au microscope. Seuls les siRNA appartenant à la banque de gènes dits « druggable » sont représentés ici (2869 gènes sur 19061).

Le criblage a été réalisé avec des macrophages adhérents au fond des puits. Cependant, une mortalité précoce ou élevée pourrait amener à un décollement des cellules mortes qui seraient éliminées lors des étapes de lavage. Ceci biaiserait ainsi les résultats en diminuant

artificiellement la valeur de la mortalité. C'est pourquoi, pour l'analyse des résultats et la recherche de conditions ayant permis la survie des cellules, nous nous sommes focalisés sur les puits contenant au moins 200 cellules détectées au microscope à fluorescence (Fig 32A).

Identification et validation d'un potentiel régulateur de la pyroptose induite par l'inflammasome non canonique.

Les siRNA de la banque ciblant le gène du granzyme B (GzmB) semblent permettre la survie des cellules après transfection du LPS, tout en préservant un nombre acceptable de cellules analysées dans le puits (Fig 33A). Les valeurs de cytotoxicité calculées à partir du marquage PI/HO ou les dosages de la LDH pour ce puits donnent des valeurs significativement plus faibles que le reste de la banque, comme l'attestent les valeurs brutes et normalisées (Fig 33A). Il semble donc que ce gène pourrait être impliqué dans la pyroptose induite par l'inflammasome non canonique en réponse au LPSi. Cependant, l'analyse de l'image obtenue par microscopie à fluorescence montre que, pour une raison inconnue (mortalité précoce des cellules due aux siRNA ou problème de plan focal ?), il est impossible de tenir compte du marquage PI/HO pour ce puits (Fig 33B). De plus, si une mortalité précoce a bien eu lieu, par exemple à cause d'une cytotoxicité des siRNA, cela pourrait expliquer la faible quantité de LDH dosée dans le milieu de culture. La demi-vie relativement courte de la LDH ainsi que les changements de milieux au cours des différentes étapes du criblage pourraient expliquer la faible quantité de LDH dosée dans ce puits, en cas de mortalité précoce. Il y a donc un risque non négligeable que le GzmB soit en fait un faux-positif identifié lors du criblage.

Le GzmB est une protéase connue pour être impliquée dans l'activité cytotoxique des lymphocytes T ou encore des cellules NK, induisant l'apoptose des cellules cibles. Cette protéine a déjà été impliquée dans le clivage de cytokines pro-inflammatoires en leur formes matures comme la pro-IL-18 ou la pro-IL-1 β (Omoto, Yamanaka et al. 2010, Afonina, Tynan et al. 2011, Akeda, Yamanaka et al. 2014) et sa déficience augmente significativement la résistance des souris au choc endotoxique induit avec une forte dose de LPS (Metkar, Menea et al. 2008). Il est aussi retrouvé en concentration élevée dans le sang de patients septiques et endotoxémiques (Lauw, Simpson et al. 2000, Afonina, Cullen et al. 2010). L'ensemble de ces données suggère que le GzmB pourrait être en lien avec l'activation de l'inflammasome non canonique en réponse au LPSi. C'est pourquoi nous avons tout de même décidé d'essayer d'infirmer ou de confirmer l'implication de ce candidat dans l'inflammasome non canonique

activé en réponse au LPSi. Pour cela, une approche d'inhibition par siRNA a été utilisée. Nous avons également eu l'opportunité de tester l'activation de cette voie avec des macrophages générés à partir de souris déficientes pour le GzmB (GzmB KO) (Fig 33 C. D. et E.). Dans les deux cas, la déficience en GzmB n'a pas empêché la perte d'intégrité membranaire en réponse au LPSi (Fig 33 C. D. et E.).

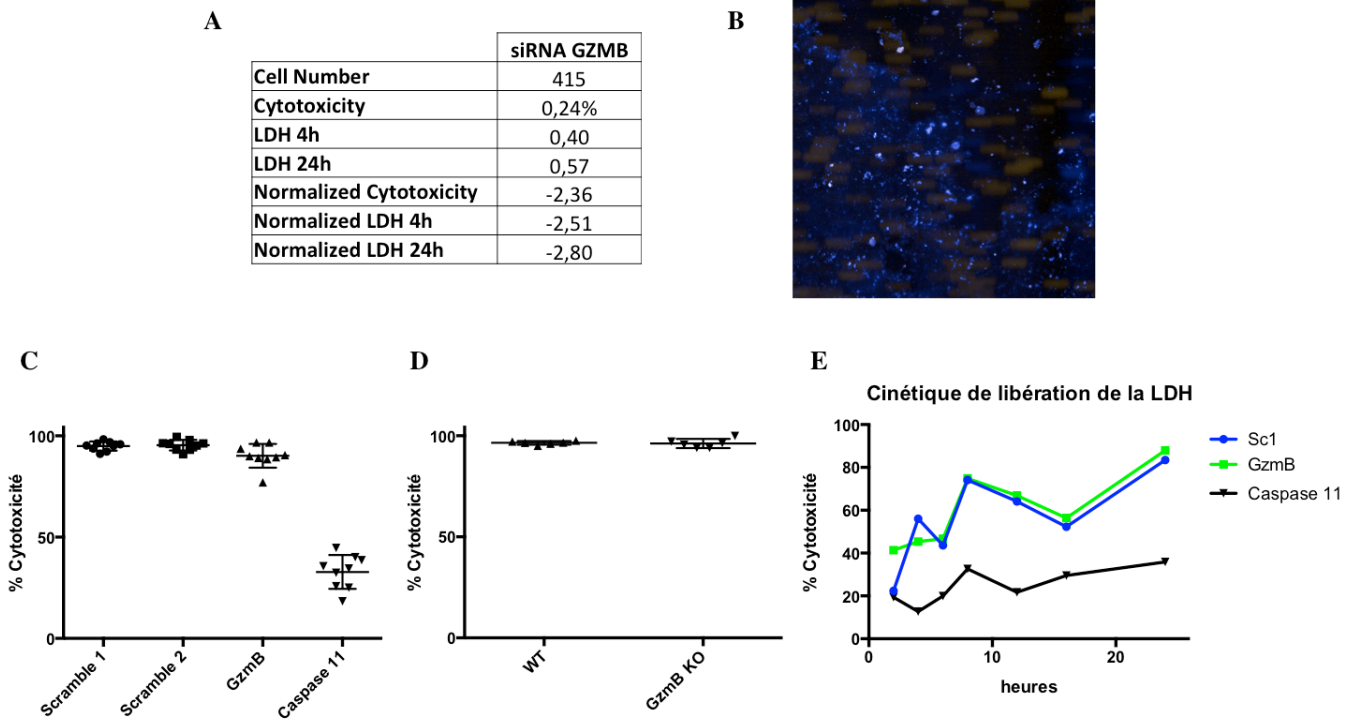


Figure 33 : Identification et validation du candidat GzmB dans la pyroptose induite par l'inflammasome non canonique. **A.** Valeurs brutes et normalisées de cytotoxicité et de dosage de la LDH pour le puits contenant les siRNA ciblant GzmB lors du criblage. **B.** Image obtenue pour ce même puits par microscopie à fluorescence (Hoechst en bleu, PI en orange). **C. D. E.** Validation du candidat GzmB à l'aide de siRNA (**C.** et **E.**) ou de macrophages différenciées à partir de souris WT ou Gzmb KO (**D.**). La cytotoxicité a été mesurée à l'aide du ratio PI/HO (**C.** et **D.**) ou par dosage de la LDH libérée dans le surnageant (**E.**). Les résultats présentés en **C. D.** et **E.** sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

Rôles du GzmB dans la liaison des LPS et le clivage de l'IL-1 β et de la Caspase-1.

Les expériences précédentes n'ont pas permis de valider l'implication du GzmB dans la pyroptose en réponse au LPSi, les macrophages déficients (KO ou siRNA) y étant autant susceptibles que les cellules normales (Fig 33 C. D. et E.). Cependant, le fait que GzmB ait déjà été impliqué dans le clivage des cytokines pro-inflammatoires nous a conduit à analyser plus en détails le rôle de cette protéase dans le clivage l'IL-1 β . De plus, une étude a montré que le GzmK avait la capacité de se lier directement au LPS. Dans cette étude, la liaison de

GzmK au LPS augmente la réponse cytokinique *in vitro* et *in vivo* en réponse au LPS (Wensink, Kemp et al. 2014). Nous avons formulé l'hypothèse que, bien qu'il semble dispensable pour la pyroptose, le GzmB pourrait directement se lier aux LPS et avoir un rôle dans la maturation des cytokines pro-inflammatoires par l'inflammasome non canonique.

Afin d'évaluer la capacité de GzmB à lier le LPS, nous avons mis au point un système de type ELISA en phase soluble, à l'aide de billes entourées de GzmB et incubées avec des LPS couplés à la biotine. La biotine a ensuite été détectée avec une Streptavidine couplée à un fluorochrome et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. De cette manière, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la fluorescence avec les LPS et le GzmB incubés ensemble mais pas avec ces réactifs seuls, suggérant qu'il existe bien une interaction entre le LPS et le GzmB (Fig 34 A. et B.). Nous avons confirmé ces résultats avec une approche plus proche d'un ELISA classique. Brièvement, les LPS ont été tapissés dans les puits d'une plaque de 96 puits et ont été incubés avec des doses croissantes de GzmB recombinant. Après plusieurs lavages, la présence de GzmB fixés aux LPS a été évaluée à l'aide d'un anticorps anti-GzmB révélé par un anticorps secondaire. La présence de l'anticorps secondaire a ensuite été évaluée par réaction enzymatique colorimétrique. L'incubation des LPS avec 100 ng/ml GzmB augmente significativement la densité optique (DO) obtenue après la réaction colorimétrique (Fig 34 C.). Ces résultats suggèrent donc que, comme le GzmK, GzmB pourrait se lier directement aux LPS.

Pour évaluer si le GzmB a un rôle dans le clivage de l'IL-1 β en réponse au LPSi, des macrophages WT ou GzmB-KO ont été activés puis transfectés avec des LPS ou stimulés avec de l'ATP et les protéines ont été récupérées après 4h avant de procéder aux western-blots (WB). De manière attendue, l'activation de l'inflammasome non canonique avec les LPSi, ou de NLRP3 avec l'ATP, induit la production de la forme bioactive p17 de l'IL-1 β (Fig 34D.). Avec les macrophages générés à partir de moelle osseuse de souris GzmB-KO, l'IL-1 β p17 est retrouvée suite à l'activation de NLRP3 avec l'ATP mais pas suite à l'activation de l'inflammasome non canonique avec les LPSi (Fig 34D.). Il semble donc que le GzmB serait bien impliqué dans le clivage de l'IL-1 β suite à l'activation de l'inflammasome non canonique avec le LPSi mais pas suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 par l'ATP. Cependant, le clivage de l'IL-1 β en réponse à l'ATP semble tout de même plus faible chez les macrophages GzmB-KO par rapport aux WT. En effet, la diminution de la pro-forme et l'augmentation du fragment p17 semblent plus modérées avec les macrophages déficients

pour GzmB. Le GzmB pourrait donc aussi avoir un rôle dans l'inflammasome canonique, bien qu'il serait plus restreint que pour l'inflammasome non canonique (Fig 34D). Ces résultats préliminaires ont fait l'objet d'une demande de financement à l'agence nationale pour la recherche afin de permettre une étude plus approfondie de l'implication du granzyme B dans la régulation des inflammasomes.

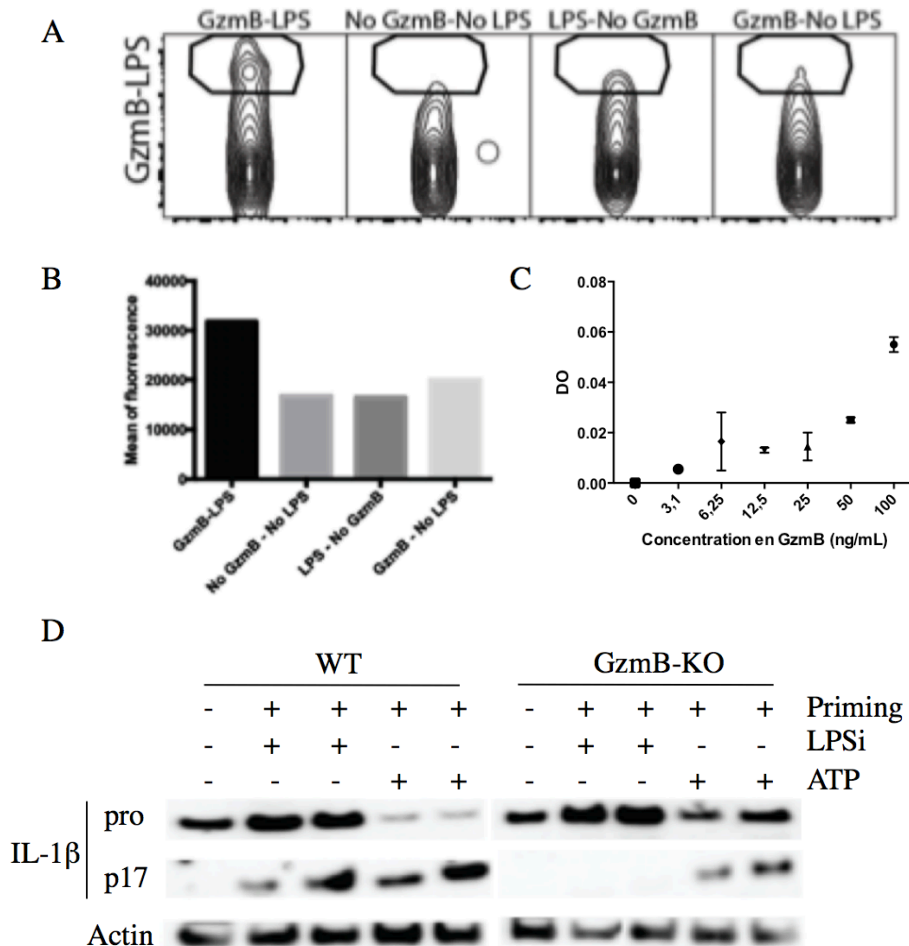


Figure 34 : Le GzmB semble lier directement les LPS et être impliqué dans le clivage de l'IL-1β. L'interaction entre GzmB et les LPS a été évaluée grâce à un système d'immunoprécipitation (A. et B.) ou d'ELISA (C.). D. Des macrophages WT ou GzmB-KO ont été activés une nuit avec du LPS puis traités avec de l'ATP pendant 30 minutes ou une transfection de LPS (LPSi) pendant 4h. Un WB a alors été réalisé avec les protéines des lysats cellulaires pour la pro-IL-1β et l'actine ou avec les protéines des surnageants concentrés pour le fragment p17 de IL-1β.

Discussion

Chapitre 1. Conditionnement des phagocytes mononucléés par les LPS

Dans ce chapitre, nous avons souhaité réévaluer l'impact d'un choc endotoxique simple sur la représentation des diverses populations de phagocytes. Les dernières avancées technologiques et scientifiques concernant l'identification de ces différentes populations et de leurs précurseurs nous ont permis de comparer l'effet des LPS sur les populations de cellules dendritiques conventionnelles (cDC) par rapport au compartiment monocyttaire, *in vivo* et *in vitro*. Nous avons observé que la présence systémique de LPS dans la circulation induit la génération de phagocytes dans la rate et la moelle osseuse, dont l'expression de CD64 suggère l'origine monocyttaire. Afin de ne pas rentrer dans le débat de leur fonctionnalité ici, nous avons simplement appelé cette population « Mo-APC », correspondant aux cellules présentatrices d'antigènes d'origine monocyttaire. Nous avons également observé que l'augmentation des nombres de ces Mo-APC était concomitante avec une diminution des DC conventionnelles (cDC) dans la rate et de leurs précurseurs directs (les pré-DC) dans la moelle osseuse. Chez les souris IFNAR-KO, l'injection intraveineuse de LPS n'a pas induit l'augmentation du nombre de Mo-APC médullaires et spléniques observées chez les souris WT. Néanmoins, bien que les nombres de cDC à l'état basal sont bien plus faibles chez les souris IFNAR-KO et que la diminution des cDC induite par les LPS chez les souris B6 n'est pas retrouvée chez les souris déficientes pour IFNAR, la diminution des pré-DC dans la moelle osseuse est également observée chez ces souris déficientes pour IFNAR suite à l'injection des LPS. Ceci suggère que les IFN de type I sont cruciaux pour générer la population de Mo-APC mais que ce mécanisme ne se fait pas au détriment de la production des cDC (Figure 35).

Nous avons ensuite cherché à évaluer l'impact de l'endotoxémie sur les nombres de précurseurs monocytaires dans la moelle osseuse. Nous avons alors observé une diminution des précurseurs monocytaires cMoP et des monocytes eux-mêmes, indépendamment de l'expression d'IFNAR. A l'inverse, l'injection des LPS induit une augmentation significative des monoblastes et des pro-monocytes, intermédiaires entre les cMoP et monocytes à la demi-vie très courte et normalement peu nombreux dans la moelle osseuse. Ceci pourrait être interprété comme étant la marque d'une monopoïèse active et le recrutement de monocytes vers les tissus, comme cela a été récemment suggéré dans un cas d'infection par la bactérie à

Gram négatif *Yersinia enterocolitica* (Pasquevich, Bieber et al. 2015). Contrairement à la diminution des cMoP et des monocytes dans la moelle osseuse, l'augmentation drastique des monoblastes et pro-monocytes observée 24h après l'injection des LPS est dépendante de l'expression des récepteurs IFNAR. Les IFN de type I seraient donc cruciaux pour l'induction d'une monopoïèse active suite à l'injection intraveineuse de LPS (Figure 35).

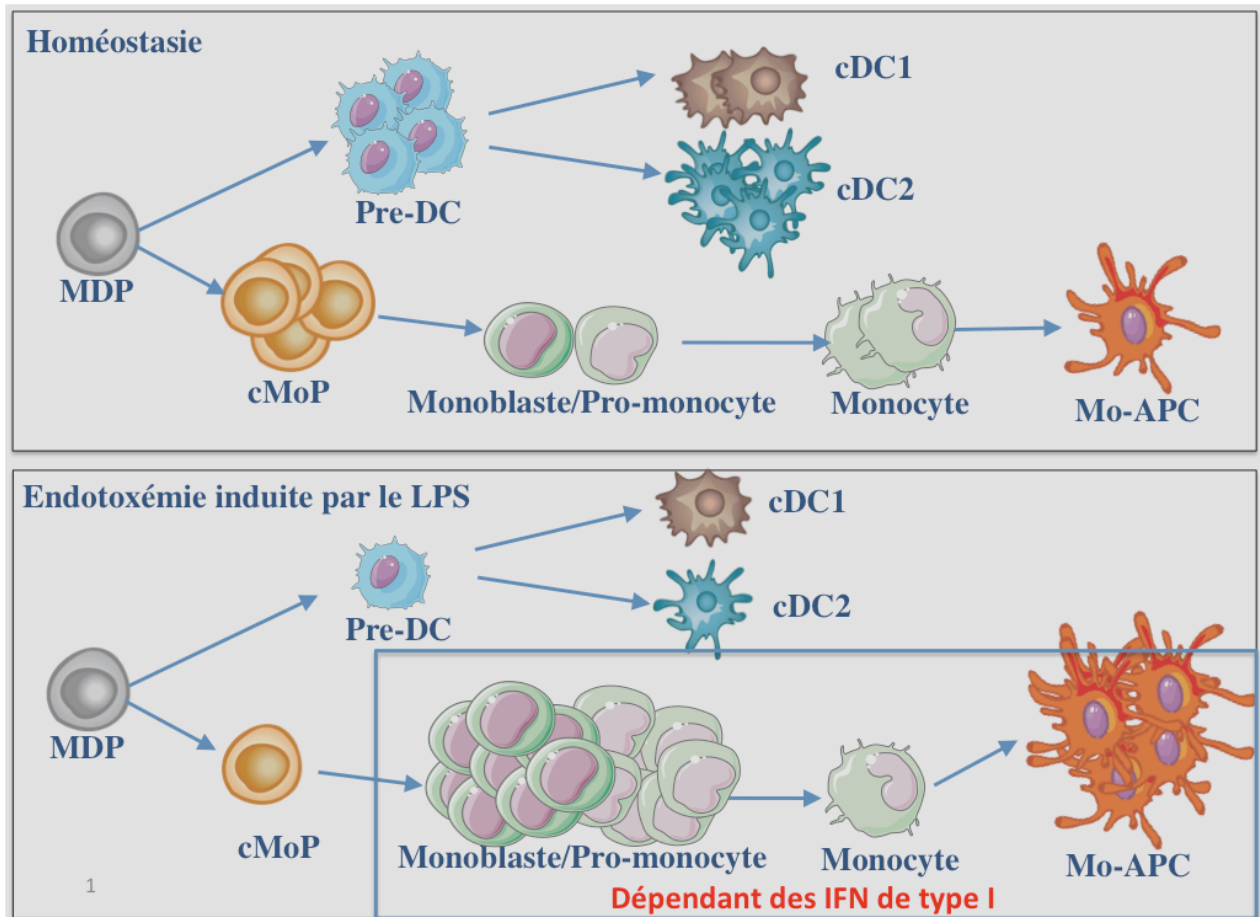


Figure 35 : Impact de l'endotoxémie sur les phagocytes mononucléés et leurs précurseurs hématopoïétiques.

Des cellules homologues aux cDC spléniques pouvant être générées *in vitro* grâce à la cytokine Flt3-L, nous avons observé que la stimulation précoce de telles cultures avec des LPS pourrait refléter ce que nous avons observé *in vivo* en conditions d'endotoxémie. La stimulation de ces cultures avec des LPS conduit à la génération de Mo-APC au détriment des cDC. La génération de la population de Mo-APC semble au moins en partie dépendante des IFN de type I. Effectivement, elle est nettement moins représentée avec la culture de cellules de moelle osseuse IFNAR-KO. De plus, les IFN de type I *in vitro* ajoutés à la cytokine Flt3-L dans ce type de culture induisent la génération de Mo-APC à partir des progéniteurs de DC et

monocytes MDP, sans toutefois abroger la production des cDC. Donc, tout comme ce que nous avons observé *in vivo*, les LPS induisent la génération de Mo-APC dépendamment des IFN de type I dans des cultures *in vitro* de DC avec la cytokine Flt3-L. Ces endotoxines induisent également la diminution de la production des cDC *in vitro*, mais indépendamment de la signalisation des IFN de type I. Ces données suggèrent donc que, *in vitro* comme *in vivo*, la monopoïèse induite par les LPS est un mécanisme au moins en partie dépendant des IFN de type I, améliorant la différenciation des MDP vers la lignée monocyttaire. La capacité de ce modèle *in vitro* à récapituler les effets de l'endotoxémie observés *in vivo* permettra d'étudier plus finement les mécanismes orientant la myélopoïèse induite par divers pathogènes.

Les IFN de type I ont déjà été décrits pour amplifier la production de la chimiokine CCL2, impliquée dans la migration des monocytes vers les tissus périphériques en cas d'infection avec la bactérie à Gram positif *Listeria monocytogenes* (Jia, Leiner et al. 2009). En plus d'être impliqués dans le recrutement des monocytes, nous proposons ici que les IFN de type I ont un rôle crucial dans l'induction d'une monopoïèse active suite à la présence systémique d'endotoxines. L'amélioration de notre compréhension des processus régulant la différenciation des monocytes ou des cDC en condition pathologique permettrait le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à augmenter la génération de cellules immunitaires protectrices ou, à l'inverse, à diminuer la production de cellules délétères.

Comment expliquer la diminution des nombres de cDC au profit des monocytes en cas d'endotoxémie ?

Afin d'expliquer la diminution des cDC et de leurs précurseurs directs en cas d'infection systémique, différents mécanismes sont concevables. Il est possible que ces cellules ou leurs précurseurs subissent un processus de mort cellulaire suite à la détection de nombreux PAMP et DAMP dans la circulation. Effectivement, dans la littérature scientifique, l'apoptose des DC murines a déjà été décrite pour être au moins en partie responsable de la diminution significative du nombre de ces cellules en cas de la présence systémique de LPS (Gautier, Huby et al. 2008) ou de sepsis polymicrobien (Pene, Courtine et al. 2009). L'activation de l'inflammasome non canonique induisant la pyroptose cellulaire dépendante de la Caspase-11 pourrait également être l'un des mécanismes menant à la diminution des cDC observée suite à l'injection des LPS. En effet, nous avons observé qu'au moins certaines populations de DC générées *in vitro* sont sensibles à la pyroptose induite par transfection de

LPS. Cependant, nos résultats avec les souris 129S2/SvPasCrl ou Caspase-1-KO, deux souches murines exprimant une Caspase-11 mutée non fonctionnelle (Kayagaki, Warming et al. 2011), suggèrent que cette caspase inflammatoire n'est pas impliquée dans ce phénomène. Effectivement, nous avons observé une diminution du nombre des cDC spléniques, 24h après l'injection des LPS, du même ordre de grandeur par rapport à celle observée chez les souris WT. Donc la diminution des cDC suite à l'injection des LPS est indépendante de la pyroptose et de l'activation des inflammasomes.

Il est également possible que la diminution du nombre des cDC soit induite par la reprogrammation des précurseurs hématopoïétiques. Au cours de ma thèse, l'équipe de Stella Autenrieth a montré qu'une infection systémique avec la bactérie entérique à Gram négatif *Yersinia enterocolitica* induit une diminution du nombre des précurseurs hématopoïétiques restreints aux cDC. Ceci est corrélé avec l'augmentation de la différenciation des précurseurs monocytaires dans la moelle osseuse et des nombres de monocytes dans la rate. Ce processus est dépendant de la signalisation du TLR4 et de l'IFN γ , induisant la production de monocytes au détriment des cDC à partir des précurseurs hématopoïétiques bipotents MDP (Pasquevich, Bieber et al. 2015). Il est possible que la diminution des DC soit due à une modification de la balance de certains facteurs de transcription importants pour la différenciation des cellules hématopoïétiques vers certaines lignées. Par exemple, une forte expression du facteur de transcription PU.1 est nécessaire pour le développement des monocytes en DC, agissant à la manière d'un antagoniste du facteurs de transcription MafB important pour la différenciation en macrophages (Bakri, Sarrazin et al. 2005). Il est probable que ces facteurs de transcription ou d'autres soient impliqués dans la différenciation des MDP en monocytes ou cDC.

Nous avons observé un mécanisme relativement similaire à celui décrit par K.A. Pasquevich, K. Bieber et leurs collaborateurs suite à une simple injection intraveineuse de LPS à des souris de laboratoire. L'injection de ces molécules induit une augmentation de la monopoïèse et une diminution de la production des cDC. L'augmentation de la production de monocytes est dépendante de la signalisation des IFN de type I, contrairement à la diminution du nombre des pré-cDC. De plus, dans notre modèle *in vitro*, la stimulation aux IFN de type I induit la production de Mo-APC sans diminuer celle des cDC. Ceci pourrait suggérer que, au moins dans notre modèle, la monopoïèse ne se fait pas au détriment de la production des cDC. Donc, il est probable que les IFN de type I influencent de manière différentielle la prolifération et la survie des précurseurs de monocytes et de cDC dans la moelle osseuse. Les

facteurs conduisant à la diminution des cDC dans notre modèle d'endotoxémie restent cependant toujours inconnus. Il est probable que l'IFN γ joue un rôle dans la perte de ces cellules suite à l'injection des LPS comme cela a été observé par Pasquevich et ses collaborateurs en cas d'infection avec *Yersinia enterocolitica* (Pasquevich, Bieber et al. 2015). Il serait également intéressant d'observer si la monopoïèse induite par les LPS est aussi dépendante de l'IFN γ . Ceci suggérerait que les IFN de type I et l'IFN γ pourraient avoir un rôle redondant concernant la génération de monocytes induite en conditions de stress infectieux.

Plusieurs études ont récemment montré que les précurseurs restreints aux cDC étaient conditionnés très tôt pour donner des pré-cDC1 ou des pré-cDC2, après la différenciation des progéniteurs bipotents MDP vers la lignée des cDC, chez la souris (Schlitzer, Sivakamasundari et al. 2015) comme chez l'homme (See, Dutertre et al. 2017). Il est probable que la population des MDP soit également hétérogène. Certains pourraient être programmés pour générer des cDC alors que les autres seraient restreints à la lignée monocyttaire. Afin d'évaluer cela, il serait intéressant de cultiver *in vitro* des MDP individuels et d'observer leur différenciation vers l'une ou l'autre des deux lignées dans différentes conditions de culture. S'il s'avère effectivement que la population des MDP est hétérogène, alors les LPS pourraient au moins indirectement privilégier la prolifération et/ou la survie des MDP restreints aux monocytes et défavoriser les précurseurs hématopoïétiques restreints aux cDC. Les IFN de type I auraient également un rôle favorisant la prolifération et/ou la survie des MDP restreints aux monocytes sans toutefois empêcher la différenciation et/ou la prolifération des MDP restreints aux cDC. Il serait alors intéressant d'étudier le transcriptome des MDP isolés suite à la stimulation avec des LPS ou des IFN de type I, comme cela a été fait récemment pour étudier les populations de cellules HLA-DR⁺ (Villani, Satija et al. 2017). Dans cette étude, A.C. Villani, R. Satija et leurs collaborateurs ont analysé le transcriptome des cellules individuelles Lin⁻ HLA-DR⁺ obtenues à partir du sang de sujets sains. Cette analyse non biaisée de l'ensemble de la population Lin⁻ HLA-DR⁺ au niveau des cellules individuelles a permis la découverte d'une population de DC faiblement représentée et qui n'avait pas été découverte auparavant (Villani, Satija et al. 2017). Il serait également intéressant de procéder de la sorte en conditions pathologiques afin d'améliorer notre compréhension de la biologie des cellules myéloïdes en conditions infectieuse ou inflammatoire.

Dans notre système nous n'avons pas observé de mortalité préférentielle de certains précurseurs hématopoïétiques médullaires suite à l'injection intraveineuse des LPS avec le marquage *Live/Dead*, permettant la détection des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (données non présentées). Cependant le turn-over rapide des cellules dans la moelle osseuse pourrait expliquer le fait que nous n'ayons pas observé de mortalité accrue de certains progéniteurs. Il serait néanmoins intéressant d'évaluer le marquage avec l'annexine V sur les progéniteurs hématopoïétiques en condition d'endotoxémie. L'annexine V marque les phosphatidylserines qui sont transloquées du feuillet interne de la membrane cellulaire vers la membrane externe au cours du processus apoptotique. Cependant, dans l'étude réalisée avec le pathogène *Yersinia enterocolitica*, la monopoïèse au détriment de la production des cDC induite par l'infection n'était pas corrélée avec l'augmentation du marquage des précurseurs de monocytes et de cDC avec l'annexine V (Pasquevich, Bieber et al. 2015). Ceci suggère que l'apoptose des précurseurs de DC ne serait pas un mécanisme crucial impliqué dans la diminution des cDC en condition d'endotoxémie. Il reste également à valider l'hypothèse de la prolifération préférentielle des précurseurs monocytaires suite à l'injection des LPS. Nous n'avons malheureusement pas pu observer de prolifération préférentielle de certains précurseurs en condition d'endotoxémie dans le système d'incubation *ex vivo* avec le BrdU que nous avons utilisé (Sarrazin, Mossadegh-Keller et al. 2009). En effet, il semble que le récepteur CD115 (M-CSF-R) soit endocyté au fur et à mesure de la manipulation suite au sacrifice des animaux. Ce récepteur est crucial pour l'identification par cytométrie en flux des précurseurs hématopoïétiques des phagocytes mononucléés. L'expérience se déroulant à 4°C, le marquage de CD115 par cytométrie en flux reste suffisant pour l'identification des populations. Cependant, l'incubation à 37°C *in vitro* afin de permettre la prolifération et l'incorporation du BrdU conduit à une perte totale du marqueur CD115, empêchant ainsi l'identification des précurseurs hématopoïétiques restreints aux phagocytes mononucléés par cytométrie en flux. Afin de pallier à ce problème, la mesure de l'incorporation du BrdU devrait être réalisée *in vivo*, en injectant le BrdU par voie intraveineuse à des souris, par exemple 30 minutes ou 1 heure avant le sacrifice des animaux et le prélèvement des organes.

Comment expliquer les résultats concernant les nombres de monoblastes et pro-monocytes chez les souris déficientes pour IFNAR ?

Nous n'avons pas observé l'augmentation des nombres de monoblastes et pro-monocytes en réponse à l'injection de LPS chez les souris IFNAR-KO, contrairement aux souris WT. Cela pourrait suggérer que les IFN de type I sont cruciaux pour la prolifération de

ces cellules dans la moelle osseuse en conditions de stress. Cependant, une étude a montré que l'expression de Sca-1 peut être induite en aval de l'activation d'IFNAR et qu'elle pourrait être impliquée directement dans la prolifération des HSC induite par les IFN de type I. Dans cette étude, l'injection de poly(I:C), agoniste du TLR3 dont la voie de signalisation passe exclusivement par l'adaptateur TRIF, à des souris WT induit une augmentation de l'incorporation du BrdU par les cellules hématopoïétiques, suggérant leur prolifération active. En revanche, chez les souris déficientes pour IFNAR ou Sca-1, cette incorporation du BrdU est totalement abolie (Essers, Offner et al. 2009). Donc le défaut apparent d'augmentation des monoblastes et pro-monocytes chez les souris IFNAR-KO suite à l'injection des LPS pourrait venir de la prolifération diminuée des HSC et/ou de l'incapacité des cellules hématopoïétiques déficientes pour IFNAR à exprimer Sca-1. De plus, Sca-1 est un marqueur crucial permettant l'identification des monoblastes et promonocytes. Donc, en plus d'induire un potentiel défaut de prolifération de ces cellules en réponse aux IFN de type I, leur incapacité à exprimer Sca-1 induirait l'impossibilité de discriminer les monoblastes et promonocytes par cytométrie en flux. C'est pourquoi nous avons souhaité évaluer le nombre et la prolifération des cellules LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) chez les souris WT ou IFNAR-KO 24h après l'injection des LPS. Comme attendu, la présence systémique de LPS induit une augmentation des nombres et de la prolifération des cellules LSK chez les souris WT. Cependant, contrairement à l'étude de M.A. Essers, S. Offner et leurs collaborateurs réalisée avec l'injection poly(I:C) (Essers, Offner et al. 2009), la déficience en IFNAR n'a pas empêché l'augmentation de l'effectif et de la prolifération des HSC en réponse aux LPS. Il existe donc probablement dans notre modèle, des voies de compensation indépendantes de la signalisation régulée par l'adaptateur des TLR TRIF. Il est possible que la signalisation du TLR4 dépendante de Myd88 soit impliquée dans ce processus, directement ou non. La signalisation dépendante de MyD88 a effectivement déjà été impliquée dans la régulation de la prolifération des HSC. Cependant, elle semble avoir des effets contradictoires en fonction de la chronicité ou non de la stimulation (Schuettpelez and Link 2013).

La déficience en IFNAR n'a pas empêché l'augmentation du nombre des cellules LSK, suggérant que les IFN de type I ne sont pas requis pour l'expression de Sca-1 dans notre modèle, au moins par les HSC. De plus, la déficience en IFNAR n'a pas empêché l'augmentation de l'incorporation du BrdU *in vitro* par les cellules LSK. Dans leur ensemble, ces données suggèrent donc que les IFN de type I sont cruciaux pour l'exacerbation de la monopoïèse et pour l'augmentation des monoblastes et pro-monocytes suite à l'injection

intraveineuse de LPS. Il serait intéressant de comparer la prolifération de ces précurseurs suite à l'injection de LPS entre des souris WT et IFNAR-KO. Nous n'avons malheureusement pas pu le faire avec le système d'incubation *in vitro* avec le BrdU pour les raisons expliquées dans le paragraphe précédent. La différence de prolifération des monoblastes et pro-monocytes entre les souris WT et IFNAR-KO devrait permettre d'expliquer les nombres plus élevés de ces cellules ainsi que ceux des Mo-APC chez les souris WT par rapport aux souris déficientes pour IFNAR suite à l'injection de LPS. Il serait également intéressant d'évaluer l'implication de Sca-1 dans la monopoïèse en conditions pathologiques et si son expression induite sur les cMoP par les LPS est un mécanisme crucial dans la génération des Mo-APC par l'intermédiaire des monoblastes et pro-monocytes.

Quelles sont les sources et les cibles de ces IFN de type I produits suite à l'injection intraveineuse de LPS ?

Les IFN de type I sont produits par un grand nombre de cellules immunitaires et structurelles suite à l'activation de leurs PRR par des composants viraux ou bactériens ou encore par des molécules endogènes à la localisation ectopique (Decker, Muller et al. 2005). Les DC plasmacytoïdes (pDC) sont cependant les seules cellules capables de produire de grandes quantités d'IFN de type I suite à leur activation (Reizis, Bunin et al. 2011). De plus, les pDC murines semblent pouvoir exprimer le TLR4 et répondre aux LPS (Boonstra, Asselin-Paturel et al. 2003, Zheng, Cao et al. 2012) et leurs effectifs sont augmentés dans un modèle murin de brûlure (Johnson, Posluszny et al. 2016). Il est également intéressant de noter que la déplétion des pDC diminue les lésions pulmonaires induites par les LPS (Mandl, Drechsler et al. 2015) et que ces cellules produisent des IFN de type I en réponse à une activation chronique du TLR7, induisant ainsi un processus de myélopoïèse d'urgence permettant le développement de neutrophiles (Buechler, Teal et al. 2013). Donc, bien qu'il reste à identifier formellement la provenance de ces cytokines dans notre modèle d'endotoxémie, les pDC pourraient probablement être une source majeure des IFN de type I permettant la monopoïèse et le développement des Mo-APC suite à l'injection intraveineuse des LPS.

Au moins certains progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques expriment les récepteurs IFNAR et répondent directement aux IFN de type I (Kelly-Scumpia, Scumpia et al. 2010). Les précurseurs hématopoïétiques MDP et cMoP expriment le gène codant pour la protéine IFNAR2 (Hettinger, Richards et al. 2013). Ces données suggèrent que ces

précurseurs pourraient directement répondre aux IFN de type I afin d'activer la monopoïèse suite à l'injection de LPS. Nous ne pouvons cependant pas exclure que les effets des IFN de type I sur l'hématopoïèse soient indirects et qu'ils nécessitent la production d'autres facteurs par exemple par les cellules structurales. Il serait intéressant d'évaluer si l'expression d'IFNAR est requise sur le compartiment hématopoïétique ou structurel, afin d'induire la génération des Mo-APC observées suite à l'injection du LPS. Ceci pourrait être réalisé à l'aide de chimères de moelle osseuse, où des souris WT ou IFNAR-KO seraient irradiées et reconstituées avec des cellules de moelle osseuse de souris IFNAR-KO ou WT.

L'injection des LPS *in vivo* a-t-elle des effets à long terme sur la génération des cellules myéloïdes ?

En utilisant le modèle murin de sepsis polymicrobien induite par ligature et ponction caecale, une étude a montré que le transfert de DC différenciées *in vitro* avec la cytokine GM-CSF à partir de moelle osseuse de souris saines diminue l'immunosuppression des souris septiques. A l'inverse, le transfert de DC différenciées à partir de la moelle osseuse de souris septiques augmente la susceptibilité des souris septiques receveuses aux infections secondaires. Donc les DC différenciées *in vitro* avec le GM-CSF à partir de la moelle osseuse de souris septiques sont immunosuppressives, contrairement à celles dérivées de souris saines (Pene, Zuber et al. 2008). Il est possible que cette différence soit due à un changement de ratio entre les différentes populations de phagocytes des lignées monocytaires ou des DC conventionnelles, ces deux populations étant générées dans ce type de culture (Helft, Bottcher et al. 2015).

Nous avons également observé que, *in vitro*, la stimulation aux LPS ou à l'ADN CpG de cultures de moelles osseuses endotoxémiques avec la cytokine Flt3-L induit une génération plus faible de la population de Mo-APC. Ces données suggèrent donc que le défaut de production de ces Mo-APC est intrinsèque aux cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse des souris endotoxémiques. Ce processus pourrait permettre aux souris de réorienter la production de cellules phagocytaires suite à une infection aiguë afin de ne pas induire un état immunosuppresseur prolongé ou de ne pas activer le système immunitaire de manière exacerbée.

Quels sont les rôles des Mo-APC produits suite à l'injection intraveineuse de LPS ?

Une question importante n'ayant pas été adressée dans notre étude est celle de la fonction des Mo-APC générées suite à l'injection des LPS. Dans une étude publiée en 2010 dans le *Journal of Experimental Medicine*, Kelly-Scumpia KM et ses collaborateurs ont montré que la déficience en IFNAR améliore la résistance à une injection létale de LPS mais augmente la susceptibilité au modèle de sepsis polymicrobien CLP (Kelly-Scumpia, Scumpia et al. 2010). Il est donc possible que les Mo-APC décrites dans notre étude soient impliquées dans la production des médiateurs de l'inflammation délétères au cours du choc endotoxique bien que ces cellules pourraient également être cruciales pour la défense de l'organisme envers les pathogènes invasifs. Une étude a montré que l'ajout d'IFN de type I à des cultures *in vitro* de monocytes avec la cytokine GM-CSF induit une voie de différenciation distincte de la culture classique avec le GM-CSF, améliorant notamment la présentation des antigènes aux lymphocytes. (Pogue, Preston et al. 2004). Il est possible que les Mo-APC induites par l'injection des LPS dépendamment des IFN de type I soient liées à celles obtenues *in vitro* dans l'étude citée précédemment. Ces cellules pourraient donc être importantes pour la présentation des antigènes et l'orchestration du système immunitaire en cas d'infection systémique. Il serait donc probable que l'incapacité des souris déficientes pour IFNAR à générer cette population soit liée à leur susceptibilité accrue au modèle de CLP

Il est également possible que les Mo-APC induites par les LPS aient un rôle dans l'immunosuppression observée suite à une inflammation systémique exacerbée. Nous avons montré que, suite à une stimulation *ex vivo* avec des ADN CpG, ces cellules produisent la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Ces cellules semblent également hyporéactives aux LPS, comme nous l'avons vu avec la faible production d'IL-12p40 suite à leur stimulation *ex vivo* avec des LPS, par rapport à l'ADN CpG. Parmi d'autres exemples (Ivashkiv and Donlin 2014), les IFN de type I ont été également décrits pour être impliqué dans la susceptibilité à l'infection via la production d'IL-10 dans des modèles murins d'infection bactérienne avec les pathogènes intracellulaires *Mycobacterium tuberculosis* ou *Listeria monocytogenes* (McNab, Ewbank et al. 2013). Une étude très récente dans un contexte différent a montré que les DC tumorales étaient composées d'un mix de cDC et de DC dérivées monocytes (MoDC) dans différents modèles murins (Laoui, Keirsse et al. 2016). Dans cet article, les MoDC ont un phénotype proche des MoAPC induite par les LPS dans notre étude, exprimant entre autre les marqueurs Ly6C, CD64, MHC-II, CD11b ou MerTK. Contrairement aux cDC, les MoDC

tumorales ont un phénotype immunorégulateur. Leur capacité de phagocytose est très augmentée par rapport aux cDC alors que leur potentiel de migration et d'activation des lymphocytes T est nettement réduit. De plus, elles produisent de l'IL-10 et des ROS impliqués dans l'immunosuppression et leur présence empêche l'activation des lymphocytes T par les cDC dans des systèmes de co-culture (Laoui, Keirsse et al. 2016). Il est possible que ces MoDC tumorales soient apparentées aux MoAPC induites par les IFN de type I suite à l'injection des LPS dans notre modèle d'endotoxémie. Il serait intéressant d'évaluer la dépendance de cette population de MoDC tumorales aux IFN de type I. Cependant, de nombreuses études suggèrent que ces cytokines seraient importantes pour l'immuno-surveillance des cancers et qu'elles pourraient être utilisées au cours de thérapies anti-cancéreuses pour leurs propriétés anti-angiogéniques et pro-apoptotiques et pour leur capacité à orchestrer le système immunitaire inné et adaptatif (Zitvogel, Galluzzi et al. 2015). Il pourrait donc être important de s'assurer que les IFN de type I n'induisent pas la génération d'une population immunosuppressive au sein des tumeurs au cours de leur utilisation thérapeutique.

Il serait donc très intéressant d'évaluer les rôles que peuvent avoir ces Mo-APC dépendantes des IFN de type I. Par exemple, en les comparant avec des cDC et des macrophages, nous pourrions mesurer leur capacité de phagocytose de billes fluorescentes et d'activation des lymphocytes T CD4 et CD8. Il serait également très intéressant de comparer leur capacité de présentation croisée des antigènes à celle des cDC1 (Segura, Albiston et al. 2009).

Ces données observées chez la souris pourraient-elles s'appliquer chez l'homme ?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la myélopoïèse menant à la génération des cDC et des monocytes à partir des précurseurs hématopoïétiques chez l'homme semble très similaire à ce qui est retrouvé chez la souris. Brièvement, des homologues humains aux MDP bipotents, aux cMoP (restreints aux monocytes), aux CDP, pré-cDC1 et aux pré-cDC2 (restreints aux cDC) murins ont été identifiés dans la moelle osseuse et le sang de cordon ombilical, source très riche de cellules hématopoïétiques (Lee, Breton et al. 2015, Breton, Zheng et al. 2016, Kawamura, Onai et al. 2017).

CD64 n'est pas discriminant chez l'homme pour identifier les cellules dérivées de monocytes. Cependant, d'autres stratégies d'identification sont possibles en utilisant les marqueurs CD14 et CD16 (Guilliams, Ginhoux et al. 2014). Il serait intéressant d'évaluer

l'impact des LPS et des IFN de type I dans la génération des cellules dérivées de monocytes à partir de la culture *ex vivo* des MDP humains. Si ce phénomène est également valable chez l'homme, il pourrait s'appliquer à différents cadres pathologiques dans lesquels les IFN de type I ou les monocytes sont impliqués. La production de Mo-APC pro- ou anti-inflammatoires induites par ces IFN pourrait par exemple être impliquée dans certaines pathologies auto-immunes pour lesquelles les IFN de type I jouent un rôle important, comme le lupus systémique érythémateux (Crow 2014).

Chapitre 2. Etude des voies de reconnaissance intracellulaire des LPS

Dans cette partie, j'ai effectué un criblage à haut débit d'une banque de siRNA représentatifs du génome murin dans son intégralité afin de découvrir de potentiels régulateurs de la pyroptose induite par l'inflammasome non canonique activé par les LPS intracellulaires (LPSi). Le fait que les siRNA de la banque correspondant à des gènes impliqués dans cet inflammasome (entre autres Caspase-11 et GSDMD) n'aient pas donné des résultats aussi satisfaisants que les siRNA contrôles suggère que la banque ait peut être été partiellement dégradée lors de son stockage ou de la mise en plaque. Le GzmB a été identifié comme faux positif lors de ce criblage. En effet, la mortalité due au LPSi semblait significativement diminuée avec les siRNA ciblant ce gène. Cependant, malgré différents essais de validation avec des siRNA et des macrophages issus de souris KO, nous n'avons pas pu mettre en évidence de résistance à la pyroptose due au LPSi induite par la déficience en GzmB. Néanmoins, les rôles déjà attribués au GzmB et aux autres granzymes ont suggéré que le GzmB pourrait lier directement le LPS et avoir un rôle dans l'autre versant de l'inflammasome, c'est à dire le clivage des pro-formes des cytokines. Nos résultats préliminaires ont effectivement montré que le GzmB pourrait se lier au LPS et qu'il serait impliqué dans le clivage de la pro-IL-1 β en réponse au LPSi. Cependant, en réponse à l'ATP, la déficience en GzmB ne semble pas induire de défaut du clivage de la pro-IL1 β aussi drastique qu'avec l'activation de l'inflammasome non canonique. Le GzmB pourrait donc être spécifiquement impliqué dans l'inflammasome non canonique impliquant la caspase-11 et avoir un rôle plus modeste dans l'inflammasome canonique.

Nos résultats concernant le défaut du clivage de l'IL-1 β par les cellules déficientes pour le GzmB doivent être confirmés. En effet, à l'exception du western blot présenté en figure 34D, nous n'avons pas réussi à observer de nouveau le fragment p17 de l'IL-1 β . Ceci pourrait être dû à un transfert trop long des protéines du gel d'acrylamide vers la membrane de nitrocellulose, le fragment de faible poids moléculaire p17 migrant plus rapidement et passant potentiellement à travers la membrane. Ce problème pourrait aussi venir de la méthode de purification des protéines libérées dans le surnageant, utilisant l'acide trichloroacétique (TCA). Cette méthode de purification pourrait être difficilement adaptée aux protéines de petite taille ou en faible concentration. Des optimisations sont donc encore nécessaires au

laboratoire afin d'évaluer la meilleure méthode de purification des protéines libérées dans le milieu de culture et le meilleur temps de migration des protéines du gel vers la membrane. Des tests sont actuellement en cours afin de comparer des méthodes de purification utilisant différentes concentrations de TCA ou des extractions au méthanol/chloroforme. Ces tests devraient permettre d'améliorer les méthodes de purification et d'analyse des fragments clivés des caspases et des cytokines afin d'explorer précisément le rôle du GzmB dans l'inflammasome non canonique.

L'expression de GzmB nécessite-t-elle une activation des cellules ?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux composants des inflammasomes (comme la protéine NLRP3, la pro-IL-1 β ou encore la pro-caspase-1) sont inductibles et ne sont pas ou peu exprimés au sein des cellules dans des conditions normales ou stériles. Ces composants sont exprimés suite à l'activation de PRR membranaires, et notamment les TLR et les récepteurs aux IFN (Bauernfeind, Horvath et al. 2009, Broz and Dixit 2016). Il serait intéressant d'évaluer si l'activation de ces PRR induit l'expression de GzmB par les macrophages, comme cela a été montré avec les LPS induisant l'expression de GzmB par les cellules souches hématopoïétiques (Carnevalli, Scognamiglio et al. 2014). Pour cela, des macrophages différenciés *in vitro* pourraient être stimulés avec différents agonistes de TLR (par exemple le Poly(I:C), le Pam3CSK4 ou encore l'ADN CpG) ou des IFN (α , β ou γ) et l'expression de GzmB pourrait être mesurée par qPCR. Des souris transgéniques reportrices exprimant le GzmB lié à la protéine fluorescente EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) (Bannard, Kraman et al. 2009) pourraient aussi permettre de suivre l'expression de GzmB en cinétique au cours d'un choc endotoxique dans différents compartiments cellulaires. De plus, il conviendrait également de s'assurer que le GzmB ne soit pas requis pour l'activation complète des cellules en réponse aux agonistes des TLR. Pour cela, l'expression des composants de l'inflammasome comme la pro-caspase-1 ou la pro-IL-1 β pourrait être évaluée par qPCR et WB, suite à l'activation de cellules WT ou GzmB-KO. Cependant, nous avons bien retrouvé la pro-forme ainsi que la forme clivée de l'IL-1 β par WB avec les macrophages déficients pour le GzmB, suite à l'activation canonique de NLRP3. Ceci suggère donc que les cellules GzmB KO n'ont pas de défaut d'activation suite au *priming* avec le LPS.

A quel niveau le GzmB pourrait-il être impliqué dans la production des cytokines pro-inflammatoires suite à la transfection des LPS ?

Dans un article publié en 2011, Kayagaki, Warming et leurs collaborateurs ont montré que, comme la déficience en Caspase-11, la déficience en NLRP3 ou en Caspase-1 inhibe complètement le clivage de l'IL-1 β en réponse aux LPS intracellulaires. Cependant, ni NLRP3 ni la caspase-1 ne sont nécessaires à la pyroptose induite par les LPSi. Celle-ci dépend totalement de la caspase-11 (Kayagaki, Warming et al. 2011). Donc, si le GzmB a effectivement un rôle dans le clivage de l'IL-1 β , celui-ci devrait être dépendant de la caspase-1 et de NLRP3. Il est alors probable que le rôle majeur du GzmB dans l'inflammasome non canonique soit le couplage de la détection du LPS à l'activation de NLRP3 et que son rôle dans le clivage de l'IL-1 β soit majoritairement indirect. Cependant, comme la déficience en GzmB semble aussi diminuer (bien que faiblement) le clivage de l'IL-1 β en réponse à l'activateur canonique de l'inflammasome NLRP3 (l'ATP), le GzmB pourrait aussi avoir un rôle d'amplification de la production de l'IL-1 β mature, en parallèle de l'activité de NLRP3.

Si le GzmB a bien un rôle dans le clivage de la pro-IL-1 β , alors il serait intéressant d'évaluer le mécanisme plus en détails, et notamment si le GzmB est aussi impliqué dans l'assemblage de NLRP3 et/ou l'activation de la caspase-1 dans ces conditions. Il serait possible d'observer l'assemblage des complexes de l'inflammasome NLRP3 par microscopie à fluorescence, par exemple grâce à des anticorps fluorescents anti-ASC. Le clivage de la caspase-1 et de l'IL-1 β pourrait être évalué par Western-Blot suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 ou non canonique avec des macrophages WT ou GzmB KO. L'activité enzymatique de la caspase-1 pourrait également être mesurée avec ces mêmes cellules, par exemple grâce au substrat fluorogénique de la caspase-1 perméable aux membranes cellulaires, le z-YVAD-AFC. Cependant, il conviendra de s'assurer que ce substrat ne puisse pas aussi être clivé par le GzmB.

Il serait très intéressant d'évaluer si le rôle catalytique du GzmB est requis pour le clivage des pro-formes des cytokines ou des caspases suite à l'activation des inflammasomes. Pour cela, des molécules de GzmB (normales ou avec un site catalytique muté) et des LPS pourraient être co-incubés afin d'évaluer l'effet direct potentiel des LPS sur l'activité protéolytique du GzmB, par exemple en analysant le clivage de la caspase-1, de l'IL-1 β , ou de l'IL-18 par WB. Ceci pourrait également être réalisé avec une réaction colorimétrique à

l'aide de substrats spécifiques du GzmB (Hagn, Sutton et al. 2014). Le GzmB au site catalytique muté pourrait aussi être ré-exprimé dans des macrophages GzmB-KO afin d'évaluer si la liaison du GzmB aux LPS est requise pour le clivage de l'IL-1 β ou de la caspase-1, suite à l'activation de l'inflammasome non canonique.

Le GzmB étant retrouvé en concentration importante dans la circulation des patients septiques et endotoxémiques, il est possible qu'au moins l'un de ses rôles soit le clivage des pro-formes des cytokines libérées par les cellules nécrotiques ou pyroptotiques avant leur clivage. De cette manière, le GzmB permettrait d'augmenter le rendement en IL-1 β mature et ainsi d'optimiser l'inflammation induite par les inflammasomes. Certaines études ont aussi montré que, pour induire ses effets intracellulaires, le GzmB peut pénétrer au sein des cellules de manière autonome ou grâce à certains récepteurs (Shi, Mai et al. 1997, Motyka, Korbitt et al. 2000). De plus, certaines pathologies induisent le clivage de l'IL-1 β indépendamment des inflammasomes et de la caspase-1 (Hildebrand, Bode et al. 2014, Netea, van de Veerdonk et al. 2015). Le GzmB pourrait donc être l'une des protéases capables de cliver les pro-formes des cytokines et ainsi former une part indépendante de l'inflammasome impliquée dans l'activation des cytokines et optimisant la réponse immune.

Nos résultats préliminaires ont montré que le GzmB pourrait se lier directement aux LPS. Cependant, afin de confirmer ces résultats et d'étudier la liaison entre le GzmB et les LPS, il serait pertinent de mesurer la constante d'affinité entre ces deux molécules par résonance des plasmons de surface. Ceci pourrait être réalisé avec des LPS de sources diverses, afin de vérifier si cette liaison est possible avec différents sérotypes. Notamment, il serait intéressant d'évaluer si, comme pour le TLR4 ou la caspase-11, la partie lipide A du LPS est suffisante pour se fixer au GzmB et si la phosphorylation de cette molécule ou encore le nombre des groupement acyles sont cruciaux pour cette fixation. Ceci pourrait mettre à nouveau en évidence l'importance de la conservation de certaines structures moléculaires dans l'activation du système immunitaire et dans les stratégies d'évasion des pathogènes.

La liaison entre le GzmB et les LPS pourrait suggérer une potentielle interaction tripartite entre le GzmB, les LPS et la caspase-11. Le GzmB serait alors une partie intégrante de l'inflammasome non canonique, impliqué notamment dans la production des cytokines pro-inflammatoires. Ceci pourrait être vérifié par différentes méthodes de co-immunoprécipitation et de *pull-down* avec des molécules purifiées ou recombinantes, ou avec le lysat de cellules pyroptotiques. Afin d'évaluer si la liaison du GzmB au LPS est requise

pour induire le clivage de la pro-IL-1 β par le GzmB, le domaine de cette protéine similaire à celui où le GzmK se lie au LPS pourrait être supprimé (Wensink, Kemp et al. 2014). De cette façon, nous pourrions voir si la troncation de cette partie de GzmB induit bien un défaut de liaison aux LPS et si cela est suffisant pour supprimer le rôle du GzmB dans le clivage de la pro-IL-1 β , en ré-exprimant cette protéine tronquée dans des macrophages GzmB-KO.

S'il s'avère effectivement que le GzmB est impliqué dans le clivage des cytokines pro-inflammatoires suite à l'activation de l'inflammasome non canonique, alors cela permettrait d'intégrer de nouveaux éléments au schéma de cette voie de signalisation récemment mise en évidence. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'importance cruciale de cette voie de signalisation dans les effets délétères du choc endotoxique suggère que celle-ci pourrait être ciblée afin de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la prise en charge des patients présentant un sepsis. L'inhibition de GzmB permettrait ainsi la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires sans pour autant empêcher la pyroptose cellulaire, importante pour contrecarrer la prolifération des bactéries à tropisme intracellulaire.

Matériel & Méthodes

Souris et modèle d'endotoxémie

Les souris C57BL/6J (WT) (Laboratoires Janvier), 129S2/SvPasCrl (Laboratoires Charles River), IFNAR KO (fournies par le Dr. François Trottein) (Muller, Steinhoff et al. 1994), Caspase-1 KO (Kuida, Lippke et al. 1995), GzmB KO (fournies par le Dr. Julian Pardo) et Ly5.1 (Laboratoires Charles River) ont été stabulées au sein de l'animalerie exempte d'organismes pathogènes spécifiques de l'Institut Pasteur de Lille. La nourriture et la boisson leur ont été fournies *ad libitum*. Toutes les procédures expérimentales ont reçu l'accord de la commission locale d'éthique.

Pour le modèle murin d'endotoxémie, les souris âgées de 6 à 16 semaines ont reçu une injection intraveineuse de 25 µg de LPS 0111 :B4 Ultrapur (Invivogen) dans 100 µl de PBS, par voie rétro-orbitale. Les contrôles n'ont reçu que du PBS. Les souris ont ensuite été sacrifiées par dislocation cervicale et le sang, la moelle osseuse (fémur et tibia) et la rate ont été collectées aux temps indiqués. Le sang circulant des souris a été récupéré dans des tubes héparinés par ponction intracardiaque immédiatement après le sacrifice des animaux. Après centrifugation, le sérum est récupéré et immédiatement congelé à -20°C

Préparation des cellules pour la cytométrie en flux et marquage des molécules extracellulaires

Les cellules de la moelle osseuse ont été récupérées dans du milieu de culture à partir des fémurs et tibias à l'aide d'une aiguille de 26G montée sur une seringue de 2ml. Une suspension cellulaire homogène a ensuite été obtenue par aspiration-refoulement répétés et filtration avec un filtre de 70 µm. Les rates ont été infusées avec du milieu de culture contenant 1 mg/ml de collagénase D (Roche) puis broyées dans cette solution. Les splénocytes ont alors été incubées 30 minutes à 37°C. Une suspension cellulaire homogène a ensuite été obtenue par aspiration-refoulement répétés et filtration avec un filtre de 70 µm. Les globules rouges de la moelle osseuse et de la rate ont ensuite été lysés avec un traitement de 5 minutes à température ambiante avec 1 ml d'une solution de 160mM NH₄Cl et 170 mM Tris. Les cellules ont alors été comptées à l'aide d'une lame de Malassez, lavées avec du tampon Phosphate Buffered Saline (PBS) 1mM EDTA et incubées 30 minutes à 4°C à l'obscurité avec le réactif LIVE/DEAD Violet (Thermo Fisher Scientific). Les cellules ont ensuite été incubées 10 minutes avec du PBS 2% sérum de veau fœtal (SVF) 5 mM EDTA contenant les anticorps purifiés rat anti-souris CD16/CD32 (clone 93, Biolegend) et du sérum de souris (Interchim) afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques des anticorps. Puis les

Matériel & Méthodes

cellules ont été incubées avec les différents anticorps monoclonaux pendant 20 minutes à l'obscurité à 4°C et lavées deux fois au PBS 1mM EDTA avant d'être resuspendues dans 400 µl de Paraformaldéhyde 1% ou directement analysées au cytomètre de flux. Le sang a été récupéré dans des tubes héparinés par ponction intracardiaque directement après le sacrifice des animaux. Les cellules sanguines ont été directement incubées avec le mix d'anticorps 20 minutes à l'obscurité à température ambiante. Les érythrocytes ont ensuite été lysés avec le réactif Optilyse B (Beckman Coulter) puis analysés au cytomètre en flux. L'acquisition des échantillons a été réalisée sur le cytomètre de flux LSR Fortessa II (BD Biosciences). Les données ont été analysées avec logiciel Flowjo V10.1 (TreeStar). Les tris cellulaires ont été réalisés avec le cytomètre BD FACS Aria (BD Biosciences). Toutes les expériences de cytométrie en flux ont été réalisées sur la plate-forme de cytométrie de l'Institut Pasteur de Lille.

Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux

Cible	Clone	Conjugué	Firme
CD3	17A2	PerCPCy5.5	Biolegend
CD19	6D5	PerCPCy5.5	Biolegend
NK1.1	PK136	PerCPCy5.5	Biolegend
Ly6G	1A8	PerCPCy5.5	Biolegend
Ter119	TER-119	PerCPCy5.5	Biolegend
CD11b	M1.70	APCCy7	Biolegend
CD115 (M-CSF R)	AFS98	APC	Biolegend
CD64	X54-5/7.1	APC, BV711, Pe	Biolegend
CD135 (Flt3)	A2F10	Pe	Biolegend
Sca-1	D7	BV605	Biolegend
Ly6C	HK1.4	AF700	Biolegend
CD117 (c-kit)	2B8	PeCy7	Biolegend
CD24	M1/69	PeCy7	Biolegend
MHC-II (I-A/I-E)	M5/114.15.2	BV510, FITC	Biolegend
CD172 α (SIRP α)	P84	FITC	Biolegend
F480	BM8	PeCy7	Biolegend
BrdU	3D4	FITC	Biolegend
Streptavidine		Pe	Biolegend
MerTK	BAF591	Biotine	R&D Systems
CD11c	HL3	Pe-CF594	BD Biosciences

Les Ac utilisés pour le mix de marqueurs de lignée (Lin) sont les suivants : CD3, CD19, NK1.1, Ter119 et Ly6G.

Incorporation du BrdU et marquage intra-cellulaire

Afin d'évaluer la prolifération cellulaire, les suspensions de cellules de rate et de moelle osseuse ont été incubées 30 minutes à 37°C 5% CO₂ dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contenant 10% de SVF, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 2mM de glutamine, 10 mM d'Hepes, 1 mM de sodium pyruvate, 1% d'acides aminés non essentiels, 0,5 mM de 2-Mercaptoéthanol et 10 µM de BrdU. Les cellules ont ensuite été récupérées et le marquage extracellulaire a été réalisé comme expliqué dans le paragraphe précédent.

Afin de marquer le BrdU incorporé au niveau nucléaire par les cellules en prolifération, le protocole du kit BrdU Flow kits (BD Pharmingen) a été scrupuleusement suivi.

Culture *in vitro* de DC dérivés de la moelle osseuse murine

Afin de générer des DC Flt3-L, les cellules isolées de la moelle osseuse ont été mises en culture à une densité de 1 à 2.10⁶ cellules/ml, dans une plaque 96 puits à fond rond traitée pour la culture cellulaire, ou une plaque 48 puits. La culture a été réalisée dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contenant 10% de SVF, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 2mM de glutamine, 10 mM d'Hepes, 1 mM de sodium pyruvate, 1% d'acides aminés non essentiels, 0,5 mM de 2-Mercaptoéthanol et 100 ng/ml de la cytokine Flt3 (Celldex). Les cultures ont été supplémentées avec 100 ng/ml de LPS 0111 :B4 Ultrapur (Invivogen), 100 ng/ml d'IFN α (Peprotech), 10 ng/ml d'IFN β (Peprotech), ou du milieu seul. Le 3^{ème} jour de culture, la moitié du milieu est remplacée par du milieu frais après centrifugation. Les cellules sont ensuite récupérées le 7^{ème} ou 8^{ème} jour de culture pour l'analyse par cytométrie en flux.

Pour les co-cultures de progéniteurs CD45.2⁺ cultivés avec des cellules de moelle osseuse CD45.1⁺, 2000 progéniteurs triés par cytométrie en flux ont été cultivés avec 100 000 cellules de moelle osseuse pendant 7 jours.

Afin de générer des DC GM-CSF, 3.10⁶ de cellules isolées de la moelle osseuse murine ont été mises en culture dans une boîte de Pétri dans 10 ml de milieu IMDM (pour *Iscove's Modified Dulbecco's Media*) contenant 10% de SVF, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 2mM de glutamine, 10 mM d'Hepes, 1 mM de sodium pyruvate, 1% d'acides aminés non essentiels, 0,5 mM de 2-Mercaptoéthanol et 30 ng/ml de la cytokine

GM-CSF. Le 5^{ème} jour, 5 ml de milieu frais sont ajoutés à la culture. Les cellules non- et semi-adhérentes sont ensuite récupérées le 9^{ème} jour de culture.

Culture *in vitro* de Mo-DC dérivés de monocytes humains

Les cellules mononuclées du sang périphérique humain ont été isolées grâce à une centrifugation sur gradient de Ficoll. Les cellules récupérées ont alors été triées sur colonne magnétique afin de récupérer les monocytes CD14⁺, selon les protocoles fournis par la firme (MACS, Miltenyi Biotec). Ces monocytes ont alors été cultivés à une densité de 1.10^6 /ml avec 50 ng/ml de GM-CSF et 10 ng/ml d'IL-4 dans du milieu RPMI contenant 10% de SVF, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 2mM de glutamine, 10 mM d'Hepes, 1 mM de sodium pyruvate, 1% d'acides aminés non essentiels, 0,5 mM de 2-Mercaptoéthanol. Le 4^{ème} jour de culture, la moitié du milieu est remplacé par du milieu frais et les Mo-DC différenciées peuvent être récupérées le 7^{ème} jour.

Culture *in vitro* de macrophages dérivés de la moelle osseuse murine

Afin de générer des macrophages, les cellules isolées de la moelle osseuse ont été mises en culture en boîtes de Pétri non traitées pour la culture cellulaire (3.10^6 cellules pour 10 ml en boîte de Pétri de 100 mm de diamètre, 6.10^6 cellules pour 25 ml en boîte de Pétri de 145 mm de diamètre). Le milieu utilisé pour la culture des macrophages est *l'Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) contenant 10% de SVF, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 2mM de glutamine, 10 mM d'Hepes, 1 mM de sodium pyruvate, 1% d'acides aminés non essentiels, 0,5 mM de 2-Mercaptoéthanol et 20% de surnageant de la lignée L929 produisant le M-CSF (milieu IMDM-1). Au 3^{ème} jour de culture, 5 ou 12,5 ml de milieu IMDM-1 frais sont ajoutés en fonction du type de boîte utilisée. Afin de récupérer les cellules, entre les 5^{ème} et 7^{ème} jours de culture, le milieu de culture est retiré et le tapis cellulaire est délicatement rincé au PBS. Ensuite, 5 ou 10 ml de PBS 1mM EDTA sont ajoutés et la boîte est incubée 5 minutes à 4°C. Les cellules peuvent ensuite être facilement récupérées par aspiration et refoulement à la pipette de 10 ml.

Transfection de siRNA et activation de l'inflammasome non canonique

Pour un puits d'une plaque « Greiner µclear » 384 puits, 5µl de siRNA 10X à 200 nM (SMARTpool siGENOME, Dharmacon) dilués dans du Dulbecco's PBS (D-PBS) sans calcium ni magnésium sont mélangés doucement avec 5µl du lipofectant LTX

Matériel & Méthodes

(Thermofischer) dilué à 1/500 dans du D-PBS. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 10µl de la solution siRNA-LTX sont déposés au fond d'un puits de la plaque 384 puits. Par dessus sont ajoutées 5000 macrophages dilués dans 40µl d'IMDM sans rouge de phénol contenant 5% de SVF, 2mM de glutamine, 10 mM d'Hepes, 1 mM de sodium pyruvate, 1% d'acides aminés non essentiels, 0,5 mM de 2-Mercaptoéthanol et 10% de surnageant de la lignée L929 produisant le M-CSF (milieu IMDM-2). La plaque est alors incubée 48h à 37°C 5% CO₂ avant l'étape de l'activation des cellules. Pour cette étape, le milieu est délicatement enlevé des puits et remplacé par de l'IMDM-2 contenant 10 ng/ml de LPS O111 :B4 Ultrapur (Invivogen). Après une nuit d'activation, la transfection des LPS peut être réalisée afin d'activer la caspase-11 et l'inflammasome non canonique, induisant ainsi la pyroptose des macrophages. Pour un puits, 5µl de LPS 10X à 100 µg/ml dilués dans du D-PBS sont mélangés doucement avec 5µl du transfectant Fugene HD (Promega) dilué à 1/500 dans du D-PBS. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, 40µl d'IMDM-2 sont ajoutés aux 10µl du mix LPS-Fugene et le milieu d'activation est alors remplacé par le milieu de transfection dans la plaque 384 puits. Après 4h, 12,5µl de surnageant sont récupérés afin d'évaluer la mortalité précoce par dosage de la LDH. Après 24h, un second dosage de la LDH est réalisé. Le tapis cellulaire est alors incubé 30 minutes à 37°C 5%CO₂ avec de l'IMDM-2 contenant 300 ng/ml de Hoechst 33342 (Thermofischer). Ce milieu est ensuite remplacé par de l'IMDM-2 contenant de l'iodure de propidium (PI) (Sigma-Aldrich) à 500 ng/ml et la plaque 384 puits est analysée au microscope confocal InCell 6000 (GE Healthcare). La cytotoxicité peut alors être mesurée grâce au ratio entre les cellules positives pour le PI (cellules mortes) par rapport à l'ensemble des cellules positives pour le Hoechst.

Pour l'activation de l'inflammasome non canonique chez les DC, le même protocole a été utilisé en adaptant les volumes à des plaques 96 puits.

Mesure de la cytotoxicité par dosage de la LDH

La lactate deshydrogenase est une enzyme impliquée dans le métabolisme des glucides. Elle est libérée dans le microenvironnement lors d'une perte de l'intégrité membranaire et peut ainsi témoigner de la nécrose ou pyroptose cellulaire. Pour évaluer la cytotoxicité par dosage de la LDH, le kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) a été utilisé en suivant le protocole fourni. Brièvement, 25µl de surnageant de culture sont incubés avec 25µl de substrat 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. 25µl de la solution

Matériel & Méthodes

Stop sont alors ajoutés afin d'arrêter la réaction et l'absorbance à 490 nm est mesurée avec le lecteur de plaque FLUOstar Omega (BMG Labtech). Des puits ne contenant pas de cellules et d'autres où 100% des cellules sont lysées (tampon de lyse fourni dans le kit) nous permettent de calculer le pourcentage de mortalité dans les puits tests.

Criblage

Le criblage à haut débit a été effectué sur la plate-forme du BICeL de l'Institut Pasteur de Lille, en collaboration avec le Dr. Priscille Brodin. Nous avons utilisé la banque de 19061 siRNA SMARTpool siRNA mouse Library (Dharmacon), répartie en 70 plaques pour une concentration finale de 20 nM grâce à l'Echo® 550 liquid Handler (Labcyte), permettant le transfert de nano-gouttes d'une solution d'une plaque stock vers une plaque test à l'aide d'ondes acoustiques. Mis à part la culture cellulaire et la préparation des milieux et réactifs, l'ensemble des étapes présentées dans le paragraphe sur la transfection des siRNA et l'activation de l'inflammasome non canonique ont été automatisées pour le criblage.

Western Blot

$5 \cdot 10^5$ macrophages différenciés à partir de souris B6 ou GzmB-KO ont été mis en plaque 6 puits et activés pendant la nuit avec 100 ng/ml de LPS O111 : B4 Ultrapur. Les cellules ont ensuite été transfectées avec 10 μ g/ml de LPS Ultrapur et 6 μ l de Fugene HD (Promega) pendant 4h ou stimulés avec 5 mM d'ATP (Invivogen). Le surnageant a alors été récupéré et centrifugé 5 minutes à 500G afin d'enlever les débris cellulaires. En parallèle, le tapis cellulaire a été lysé et les protéines ont été extraites avec 100 μ l d'une solution de RIPA (Tris HCL 10 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100, Sodium deoxycholate 0,5%, SDS 0,1) et d'inhibiteurs de protéases (Roche) après lavage au PBS. Afin de récupérer les protéines libérées dans le surnageant, ces dernières ont été précipitées avec une solution d'acide trichloroacétique (TCA) 100% p/v. Brièvement, 100 μ l de la solution de TCA 100% sont ajoutés pour 1 ml de surnageant et le mix est incubé 30 minutes dans la glace. Le tube est alors centrifugé à 14000 rpm 15 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot lavé deux fois à l'acétone froid. Après une dernière centrifugation à 14000 rpm 15 minutes à 4°C, le culot est séché et repris dans du tampon de Laemmli.

Les échantillons de protéines provenant des lysats cellulaires ou des surnageants sont mélangés avec du tampon de Laemmli (concentration finale Tris HCl 0,06M, SDS 2%, Glycerol 10%, 2-mercaptoethanol 5%, bleu de bromophénol 0,002%). Les échantillons sont

Matériel & Méthodes

dénaturés 2 minutes à 90°C et 20 µl sont alors déposés dans les puits d'un gel d'acrylamide 4-12% (Invitrogen). L'électrophorèse est ensuite réalisée à 150V pendant environ 30 minutes jusqu'à ce que le front de migration atteigne les bords du gel (tampon Tris HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1% pH 8,3). Après la migration, le gel est lavé dans un bain d'éthanol 20% et les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose avec l'appareil I Blot 2 (Life Technologies, programme P0). La membrane de nitrocellulose est alors rincée à l'eau et saturée 1h avec du PBS Tween 0,05% et lait écrémé 5%. Après deux lavages au PBS Tween 0,05%, la membrane est incubée une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS Tween 0,05% et lait écrémé 5%. Le lendemain, la membrane est lavée trois fois au PBS Tween et incubée 1h à température ambiante sous agitation avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS Tween 0,05% et lait écrémé 5%. Ensuite, après trois lavages au PBS Tween, les protéines sont révélées avec le réactif chimioluminescent Fast Femo (ThermoFisher) dans lequel les membranes sont incubées 5 minutes à l'obscurité. Elles sont ensuite analysées avec l'appareil Image Quad LAS 4000 (GE Healthcare).

ELISA

Les ELISA IL-10 et IL-12p40 ont été réalisés en suivant le protocole des kits DuoSet ELISA, R&D Systems. Pour les ELISA IL-18, l'anticorps purifié anti-IL-18 (Clone 74, MBL International) et l'anticorps biotine anti-IL-18 (Clone 93-10C, MBL International) ont été utilisés pour le *coating* des plaques et la détection de l'IL-18, respectivement. L'IL-18 recombinant murin (R&D systems) a été utilisé pour la gamme étalon.

Afin d'évaluer la possibilité d'une liaison entre le LPS et le GzmB, des LPS (0111 :B4 Ultrapur) ont été tapissés pendant une nuit à température ambiante sur les bords des puits d'une plaque d'ELISA (Costar). Après saturation au PBS 1% BSA, les puits ont été incubés avec des doses croissantes de GzmB murin recombinant (Peprotech). Le GzmB a ensuite été détecté avec un anticorps purifié anti-GzmB (eBiosciences) et la suite de l'ELISA a été réalisée selon le protocole des kits DuoSet (R&D Systems). Afin de minimiser les risques d'interaction non spécifique, les puits ont été abondamment lavés entre chaque étape.

Un autre type d'ELISA cette fois en phase soluble a été mis au point au laboratoire afin d'évaluer la possibilité d'une liaison entre le LPS et le GzmB d'une seconde manière. Des billes fixant les chaînes κ des IgG de rats ou hamsters (Compbeads, BD Biosciences) ont été recouvertes d'Ac anti-GzmB (eBiosciences) puis saturées avec des molécules de GzmB murin

Matériel & Méthodes

recombinant (Peprotech). Les puits ont ensuite été incubés avec des molécules de LPS-biotine (Invivogen). La fixation du LPS-biotine aux billes recouvertes de GzmB a été détectée grâce à une streptavidine couplée au fluorochrome phycoérythrine (Pe) et la fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. Les billes ont été abondamment lavées entre chaque étape afin de minimiser les risques d'interaction non spécifique.

Bibliographie

Bibliographie

Abderrazak, A., T. Syrovets, D. Couchie, K. El Hadri, B. Friguet, T. Simmet and M. Rouis (2015). "NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases." Redox Biol **4**: 296-307.

Adib-Conquy, M., C. Adrie, C. Fitting, O. Gattolliat, R. Beyaert and J. M. Cavaillon (2006). "Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients." Crit Care Med **34**(9): 2377-2385.

Adolfsson, J., O. J. Borge, D. Bryder, K. Theilgaard-Monch, I. Astrand-Grundstrom, E. Sitnicka, Y. Sasaki and S. E. Jacobsen (2001). "Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity." Immunity **15**(4): 659-669.

Afonina, I. S., S. P. Cullen and S. J. Martin (2010). "Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B." Immunol Rev **235**(1): 105-116.

Afonina, I. S., G. A. Tynan, S. E. Logue, S. P. Cullen, M. Bots, A. U. Luthi, E. P. Reeves, N. G. McElvaney, J. P. Medema, E. C. Lavelle and S. J. Martin (2011). "Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1alpha." Mol Cell **44**(2): 265-278.

Ajami, B., J. L. Bennett, C. Krieger, W. Tetzlaff and F. M. Rossi (2007). "Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life." Nat Neurosci **10**(12): 1538-1543.

Akeda, T., K. Yamanaka, K. Tsuda, Y. Omoto, E. C. Gabazza and H. Mizutani (2014). "CD8+ T cell granzyme B activates keratinocyte endogenous IL-18." Arch Dermatol Res **306**(2): 125-130.

Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.

Albert, M. L. (2004). "Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?" Nat Rev Immunol **4**(3): 223-231.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-738.

Aliberti, J., O. Schulz, D. J. Pennington, H. Tsujimura, C. Reis e Sousa, K. Ozato and A. Sher (2003). "Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8alpha + dendritic cells." Blood **101**(1): 305-310.

Alliot, F., I. Godin and B. Pessac (1999). "Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain." Brain Res Dev Brain Res **117**(2): 145-152.

Andrews, C. S., M. Miyata, S. Susuki-Miyata, B. C. Lee, K. Komatsu and J. D. Li (2015). "Nontypeable Haemophilus influenzae-Induced MyD88 Short Expression Is Regulated by Positive IKKbeta and CREB Pathways and Negative ERK1/2 Pathway." PLoS One **10**(12): e0144840.

Bibliographie

- Auffray, C., D. K. Fogg, E. Narni-Mancinelli, B. Senechal, C. Trouillet, N. Saederup, J. Leemput, K. Bigot, L. Campisi, M. Abitbol, T. Molina, I. Charo, D. A. Hume, A. Cumano, G. Lauvau and F. Geissmann (2009). "CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation." *J Exp Med* **206**(3): 595-606.
- Aziz, A., E. Soucie, S. Sarrazin and M. H. Sieweke (2009). "MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages." *Science* **326**(5954): 867-871.
- Bachem, A., S. Guttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H. W. Mages, V. Henn, P. M. Kloetzel, S. Gurka and R. A. Kroccek (2010). "Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells." *J Exp Med* **207**(6): 1273-1281.
- Bain, C. C., A. Bravo-Blas, C. L. Scott, E. Gomez Perdiguero, F. Geissmann, S. Henri, B. Malissen, L. C. Osborne, D. Artis and A. M. Mowat (2014). "Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice." *Nat Immunol* **15**(10): 929-937.
- Bakri, Y., S. Sarrazin, U. P. Mayer, S. Tillmanns, C. Nerlov, A. Boned and M. H. Sieweke (2005). "Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate." *Blood* **105**(7): 2707-2716.
- Bannard, O., M. Kraman and D. T. Fearon (2009). "Secondary replicative function of CD8+ T cells that had developed an effector phenotype." *Science* **323**(5913): 505-509.
- Barchet, W., M. Cella, B. Odermatt, C. Asselin-Paturel, M. Colonna and U. Kalinke (2002). "Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo." *J Exp Med* **195**(4): 507-516.
- Bauernfeind, F., A. Rieger, F. A. Schildberg, P. A. Knolle, J. L. Schmid-Burgk and V. Hornung (2012). "NLRP3 inflammasome activity is negatively controlled by miR-223." *J Immunol* **189**(8): 4175-4181.
- Bauernfeind, F. G., G. Horvath, A. Stutz, E. S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B. G. Monks, K. A. Fitzgerald, V. Hornung and E. Latz (2009). "Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression." *J Immunol* **183**(2): 787-791.
- Benjamim, C. F., S. K. Lundy, N. W. Lukacs, C. M. Hogaboam and S. L. Kunkel (2005). "Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells." *Blood* **105**(9): 3588-3595.
- Bergsbaken, T., S. L. Fink and B. T. Cookson (2009). "Pyroptosis: host cell death and inflammation." *Nat Rev Microbiol* **7**(2): 99-109.
- Bertrand, J. Y., A. Jalil, M. Klaine, S. Jung, A. Cumano and I. Godin (2005). "Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac." *Blood* **106**(9): 3004-3011.

Bibliographie

- Beutler, B. (2000). "Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor." Curr Opin Immunol **12**(1): 20-26.
- Beutler, B. and E. T. Rietschel (2003). "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin." Nat Rev Immunol **3**(2): 169-176.
- Bhatia, M. and S. Mochhala (2004). "Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome." J Pathol **202**(2): 145-156.
- Bigley, V., M. Haniffa, S. Doulatov, X. N. Wang, R. Dickinson, N. McGovern, L. Jardine, S. Pagan, I. Dimmick, I. Chua, J. Wallis, J. Lordan, C. Morgan, D. S. Kumararatne, R. Doffinger, M. van der Burg, J. van Dongen, A. Cant, J. E. Dick, S. Hambleton and M. Collin (2011). "The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency." J Exp Med **208**(2): 227-234.
- Biswas, S. K. and E. Lopez-Collazo (2009). "Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance." Trends Immunol **30**(10): 475-487.
- Boettcher, S., P. Ziegler, M. A. Schmid, H. Takizawa, N. van Rooijen, M. Kopf, M. Heikenwalder and M. G. Manz (2012). "Cutting edge: LPS-induced emergency myelopoiesis depends on TLR4-expressing nonhematopoietic cells." J Immunol **188**(12): 5824-5828.
- Bogdan, C., J. Mattner and U. Schleicher (2004). "The role of type I interferons in non-viral infections." Immunol Rev **202**: 33-48.
- Boomer, J. S., K. To, K. C. Chang, O. Takasu, D. F. Osborne, A. H. Walton, T. L. Bricker, S. D. Jarman, D. Kreisel, A. S. Krupnick, A. Srivastava, P. E. Swanson, J. M. Green and R. S. Hotchkiss (2011). "Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure." JAMA **306**(23): 2594-2605.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y. J. Liu and A. O'Garra (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197**(1): 101-109.
- Borden, E. C., G. C. Sen, G. Uze, R. H. Silverman, R. M. Ransohoff, G. R. Foster and G. R. Stark (2007). "Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine." Nat Rev Drug Discov **6**(12): 975-990.
- Breton, G., J. Lee, Y. J. Zhou, J. J. Schreiber, T. Keler, S. Pühr, N. Anandasabapathy, S. Schlesinger, M. Caskey, K. Liu and M. C. Nussenzweig (2015). "Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells." J Exp Med **212**(3): 401-413.
- Breton, G., S. Zheng, R. Valieris, I. Tojal da Silva, R. Satija and M. C. Nussenzweig (2016). "Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c+ or CD141+ DCs." J Exp Med **213**(13): 2861-2870.
- Briseno, C. G., M. Haldar, N. M. Kretzer, X. Wu, D. J. Theisen, W. Kc, V. Durai, G. E. Grajales-Reyes, A. Iwata, P. Bagadia, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2016). "Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells." Cell Rep **15**(11): 2462-2474.

Bibliographie

- Broz, P. and V. M. Dixit (2016). "Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling." Nat Rev Immunol **16**(7): 407-420.
- Broz, P. and D. M. Monack (2013). "Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens." Nat Rev Immunol **13**(8): 551-565.
- Bryant, C. E., D. R. Spring, M. Gangloff and N. J. Gay (2010). "The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide." Nat Rev Microbiol **8**(1): 8-14.
- Buechler, M. B., H. M. Akilesh and J. A. Hamerman (2016). "Cutting Edge: Direct Sensing of TLR7 Ligands and Type I IFN by the Common Myeloid Progenitor Promotes mTOR/PI3K-Dependent Emergency Myelopoiesis." J Immunol **197**(7): 2577-2582.
- Buechler, M. B., T. H. Teal, K. B. Elkon and J. A. Hamerman (2013). "Cutting edge: Type I IFN drives emergency myelopoiesis and peripheral myeloid expansion during chronic TLR7 signaling." J Immunol **190**(3): 886-891.
- Buras, J. A., B. Holzmann and M. Sitkovsky (2005). "Animal models of sepsis: setting the stage." Nat Rev Drug Discov **4**(10): 854-865.
- Burberry, A., M. Y. Zeng, L. Ding, I. Wicks, N. Inohara, S. J. Morrison and G. Nunez (2014). "Infection mobilizes hematopoietic stem cells through cooperative NOD-like receptor and Toll-like receptor signaling." Cell Host Microbe **15**(6): 779-791.
- Burns, K., S. Janssens, B. Brissoni, N. Olivos, R. Beyaert and J. Tschopp (2003). "Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4." J Exp Med **197**(2): 263-268.
- Bursch, L. S., L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D. H. Kaplan and K. A. Hogquist (2007). "Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells." J Exp Med **204**(13): 3147-3156.
- Caminschi, I., A. I. Proietto, F. Ahmet, S. Kitsoulis, J. Shin Teh, J. C. Lo, A. Rizzitelli, L. Wu, D. Vremec, S. L. van Dommelen, I. K. Campbell, E. Maraskovsky, H. Braley, G. M. Davey, P. Mottram, N. van de Velde, K. Jensen, A. M. Lew, M. D. Wright, W. R. Heath, K. Shortman and M. H. Lahoud (2008). "The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement." Blood **112**(8): 3264-3273.
- Carnevalli, L. S., R. Scognamiglio, N. Cabezas-Wallscheid, S. Rahmig, E. Laurenti, K. Masuda, L. Jockel, A. Kuck, S. Sujer, A. Polykratis, M. Erlacher, M. Pasparakis, M. A. Essers and A. Trumpp (2014). "Improved HSC reconstitution and protection from inflammatory stress and chemotherapy in mice lacking granzyme B." J Exp Med **211**(5): 769-779.
- Cavaillon, J. M. and M. Adib-Conquy (2006). "Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis." Crit Care **10**(5): 233.
- Cavaillon, J. M., M. Adib-Conquy, I. Cloez-Tayarani and C. Fitting (2001). "Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review." J Endotoxin Res **7**(2): 85-93.
- Cavaillon, J. M., C. Adrie, C. Fitting and M. Adib-Conquy (2005). "Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS." J Endotoxin Res **11**(5): 311-320.

Bibliographie

- Cecchini, M. G., M. G. Dominguez, S. Mocci, A. Wetterwald, R. Felix, H. Fleisch, O. Chisholm, W. Hofstetter, J. W. Pollard and E. R. Stanley (1994). "Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse." Development **120**(6): 1357-1372.
- Cheong, C., I. Matos, J. H. Choi, D. B. Dandamudi, E. Shrestha, M. P. Longhi, K. L. Jeffrey, R. M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C. G. Park and R. M. Steinman (2010). "Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas." Cell **143**(3): 416-429.
- Chihara, T., S. Suzu, R. Hassan, N. Chutiwitoonchai, M. Hiyoshi, K. Motoyoshi, F. Kimura and S. Okada (2010). "IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation." Cell Death Differ **17**(12): 1917-1927.
- Chuang, T. H. and R. J. Ulevitch (2004). "Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors." Nat Immunol **5**(5): 495-502.
- Coopersmith, C. M., H. Wunsch, M. P. Fink, W. T. Linde-Zwirble, K. M. Olsen, M. S. Sommers, K. J. Anand, K. M. Tchorz, D. C. Angus and C. S. Deutschman (2012). "A comparison of critical care research funding and the financial burden of critical illness in the United States." Crit Care Med **40**(4): 1072-1079.
- Copeland, S., H. S. Warren, S. F. Lowry, S. E. Calvano, D. Remick, Inflammation and I. the Host Response to Injury (2005). "Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans." Clin Diagn Lab Immunol **12**(1): 60-67.
- Corcoran, L., I. Ferrero, D. Vremec, K. Lucas, J. Waithman, M. O'Keeffe, L. Wu, A. Wilson and K. Shortman (2003). "The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells." J Immunol **170**(10): 4926-4932.
- Costa, A., R. Gupta, G. Signorino, A. Malara, F. Cardile, C. Biondo, A. Midiri, R. Galbo, P. Trieu-Cuot, S. Papasergi, G. Teti, P. Henneke, G. Mancuso, D. T. Golenbock and C. Beninati (2012). "Activation of the NLRP3 inflammasome by group B streptococci." J Immunol **188**(4): 1953-1960.
- Costa, T. R., C. Felisberto-Rodrigues, A. Meir, M. S. Prevost, A. Redzej, M. Trokter and G. Waksman (2015). "Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights." Nat Rev Microbiol **13**(6): 343-359.
- Courtine, E., F. Pene, N. Cagnard, J. Toubiana, C. Fitting, J. Brocheton, C. Rousseau, S. Gerondakis, J. D. Chiche, F. Ouaz and J. P. Mira (2011). "Critical role of cRel subunit of NF-kappaB in sepsis survival." Infect Immun **79**(5): 1848-1854.
- Covert, M. W., T. H. Leung, J. E. Gaston and D. Baltimore (2005). "Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation." Science **309**(5742): 1854-1857.
- Crocker, B. A., J. A. O'Donnell and M. Gerlic (2014). "Pyroptotic death storms and cytopenia." Curr Opin Immunol **26**: 128-137.
- Crow, M. K. (2014). "Type I interferon in the pathogenesis of lupus." J Immunol **192**(12): 5459-5468.

Bibliographie

Crowley, M., K. Inaba, M. Witmer-Pack and R. M. Steinman (1989). "The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus." Cell Immunol **118**(1): 108-125.

Crozat, K., S. Tamoutounour, T. P. Vu Manh, E. Fossum, H. Luche, L. Ardouin, M. Williams, H. Azukizawa, B. Bogen, B. Malissen, S. Henri and M. Dalod (2011). "Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8alpha+ type." J Immunol **187**(9): 4411-4415.

Cullen, T. W., D. K. Giles, L. N. Wolf, C. Ecobichon, I. G. Boneca and M. S. Trent (2011). "Helicobacter pylori versus the host: remodeling of the bacterial outer membrane is required for survival in the gastric mucosa." PLoS Pathog **7**(12): e1002454.

Cumano, A. and I. Godin (2007). "Ontogeny of the hematopoietic system." Annu Rev Immunol **25**: 745-785.

Cusson-Hermance, N., S. Khurana, T. H. Lee, K. A. Fitzgerald and M. A. Kelliher (2005). "Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation." J Biol Chem **280**(44): 36560-36566.

Dabbagh, K., M. E. Dahl, P. Stepick-Biek and D. B. Lewis (2002). "Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells." J Immunol **168**(9): 4524-4530.

Dai, X. M., G. R. Ryan, A. J. Hapel, M. G. Dominguez, R. G. Russell, S. Kapp, V. Sylvestre and E. R. Stanley (2002). "Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects." Blood **99**(1): 111-120.

Dalod, M., T. P. Salazar-Mather, L. Malmgaard, C. Lewis, C. Asselin-Paturel, F. Brière, G. Trinchieri and C. A. Biron (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." J Exp Med **195**(4): 517-528.

Das, M., G. Sabio, F. Jiang, M. Rincón, R. A. Flavell and R. J. Davis (2009). "Induction of hepatitis by JNK-mediated expression of TNF-alpha." Cell **136**(2): 249-260.

Davies, L. C., S. J. Jenkins, J. E. Allen and P. R. Taylor (2013). "Tissue-resident macrophages." Nat Immunol **14**(10): 986-995.

De Luca, K., V. Frances-Duvert, M. J. Asensio, R. Ihsani, E. Debien, M. Taillardet, E. Verhoeyen, C. Bella, S. Lantheaume, L. Genestier and T. Defrance (2009). "The TLR1/2 agonist PAM(3)CSK(4) instructs commitment of human hematopoietic stem cells to a myeloid cell fate." Leukemia **23**(11): 2063-2074.

Decker, T., M. Muller and S. Stockinger (2005). "The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection." Nat Rev Immunol **5**(9): 675-687.

del Rio, M. L., G. Bernhardt, J. I. Rodriguez-Barbosa and R. Forster (2010). "Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells." Immunol Rev **234**(1): 268-281.

Bibliographie

del Rio, M. L., J. I. Rodriguez-Barbosa, E. Kremmer and R. Forster (2007). "CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells." *J Immunol* **178**(11): 6861-6866.

Delano, M. J. and P. A. Ward (2016). "Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality?" *J Clin Invest* **126**(1): 23-31.

den Haan, J. M. and M. J. Bevan (2002). "Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **196**(6): 817-827.

DiGiandomenico, A., R. A. Veach, J. Zienkiewicz, D. J. Moore, L. S. Wylezinski, M. A. Hutchens and J. Hawiger (2014). "The "genomic storm" induced by bacterial endotoxin is calmed by a nuclear transport modifier that attenuates localized and systemic inflammation." *PLoS One* **9**(10): e110183.

Dinarello, C. A. (1991). "Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism." *Blood* **77**(8): 1627-1652.

Ding, Y., C. S. Chung, S. Newton, Y. Chen, S. Carlton, J. E. Albina and A. Ayala (2004). "Polymicrobial sepsis induces divergent effects on splenic and peritoneal dendritic cell function in mice." *Shock* **22**(2): 137-144.

Dominguez, P. M. and C. Ardavin (2010). "Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation." *Immunol Rev* **234**(1): 90-104.

Dostert, C., V. Pétrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman and J. Tschopp (2008). "Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica." *Science* **320**(5876): 674-677.

Dranoff, G., A. D. Crawford, M. Sadelain, B. Ream, A. Rashid, R. T. Bronson, G. R. Dickersin, C. J. Bachurski, E. L. Mark, J. A. Whitsett and et al. (1994). "Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis." *Science* **264**(5159): 713-716.

Dubois, C. M., R. Neta, J. R. Keller, S. E. Jacobsen, J. J. Oppenheim and F. Ruscetti (1993). "Hematopoietic growth factors and glucocorticoids synergize to mimic the effects of IL-1 on granulocyte differentiation and IL-1 receptor induction on bone marrow cells in vivo." *Exp Hematol* **21**(2): 303-310.

Dumestre-Pérard, C., E. Doerr, M. G. Colomb and M. Loos (2007). "Involvement of complement pathways in patients with bacterial septicemia." *Mol Immunol* **44**(7): 1631-1638.

Edelson, B. T., T. R. Bradstreet, W. Kc, K. Hildner, J. W. Herzog, J. Sim, J. H. Russell, T. L. Murphy, E. R. Unanue and K. M. Murphy (2011). "Batf3-dependent CD11b(low/-) peripheral dendritic cells are GM-CSF-independent and are not required for Th cell priming after subcutaneous immunization." *PLoS One* **6**(10): e25660.

Edelson, B. T., W. Kc, R. Juang, M. Kohyama, L. A. Benoit, P. A. Klekotka, C. Moon, J. C. Albring, W. Ise, D. G. Michael, D. Bhattacharya, T. S. Stappenbeck, M. J. Holtzman, S. S. Sung, T. L. Murphy, K. Hildner and K. M. Murphy (2010). "Peripheral CD103+ dendritic

Bibliographie

cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells." *J Exp Med* **207**(4): 823-836.

Efron, P. A., A. Martins, D. Minnich, K. Tinsley, R. Ungaro, F. R. Bahjat, R. Hotchkiss, M. Clare-Salzler and L. L. Moldawer (2004). "Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis." *J Immunol* **173**(5): 3035-3043.

Eisenbarth, S. C., O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala and R. A. Flavell (2008). "Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants." *Nature* **453**(7198): 1122-1126.

Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, J. W. Huleatt, I. Visintin, C. A. Herrick and K. Bottomly (2002). "Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen." *J Exp Med* **196**(12): 1645-1651.

Elsayh, K. I., A. M. Zahran, I. Lotfy Mohamad and S. S. Aly (2013). "Dendritic cells in childhood sepsis." *J Crit Care* **28**(5): 881 e887-813.

Essers, M. A., S. Offner, W. E. Blanco-Bose, Z. Waibler, U. Kalinke, M. A. Duchosal and A. Trumpp (2009). "IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo." *Nature* **458**(7240): 904-908.

Faivre, V., A. C. Lukaszewicz, A. Alves, D. Charron, D. Payen and A. Haziot (2012). "Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis." *PLoS One* **7**(10): e47209.

Fink, M. P. (2014). "Animal models of sepsis." *Virulence* **5**(1): 143-153.

Fink, M. P. and S. O. Heard (1990). "Laboratory models of sepsis and septic shock." *J Surg Res* **49**(2): 186-196.

Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird and L. A. O'Neill (2001). "Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction." *Nature* **413**(6851): 78-83.

Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha and D. T. Golenbock (2003). "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF." *J Exp Med* **198**(7): 1043-1055.

Flohe, S. B., H. Agrawal, D. Schmitz, M. Gertz, S. Flohe and F. U. Schade (2006). "Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response." *J Leukoc Biol* **79**(3): 473-481.

Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano and F. Geissmann (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." *Science* **311**(5757): 83-87.

Franchi, L., R. Muñoz-Planillo and G. Núñez (2012). "Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes." *Nat Immunol* **13**(4): 325-332.

Bibliographie

- Franchi, L., N. Warner, K. Viani and G. Nuñez (2009). "Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense." *Immunol Rev* **227**(1): 106-128.
- Francisco-Cruz, A., M. Aguilar-Santelises, O. Ramos-Espinosa, D. Mata-Espinosa, B. Marquina-Castillo, J. Barrios-Payan and R. Hernandez-Pando (2014). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor." *Med Oncol* **31**(1): 774.
- Gao, Y., S. A. Nish, R. Jiang, L. Hou, P. Licona-Limon, J. S. Weinstein, H. Zhao and R. Medzhitov (2013). "Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells." *Immunity* **39**(4): 722-732.
- Gautier, E. L., T. Huby, F. Saint-Charles, B. Ouzilleau, M. J. Chapman and P. Lesnik (2008). "Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock." *J Immunol* **180**(10): 6941-6946.
- Gautier, E. L., T. Shay, J. Miller, M. Greter, C. Jakubzick, S. Ivanov, J. Helft, A. Chow, K. G. Elpek, S. Gordonov, A. R. Mazloom, A. Ma'ayan, W. J. Chua, T. H. Hansen, S. J. Turley, M. Merad, G. J. Randolph and C. Immunological Genome (2012). "Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages." *Nat Immunol* **13**(11): 1118-1128.
- Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." *Immunity* **19**(1): 71-82.
- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* **327**(5966): 656-661.
- Gentile, L. F., A. L. Cuenca, A. G. Cuenca, D. C. Nacionales, R. Ungaro, P. A. Efron, L. L. Moldawer and S. D. Larson (2015). "Improved emergency myelopoiesis and survival in neonatal sepsis by caspase-1/11 ablation." *Immunology* **145**(2): 300-311.
- Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." *Science* **330**(6005): 841-845.
- Ginhoux, F. and M. Williams (2016). "Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis." *Immunity* **44**(3): 439-449.
- Ginhoux, F. and S. Jung (2014). "Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis." *Nat Rev Immunol* **14**(6): 392-404.
- Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S. A. Lira, E. R. Stanley, M. Nussenzweig and M. Merad (2009). "The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs." *J Exp Med* **206**(13): 3115-3130.
- Gioannini, T. L., A. Teghanemt, D. Zhang, P. Prohinar, E. N. Levis, R. S. Munford and J. P. Weiss (2007). "Endotoxin-binding proteins modulate the susceptibility of bacterial endotoxin to deacylation by acyloxyacyl hydrolase." *J Biol Chem* **282**(11): 7877-7884.

Bibliographie

Gioannini, T. L., D. Zhang, A. Teghanemt and J. P. Weiss (2002). "An essential role for albumin in the interaction of endotoxin with lipopolysaccharide-binding protein and sCD14 and resultant cell activation." *J Biol Chem* **277**(49): 47818-47825.

Gray, P., A. Dunne, C. Brikos, C. A. Jefferies, S. L. Doyle and L. A. O'Neill (2006). "MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction." *J Biol Chem* **281**(15): 10489-10495.

Greter, M., J. Helft, A. Chow, D. Hashimoto, A. Mortha, J. Agudo-Cantero, M. Bogunovic, E. L. Gautier, J. Miller, M. Leboeuf, G. Lu, C. Aloman, B. D. Brown, J. W. Pollard, H. Xiong, G. J. Randolph, J. E. Chipuk, P. S. Frenette and M. Merad (2012). "GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells." *Immunity* **36**(6): 1031-1046.

Grimaldi, D., S. Louis, F. Pene, G. Sirgo, C. Rousseau, Y. E. Claessens, L. Vimeux, A. Cariou, J. P. Mira, A. Hosmalin and J. D. Chiche (2011). "Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock." *Intensive Care Med* **37**(9): 1438-1446.

Guarda, G., M. Braun, F. Staehli, A. Tardivel, C. Mattmann, I. Forster, M. Farlik, T. Decker, R. A. Du Pasquier, P. Romero and J. Tschopp (2011). "Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation." *Immunity* **34**(2): 213-223.

Guilliams, M., P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad and B. N. Lambrecht (2014). "The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages." *Nat Rev Immunol* **14**(2): 94-108.

Guilliams, M., I. De Kleer, S. Henri, S. Post, L. Vanhoutte, S. De Prijck, K. Deswarte, B. Malissen, H. Hammad and B. N. Lambrecht (2013). "Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF." *J Exp Med* **210**(10): 1977-1992.

Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S. H. Naik, N. Onai, B. U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand and S. Yona (2014). "Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny." *Nat Rev Immunol* **14**(8): 571-578.

Guisset, O., M. S. Dilhuydy, R. Thiebaut, J. Lefevre, F. Camou, A. Sarrat, C. Gabinski, J. F. Moreau and P. Blanco (2007). "Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock." *Intensive Care Med* **33**(1): 148-152.

Guo, H., J. B. Callaway and J. P. Ting (2015). "Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics." *Nat Med* **21**(7): 677-687.

Hagar, J. A., D. A. Powell, Y. Aachoui, R. K. Ernst and E. A. Miao (2013). "Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock." *Science* **341**(6151): 1250-1253.

Hagn, M., V. R. Sutton and J. A. Trapani (2014). "A colorimetric assay that specifically measures Granzyme B proteolytic activity: hydrolysis of Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl." *J Vis Exp*(93): e52419.

Bibliographie

- Halle, A., V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore and D. T. Golenbock (2008). "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta." *Nat Immunol* **9**(8): 857-865.
- Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain and B. N. Lambrecht (2009). "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." *Nat Med* **15**(4): 410-416.
- Han, K. J., X. Su, L. G. Xu, L. H. Bin, J. Zhang and H. B. Shu (2004). "Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways." *J Biol Chem* **279**(15): 15652-15661.
- Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P. S. Wasan, X. N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R. F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J. K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin and F. Ginhoux (2012). "Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells." *Immunity* **37**(1): 60-73.
- Hänsch, G. M., M. Seitz, G. Martinotti, M. Betz, E. W. Rauterberg and D. Gemsa (1984). "Macrophages release arachidonic acid, prostaglandin E2, and thromboxane in response to late complement components." *J Immunol* **133**(4): 2145-2150.
- Harboe, M. and T. E. Mollnes (2008). "The alternative complement pathway revisited." *J Cell Mol Med* **12**(4): 1074-1084.
- Hartemink, K. J., M. A. Paul, J. J. Spijkstra, A. R. Girbes and K. H. Polderman (2003). "Immunoparalysis as a cause for invasive aspergillosis?" *Intensive Care Med* **29**(11): 2068-2071.
- He, W. T., H. Wan, L. Hu, P. Chen, X. Wang, Z. Huang, Z. H. Yang, C. Q. Zhong and J. Han (2015). "Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion." *Cell Res* **25**(12): 1285-1298.
- He, Y., M. Y. Zeng, D. Yang, B. Motro and G. Núñez (2016). "NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux." *Nature* **530**(7590): 354-357.
- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2009). "Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces." *Nat Immunol* **10**(12): 1237-1244.
- Heid, M. E., P. A. Keyel, C. Kamga, S. Shiva, S. C. Watkins and R. D. Salter (2013). "Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation." *J Immunol* **191**(10): 5230-5238.
- Helft, J., J. Bottcher, P. Chakravarty, S. Zelenay, J. Huotari, B. U. Schraml, D. Goubau and C. Reis e Sousa (2015). "GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells." *Immunity* **42**(6): 1197-1211.
- Hettinger, J., D. M. Richards, J. Hansson, M. M. Barra, A. C. Joschko, J. Krijgsveld and M. Feuerer (2013). "Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor." *Nat Immunol* **14**(8): 821-830.

Bibliographie

- Hildebrand, D., K. A. Bode, D. Riess, D. Cerny, A. Waldhuber, F. Rommler, J. Strack, S. Korten, J. H. Orth, T. Miethke, K. Heeg and K. F. Kubatzky (2014). "Granzyme A produces bioactive IL-1beta through a nonapoptotic inflammasome-independent pathway." *Cell Rep* **9**(3): 910-917.
- Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2008). "Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity." *Science* **322**(5904): 1097-1100.
- Hirotsu, T., M. Yamamoto, Y. Kumagai, S. Uematsu, I. Kawase, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "Regulation of lipopolysaccharide-inducible genes by MyD88 and Toll/IL-1 domain containing adaptor inducing IFN-beta." *Biochem Biophys Res Commun* **328**(2): 383-392.
- Hise, A. G., J. Tomalka, S. Ganesan, K. Patel, B. A. Hall, G. D. Brown and K. A. Fitzgerald (2009). "An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*." *Cell Host Microbe* **5**(5): 487-497.
- Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog and M. O'Keeffe (2001). "Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets." *J Immunol* **166**(9): 5448-5455.
- Hoeffel, G., J. Chen, Y. Lavin, D. Low, F. F. Almeida, P. See, A. E. Beaudin, J. Lum, I. Low, E. C. Forsberg, M. Poidinger, F. Zolezzi, A. Larbi, L. G. Ng, J. K. Chan, M. Greter, B. Becher, I. M. Samokhvalov, M. Merad and F. Ginhoux (2015). "C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages." *Immunity* **42**(4): 665-678.
- Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E. O. Samstad, H. Kono, K. L. Rock, K. A. Fitzgerald and E. Latz (2008). "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." *Nat Immunol* **9**(8): 847-856.
- Hotchkiss, R. S., G. Monneret and D. Payen (2013). "Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach." *Lancet Infect Dis* **13**(3): 260-268.
- Hotchkiss, R. S., G. Monneret and D. Payen (2013). "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **13**(12): 862-874.
- Hotchkiss, R. S. and D. W. Nicholson (2006). "Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 813-822.
- Hotchkiss, R. S., K. W. Tinsley, P. E. Swanson, K. C. Chang, J. P. Cobb, T. G. Buchman, S. J. Korsmeyer and I. E. Karl (1999). "Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14541-14546.
- Huys, L., F. Van Hauwermeiren, L. Dejager, E. Dejonckheere, S. Lienenklaus, S. Weiss, G. Leclercq and C. Libert (2009). "Type I interferon drives tumor necrosis factor-induced lethal shock." *J Exp Med* **206**(9): 1873-1882.
- Ichinohe, T., I. K. Pang and A. Iwasaki (2010). "Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel." *Nat Immunol* **11**(5): 404-410.

Bibliographie

- Israël, A. (2010). "The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(3): a000158.
- Ito, M., Y. Yanagi and T. Ichinohe (2012). "Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome." PLoS Pathog **8**(8): e1002857.
- Ivashkiv, L. B. and L. T. Donlin (2014). "Regulation of type I interferon responses." Nat Rev Immunol **14**(1): 36-49.
- Iwami, K. I., T. Matsuguchi, A. Masuda, T. Kikuchi, T. Musikachoen and Y. Yoshikai (2000). "Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling." J Immunol **165**(12): 6682-6686.
- Ji, Q., L. Castelli and J. M. Goverman (2013). "MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells." Nat Immunol **14**(3): 254-261.
- Jia, T., I. Leiner, G. Dorothee, K. Brandl and E. G. Pamer (2009). "MyD88 and Type I interferon receptor-mediated chemokine induction and monocyte recruitment during Listeria monocytogenes infection." J Immunol **183**(2): 1271-1278.
- Johnson, N. B., J. A. Posluszny, L. K. He, A. Szilagy, R. L. Gamelli, R. Shankar and K. Muthumalaiappan (2016). "Perturbed MafB/GATA1 axis after burn trauma bares the potential mechanism for immune suppression and anemia of critical illness." J Leukoc Biol **100**(4): 725-736.
- Joly, S., N. Ma, J. J. Sadler, D. R. Soll, S. L. Cassel and F. S. Sutterwala (2009). "Cutting edge: Candida albicans hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome." J Immunol **183**(6): 3578-3581.
- Kagan, J. C. and R. Medzhitov (2006). "Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling." Cell **125**(5): 943-955.
- Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira and R. Medzhitov (2008). "TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta." Nat Immunol **9**(4): 361-368.
- Kahn, J. M., T. Le, D. C. Angus, C. E. Cox, C. L. Hough, D. B. White, S. Yende, S. S. Carson and P. S. G. Investigators (2015). "The epidemiology of chronic critical illness in the United States*." Crit Care Med **43**(2): 282-287.
- Kanitakis, J., E. Morelon, P. Petruzzo, L. Badet and J. M. Dubernard (2011). "Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft." Exp Dermatol **20**(2): 145-146.
- Karaghiosoff, M., R. Steinborn, P. Kovarik, G. Kriegshauser, M. Baccharini, B. Donabauer, U. Reichart, T. Kolbe, C. Bogdan, T. Leanderson, D. Levy, T. Decker and M. Muller (2003). "Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock." Nat Immunol **4**(5): 471-477.

Bibliographie

- Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I. L. Weissman and M. G. Manz (2003). "Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo." *J Exp Med* **198**(2): 305-313.
- Kaukonen, K. M., M. Bailey, S. Suzuki, D. Pilcher and R. Bellomo (2014). "Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012." *JAMA* **311**(13): 1308-1316.
- Kawamura, S., N. Onai, F. Miya, T. Sato, T. Tsunoda, K. Kurabayashi, S. Yotsumoto, S. Kuroda, K. Takenaka, K. Akashi and T. Ohteki (2017). "Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs." *Immunity* **46**(5): 835-848 e834.
- Kayagaki, N., I. B. Stowe, B. L. Lee, K. O'Rourke, K. Anderson, S. Warming, T. Cuellar, B. Haley, M. Roose-Girma, Q. T. Phung, P. S. Liu, J. R. Lill, H. Li, J. Wu, S. Kummerfeld, J. Zhang, W. P. Lee, S. J. Snipas, G. S. Salvesen, L. X. Morris, L. Fitzgerald, Y. Zhang, E. M. Bertram, C. C. Goodnow and V. M. Dixit (2015). "Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling." *Nature* **526**(7575): 666-671.
- Kayagaki, N., S. Warming, M. Lamkanfi, L. Vande Walle, S. Louie, J. Dong, K. Newton, Y. Qu, J. Liu, S. Heldens, J. Zhang, W. P. Lee, M. Roose-Girma and V. M. Dixit (2011). "Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11." *Nature* **479**(7371): 117-121.
- Kayagaki, N., M. T. Wong, I. B. Stowe, S. R. Ramani, L. C. Gonzalez, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, J. Zhang, W. P. Lee, A. Muszyński, L. S. Forsberg, R. W. Carlson and V. M. Dixit (2013). "Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4." *Science* **341**(6151): 1246-1249.
- Kelly-Scumpia, K. M., P. O. Scumpia, M. J. Delano, J. S. Weinstein, A. G. Cuenca, J. L. Wynn and L. L. Moldawer (2010). "Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10." *J Exp Med* **207**(2): 319-326.
- Kim, C., Y. Sano, K. Todorova, B. A. Carlson, L. Arpa, A. Celada, T. Lawrence, K. Otsu, J. L. Brissette, J. S. Arthur and J. M. Park (2008). "The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression." *Nat Immunol* **9**(9): 1019-1027.
- King, I. L., M. A. Kroenke and B. M. Segal (2010). "GM-CSF-dependent, CD103+ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization." *J Exp Med* **207**(5): 953-961.
- Kingston, D., M. A. Schmid, N. Onai, A. Obata-Onai, D. Baumjohann and M. G. Manz (2009). "The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis." *Blood* **114**(4): 835-843.
- Kishore, U., R. Ghai, T. J. Greenhough, A. K. Shrive, D. M. Bonifati, M. G. Gadjeva, P. Waters, M. S. Kojouharova, T. Chakraborty and A. Agrawal (2004). "Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q." *Immunol Lett* **95**(2): 113-128.

Bibliographie

- Kobayashi, T., M. Ogawa, T. Sanada, H. Mimuro, M. Kim, H. Ashida, R. Akakura, M. Yoshida, M. Kawalec, J. M. Reichhart, T. Mizushima and C. Sasakawa (2013). "The Shigella OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection." Cell Host Microbe **13**(5): 570-583.
- Kuida, K., J. A. Lippke, G. Ku, M. W. Harding, D. J. Livingston, M. S. Su and R. A. Flavell (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme." Science **267**(5206): 2000-2003.
- Kushwah, R., J. Wu, J. R. Oliver, G. Jiang, J. Zhang, K. A. Siminovitch and J. Hu (2010). "Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg." Eur J Immunol **40**(4): 1022-1035.
- Laarman, A., F. Milder, J. van Strijp and S. Rooijackers (2010). "Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications." J Mol Med (Berl) **88**(2): 115-120.
- Lambris, J. D., D. Ricklin and B. V. Geisbrecht (2008). "Complement evasion by human pathogens." Nat Rev Microbiol **6**(2): 132-142.
- Langlet, C., S. Tamoutounour, S. Henri, H. Luche, L. Ardouin, C. Gregoire, B. Malissen and M. Guillems (2012). "CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization." J Immunol **188**(4): 1751-1760.
- Laoui, D., J. Keirse, Y. Morias, E. Van Overmeire, X. Geeraerts, Y. Elkrim, M. Kiss, E. Bolli, Q. Lahmar, D. Sichien, J. Serneels, C. L. Scott, L. Boon, P. De Baetselier, M. Mazzone, M. Guillems and J. A. Van Ginderachter (2016). "The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity." Nat Commun **7**: 13720.
- Latz, E., T. S. Xiao and A. Stutz (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." Nat Rev Immunol **13**(6): 397-411.
- Lauw, F. N., A. J. Simpson, C. E. Hack, J. M. Prins, A. M. Wolbink, S. J. van Deventer, W. Chaowagul, N. J. White and T. van Der Poll (2000). "Soluble granzymes are released during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria." J Infect Dis **182**(1): 206-213.
- Lee, J., G. Breton, T. Y. Oliveira, Y. J. Zhou, A. Aljoufi, S. Pühr, M. J. Cameron, R. P. Sekaly, M. C. Nussenzweig and K. Liu (2015). "Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow." J Exp Med **212**(3): 385-399.
- Lee, J., Y. J. Zhou, W. Ma, W. Zhang, A. Aljoufi, T. Luh, K. Lucero, D. Liang, M. Thomsen, G. Bhagat, Y. Shen and K. Liu (2017). "Lineage specification of human dendritic cells is marked by IRF8 expression in hematopoietic stem cells and multipotent progenitors." Nat Immunol.
- Leibovici, L. (2013). "Long-term consequences of severe infections." Clin Microbiol Infect **19**(6): 510-512.

Bibliographie

- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-983.
- Leon, B., M. Lopez-Bravo and C. Ardavin (2007). "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*." Immunity **26**(4): 519-531.
- Levy, D. E. (2002). "Whence interferon? Variety in the production of interferon in response to viral infection." J Exp Med **195**(4): F15-18.
- Lewis, K. L., M. L. Caton, M. Bogunovic, M. Greter, L. T. Grajkowska, D. Ng, A. Klinakis, I. F. Charo, S. Jung, J. L. Gommerman, Ivanov, II, K. Liu, M. Merad and B. Reizis (2011). "Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine." Immunity **35**(5): 780-791.
- Limaye, A. P., K. A. Kirby, G. D. Rubenfeld, W. M. Leisenring, E. M. Bulger, M. J. Neff, N. S. Gibran, M. L. Huang, T. K. Santo Hayes, L. Corey and M. Boeckh (2008). "Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients." JAMA **300**(4): 413-422.
- Linton, S. M. and B. P. Morgan (1999). "Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis." Mol Immunol **36**(13-14): 905-914.
- Liu, X., Z. Zhang, J. Ruan, Y. Pan, V. G. Magupalli, H. Wu and J. Lieberman (2016). "Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores." Nature **535**(7610): 153-158.
- Lu, A., V. G. Magupalli, J. Ruan, Q. Yin, M. K. Atianand, M. R. Vos, G. F. Schröder, K. A. Fitzgerald, H. Wu and E. H. Egelman (2014). "Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes." Cell **156**(6): 1193-1206.
- Luyt, C. E., A. Combes, C. Deback, M. H. Aubriot-Lorton, A. Nieszkowska, J. L. Trouillet, F. Capron, H. Agut, C. Gibert and J. Chastre (2007). "Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation." Am J Respir Crit Care Med **175**(9): 935-942.
- Ma, X., W. Y. Lin, Y. Chen, S. Stawicki, K. Mukhyala, Y. Wu, F. Martin, J. F. Bazan and M. A. s. Starovasnik (2012). "Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R." Structure **20**(4): 676-687.
- Maeshima, N. and R. C. Fernandez (2013). "Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex." Front Cell Infect Microbiol **3**: 3.
- Mahieu, T. and C. Libert (2007). "Should we inhibit type I interferons in sepsis?" Infect Immun **75**(1): 22-29.
- Man, S. M., R. Karki, M. Sasai, D. E. Place, S. Kesavardhana, J. Temirov, S. Frase, Q. Zhu, R. K. Malireddi, T. Kuriakose, J. L. Peters, G. Neale, S. A. Brown, M. Yamamoto and T. D. Kanneganti (2016). "IRGB10 Liberates Bacterial Ligands for Sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 Inflammasomes." Cell **167**(2): 382-396.e317.

Bibliographie

- Mandl, M., M. Drechsler, Y. Jansen, C. Neideck, H. Noels, A. Faussner, O. Soehnlein, C. Weber and Y. Doring (2015). "Evaluation of the BDCA2-DTR Transgenic Mouse Model in Chronic and Acute Inflammation." PLoS One **10**(8): e0134176.
- Manz, M. G. and S. Boettcher (2014). "Emergency granulopoiesis." Nat Rev Immunol **14**(5): 302-314.
- Manz, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman and K. Akashi (2001). "Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors." Blood **97**(11): 3333-3341.
- Mariathasan, S., D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack and V. M. Dixit (2006). "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP." Nature **440**(7081): 228-232.
- Markiewski, M. M., R. A. DeAngelis and J. D. Lambris (2008). "Complexity of complement activation in sepsis." J Cell Mol Med **12**(6A): 2245-2254.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). "Toll-like receptors in systemic autoimmune disease." Nat Rev Immunol **6**(11): 823-835.
- Marshall, J. C. (2014). "Why have clinical trials in sepsis failed?" Trends Mol Med **20**(4): 195-203.
- Martin, B. N., C. Wang, J. Willette-Brown, T. Herjan, M. F. Gulen, H. Zhou, K. Bulek, L. Franchi, T. Sato, E. S. Alnemri, G. Narla, X. P. Zhong, J. Thomas, D. Klinman, K. A. Fitzgerald, M. Karin, G. Nuñez, G. Dubyak, Y. Hu and X. Li (2014). "IKK α negatively regulates ASC-dependent inflammasome activation." Nat Commun **5**: 4977.
- Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000Prime Rep **6**: 13.
- Martinon, F., V. Pétrilli, A. Mayor, A. Tardivel and J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-241.
- Massberg, S., P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica, M. Kollnberger, N. Tubo, E. A. Moseman, I. V. Huff, T. Junt, A. J. Wagers, I. B. Mazo and U. H. von Andrian (2007). "Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues." Cell **131**(5): 994-1008.
- Masters, S. L., M. Gerlic, D. Metcalf, S. Preston, M. Pellegrini, J. A. O'Donnell, K. McArthur, T. M. Baldwin, S. Chevrier, C. J. Nowell, L. H. Cengia, K. J. Henley, J. E. Collinge, D. L. Kastner, L. Feigenbaum, D. J. Hilton, W. S. Alexander, B. T. Kile and B. A. Croker (2012). "NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells." Immunity **37**(6): 1009-1023.
- Mayor, A., F. Martinon, T. De Smedt, V. Pétrilli and J. Tschopp (2007). "A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses." Nat Immunol **8**(5): 497-503.
- McCartney-Francis, N., W. Jin and S. M. Wahl (2004). "Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway." J Immunol **172**(6): 3814-3821.

Bibliographie

McGettrick, A. F., E. K. Brint, E. M. Palsson-McDermott, D. C. Rowe, D. T. Golenbock, N. J. Gay, K. A. Fitzgerald and L. A. O'Neill (2006). "Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC $\{\epsilon\}$ during Toll-like receptor 4 signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24): 9196-9201.

McNab, F. W., J. Ewbank, R. Rajsbaum, E. Stavropoulos, A. Martirosyan, P. S. Redford, X. Wu, C. M. Graham, M. Saraiva, P. Tschlis, D. Chaussabel, S. C. Ley and A. O'Garra (2013). "TPL-2-ERK1/2 signaling promotes host resistance against intracellular bacterial infection by negative regulation of type I IFN production." *J Immunol* **191**(4): 1732-1743.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* **388**(6640): 394-397.

Meersseman, W., S. J. Vandecasteele, A. Wilmer, E. Verbeken, W. E. Peetermans and E. Van Wijngaerden (2004). "Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(6): 621-625.

Menezes, S., D. Melandri, G. Anselmi, T. Perchet, J. Loschko, J. Dubrot, R. Patel, E. L. Gautier, S. Hugues, M. P. Longhi, J. Y. Henry, S. A. Quezada, G. Lauvau, A. M. Lennon-Dumenil, E. Gutierrez-Martinez, A. Bessis, E. Gomez-Perdiguero, C. E. Jacome-Galarza, H. Garner, F. Geissmann, R. Golub, M. C. Nussenzweig and P. Guermonprez (2016). "The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS+ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Immunity* **45**(6): 1205-1218.

Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster and E. G. Engleman (2002). "Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions." *Nat Immunol* **3**(12): 1135-1141.

Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller and A. Mortha (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting." *Annu Rev Immunol* **31**: 563-604.

Meredith, M. M., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, A. O. Kamphorst, H. A. Schreiber, P. Guermonprez, J. Idoyaga, C. Cheong, K. H. Yao, R. E. Niec and M. C. Nussenzweig (2012). "Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage." *J Exp Med* **209**(6): 1153-1165.

Merle, N. S., S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi and L. T. Roumenina (2015). "Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation." *Front Immunol* **6**: 262.

Metkar, S. S., C. Menea, J. Pardo, B. Wang, R. Wallich, M. Freudenberg, S. Kim, S. M. Raja, L. Shi, M. M. Simon and C. J. Froelich (2008). "Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response." *Immunity* **29**(5): 720-733.

Meunier, E., M. S. Dick, R. F. Dreier, N. Schürmann, D. Kenzelmann Broz, S. Warming, M. Roose-Girma, D. Bumann, N. Kayagaki, K. Takeda, M. Yamamoto and P. Broz (2014). "Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases." *Nature* **509**(7500): 366-370.

Monneret, G., M. E. Finck, F. Venet, A. L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu and A. Lepape (2004). "The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low

Bibliographie

monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration." *Immunol Lett* **95**(2): 193-198.

Montminy, S. W., N. Khan, S. McGrath, M. J. Walkowicz, F. Sharp, J. E. Conlon, K. Fukase, S. Kusumoto, C. Sweet, K. Miyake, S. Akira, R. J. Cotter, J. D. Goguen and E. Lien (2006). "Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response." *Nat Immunol* **7**(10): 1066-1073.

Motyka, B., G. Korbitt, M. J. Pinkoski, J. A. Heibin, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C. F. Holmes, J. Gaudie and R. C. Bleackley (2000). "Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis." *Cell* **103**(3): 491-500.

Muller, U., U. Steinhoff, L. F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel and M. Aguet (1994). "Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense." *Science* **264**(5167): 1918-1921.

Müller-Eberhard, H. J. (1985). "The killer molecule of complement." *J Invest Dermatol* **85**(1 Suppl): 47s-52s.

Muñoz-Planillo, R., P. Kuffa, G. Martínez-Colón, B. L. Smith, T. M. Rajendiran and G. Núñez (2013). "K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter." *Immunity* **38**(6): 1142-1153.

Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." *Nat Rev Immunol* **11**(11): 723-737.

Nagai, Y., K. P. Garrett, S. Ohta, U. Bahrun, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu and P. W. Kincade (2006). "Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment." *Immunity* **24**(6): 801-812.

Naik, S. H., D. Metcalf, A. van Nieuwenhuijze, I. Wicks, L. Wu, M. O'Keeffe and K. Shortman (2006). "Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes." *Nat Immunol* **7**(6): 663-671.

Naik, S. H., L. Perie, E. Swart, C. Gerlach, N. van Rooij, R. J. de Boer and T. N. Schumacher (2013). "Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors." *Nature* **496**(7444): 229-232.

Naik, S. H., A. I. Proietto, N. S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M. H. Lahoud, M. O'Keeffe, Q. X. Shao, W. F. Chen, J. A. Villadangos, K. Shortman and L. Wu (2005). "Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures." *J Immunol* **174**(11): 6592-6597.

Naik, S. H., P. Sathe, H. Y. Park, D. Metcalf, A. I. Proietto, A. Dakic, S. Carotta, M. O'Keeffe, M. Bahlo, A. Papenfuss, J. Y. Kwak, L. Wu and K. Shortman (2007). "Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo." *Nat Immunol* **8**(11): 1217-1226.

Naiki, Y., K. S. Michelsen, W. Zhang, S. Chen, T. M. Doherty and M. Arditì (2005). "Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM-

Bibliographie

and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling." *J Biol Chem* **280**(7): 5491-5495.

Naito, M., G. Hasegawa and K. Takahashi (1997). "Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells." *Microsc Res Tech* **39**(4): 350-364.

Nakahira, K., J. A. Haspel, V. A. Rathinam, S. J. Lee, T. Dolinay, H. C. Lam, J. A. Englert, M. Rabinovitch, M. Cernadas, H. P. Kim, K. A. Fitzgerald, S. W. Ryter and A. M. Choi (2011). "Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome." *Nat Immunol* **12**(3): 222-230.

Napier, B. A., S. W. Brubaker, T. E. Sweeney, P. Monette, G. H. Rothmeier, N. A. Gertsvolf, A. Puschnik, J. E. Carette, P. Khatri and D. M. Monack (2016). "Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity." *J Exp Med* **213**(11): 2365-2382.

Nemzek, J. A., K. M. Hugunin and M. R. Opp (2008). "Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being." *Comp Med* **58**(2): 120-128.

Netea, M. G., F. L. van de Veerdonk, J. W. van der Meer, C. A. Dinarello and L. A. Joosten (2015). "Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines." *Annu Rev Immunol* **33**: 49-77.

Newton, K. and V. M. Dixit (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(3).

Nierkens, S., J. Tel, E. Janssen and G. J. Adema (2013). "Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants?" *Trends Immunol* **34**(8): 361-370.

Nilsson, B. and K. Nilsson Ekdahl (2012). "The tick-over theory revisited: is C3 a contact-activated protein?" *Immunobiology* **217**(11): 1106-1110.

Nussenzweig, M. C. and R. M. Steinman (1980). "Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction." *J Exp Med* **151**(5): 1196-1212.

O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **7**(5): 353-364.

Okusawa, S., J. A. Gelfand, T. Ikejima, R. J. Connolly and C. A. Dinarello (1988). "Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition." *J Clin Invest* **81**(4): 1162-1172.

Omoto, Y., K. Yamanaka, K. Tokime, S. Kitano, M. Kakeda, T. Akeda, I. Kurokawa, E. C. Gabazza, H. Tsutsui, N. Katayama, K. Yamanishi, K. Nakanishi and H. Mizutani (2010). "Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme." *J Dermatol Sci* **59**(2): 129-135.

Onai, N., K. Kurabayashi, M. Hosoi-Amaike, N. Toyama-Sorimachi, K. Matsushima, K. Inaba and T. Ohteki (2013). "A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential." *Immunity* **38**(5): 943-957.

Bibliographie

- Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid and M. G. Manz (2007). "Flt3 in regulation of type I interferon-producing cell and dendritic cell development." *Ann N Y Acad Sci* **1106**: 253-261.
- Onai, N., A. Obata-Onai, M. A. Schmid, T. Ohteki, D. Jarrossay and M. G. Manz (2007). "Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow." *Nat Immunol* **8**(11): 1207-1216.
- Onai, N., A. Obata-Onai, R. Tussiwand, A. Lanzavecchia and M. G. Manz (2006). "Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development." *J Exp Med* **203**(1): 227-238.
- Orford, K. W. and D. T. Scadden (2008). "Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation." *Nat Rev Genet* **9**(2): 115-128.
- Orkin, S. H. and L. I. Zon (2008). "Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology." *Cell* **132**(4): 631-644.
- Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska and J. E. Dixon (1999). "Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector." *Science* **285**(5435): 1920-1923.
- Orth, K., Z. Xu, M. B. Mudgett, Z. Q. Bao, L. E. Palmer, J. B. Bliska, W. F. Mangel, B. Staskawicz and J. E. Dixon (2000). "Disruption of signaling by Yersinia effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease." *Science* **290**(5496): 1594-1597.
- Paciello, I., A. Silipo, L. Lembo-Fazio, L. Curcurù, A. Zumsteg, G. Noël, V. Ciancarella, L. Sturiale, A. Molinaro and M. L. Bernardini (2013). "Intracellular Shigella remodels its LPS to dampen the innate immune recognition and evade inflammasome activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(46): E4345-4354.
- Panda, S. K., R. Kolbeck and M. A. Sanjuan (2016). "Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity." *Curr Opin Immunol* **44**: 20-25.
- Pasquevich, K. A., K. Bieber, M. Gunter, M. Grauer, O. Potz, U. Schleicher, T. Biedermann, S. Beer-Hammer, H. J. Buhning, H. G. Rammensee, L. Zender, I. B. Autenrieth, C. Lengerke and S. E. Autenrieth (2015). "Innate immune system favors emergency monopoiesis at the expense of DC-differentiation to control systemic bacterial infection in mice." *Eur J Immunol* **45**(10): 2821-2833.
- Passegue, E., A. J. Wagers, S. Giuriato, W. C. Anderson and I. L. Weissman (2005). "Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates." *J Exp Med* **202**(11): 1599-1611.
- Pastille, E., S. Didovic, D. Brauckmann, M. Rani, H. Agrawal, F. U. Schade, Y. Zhang and S. B. Flohé (2011). "Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis." *J Immunol* **186**(2): 977-986.
- Patel, S. K. and J. M. Janjic (2015). "Macrophage targeted theranostics as personalized nanomedicine strategies for inflammatory diseases." *Theranostics* **5**(2): 150-172.
- Paul, F., Y. Arkin, A. Giladi, D. A. Jaitin, E. Kenigsberg, H. Keren-Shaul, D. Winter, D. Lara-Astiaso, M. Gury, A. Weiner, E. David, N. Cohen, F. K. Lauridsen, S. Haas, A.

Bibliographie

Schlitzer, A. Mildner, F. Ginhoux, S. Jung, A. Trumpp, B. T. Porse, A. Tanay and I. Amit (2015). "Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors." Cell **163**(7): 1663-1677.

Peck-Palmer, O. M., J. Unsinger, K. C. Chang, J. S. McDonough, H. Perlman, J. E. McDunn and R. S. Hotchkiss (2009). "Modulation of the Bcl-2 family blocks sepsis-induced depletion of dendritic cells and macrophages." Shock **31**(4): 359-366.

Pedraza-Alva, G., L. Pérez-Martínez, L. Valdez-Hernández, K. F. Meza-Sosa and M. Ando-Kuri (2015). "Negative regulation of the inflammasome: keeping inflammation under control." Immunol Rev **265**(1): 231-257.

Pene, F., E. Courtine, F. Ouaz, B. Zuber, B. Sauneuf, G. Sirgo, C. Rousseau, J. Toubiana, V. Balloy, M. Chignard, J. P. Mira and J. D. Chiche (2009). "Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells." Infect Immun **77**(12): 5651-5658.

Pene, F., B. Zuber, E. Courtine, C. Rousseau, F. Ouaz, J. Toubiana, A. Tazi, J. P. Mira and J. D. Chiche (2008). "Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction." J Immunol **181**(12): 8513-8520.

Persson, E. K., H. Uronen-Hansson, M. Semmrich, A. Rivollier, K. Hagerbrand, J. Marsal, S. Gudjonsson, U. Hakansson, B. Reizis, K. Kotarsky and W. W. Agace (2013). "IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation." Immunity **38**(5): 958-969.

Pétrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon and J. Tschopp (2007). "Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration." Cell Death Differ **14**(9): 1583-1589.

Pinheiro da Silva, F. and V. Nizet (2009). "Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection." Apoptosis **14**(4): 509-521.

Pixley, F. J. and E. R. Stanley (2004). "CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action." Trends Cell Biol **14**(11): 628-638.

Plantinga, M., M. Guilliams, M. Vanheerswyngheles, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad and B. N. Lambrecht (2013). "Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen." Immunity **38**(2): 322-335.

Poehlmann, H., J. C. Schefold, H. Zuckermann-Becker, H. D. Volk and C. Meisel (2009). "Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis." Crit Care **13**(4): R119.

Pogue, S. L., B. T. Preston, J. Stalder, C. R. Bebbington and P. M. Cardarelli (2004). "The receptor for type I IFNs is highly expressed on peripheral blood B cells and monocytes and mediates a distinct profile of differentiation and activation of these cells." J Interferon Cytokine Res **24**(2): 131-139.

Bibliographie

- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-2088.
- Porta, C., M. Rimoldi, G. Raes, L. Brys, P. Ghezzi, D. Di Liberto, F. Dieli, S. Ghisletti, G. Natoli, P. De Baetselier, A. Mantovani and A. Sica (2009). "Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(35): 14978-14983.
- Potempa, J. and R. N. Pike (2009). "Corruption of innate immunity by bacterial proteases." J Innate Immun **1**(2): 70-87.
- Poulin, L. F., Y. Reyat, H. Uronen-Hansson, B. U. Schraml, D. Sancho, K. M. Murphy, U. K. Hakansson, L. F. Moita, W. W. Agace, D. Bonnet and C. Reis e Sousa (2012). "DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues." Blood **119**(25): 6052-6062.
- Poulin, L. F., M. Salio, E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, L. Craciun, J. L. Chen, A. M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, A. Le Moine, F. Faure, V. Donckier, D. Sancho, V. Cerundolo, D. Bonnet and C. Reis e Sousa (2010). "Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells." J Exp Med **207**(6): 1261-1271.
- Prakash, A., E. Smith, C. K. Lee and D. E. Levy (2005). "Tissue-specific positive feedback requirements for production of type I interferon following virus infection." J Biol Chem **280**(19): 18651-18657.
- Qian, L., D. Xiang, J. Zhang, S. Zhu, J. Gao, X. Wang, J. Gao, Y. Zhang, J. Shen, Y. Yu, W. Han and M. Wu (2013). "Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist reduces acute lethal toxicity and protects hematopoiesis from chemotoxicity in vivo." Biomed Pharmacother **67**(2): 108-115.
- Qureshi, S. T., L. Larivière, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros and D. Malo (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." J Exp Med **189**(4): 615-625.
- Rathinam, V. A., S. K. Vanaja, L. Waggoner, A. Sokolovska, C. Becker, L. M. Stuart, J. M. Leong and K. A. Fitzgerald (2012). "TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria." Cell **150**(3): 606-619.
- Rawal, N., R. Rajagopalan and V. P. Salvi (2008). "Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical pathway of complement." J Biol Chem **283**(12): 7853-7863.
- Rehli, M. (2002). "Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression." Trends Immunol **23**(8): 375-378.
- Reizis, B., A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis and V. Sisirak (2011). "Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions." Annu Rev Immunol **29**: 163-183.

Bibliographie

- Remick, D. G., D. R. Call, S. J. Ebong, D. E. Newcomb, P. Nybom, J. A. Nemzek and G. E. Bolgos (2001). "Combination immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1 receptor antagonist decreases sepsis mortality." *Crit Care Med* **29**(3): 473-481.
- Rittirsch, D., M. A. Flierl, B. A. Nadeau, D. E. Day, M. Huber-Lang, C. R. Mackay, F. S. Zetoune, N. P. Gerard, K. Cianflone, J. Köhl, C. Gerard, J. V. Sarma and P. A. Ward (2008). "Functional roles for C5a receptors in sepsis." *Nat Med* **14**(5): 551-557.
- Robbins, S. H., T. Walzer, D. Dembele, C. Thibault, A. Defays, G. Bessou, H. Xu, E. Vivier, M. Sellars, P. Pierre, F. R. Sharp, S. Chan, P. Kastner and M. Dalod (2008). "Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling." *Genome Biol* **9**(1): R17.
- Rodríguez de Córdoba, S., J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa and P. Sánchez-Corral (2004). "The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations." *Mol Immunol* **41**(4): 355-367.
- Roumenina, L. T., K. T. Popov, S. V. Bureeva, M. Kojouharova, M. Gadjeva, S. Rabheru, R. Thakrar, A. Kaplun and U. Kishore (2008). "Interaction of the globular domain of human C1q with Salmonella typhimurium lipopolysaccharide." *Biochim Biophys Acta* **1784**(9): 1271-1276.
- Samarajiwa, S. A., N. E. Mangan, M. P. Hardy, M. Najdovska, D. Dubach, S. J. Braniff, C. M. Owczarek and P. J. Hertzog (2014). "Soluble IFN receptor potentiates in vivo type I IFN signaling and exacerbates TLR4-mediated septic shock." *J Immunol* **192**(9): 4425-4435.
- Sancho, D., O. P. Joffre, A. M. Keller, N. C. Rogers, D. Martinez, P. Hernanz-Falcon, I. Rosewell and C. Reis e Sousa (2009). "Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity." *Nature* **458**(7240): 899-903.
- Sarrazin, S., N. Mossadegh-Keller, T. Fukao, A. Aziz, F. Mourcin, L. Vanhille, L. Kelly Modis, P. Kastner, S. Chan, E. Duprez, C. Otto and M. H. Sieweke (2009). "MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells." *Cell* **138**(2): 300-313.
- Sathe, P., J. Pooley, D. Vremec, J. Mintern, J. O. Jin, L. Wu, J. Y. Kwak, J. A. Villadangos and K. Shortman (2011). "The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells." *J Immunol* **186**(9): 5184-5192.
- Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda and S. Akira (2003). "Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling." *J Immunol* **171**(8): 4304-4310.
- Satpathy, A. T., W. Kc, J. C. Albring, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, D. Bhattacharya, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2012). "Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages." *J Exp Med* **209**(6): 1135-1152.
- Satpathy, A. T., X. Wu, J. C. Albring and K. M. Murphy (2012). "Re(de)fining the dendritic cell lineage." *Nat Immunol* **13**(12): 1145-1154.

Bibliographie

Scanga, C. A., J. Aliberti, D. Jankovic, F. Tilloy, S. Bennouna, E. Y. Denkers, R. Medzhitov and A. Sher (2002). "Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells." J Immunol **168**(12): 5997-6001.

Schlitzer, A., N. McGovern, P. Teo, T. Zelante, K. Atarashi, D. Low, A. W. Ho, P. See, A. Shin, P. S. Wasan, G. Hoeffel, B. Malleret, A. Heiseke, S. Chew, L. Jardine, H. A. Purvis, C. M. Hilkens, J. Tam, M. Poidinger, E. R. Stanley, A. B. Krug, L. Renia, B. Sivasankar, L. G. Ng, M. Collin, P. Ricciardi-Castagnoli, K. Honda, M. Haniffa and F. Ginhoux (2013). "IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses." Immunity **38**(5): 970-983.

Schlitzer, A., V. Sivakamasundari, J. Chen, H. R. Sumatoh, J. Schreuder, J. Lum, B. Malleret, S. Zhang, A. Larbi, F. Zolezzi, L. Renia, M. Poidinger, S. Naik, E. W. Newell, P. Robson and F. Ginhoux (2015). "Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow." Nat Immunol **16**(7): 718-728.

Schmid, M. A., D. Kingston, S. Boddupalli and M. G. Manz (2010). "Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment." Immunol Rev **234**(1): 32-44.

Schmid, M. A., H. Takizawa, D. R. Baumjohann, Y. Saito and M. G. Manz (2011). "Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes." Blood **118**(18): 4829-4840.

Schmid-Burgk, J. L., D. Chauhan, T. Schmidt, T. S. Ebert, J. Reinhardt, E. Endl and V. Hornung (2016). "A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation." J Biol Chem **291**(1): 103-109.

Schneider, M. C., B. E. Prosser, J. J. Caesar, E. Kugelberg, S. Li, Q. Zhang, S. Quoraishi, J. E. Lovett, J. E. Deane, R. B. Sim, P. Roversi, S. Johnson, C. M. Tang and S. M. Lea (2009). "Neisseria meningitidis recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates." Nature **458**(7240): 890-893.

Schroder, K., R. Zhou and J. Tschopp (2010). "The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?" Science **327**(5963): 296-300.

Schuettpelz, L. G. and D. C. Link (2013). "Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation." Front Immunol **4**: 204.

Schulz, C., E. Gomez Perdiguero, L. Chorro, H. Szabo-Rogers, N. Cagnard, K. Kierdorf, M. Prinz, B. Wu, S. E. Jacobsen, J. W. Pollard, J. Frampton, K. J. Liu and F. Geissmann (2012). "A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells." Science **336**(6077): 86-90.

Schwabe, M., A. M. Hartert, H. Bertz and J. Finke (2004). "Treatment with granulocyte colony-stimulating factor increases interleukin-1 receptor antagonist levels during engraftment following allogeneic stem-cell transplantation." Eur J Clin Invest **34**(11): 759-765.

Bibliographie

See, P., C. A. Dutertre, J. Chen, P. Gunther, N. McGovern, S. E. Irac, M. Gunawan, M. Beyer, K. Handler, K. Duan, H. R. B. Sumatoh, N. Ruffin, M. Jouve, E. Gea-Mallorqui, R. C. M. Hennekam, T. Lim, C. C. Yip, M. Wen, B. Malleret, I. Low, N. B. Shadan, C. F. S. Fen, A. Tay, J. Lum, F. Zolezzi, A. Larbi, M. Poidinger, J. K. Y. Chan, Q. Chen, L. Renia, M. Haniffa, P. Benaroch, A. Schlitzer, J. L. Schultze, E. W. Newell and F. Ginhoux (2017). "Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques." Science.

See, P., C. A. Dutertre, J. Chen, P. Gunther, N. McGovern, S. E. Irac, M. Gunawan, M. Beyer, K. Handler, K. Duan, H. R. B. Sumatoh, N. Ruffin, M. Jouve, E. Gea-Mallorqui, R. C. M. Hennekam, T. Lim, C. C. Yip, M. Wen, B. Malleret, I. Low, N. B. Shadan, C. F. S. Fen, A. Tay, J. Lum, F. Zolezzi, A. Larbi, M. Poidinger, J. K. Y. Chan, Q. Chen, L. Renia, M. Haniffa, P. Benaroch, A. Schlitzer, J. L. Schultze, E. W. Newell and F. Ginhoux (2017). "Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques." Science **356**(6342).

Segura, E., A. L. Albiston, I. P. Wicks, S. Y. Chai and J. A. Villadangos (2009). "Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20377-20381.

Segura, E. and S. Amigorena (2013). "Inflammatory dendritic cells in mice and humans." Trends Immunol **34**(9): 440-445.

Segura, E., M. Durand and S. Amigorena (2013). "Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells." J Exp Med **210**(5): 1035-1047.

Segura, E., M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiocchia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis and S. Amigorena (2013). "Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation." Immunity **38**(2): 336-348.

Seok, J., H. S. Warren, A. G. Cuenca, M. N. Mindrinos, H. V. Baker, W. Xu, D. R. Richards, G. P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C. C. Finnerty, C. M. López, S. Honari, E. E. Moore, J. P. Minei, J. Cuschieri, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, M. G. Jeschke, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S. E. Calvano, P. H. Mason, J. P. Cobb, L. G. Rahme, S. F. Lowry, R. V. Maier, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, R. W. Davis, W. Xiao, R. G. Tompkins and L. r. S. C. R. P. Inflammation and Host Response to Injury (2013). "Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(9): 3507-3512.

Serbina, N. V., T. M. Hohl, M. Cherny and E. G. Pamer (2009). "Selective expansion of the monocytic lineage directed by bacterial infection." J Immunol **183**(3): 1900-1910.

Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl and E. G. Pamer (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." Annu Rev Immunol **26**: 421-452.

Serbina, N. V. and E. G. Pamer (2006). "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2." Nat Immunol **7**(3): 311-317.

Bibliographie

Serna, M., J. L. Giles, B. P. Morgan and D. Bubeck (2016). "Structural basis of complement membrane attack complex formation." *Nat Commun* **7**: 10587.

Seymour, C. W., V. X. Liu, T. J. Iwashyna, F. M. Brunkhorst, T. D. Rea, A. Scherag, G. Rubenfeld, J. M. Kahn, M. Shankar-Hari, M. Singer, C. S. Deutschman, G. J. Escobar and D. C. Angus (2016). "Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." *JAMA* **315**(8): 762-774.

Shakoory, B., J. A. Carcillo, W. W. Chatham, R. L. Amdur, H. Zhao, C. A. Dinarello, R. Q. Cron and S. M. Opal (2016). "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* **44**(2): 275-281.

Shalova, I. N., J. Y. Lim, M. Chittechath, A. S. Zinkernagel, F. Beasley, E. Hernandez-Jimenez, V. Toledano, C. Cubillos-Zapata, A. Rapisarda, J. Chen, K. Duan, H. Yang, M. Poidinger, G. Melillo, V. Nizet, F. Arnalich, E. Lopez-Collazo and S. K. Biswas (2015). "Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1alpha." *Immunity* **42**(3): 484-498.

Shankar-Hari, M., G. S. Phillips, M. L. Levy, C. W. Seymour, V. X. Liu, C. S. Deutschman, D. C. Angus, G. D. Rubenfeld, M. Singer and F. Sepsis Definitions Task (2016). "Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." *JAMA* **315**(8): 775-787.

Shi, C. and E. G. Pamer (2011). "Monocyte recruitment during infection and inflammation." *Nat Rev Immunol* **11**(11): 762-774.

Shi, H., Y. Wang, X. Li, X. Zhan, M. Tang, M. Fina, L. Su, D. Pratt, C. H. Bu, S. Hildebrand, S. Lyon, L. Scott, J. Quan, Q. Sun, J. Russell, S. Arnett, P. Jurek, D. Chen, V. V. Kravchenko, J. C. Mathison, E. M. Moresco, N. L. Monson, R. J. Ulevitch and B. Beutler (2016). "NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component." *Nat Immunol* **17**(3): 250-258.

Shi, J., W. Gao and F. Shao (2017). "Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death." *Trends Biochem Sci* **42**(4): 245-254.

Shi, J., Y. Zhao, K. Wang, X. Shi, Y. Wang, H. Huang, Y. Zhuang, T. Cai, F. Wang and F. Shao (2015). "Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death." *Nature* **526**(7575): 660-665.

Shi, J., Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, J. Ding, P. Li, L. Hu and F. Shao (2014). "Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS." *Nature* **514**(7521): 187-192.

Shi, L., S. Mai, S. Israels, K. Browne, J. A. Trapani and A. H. Greenberg (1997). "Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization." *J Exp Med* **185**(5): 855-866.

Shimada, K., T. R. Crother, J. Karlin, J. Dagvadorj, N. Chiba, S. Chen, V. K. Ramanujan, A. J. Wolf, L. Vergnes, D. M. Ojcius, A. Rentsendorj, M. Vargas, C. Guerrero, Y. Wang, K. A. Fitzgerald, D. M. Underhill, T. Town and M. Arditi (2012). "Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis." *Immunity* **36**(3): 401-414.

Bibliographie

Siddiqui, K. R., S. Laffont and F. Powrie (2010). "E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis." *Immunity* **32**(4): 557-567.

Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent and D. C. Angus (2016). "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." *JAMA* **315**(8): 801-810.

Sioud, M. and Y. Floisand (2007). "TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitors into CD11c+ CD80/86+ DC capable of inducing a Th1-type response." *Eur J Immunol* **37**(10): 2834-2846.

Sioud, M., Y. Floisand, L. Forfang and F. Lund-Johansen (2006). "Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage." *J Mol Biol* **364**(5): 945-954.

Smith, J. N., V. S. Kanwar and K. C. MacNamara (2016). "Hematopoietic Stem Cell Regulation by Type I and II Interferons in the Pathogenesis of Acquired Aplastic Anemia." *Front Immunol* **7**: 330.

Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* **137**(5): 1142-1162.

Storch, M. K., S. Piddlesden, M. Haltia, M. Iivanainen, P. Morgan and H. Lassmann (1998). "Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination." *Ann Neurol* **43**(4): 465-471.

Strother, R. K., D. B. Danahy, D. I. Kotov, T. A. Kucaba, Z. R. Zacharias, T. S. Griffith, K. L. Legge and V. P. Badovinac (2016). "Polymicrobial Sepsis Diminishes Dendritic Cell Numbers and Function Directly Contributing to Impaired Primary CD8 T Cell Responses In Vivo." *J Immunol* **197**(11): 4301-4311.

Sun, C. M., J. A. Hall, R. B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J. R. Mora and Y. Belkaid (2007). "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid." *J Exp Med* **204**(8): 1775-1785.

Sung, S. S., S. M. Fu, C. E. Rose, Jr., F. Gaskin, S. T. Ju and S. R. Beaty (2006). "A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins." *J Immunol* **176**(4): 2161-2172.

Suzuki, A., T. Takahashi, Y. Okuno, R. Tsuyuoka, M. Fukumoto, K. Nakamura and H. Imura (1992). "IL-1 production as a regulator of G-CSF and IL-6 production in CSF-producing cell lines." *Br J Cancer* **65**(4): 515-518.

Taylor, P., T. Tamura, H. C. Morse, 3rd and K. Ozato (2008). "The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse." *Blood* **111**(4): 1942-1945.

Bibliographie

Takahashi, K., M. Naito and M. Takeya (1996). "Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways." *Pathol Int* **46**(7): 473-485.

Takao, K. and T. Miyakawa (2015). "Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(4): 1167-1172.

Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* **11**(4): 443-451.

Tamoutounour, S., M. Guillemins, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen and S. Henri (2013). "Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin." *Immunity* **39**(5): 925-938.

Tamoutounour, S., S. Henri, H. Lelouard, B. de Bovis, C. de Haar, C. J. van der Woude, A. M. Woltman, Y. Reyat, D. Bonnet, D. Sichien, C. C. Bain, A. M. Mowat, C. Reis e Sousa, L. F. Poulin, B. Malissen and M. Guillemins (2012). "CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis." *Eur J Immunol* **42**(12): 3150-3166.

Tewari, A., W. C. Buhles and H. F. Starnes (1990). "Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts." *Lancet* **336**(8717): 712-714.

Tinsley, K. W., M. H. Grayson, P. E. Swanson, A. M. Drewry, K. C. Chang, I. E. Karl and R. S. Hotchkiss (2003). "Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells." *J Immunol* **171**(2): 909-914.

Tracey, K. J., B. Beutler, S. F. Lowry, J. Merryweather, S. Wolpe, I. W. Milsark, R. J. Hariri, T. J. Fahey, A. Zentella and J. D. Albert (1986). "Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin." *Science* **234**(4775): 470-474.

Tracey, K. J., Y. Fong, D. G. Hesse, K. R. Manogue, A. T. Lee, G. C. Kuo, S. F. Lowry and A. Cerami (1987). "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia." *Nature* **330**(6149): 662-664.

van Dissel, J. T., P. van Langevelde, R. G. Westendorp, K. Kwappenberg and M. Frölich (1998). "Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients." *Lancet* **351**(9107): 950-953.

Vanaja, S. K., A. J. Russo, B. Behl, I. Banerjee, M. Yankova, S. D. Deshmukh and V. A. Rathinam (2016). "Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation." *Cell* **165**(5): 1106-1119.

Vanden Berghe, T., P. Hulpiau, L. Martens, R. E. Vandenbroucke, E. Van Wonterghem, S. W. Perry, I. Bruggeman, T. Divert, S. M. Choi, M. Vuylsteke, V. I. Shestopalov, C. Libert and P. Vandenabeele (2015). "Passenger Mutations Confound Interpretation of All Genetically Modified Congenic Mice." *Immunity* **43**(1): 200-209.

Villani, A. C., R. Satija, G. Reynolds, S. Sarkizova, K. Shekhar, J. Fletcher, M. Griesbeck, A. Butler, S. Zheng, S. Lazo, L. Jardine, D. Dixon, E. Stephenson, E. Nilsson, I. Grundberg, D.

Bibliographie

McDonald, A. Filby, W. Li, P. L. De Jager, O. Rozenblatt-Rosen, A. A. Lane, M. Haniffa, A. Regev and N. Hacohen (2017). "Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors." Science **356**(6335).

von Moltke, J., J. S. Ayres, E. M. Kofoed, J. Chavarría-Smith and R. E. Vance (2013). "Recognition of bacteria by inflammasomes." Annu Rev Immunol **31**: 73-106.

Vremec, D., G. J. Lieschke, A. R. Dunn, L. Robb, D. Metcalf and K. Shortman (1997). "The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs." Eur J Immunol **27**(1): 40-44.

Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. J. Saunders, C. F. Ardavin, L. Wu and K. Shortman (1992). "The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells." J Exp Med **176**(1): 47-58.

Wallis, R., D. A. Mitchell, R. Schmid, W. J. Schwaeble and A. H. Keeble (2010). "Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation." Immunobiology **215**(1): 1-11.

Wang, N., H. Liang and K. Zen (2014). "Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance." Front Immunol **5**: 614.

Watanabe, N., Y. Suzuki, S. Inokuchi and S. Inoue (2016). "Sepsis induces incomplete M2 phenotype polarization in peritoneal exudate cells in mice." J Intensive Care **4**: 6.

Weber, G. F., B. G. Chousterman, S. He, A. M. Fenn, M. Nairz, A. Anzai, T. Brenner, F. Uhle, Y. Iwamoto, C. S. Robbins, L. Noiret, S. L. Maier, T. Zonnchen, N. N. Rahbari, S. Scholch, A. Klotzsche-von Ameln, T. Chavakis, J. Weitz, S. Hofer, M. A. Weigand, M. Nahrendorf, R. Weissleder and F. K. Swirski (2015). "Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis." Science **347**(6227): 1260-1265.

Welner, R. S., R. Pelayo, Y. Nagai, K. P. Garrett, T. R. Wuest, D. J. Carr, L. A. Borghesi, M. A. Farrar and P. W. Kincade (2008). "Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection." Blood **112**(9): 3753-3761.

Wen, H., Y. Dou, C. M. Hogaboam and S. L. Kunkel (2008). "Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response." Blood **111**(4): 1797-1804.

Wen, H., C. M. Hogaboam, J. Gauldie and S. L. Kunkel (2006). "Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile." Am J Pathol **168**(6): 1940-1950.

Wensink, A. C., V. Kemp, J. Fermie, M. I. Garcia Laorden, T. van der Poll, C. E. Hack and N. Bovenschen (2014). "Granzyme K synergistically potentiates LPS-induced cytokine responses in human monocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(16): 5974-5979.

Werner, S. L., D. Barken and A. Hoffmann (2005). "Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity." Science **309**(5742): 1857-1861.

Bibliographie

Wichterman, K. A., A. E. Baue and I. H. Chaudry (1980). "Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal." J Surg Res **29**(2): 189-201.

Williams, J. W., M. Y. Tjota, B. S. Clay, B. Vander Lugt, H. S. Bandukwala, C. L. Hrusch, D. C. Decker, K. M. Blaine, B. R. Fixsen, H. Singh, R. Sciammas and A. I. Sperling (2013). "Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation." Nat Commun **4**: 2990.

Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nat Rev Immunol **6**(2): 93-106.

Wong, K. A. and A. Rodriguez (2008). "Plasmodium infection and endotoxic shock induce the expansion of regulatory dendritic cells." J Immunol **180**(2): 716-726.

Wright, D. E., A. J. Wagers, A. P. Gulati, F. L. Johnson and I. L. Weissman (2001). "Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells." Science **294**(5548): 1933-1936.

Wynn, T. A., A. Chawla and J. W. Pollard (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." Nature **496**(7446): 445-455.

Wysocka, M., L. J. Montaner and C. L. Karp (2005). "Flt3 ligand treatment reverses endotoxin tolerance-related immunoparalysis." J Immunol **174**(11): 7398-7402.

Xiao, W., M. N. Mindrinos, J. Seok, J. Cuschieri, A. G. Cuenca, H. Gao, D. L. Hayden, L. Hennessy, E. E. Moore, J. P. Minei, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, B. H. Brownstein, P. H. Mason, H. V. Baker, C. C. Finnerty, M. G. Jeschke, M. C. López, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. Arnoldo, W. Xu, Y. Zhang, S. E. Calvano, G. P. McDonald-Smith, D. A. Schoenfeld, J. D. Storey, J. P. Cobb, H. S. Warren, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, S. F. Lowry, R. V. Maier, R. W. Davis, R. G. Tompkins and I. a. H. R. t. I. L.-S. C. R. Program (2011). "A genomic storm in critically injured humans." J Exp Med **208**(13): 2581-2590.

Xu, Y., Y. Zhan, A. M. Lew, S. H. Naik and M. H. Kershaw (2007). "Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking." J Immunol **179**(11): 7577-7584.

Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda and S. Akira (2002). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." Nature **420**(6913): 324-329.

Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira (2003). "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." Nat Immunol **4**(11): 1144-1150.

Yamamoto, R., Y. Morita, J. Ooehara, S. Hamanaka, M. Onodera, K. L. Rudolph, H. Ema and H. Nakauchi (2013). "Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells." Cell **154**(5): 1112-1126.

Yanai, H., T. Ban, Z. Wang, M. K. Choi, T. Kawamura, H. Negishi, M. Nakasato, Y. Lu, S. Hangai, R. Koshiba, D. Savitsky, L. Ronfani, S. Akira, M. E. Bianchi, K. Honda, T. Tamura,

Bibliographie

- T. Kodama and T. Taniguchi (2009). "HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses." Nature **462**(7269): 99-103.
- Yang, D., Y. He, R. Munoz-Planillo, Q. Liu and G. Nunez (2015). "Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock." Immunity **43**(5): 923-932.
- Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Williams, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer and S. Jung (2013). "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis." Immunity **38**(1): 79-91.
- Zhan, Y., E. M. Carrington, A. van Nieuwenhuijze, S. Bedoui, S. Seah, Y. Xu, N. Wang, J. D. Mintern, J. A. Villadangos, I. P. Wicks and A. M. Lew (2011). "GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8(+) spleen dendritic cells." Eur J Immunol **41**(9): 2585-2595.
- Zhang, J., D. Xiang, S. Zhu, W. Mao, H. Lu, M. Wu, Q. Wang, Y. Yu, K. D. Herbst and W. Han (2009). "Interleukin 1 receptor antagonist inhibits normal hematopoiesis and reduces lethality and bone marrow toxicity of 5-fluouracil in mouse." Biomed Pharmacother **63**(7): 501-508.
- Zhang, L., J. S. Cardinal, P. Pan, B. R. Rosborough, Y. Chang, W. Yan, H. Huang, T. R. Billiar, M. R. Rosengart and A. Tsung (2012). "Splenic apoptosis and autophagy is mediated by interferon regulatory factor 1 during murine endotoxemia." Shock **37**(5): 511-517.
- Zhang, Q., M. Raouf, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki and C. J. Hauser (2010). "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury." Nature **464**(7285): 104-107.
- Zheng, D., Q. Cao, V. W. Lee, Y. Wang, G. Zheng, Y. Wang, T. K. Tan, C. Wang, S. I. Alexander, D. C. Harris and Y. Wang (2012). "Lipopolysaccharide-pretreated plasmacytoid dendritic cells ameliorate experimental chronic kidney disease." Kidney Int **81**(9): 892-902.
- Zhou, R., A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi and J. Tschopp (2010). "Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation." Nat Immunol **11**(2): 136-140.
- Zhou, R., A. S. Yazdi, P. Menu and J. Tschopp (2011). "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation." Nature **469**(7329): 221-225.
- Zigmond, E., S. Samia-Grinberg, M. Pasmanik-Chor, E. Brazowski, O. Shibolet, Z. Halpern and C. Varol (2014). "Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury." J Immunol **193**(1): 344-353.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(5450): 701-702.
- Zitvogel, L., L. Galluzzi, O. Kepp, M. J. Smyth and G. Kroemer (2015). "Type I interferons in anticancer immunity." Nat Rev Immunol **15**(7): 405-414.

Annexes

Type I interferons drive inflammasome-independent emergency monocytopenia during endotoxemia

Corentin Lasseaux¹, Marie-Pierre Fourmaux¹, Mathias Chamaillard¹, Lionel Franz Poulin¹

¹Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

Address correspondence to:

Dr. Lionel F. Poulin
Institut Pasteur de Lille
1 rue du Professeur Calmette
BP 245
F- 59019 Lille cedex
France

Correspondence should be addressed to: lionel.poulin@cnrs.fr

Manuscript information: Text pages: 24; Figures: 7; Supplementary figures: 5.

Word count (counting spaces): Title: 9 words; Abstract: 198 words; Text (excluding references): 4493 words.

Abstract

Emergency monocytopoiesis is an inflammation-driven hematological process that supplies the periphery with monocytes and subsequently with macrophages and monocyte-derived dendritic cells. Yet, it is unclear how is regulated the commitment of early bone marrow myeloid progenitors for monocyte-derived phagocytes during endotoxemia. Herein, we show that type I interferons signaling promote the differentiation of monocyte-derived phagocytes at the level of their progenitors during a mouse model of endotoxemia. In this model, we characterized early changes in the numbers of conventional dendritic cells, monocyte-derived antigen-presenting cells and their respective precursors. While loss of caspase-1/11 failed to impair a shift toward monocytopoiesis, we observed sustained type-I-IFN-dependent monocyte progenitors differentiation in the bone marrow correlated to an accumulation of Mo-APCs in the spleen. Importantly, IFN-alpha and -beta were found to efficiently generate the development of monocyte-derived antigen-presenting cells while having no impact on the precursor activity of conventional dendritic cells. Consistently, the depletion of conventional dendritic cells and their direct precursor occurred independently of type-I-IFN signaling *in vivo*. Our characterization of early changes in mononuclear phagocytes and their dependency on type I IFN signaling during sepsis opens the way to the development of treatments for limiting the immunosuppressive state associated with sepsis.

Introduction

Emergency monocytopoiesis is thought to modulate hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) and non-self-renewing precursors that express TLR4¹. Indeed, it has been suggested that TLR activation alters the function and fate of HSPCs². There are several dendritic cell (DC) subsets, which originate from either monocytic precursors differentiating into monocyte-derived antigen-presenting cells (Mo-APCs) or from non-monocytic progenitors differentiating into conventional DCs (cDCs)^{3,4}. The latter can be further divided

into two subsets (namely cDC1 and cDC2³), both of which can be generated by *in vitro* culture of bone marrow cells with the cDC growth factor FMS-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L)⁵. DCs are generally studied by characterizing their surface markers; all the subsets display the integrin CD11c and major histocompatibility complex class II (MHCII). We and others have shown that the surface markers CD64 (also known as Fc γ RI) and MerTK are specific for Mo-APCs, allowing the distinction between such cells and cDC^{3,6-9}. DCs are part of the mononuclear phagocyte lineage, which originate from the bipotent macrophage and DC progenitor (MDP). The latter can differentiate into either a common monocyte progenitor (cMoP)¹⁰ or a cDC precursor (CDP)¹¹. The CDPs give rise to pre-DCs, which migrate from the bone marrow to produce cDCs in peripheral tissues¹¹. Due to the DCs' protective role during sepsis, some researchers have argued that maintaining DC function should be a key objective in this field¹²⁻¹⁶. However, most of the studies in this area were performed before it became possible to distinguish between cDCs and monocyte-derived APCs with the marker CD64^{3,4}. In this context, several inflammatory cytokines (such as IFN α) favor the proliferation of hematopoietic stem cells with a bias towards the myelomonocytic hematopoietic branch, although IFN α has also been described as an inhibitor of hematopoiesis¹⁷.

Sepsis is a relatively common, life-threatening syndrome in which a systemic bacterial infection triggers a dysregulated host inflammatory response and leading to an immunosuppressive state associated with the development of secondary and nosocomial infections¹⁸⁻²⁰. Although the inflammatory response is often brought under control in the intensive care unit, the immunosuppressive state appears to increase subsequently the likelihood of death in sepsis patients^{18,21}. Although specific antisepsis treatments and reliable sepsis biomarkers are still lacking²², dendritic cells (DCs) are considered to be crucial for the resolution of sepsis and and to combat life-threatening infection^{16,23-30}. Notably, *Escherichia*

coli is a major cause of sepsis in hospitalized patients³¹. The cell wall of *E. coli* contains lipopolysaccharide (LPS), which triggers the expression of type I interferon (IFN)³², upon its recognition by Toll-like receptor 4 (TLR4). Type I IFNs constitute a multigene family whose main members (IFN α and IFN β) have a major role in mediating the lethal effects of septic shock³³⁻³⁵. Type I IFNs exert their biological effects by binding to at least two transmembrane receptors (Ifnar1 and Ifnar2) and thus activating intracellular pathways leading to the expression of various IFN regulated genes^{36,37}. On one hand, type I IFNs are required for the successful resolution of infections. On the other, type I IFNs are harmful during endotoxemia³⁸. This duality may explain why *in vivo* experiments in mouse models have prompted different conclusions about their involvement in sepsis³⁹. Consequently, the type I IFNs' exact role in sepsis has yet to be clearly defined. As most deaths in human sepsis occur during the prolonged period of immunosuppression that follows the acute inflammation, we used a murine model of non-lethal endotoxemia to determine the role of type I IFNs in emergency monocytopoiesis and in depletion of conventional dendritic cells. In the present study, we discriminated between cDCs and monocyte-derived cells by gating on the monocytic lineage marker CD64^{3,6,7}. We found that (i) cDCs and their precursors were impaired by a low-dose LPS injection, and (ii) LPS-induced induction of Mo-APC and their precursors was dependent on type I IFN signaling in spleen and bone marrow. Moreover, we demonstrated that IFN α/β allows the generation of Mo-APCs from MDPs, without impairing cDC development. This knowledge of the upstream modulation of medullar monocytopoiesis and their dependency on type I IFN signaling is likely to facilitate the development of treatments that limit the immunosuppressive state associated with sepsis.

Results

LPS-induced endotoxemia is associated to the development of Mo-APCs in a type-I IFN dependent manner.

To investigate the impact of LPS on the development of Mo-APCs in mice, we counted these APCs in the spleen at various time points after an intravenous (IV) injection of LPS (Figure 1). Single-cell suspensions were prepared from the spleens and analyzed using multiparameter flow cytometry. Live singlet cells were gated on MHCII, and lineage-positive (Lin^+) cells (such as T, B and NK cells, eosinophils and neutrophils) were excluded based on CD3, CD19, NK1.1, CCR3, and Ly6G, respectively⁶. Subsequently, Lin^- (lineage-negative) MHCII⁺ cells were divided into cDCs and Mo-APCs, based on the latter's expression of CD64 and non-expression of the cDC marker CD135^{3,6} (Figure 1A). The Mo-APC count had increased significantly 24h after an IV injection of LPS (Figure 1A). Given that hematopoietic progenitor cells can respond to inflammatory cytokines like IFN α and IL-1^{40,41}, *Ifnar* and *Caspase-1/11* knock-out (*Casp1/11*^{-/-}) mice were injected with LPS or PBS only, and their spleen harvested at 24h. In contrast to *Caspase-1/11*-KO mice, LPS-induced Mo-APCs were not observed in *Ifnar*-deficient mice (Figure 1B) and also in the BM of these mice (see Supplementary Figure S1 online). Meanwhile required for LPS-induced IL-18 augmentation in the serum (see Supplementary Figure S2A online), Caspase-1/11 was dispensable for the increased proportion of Mo-APC in the BM and spleen following LPS injection. Additionally, bone marrow cells deficient for *Asc* (referred herein as *Pycard*^{-/-} mice) are not affected in their ability to generate Mo-APCs in the presence of Flt3-L and LPS (see Supplementary Figure S2B online). These data indicate that the type-I-IFN-dependent increase in Mo-APC counts is inflammasome-independent. We further analyzed the phenotype of the Mo-APC cells induced 24h after LPS injection. The CD64⁺ CD11b⁺ induced cells have a phenotype reminiscent of the so-called monocyte-waterfall. Briefly, recruited monocytes during inflammation acquire MHCII, and CD64 expression, and lose progressively the marker Ly6C⁶. We observed a significant increase in the population CD64⁺ CD11b⁺ Ly6C⁺ after LPS treatment regardless of

MHCII expression in WT and *Caspase-1/11*-KO mice (Figure 1C), and also in the BM of these mice (see Supplementary Figure S1 online). These results argue for a monocytic origin of the CD64⁺ cells induced after LPS treatment⁶. Altogether, these results indicate that LPS-induced endotoxemia is associated to the induction Mo-APC in a type-I IFN manner, independently of inflammasome activation.

LPS-induced endotoxemia impaired conventional DCs development.

Spleen DCs (Lin⁻ CD64⁻ MHCII⁺ CD11c⁺) were divided in cDC1 and cDC2 based on the CD11b expression on the latter (Figure 2A). Both DC populations were significantly reduced 24h after LPS treatment in WT mice (relative to control mice injected with PBS only). The lower number of DC in the spleen of untreated *Ifnar*-KO mice impeded any conclusion on the LPS effect on the development of these cells (Figure 2A, lower panel). The lower DC number in *Ifnar*-KO is not due to the gating strategy as we take into account the putative lower MHCII level reported in these mice due to the role of type I IFN on DC maturation^{42,43} by taking not only the MHCII high cells but also the intermediate ones. We concluded that the increase in the Mo-APC count was accompanied by a decrease in the DC number. In order to study this mechanism in more details, we counted the numbers of direct DC precursors (namely pre-DCs) in the BM 24h after the LPS injection. The pre-DC was gated as Lin⁻ CD115⁺ CD11c⁺ MHCII⁻ CD135⁺ live singlet cells²⁵ (Figure 2B). In WT animals, the absolute count of pre-DCs in the BM was significantly reduced 24h after LPS injection; this observation is consistent with a decreased number of DCs during LPS-mediated inflammation (Figure 2A). To establish whether this affected pre-DC count following LPS treatment were dependent on type I IFNs, we counted the BM pre-DCs in *Ifnar*-KO mice after LPS injection. We found that LPS-induced BM pre-DCs reduction is type I IFN independent.

These results argue for a reduction of conventional dendritic cells and their pre-DC precursor during LPS-induced endotoxemia.

LPS-induced endotoxemia stimulated monocytopoiesis.

To determine whether the LPS-mediated induction of Mo-APC is correlated with an induction of monocytopoiesis, we counted the recently described monocyte committed progenitors (namely cMoP) 24h after LPS injection. The cMoP was gated as described previously^{10,25,44}. Briefly, live singlet Lin⁻ CD115⁺ CD11c⁻ MHCII⁻ Ly6C⁺ cells (Figure 3A, left) were analyzed for Ly6C vs. CD11b, CD117 vs. CD11b, or Sca-1 vs. CD11b, in order to distinguish between cMoPs (live singlet Lin⁻ CD115⁺ CD11c⁻ MHCII⁻ Ly6C⁺ CD117⁺ CD11b⁻ cells), and monocytes (live singlet Lin⁻ CD115⁺ CD11c⁻ MHCII⁻ Ly6C⁺ Sca-1⁻ CD11b⁺ cells) (Figure 3A). At 24h after LPS injection, monocytes were significantly decreased in the BM (Figure 3A and 3B) and in the blood (see Supplementary Figure S3 online) of WT and *Ifnar*-KO mice. This drop of BM monocytes might reflect a higher recruitment of these cells towards the peripheral organs, such as the spleen, to favor the generation of LPS-induced Mo-APC. To determine the effects of LPS on cMoPs, BM cells were counted in WT mice after an injection of LPS or PBS. As reported previously in the context of bacterial infection⁴⁵, a significant drop in the number of cMoP precursor cells was observed 24h after LPS injection (Figure 3A and 3B). These observations indicate that LPS rapidly induces a loss of cMoPs. To determine whether this decrease in cMoPs resulted from accelerated differentiation into monoblasts and promonocyte (pro-Mo) cells (as suggested by⁴⁵), we counted these precursors in the BM. Monoblasts were defined as live singlet Lin⁻ CD115⁺ CD11c⁻ MHCII⁻ Ly6C⁺ Sca-1⁺ CD11b⁻ cells, and pro-Mo cells were defined as live singlet Lin⁻ CD115⁺ CD11c⁻ MHCII⁻ Ly6C⁺ Sca-1⁺ CD11b⁺ cells⁴⁵. We detected a significant increase in the BM number of monoblasts and pro-Mo cells (Figure 3A and 3C) after LPS

injection (relative to PBS injection). This observation indicates that LPS treatment induces monocytopoiesis in the BM. Given that cMoP cells express the *Ifnar* receptor¹⁰, we next determined the impact of LPS injection on monocytopoiesis in *Ifnar*-KO mice. As had been observed in WT animals, we found that the cMoP count in the BM of *Ifnar*-KO mice had decreased 24h after LPS injection. Although LPS-induced fall in the cMoP count was *Ifnar*-independent (Figure 3A and 3B), LPS-induced increase in monoblast and pro-Mo counts was *Ifnar*-dependent (Figure 3A and 3C). As positive and negative effects of type-I IFN on hematopoietic precursor cells are described in the literature¹⁷, we measured the proliferation and number of LSK BM cells ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-kit}^+$)^{45,46}. LSK cells were gated as described in Supplementary Figure S4A online⁴⁵, and a significant increase of their number and proliferation, evaluated by BrdU incorporation, was observed in a type-I IFN independent manner (see Supplementary Figure S4B online). Then, LPS induced the generation of monocyte precursors 24h after its injection in a type-I dependent manner. These observations indicate that the LPS-dependent increase in the BM monoblast and pro-Mo counts was type I IFN signaling dependent. This finding indicates that LPS-induced monocytopoiesis requires intact *Ifnar* signaling.

LPS induced Mo-APC on macrophage/dendritic cell precursor in type-I IFN manner.

With a view to establish whether LPS induces monocytopoiesis by modulating the development of BM cells, we studied *in vitro* cultures of Flt3-L-derived DCs⁵. To establish whether LPS can induce Mo-APC by modulating progenitor development in Flt3-L-DCs, we titrated the induction of Mo-APCs (live singlet MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁺ cells) in response to increasing concentrations of LPS in the culture. We found that LPS concentrations ranging from 10 to 1000 ng/ml induced Mo-APCs (Figure 4A). To confirm the monocytic origin of these *in vitro* generated Mo-APCs, we sorted MDP, CDP and cMoP and cultured them on

filler cells in the presence of Flt3-L or Flt3-L and LPS to measure the origin of the induced Mo-APC. As expected only MDP and cMoP cells were able to generate Mo-APC in the presence of LPS (Figure 4B). These results showed that LPS addition during *in vitro* cultures of Flt3-L-derived DCs induced Mo-APC. To determine whether type I IFN signaling is required for the generation of LPS-induced Mo-APCs in BM cells, we compared *Ifnar*-KO and WT BM cells cultured with Flt3-L in the presence of LPS (Figure 5A and B). Flt3-L-DCs were analyzed in order to determine the proportions of Mo-APCs (live singlet MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁺ cells), cDC1s (live singlet MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁻ CD24⁺ CD172a⁻ cells) and cDC2s (live singlet MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁻ CD24⁻ CD172a⁺ cells) (Figure 5A). As expected, we found very few Mo-APCs in the Flt3-L-DC culture (Figure 5A, upper part). However, cDC1s and cDC2s were present in both WT and *Ifnar*-KO BM (Figure 5A, upper part). In contrast to experiments with Flt3-L alone, the addition of LPS to the Flt3-L-BM culture at day 0 was associated with a significant increase in the number of Mo-APCs (Figure 5A, lower part). These results indicate that early addition of LPS to Flt3-L-BM culture system makes the latter a good model of LPS-induced monocytopoiesis. To establish whether type I IFN signaling is required for LPS-induced monocytopoiesis, *Ifnar*-KO BM cells were compared with WT BM cells in a LPS-Flt3-L-BM culture (Figure 5A, lower part). We observed that *Ifnar*-KO BM cells produced fewer Mo-APCs, which is consistent with a crucial role of type I IFN in LPS-induced monocytopoiesis.

To establish whether type I IFN is able to influence MDP progenitors and favor their differentiation into Mo-APCs, MDPs from CD45.2⁺ mice were sorted and cultured on CD45.1⁺ filler cells⁴⁴ in the presence of Flt3-L and in the presence or absence of IFN α , IFN β or LPS (Figure 4C). We gated on the progeny of the precursor cells by selecting live singlet CD45.2⁺ MHCII⁺ cells (Figure 6A) and analyzed frequencies of Mo-APCs, cDC1s and cDC2s after 7 days of culture (Figure 6B). As expected, purified MDP donor cells gave rise to

only cDC1s and cDC2s in the presence of Flt3-L. The addition of IFN α or IFN β at day 0 of the Flt3-L-DC culture induced a significant increase in Mo-APC counts. Addition of LPS favored Mo-APC induction and impaired DC generation; in contrast, addition of IFN α/β was not associated with a decrease in DC differentiation despite Mo-APC generation. These observations indicate that IFN α/β acts on BM cells to drive the generation of MDP-derived Mo-APCs. More precisely, we hypothesize that MDPs and cMoPs might be direct targets of type I IFN, as they express the Ifnar2 receptor protein¹⁰ and Ifnar1 and Ifnar2 transcripts (see Supplementary Figure S5A online). To test this hypothesis, MDPs and cMoP from CD45.2⁺ WT or *Ifnar*-deficient mice were sorted and cultured on filler cells as described above and their ability to generate Mo-APC cells was measured, and the presence of filler-derived Mo-APCs was used as an internal control (see Supplementary Figure S5B online). The presence of LPS as expected favored Mo-APC on filler cells and WT precursors; in contrast, the *Ifnar*-deficient MDP or cMoP were impaired in their ability to produce Mo-APCs, which is coherent with an intrinsic role of Ifnar signaling on monocyte precursors during LPS-induced monocytopoiesis.

Discussion

Here, we demonstrated that LPS induces monocytopoiesis in a type-I-IFN-dependent manner at the expense of DC development. Furthermore, we showed for the first time that type I IFN, IFN α and IFN β , modulate the fate of MDP and increase monocytic progeny. Our results indicate that type I IFN signaling in an inflammatory environment favors the generation of immune cells (Figure 7).

Sepsis is generally characterized by a decrease in the DC count²³⁻²⁸. The DC count is decreased directly by inducing DC apoptosis^{12,18,26,47}. For instance, inhibition of apoptotic mediator such as caspase-8 increases mice resistance in sepsis model⁴⁸. Alternatively, DC

count might also be affected by decreasing DC generation⁴⁵. For example, the DC content decreases after a bacterial infection as a result of a decrease in the number of pre-DC precursors, with no change in the level of apoptosis⁴⁵. Here, by using the discriminating marker CD64 and a murine model of endotoxemia, we noted a rapid increase in the Mo-APC count and a decrease of DC numbers in spleens^{6,7}. Indeed, we observed a decrease in splenic cDCs counts after *in vivo* LPS treatment, which is consistent with the reduction in the pre-DC numbers in bone marrow. Moreover, *in vitro* addition of LPS induced a similar decrease in cDCs composition of Flt3-L-derived DCs. This LPS-induced reduction in cDCs is counterbalanced by a type I IFN dependent generation of Mo-APC. The exact mechanism by which LPS reduced pre-DC precursors and cDCs requires more future analysis.

Induction of monocytopoiesis has been reported in various sepsis-related models. In mice, the monocytopoiesis induced by bacterial infections (e.g. with *Yersinia enterocolitica*) is similar to that observed upon LPS treatment⁴⁵. In fact, the cMoP count decreases rapidly in a TLR4- and IFN γ -dependent manner, leading to high numbers of Sca-1⁺ monoblasts and promonocytes⁴⁵. Similarly, LPS induces a decrease in numbers of the upstream MDP precursor, namely the granulocyte-macrophage progenitor⁴⁹. Moreover, monocytopoiesis during *Listeria monocytogenes* infection is characterized by a significant, Caspase-1-independent increase in the number and proliferation of BM monocytes⁵⁰. Finally, monocytopoiesis is also induced during *E. coli*-infected mice by the accumulation of mobilized HSCs and progenitor cells in the spleen⁵¹.

In LPS-induced monocytopoiesis, the exact source of type I IFN, the IFN's target cells and other synergistic factors remain to be identified. Plasmacytoid DCs are a candidate for the source of type I IFN, since their number increases in a burn injury model (relative to a sham intervention)⁵², their depletion diminishes LPS-induced acute lung injury⁵³, and chronic TLR7 stimulation results in their type I IFN production which promotes the development of

neutrophils in the bone marrow⁵⁴. Hematopoietic cells (including HCS and myeloid precursors) can be considered as targets for type I IFN. Indeed, type I IFN acts on hematopoietic cells and is required for survival in a mouse CLP-based sepsis model by increasing CXCL10 production, recruiting neutrophils and macrophages, and stimulating phagocyte functions³⁹. Moreover, we found that LPS and IFN α/β were capable of inducing *ex vivo* Mo-APCs in the BM, which predominantly contains hematopoietic cells, and that MDP and cMoP could be direct targets of type I IFN. Aside a direct effect of type I IFN on MDP and cMoP, another target cell of type I IFN is monocyte, which responds to this trigger by producing IL-18 during viral infection⁵⁵. However, we cannot rule out the possibility that type I IFN modulates progenitor cells indirectly by inducing other factors. With regard to type I IFN synergistic factors, IFN γ induces the differentiation of myeloid precursors and a decrease in the generation of neutrophils (in viral infections)⁵⁶ or DCs (in bacterial infections)⁴⁵. Similarly, IFN γ induces IL-27 production during malaria infection; IL-27 then promotes the expansion and differentiation of long term hematopoietic stem cells (HSCs) into myeloid progenitors, in synergy with stem cell factor (a c-kit ligand)⁵⁷. In a mouse model of acute abdominal sepsis, IL-3 produced by B cells promotes a cytokine storm by inducing the differentiation of Ly6C^{hi} monocytes and neutrophils⁵⁸. Blocking IL-3 production reduces the intensity of sepsis by decreasing inflammation-associated myelopoiesis⁵⁸. Interestingly, IFN-I-activated B cells are protective in early innate immune responses during bacterial sepsis⁵⁹.

Unexpectedly, we observed a significant decrease of cMoP counts at 24h after LPS injection in BM; this apparently contradicts the type-I-IFN-dependent increase in the BM content of Sca-1-expressing monoblast, promonocyte precursor cells and LSK cells. Given that IFN α induces Sca-1 expression in HSCs⁶⁰, type I IFN signaling might modulate a rapid transition from Sca-1-negative cells to Sca-1 positive cells. However, we saw no impact of *Ifnar* deficiency on LSK cell number and proliferation. Suggesting that our results can not be

explained by a decreased Sca-1 expression or HSC proliferation in *Ifnar* deficient mice. Sca-1 is not only a widely used HSC marker but is also required for HSC self-renewal and the development of committed progenitor cells⁶¹. Along the same lines, Sca-1 has a crucial role during severe bacterial infections in mice by diverting early hematopoietic precursors towards the myeloid lineage⁶². Moreover, HSCs lacking Sca-1 (like those lacking the *Ifnar*) are insensitive to IFN α stimulation¹⁷; this observation demonstrates that Sca-1 mediates the IFN α -induced proliferation of HSCs.

We hypothesize that in an inflammatory context (such as that created by exposure to LPS), type I IFN drives emergency monocytopoiesis by increasing the monocytic output of MDPs. Our present results show that exposure to LPS (a surrogate of bacterial septicemia) leads to type-I-IFN dependent monocytopoiesis by favoring the differentiation of MDPs into Mo-APCs. Although type-I-IFN-dependent monocytopoiesis might represent a potential escape mechanism for viruses⁶³, it may enable the host to contain the invading pathogen by increasing the availability of innate immune cells. Meanwhile the role of type-I IFN is opposite in endotoxemia³⁸ and sepsis models³⁹, our observations might be applicable to other biological situations in which overproduction of type I IFN production is observed, such as viral infections and interferon-related diseases^{64,54}.

Furthermore, we suggest that our findings might also apply to other CD11c-expressing cells, such as regulatory DCs (which expand during endotoxic shock⁶⁵) and inflammatory DCs⁶⁶. Our study opens up opportunities for detailed analyses of type-I-IFN-dependent monocytopoiesis in various inflammatory settings. Although monocytopoiesis is detrimental in the early acute sepsis phase (due to an enhanced inflammatory state), it is beneficial in the late immunosuppressive phase⁶⁷. Based on our results in the mouse, we suggest that the cDC/Mo-APC content in septic patients should be re-evaluated. Unfortunately, the CD64 marker is not discriminative for human cDCs, although other gating strategies have been

recently proposed³. Moreover, our *in vitro* model of progenitors cultured on filler cells might be a useful tool for determining the mechanism by which type I IFNs acts on progenitors to favor monocytopoiesis. In fact, the culture system dissociates the contrasting positive and negative effects of type I IFN on HSCs without affecting the modulation of downstream targets like MDPs and cMoPs¹⁷. The molecular mechanisms by which type I IFNs render the host more vulnerable to secondary bacterial challenge (including exposure to other PAMPs such as bacterial muramyl dipeptide) merit further study. In summary, our findings describe the molecular mechanism of endotoxemia-associated monocytopoiesis and thus open up new perspectives for immunotherapeutic strategies in the fight against systemic microbial infections. For example, treatment with IFN α might restore normal monocytopoiesis and reduce susceptibility to secondary infections and/or the persistence of some viruses. Similarly, administration of anti-IFN α relieve monocyte-dependent inflammatory disorders.

Materials and Methods

The murine model, and induction of LPS-induced endotoxemia. C57BL/6J mice (from Janvier Labs), *Caspase-1/11*^{-/-68} and *Ifnar*^{-/-69} ((F. Trottein (CIIL) (housing) and B. Ryffel (CNRS, Orléans) (gift)) mice at 8 to 16 weeks of age received a retro-orbital, intravenous (IV) injection of 25 μ g of LPS (O111:B4 Ultrapure, Invivogen) in 100 μ l of Dulbecco's PBS. Control mice received Dulbecco's PBS only. Spleen, blood and BM (femur and tibia) samples were collected at the indicated time points. The local investigational review board approved all animal studies (CEEA – “75 Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Nord - Pas de Calais” (CEEA232009R). Animal experiments were performed in an accredited establishment (N° B59-108) according to governmental guidelines N°86/609/CEE.

Cell preparation and flow cytometry. BM cells were flushed out of the bones. A single-cell suspension was prepared by repeated pipetting. Spleen samples were disaggregated by 30 minutes of 1 mg/ml Collagenase D (Roche) treatment and a single-cell suspension was prepared by repeated pipetting. Red blood cells were lysed by treatment with 160mM NH₄Cl and 170 mM Tris. Single-cell suspensions were incubated in the dark with LIVE/DEAD reagent (Thermo Fisher Scientific) for 30 minutes on ice. The cells were then incubated for 10 minutes with purified rat anti-mouse CD16/CD32 (Biolegend, 93 clone) and normal mouse serum (Interchim) before being stained with various monoclonal antibodies for 20 minutes in the dark on ice. Blood has been sampled in heparinized tubes by cardiac puncture immediately after sacrifice. Whole blood cells were then directly incubated with the antibodies for 20 minutes at room temperature in the dark. Red blood cells were lysed after staining with Optilyse B erythrolytic reagent (Beckman Coulter). Samples were analyzed with a LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) or sorted on a BD FACS Aria (BD Biosciences). The data were analyzed with Flowjo software V10.1 (TreeStar). The following antibodies were used for staining (Biolegend): PerCP anti-mouse CD3 (17A2), CD19 (6D5), NK1.1 (PK136), Ly6G (1A8) and Ter119 (TER-119), APC-Cy7 anti-mouse CD11b (M1.70), APC anti-mouse CD115 (AFS98) and CD64 (X54-5/7.1), PE anti-mouse CD135 (A2F10) and CD64 (X54-5/7.1), BV605 anti-mouse Scal (D7), Alexa Fluor 700 anti-mouse Ly6C (HK1.4), PeCy7 anti-mouse CD117 (2B8) and CD24 (M1/69), BV711 anti-mouse CD64 (X54-5/7.1), BV510 or FITC anti-mouse I-A/I-E (M5/114.15.2), and FITC anti-mouse CD172a (P84), and anti-mouse BrdU (3D4). The PE-CF594 anti-mouse CD11c (HL3) antibody was purchased from BD Biosciences.

Serum and ELISA. Serums were harvested from blood samples, collected by cardiac puncture in heparinized tubes after sacrifice. For IL-18 ELISA, purified anti-IL-18 (Clone 74, MBL International) was used for coating the plates and biotin anti-IL-18 (Clone 93-10C,

MBL International) was used for IL-18 detection. For standard curve, recombinant murine IL-18 (R&D system, B002-5) was used.

Gene expression. Isolated RNA was reverse-transcribed with the cDNA synthesis kit (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA (equivalent to 500 ng of total RNA) was amplified using the SYBR Green real-time PCR kit and detected on a Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies). qPCR was performed using forward and reverse primers (sequences available upon request). On completion of the PCR amplification, a DNA melting curve analysis was carried out in order to confirm the presence of a single amplicon. Actb was used as an internal reference gene in order to normalize the transcript levels. Relative mRNA levels (2-DDCt) were determined by comparing (a) the PCR cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and Actb (DCt) and (b) DCt values for precursor cells and monocyte control group (DDCt).

BrdU incorporation and intracellular staining. Single-cell suspensions of BM cells were incubated for 1 hour *in vitro* with 10 μ M BrdU in complete medium⁷⁰. The cells were then harvested, washed and stained for extracellular markers as described previously. Intracellular BrdU staining was performed using a BrdU Flow Kit (BD Pharmingen), according to the manufacturer's instructions.

***In vitro* culture of BM-derived DCs.** BM cells were cultured with recombinant human Flt3-L (Celldex) as previously described⁵ and supplemented with 100 ng/ml LPS 0111:B4 Ultrapur (Invivogen), 100 ng/ml IFN α (Peprotech), 10 ng/ml IFN β (Peprotech), or medium only. Cells were harvested, stained and analyzed by flow cytometry on day 7.

Data Availability

No datasets were generated or analyzed during the current study.

Acknowledgements

This work was funded by the French government's ATIP-Avenir program. LFP also received a fellowship from the ATIP-Avenir program. CL received of a PhD fellowship funded by the INSERM, the Nord-Pas de Calais Regional Council, and the *Association pour la Recherche sur le Cancer*" cancer charity. We thank the staff at the animal and cytometry facility at the Pasteur Institute of Lille.

Authorship Contributions

LFP, MC and CL designed the experiments and wrote the manuscript. MPF provided technical assistance.

Disclosure of Competing financial interests

The authors declare no competing financial interest.

References

- 1 Nagai, Y. *et al.* Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* **24**, 801-812, doi:10.1016/j.immuni.2006.04.008 (2006).
- 2 Esplin, B. L. *et al.* Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. *J Immunol* **186**, 5367-5375, doi:10.4049/jimmunol.1003438 (2011).
- 3 Guilliams, M. *et al.* Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* **45**, 669-684, doi:10.1016/j.immuni.2016.08.015 (2016).
- 4 Guilliams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* **14**, 571-578, doi:10.1038/nri3712 (2014).
- 5 Naik, S. H. *et al.* Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* **174**, 6592-6597 (2005).
- 6 Tamoutounour, S. *et al.* CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur J Immunol* **42**, 3150-3166, doi:10.1002/eji.201242847 (2012).
- 7 Langlet, C. *et al.* CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J Immunol* **188**, 1751-1760, doi:10.4049/jimmunol.1102744 (2012).
- 8 Gautier, E. L. *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol* **13**, 1118-1128, doi:10.1038/ni.2419 (2012).
- 9 Laoui, D. *et al.* The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun* **7**, 13720, doi:10.1038/ncomms13720 (2016).
- 10 Hettinger, J. *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* **14**, 821-830, doi:10.1038/ni.2638 (2013).
- 11 Schraml, B. U. & Reis e Sousa, C. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **32**, 13-20, doi:10.1016/j.coi.2014.11.001 (2015).
- 12 Hotchkiss, R. S. *et al.* Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* **168**, 2493-2500 (2002).
- 13 Bohannon, J., Cui, W., Sherwood, E. & Toliver-Kinsky, T. Dendritic cell modification of neutrophil responses to infection after burn injury. *J Immunol* **185**, 2847-2853, doi:10.4049/jimmunol.0903619 (2010).
- 14 Toliver-Kinsky, T. E., Cui, W., Murphey, E. D., Lin, C. & Sherwood, E. R. Enhancement of dendritic cell production by fms-like tyrosine kinase-3 ligand increases the resistance of mice to a burn wound infection. *J Immunol* **174**, 404-410 (2005).
- 15 Toliver-Kinsky, T. E., Lin, C. Y., Herndon, D. N. & Sherwood, E. R. Stimulation of hematopoiesis by the Fms-like tyrosine kinase 3 ligand restores bacterial induction of Th1 cytokines in thermally injured mice. *Infect Immun* **71**, 3058-3067 (2003).
- 16 Benjamim, C. F., Lundy, S. K., Lukacs, N. W., Hogaboam, C. M. & Kunkel, S. L. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* **105**, 3588-3595, doi:10.1182/blood-2004-08-3251 (2005).
- 17 Essers, M. A. *et al.* IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* **458**, 904-908, doi:10.1038/nature07815 (2009).

- 18 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **13**, 862-874, doi:10.1038/nri3552 (2013).
- 19 Heumann, D. & Roger, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* **323**, 59-72 (2002).
- 20 Cohen, J. et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis* **15**, 581-614, doi:10.1016/S1473-3099(15)70112-X (2015).
- 21 Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* **30**, 475-487, doi:10.1016/j.it.2009.07.009 (2009).
- 22 Hotchkiss, R. S. & Sherwood, E. R. Immunology. Getting sepsis therapy right. *Science* **347**, 1201-1202, doi:10.1126/science.aaa8334 (2015).
- 23 Gautier, E. L. et al. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol* **180**, 6941-6946 (2008).
- 24 Efron, P. A. et al. Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J Immunol* **173**, 3035-3043 (2004).
- 25 Autenrieth, S. E. et al. Immune evasion by *Yersinia enterocolitica*: differential targeting of dendritic cell subpopulations in vivo. *PLoS Pathog* **6**, e1001212, doi:10.1371/journal.ppat.1001212 (2010).
- 26 De Smedt, T. et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* **184**, 1413-1424 (1996).
- 27 Pene, F. et al. Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect Immun* **77**, 5651-5658, doi:10.1128/IAI.00238-09 (2009).
- 28 Sundquist, M. & Wick, M. J. Salmonella induces death of CD8alpha(+) dendritic cells but not CD11c(int)CD11b(+) inflammatory cells in vivo via MyD88 and TNFR1. *J Leukoc Biol* **85**, 225-234, doi:10.1189/jlb.0708413 (2009).
- 29 Pene, F. et al. Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsis-induced immune dysfunction. *J Immunol* **181**, 8513-8520 (2008).
- 30 Scumpia, P. O. et al. CD11c+ dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* **175**, 3282-3286 (2005).
- 31 Laupland, K. B. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin Microbiol Infect* **19**, 492-500, doi:10.1111/1469-0691.12144 (2013).
- 32 Creagh, E. M. & O'Neill, L. A. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* **27**, 352-357, doi:10.1016/j.it.2006.06.003 (2006).
- 33 Hertzog, P. J., O'Neill, L. A. & Hamilton, J. A. The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol* **24**, 534-539 (2003).
- 34 Karaghiosoff, M. et al. Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat Immunol* **4**, 471-477, doi:10.1038/ni910 (2003).
- 35 Thomas, K. E., Galligan, C. L., Newman, R. D., Fish, E. N. & Vogel, S. N. Contribution of interferon-beta to the murine macrophage response to the toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **281**, 31119-31130, doi:10.1074/jbc.M604958200 (2006).
- 36 de Weerd, N. A., Samarajiwa, S. A. & Hertzog, P. J. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* **282**, 20053-20057, doi:10.1074/jbc.R700006200 (2007).

- 37 Plataniias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**, 375-386, doi:10.1038/nri1604 (2005).
- 38 Huys, L. et al. Type I interferon drives tumor necrosis factor-induced lethal shock. *J Exp Med* **206**, 1873-1882, doi:10.1084/jem.20090213 (2009).
- 39 Kelly-Scumpia, K. M. et al. Type I interferon signaling in hematopoietic cells is required for survival in mouse polymicrobial sepsis by regulating CXCL10. *J Exp Med* **207**, 319-326, doi:10.1084/jem.20091959 (2010).
- 40 Takizawa, H., Boettcher, S. & Manz, M. G. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood* **119**, 2991-3002, doi:10.1182/blood-2011-12-380113 (2012).
- 41 Ueda, Y., Cain, D. W., Kuraoka, M., Kondo, M. & Kelsoe, G. IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. *J Immunol* **182**, 6477-6484, doi:10.4049/jimmunol.0803961 (2009).
- 42 Le Bon, A. et al. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* **4**, 1009-1015, doi:10.1038/ni978 (2003).
- 43 Hou, L. et al. Type 1 interferon-induced IL-7 maintains CD8+ T-cell responses and homeostasis by suppressing PD-1 expression in viral hepatitis. *Cell Mol Immunol* **12**, 213-221, doi:10.1038/cmi.2014.49 (2015).
- 44 Helft, J. et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* **42**, 1197-1211, doi:10.1016/j.immuni.2015.05.018 (2015).
- 45 Pasquevich, K. A. et al. Innate immune system favors emergency monopoiesis at the expense of DC-differentiation to control systemic bacterial infection in mice. *Eur J Immunol* **45**, 2821-2833, doi:10.1002/eji.201545530 (2015).
- 46 Baldrige, M. T., King, K. Y. & Goodell, M. A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol* **32**, 57-65, doi:10.1016/j.it.2010.12.003 (2011).
- 47 Peck-Palmer, O. M. et al. Modulation of the Bcl-2 family blocks sepsis-induced depletion of dendritic cells and macrophages. *Shock* **31**, 359-366, doi:10.1097/SHK.0b013e31818ba2a2 (2009).
- 48 Hotchkiss, R. S. & Nicholson, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* **6**, 813-822, doi:10.1038/nri1943 (2006).
- 49 Rodriguez, S. et al. Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis. *Blood* **114**, 4064-4076, doi:10.1182/blood-2009-04-214916 (2009).
- 50 Serbina, N. V., Hohl, T. M., Cherny, M. & Pamer, E. G. Selective expansion of the monocytic lineage directed by bacterial infection. *J Immunol* **183**, 1900-1910, doi:10.4049/jimmunol.0900612 (2009).
- 51 Burberry, A. et al. Infection mobilizes hematopoietic stem cells through cooperative NOD-like receptor and Toll-like receptor signaling. *Cell Host Microbe* **15**, 779-791, doi:10.1016/j.chom.2014.05.004 (2014).
- 52 Johnson, N. B. et al. Perturbed MafB/GATA1 axis after burn trauma bares the potential mechanism for immune suppression and anemia of critical illness. *J Leukoc Biol* **100**, 725-736, doi:10.1189/jlb.1A0815-377R (2016).
- 53 Mandl, M. et al. Evaluation of the BDCA2-DTR Transgenic Mouse Model in Chronic and Acute Inflammation. *PLoS One* **10**, e0134176, doi:10.1371/journal.pone.0134176 (2015).

- 54 Buechler, M. B., Teal, T. H., Elkon, K. B. & Hamerman, J. A. Cutting edge: Type I IFN drives emergency myelopoiesis and peripheral myeloid expansion during chronic TLR7 signaling. *J Immunol* **190**, 886-891, doi:10.4049/jimmunol.1202739 (2013).
- 55 Lee, A. J. et al. Inflammatory monocytes require type I interferon receptor signaling to activate NK cells via IL-18 during a mucosal viral infection. *J Exp Med* **214**, 1153-1167, doi:10.1084/jem.20160880 (2017).
- 56 de Bruin, A. M. et al. IFN γ induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood* **119**, 1543-1554, doi:10.1182/blood-2011-07-367706 (2012).
- 57 Furusawa, J. et al. Promotion of Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem Cells by Interleukin-27 into Myeloid Progenitors to Control Infection in Emergency Myelopoiesis. *PLoS Pathog* **12**, e1005507, doi:10.1371/journal.ppat.1005507 (2016).
- 58 Weber, G. F. et al. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* **347**, 1260-1265, doi:10.1126/science.aaa4268 (2015).
- 59 Kelly-Scumpia, K. M. et al. B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. *J Exp Med* **208**, 1673-1682, doi:10.1084/jem.20101715 (2011).
- 60 King, K. Y. & Goodell, M. A. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol* **11**, 685-692, doi:10.1038/nri3062 (2011).
- 61 Ito, C. Y., Li, C. Y., Bernstein, A., Dick, J. E. & Stanford, W. L. Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. *Blood* **101**, 517-523, doi:10.1182/blood-2002-06-1918 (2003).
- 62 Zhang, P. et al. The lineage-c-Kit+Sca-1+ cell response to Escherichia coli bacteremia in Balb/c mice. *Stem Cells* **26**, 1778-1786, doi:10.1634/stemcells.2007-1027 (2008).
- 63 McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O'Garra, A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* **15**, 87-103, doi:10.1038/nri3787 (2015).
- 64 Sato, T. et al. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. *Nat Med* **15**, 696-700, doi:10.1038/nm.1973 (2009).
- 65 Wong, K. A. & Rodriguez, A. Plasmodium infection and endotoxic shock induce the expansion of regulatory dendritic cells. *J Immunol* **180**, 716-726 (2008).
- 66 Greter, M. et al. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* **36**, 1031-1046, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.027 (2012).
- 67 Meisel, C. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 640-648, doi:10.1164/rccm.200903-0363OC (2009).
- 68 Kuida, K. et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **267**, 2000-2003 (1995).
- 69 Muller, U. et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918-1921 (1994).
- 70 Sarrazin, S. et al. MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells. *Cell* **138**, 300-313, doi:10.1016/j.cell.2009.04.057 (2009).

Figure Legends

Figure 1. Induction of splenic monocyte-derived antigen presenting cells during LPS-induced endotoxemia depends on type I IFN. Wild-type (WT), *Ifnar* -KO, and *Caspase-1/11*-KO mice were injected intravenously (IV) with a non-lethal dose of ultrapure LPS from *E. coli* O111:B4 (25 µg/mouse), or PBS. Spleen cells were analyzed by flow cytometry in kinetic in WT mice (A) or 24h after LPS injection in Wild-type (WT), *Ifnar* -KO, and *Caspase-1/11*-KO mice (B and C). Splenic Mo-APC were gated as $\text{Lin}^- \text{CD135}^- \text{CD11b}^+ \text{CD64}^+$ to quantified their number (A) and their expression of Ly6C and MHCII has been assessed (B). Data are representative of at least two independent experiments done in triplicates. Bars indicate mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by non-parametric Mann-Whitney test. $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) and $P < 0.0001$ (****) were considered statistically significant.

Figure 2. Decrease of splenic conventional dendritic cells numbers and their precursors in bone marrow during endotoxemia. WT and *Ifnar*-KO mice were treated as described in Figure 1. Spleens and bone marrows were collected and analyzed by flow cytometry 24h after LPS injection. Dendritic cells (DCs) were gated as $\text{Lin}^- \text{CD64}^- \text{MHCII}^+ \text{CD11c}^+$ in the spleen and were divided in cDC1 and cDC2 based on the CD11b expression on the latter (A) and bone marrow pre-DC were gated as $\text{Lin}^- \text{CD115}^+ \text{CD11c}^+ \text{MHCII}^- \text{CD135}^+ \text{CD11b}^-$ (B) to quantify their number. Bars indicate mean \pm SEM from 3 independent experiments. Statistical significance was assessed by non-parametric Mann-Whitney test. $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) and $P < 0.0001$ (****) were considered statistically significant.

Figure 3. Monocytopoiesis during LPS-induced endotoxemia depends on type I IFN signaling. WT and *Ifnar*-KO mice were treated as described in Figure 1. Bone marrows were collected and analyzed by flow cytometry 24h after LPS injection. Among $\text{Lin}^- \text{CD115}^+ \text{CD11c}^- \text{MHCII}^-$ bone marrow cells, cMoP were gated as $\text{Ly6C}^+ \text{CD135}^- \text{CD11b}^- \text{CD117}^+$,

monoblasts as Ly6C⁺ CD135⁻ CD11b⁻ Sca1⁺, pro-monocytes (pro-Mo) were gated as Ly6C⁺ CD135⁻ CD11b⁺ Sca1⁺, monocytes (mono) as Ly6C⁺ CD135⁻ CD11b⁺ Sca1⁻ and MDP as Ly6C⁻ CD135⁺ CD117⁺ (A), and their number were calculated (B, C). Data are representative of 3 independent experiments (A, B and C). Bars indicate mean ± SEM from 1 (A, B and C). Statistical significance was assessed by non-parametric Mann-Whitney test. P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***) and P<0.0001 (****) were considered statistically significant.

Figure 4. LPS induced Mo-APC are derived from monocyte progenitors in vitro but not from pre-DC. Increasing doses of LPS ultrapure from *E. coli* O111:B4 were added at day 0 in Flt3-L-dependent dendritic cells culture. After 7 days, the Flt3-L-treated bone marrow cells were analyzed by flow cytometry for the presence of DC (gated as MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁻) and Mo-APC (gated as MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁺) (A). CD45.2⁺ cMoP (gated as Lin⁻ MHCII⁻ CD11c⁻ CD115⁺ CD135⁻ CD117⁺ Ly6C⁺ CD11b⁻), CDP (gated as Lin⁻ MHCII⁻ CD11c⁻ CD115⁺ CD135⁺ CD117⁻ Ly6C⁻ CD11b⁻) and MDP (gated as Lin⁻ MHCII⁻ CD11c⁻ CD115⁺ CD135⁺ CD117⁺ Ly6C⁻ CD11b⁻) were sorted by flow cytometry and were co-cultured with CD45.1⁺ bone marrow filler cells in Flt3-L-dependent dendritic cells culture. Cultures were supplemented with LPS (100ng/ml) at day 0 and the cDC1 (gated as CD64⁻ MerTK⁻ MHCII⁺ CD11c⁺ CD24⁺ CD172a⁻), cDC2 (gated as CD64⁻ MerTK⁻ MHCII⁺ CD11c⁺ CD24⁻ CD172a⁺) and Mo-APC (gated as CD64⁺ MerTK⁺) composition after 7 days was measured. The frequencies of each population among the CD45.2⁺ cells were calculated (B). Data are from one experiment done in triplicate. Bars indicate mean ± SEM. Statistical significance was assessed by non-parametric Mann-Whitney test. P<0.01 (**) were considered statistically significant.

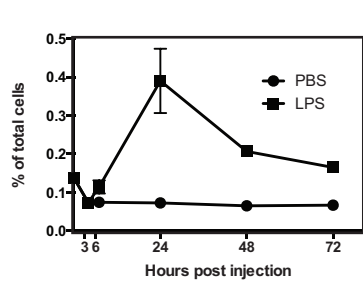
Figure 5. Type I IFN signaling is required for LPS-induced Mo-APC in vitro. LPS ultrapure from *E. coli* O111:B4 (100 ng/ml) were added or not at day 0 in Flt3-L-dependent in vitro dendritic cells cultures generated with WT or *Ifnar*-KO bone marrow cells. After 7 days,

the Flt3-L-treated bone marrow cells were analyzed by flow cytometry for the presence of cDC1 (gated as MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁻ CD24⁺ CD172a⁻), cDC2 (gated as MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁻ CD24⁻ CD172a⁺) and Mo-APC (gated as MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁺) (A). The frequencies of these populations were calculated for each condition (B). Data are representative of at least 2 independent experiments done in quadruplicate. Bars indicate mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA/Bonferroni posttest. P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***) and P<0.0001 (****) were considered statistically significant.

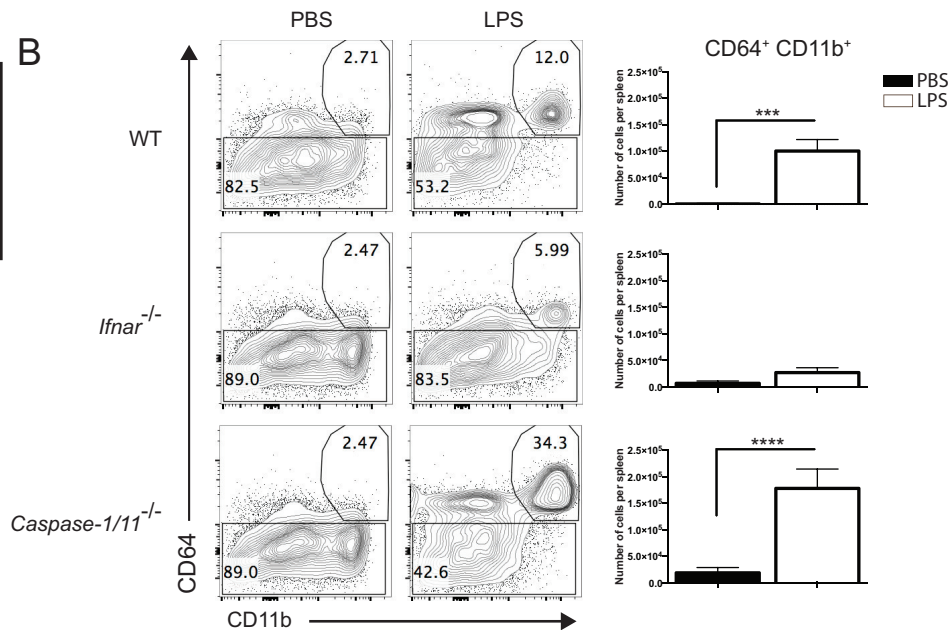
Figure 6. IFN α and IFN β favour macrophage and DC progenitor development toward monocyte-derived antigen presenting cells. CD45.2⁺ MDP (gated as described in Figure 3) sorted by flow cytometry were co-cultured with CD45.1⁺ bone marrow filler cells at day 0 in Flt3-L-dependent dendritic cells cultures. Cultures were supplemented with LPS (100ng/ml), IFN α (100ng/ml) or IFN β (10ng/ml) at day 0 and the DC and Mo-APC composition after 7 days was measured by flow cytometry (A). The frequencies of each population among the CD45.2⁺ MHCII⁺ cells were calculated (B). Data are representative of at least 2 independent experiments done in quadruplicate. Bars indicate mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA/Bonferroni posttest. P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***) and P<0.0001 (****) were considered statistically significant.

Figure 7. Schematic overview of the mechanisms leading to Mo-APC induction during LPS-induced endotoxemia. In the steady state, the myeloid progenitors develop into conventional dendritic cells or Mo-APCs (upper part). LPS-induced endotoxemia favors a type-I IFN dependent monocytopiesis at the expense of conventional DCs generation (lower part). cDC conventional dendritic cell; LPS lipopolysaccharide; MDP macrophage and DC progenitor; pre-DC precursor of DCs; cMoP common monocyte progenitor; pro-Mo promonocyte; mono monocytes; Mo-APC monocyte-derived antigen-presenting cells.

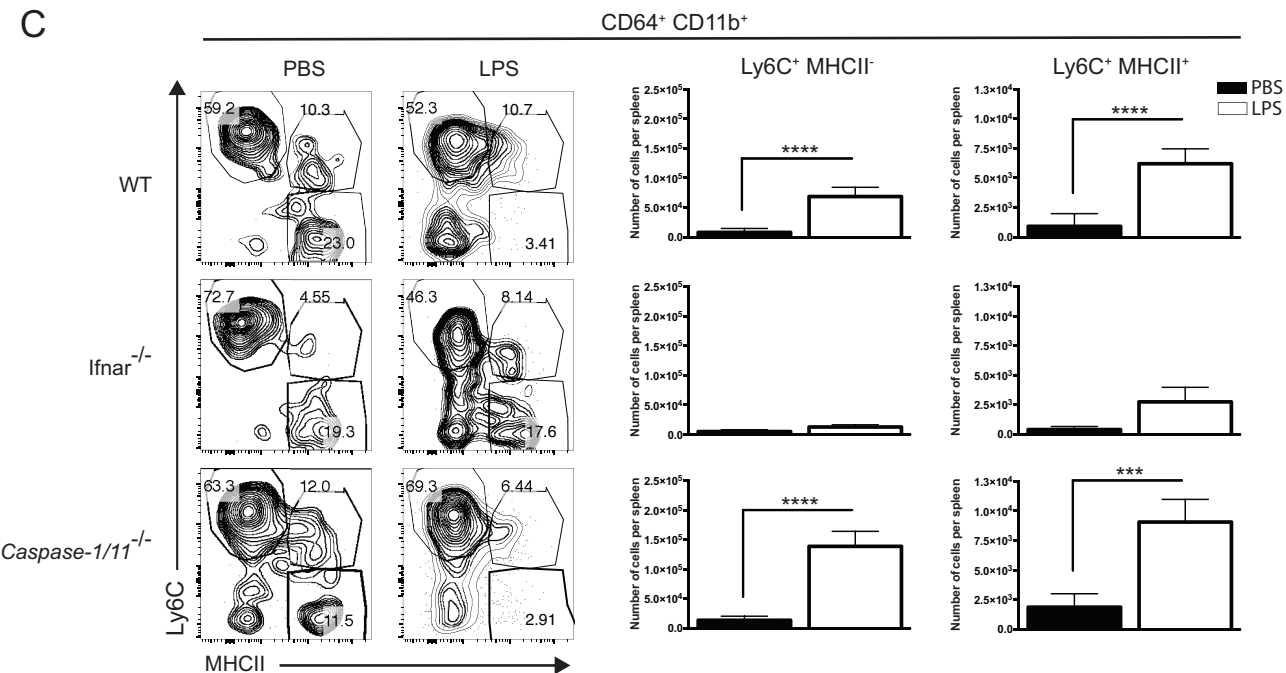
A



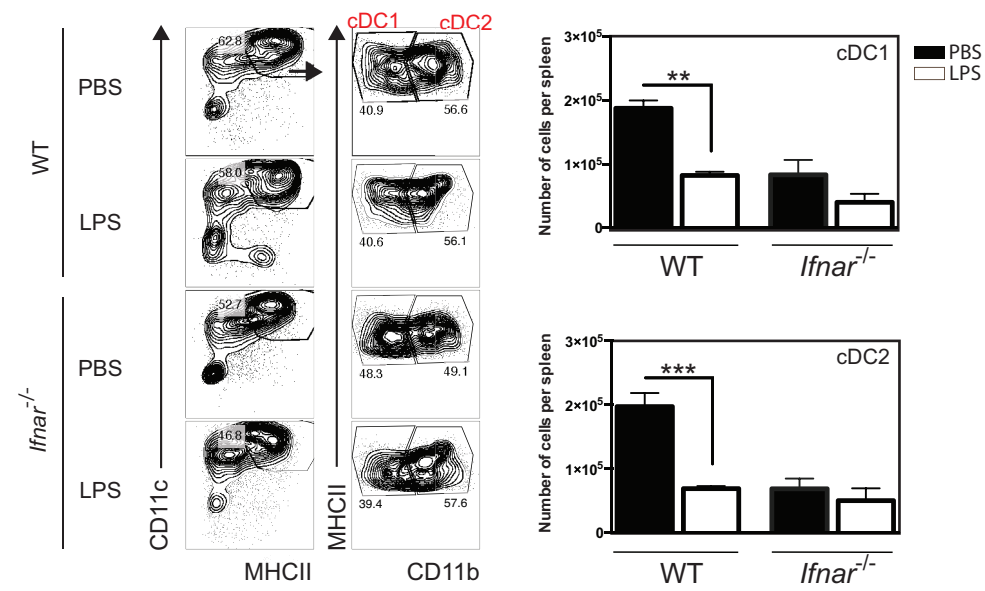
B



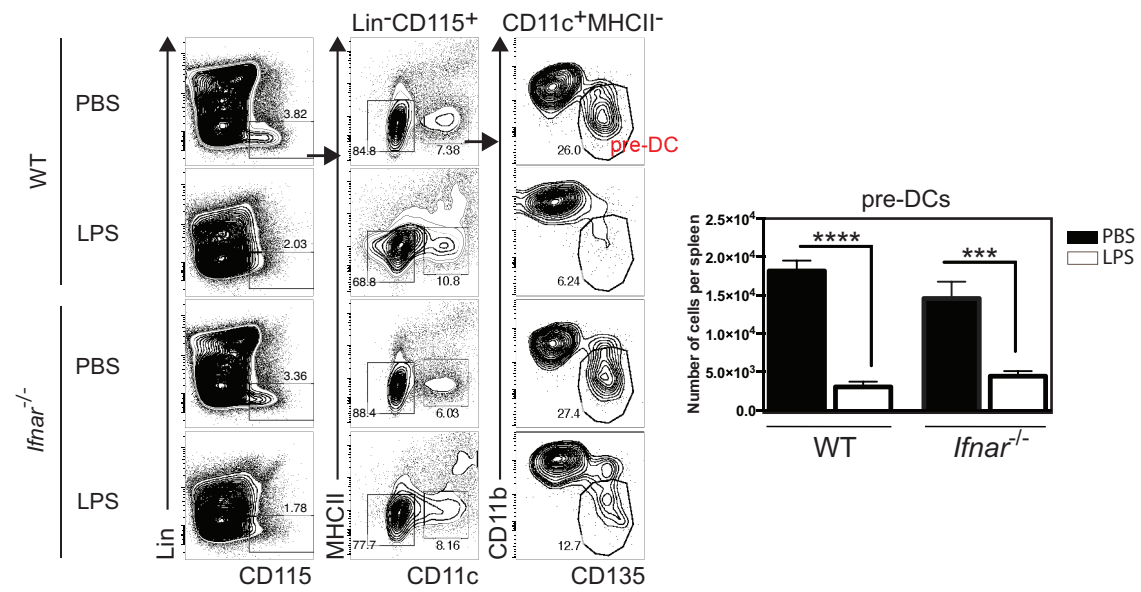
C

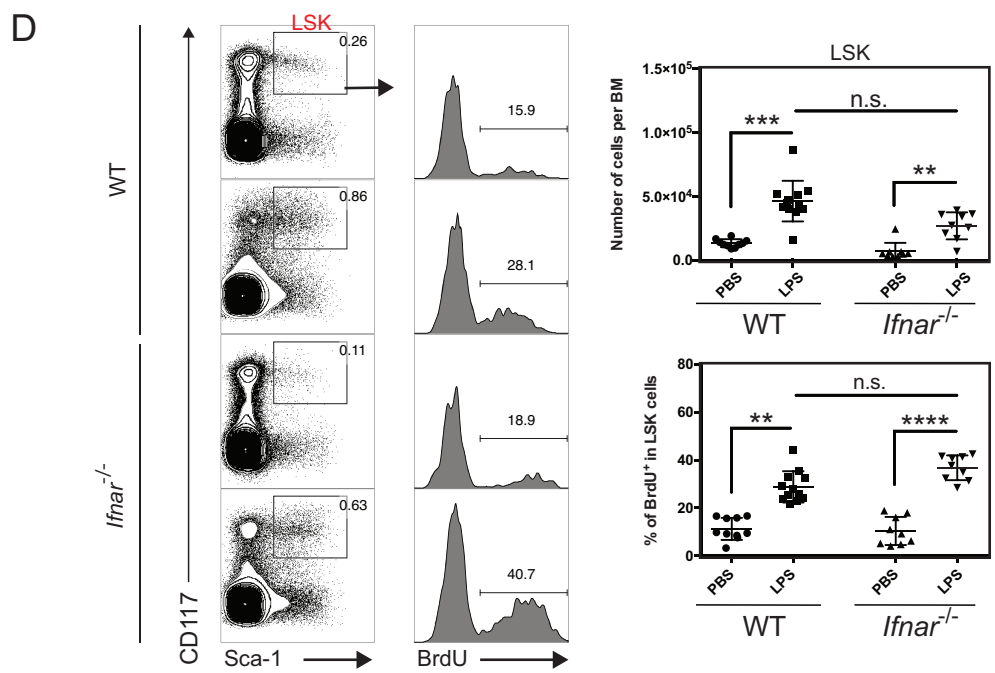
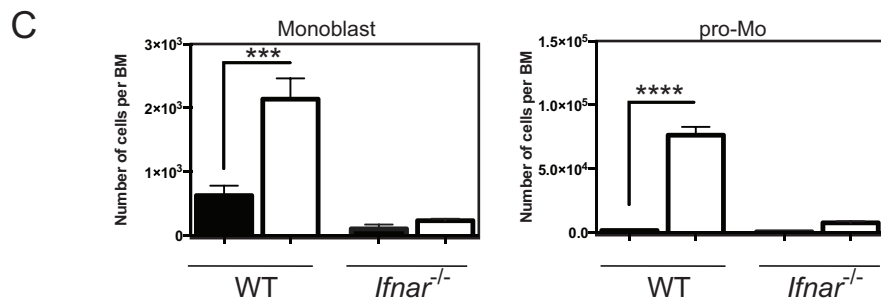
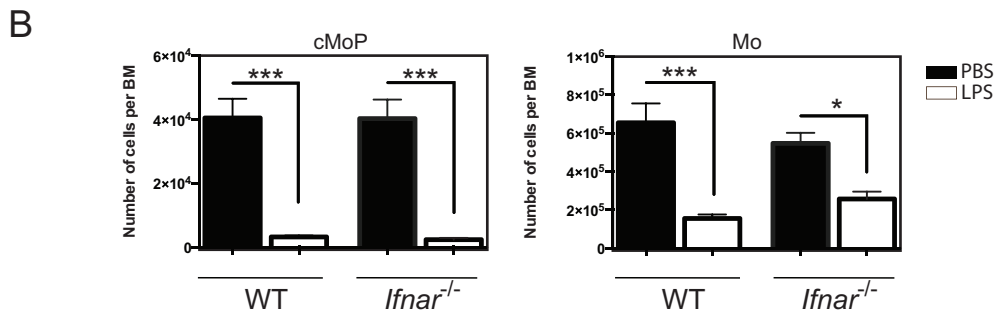
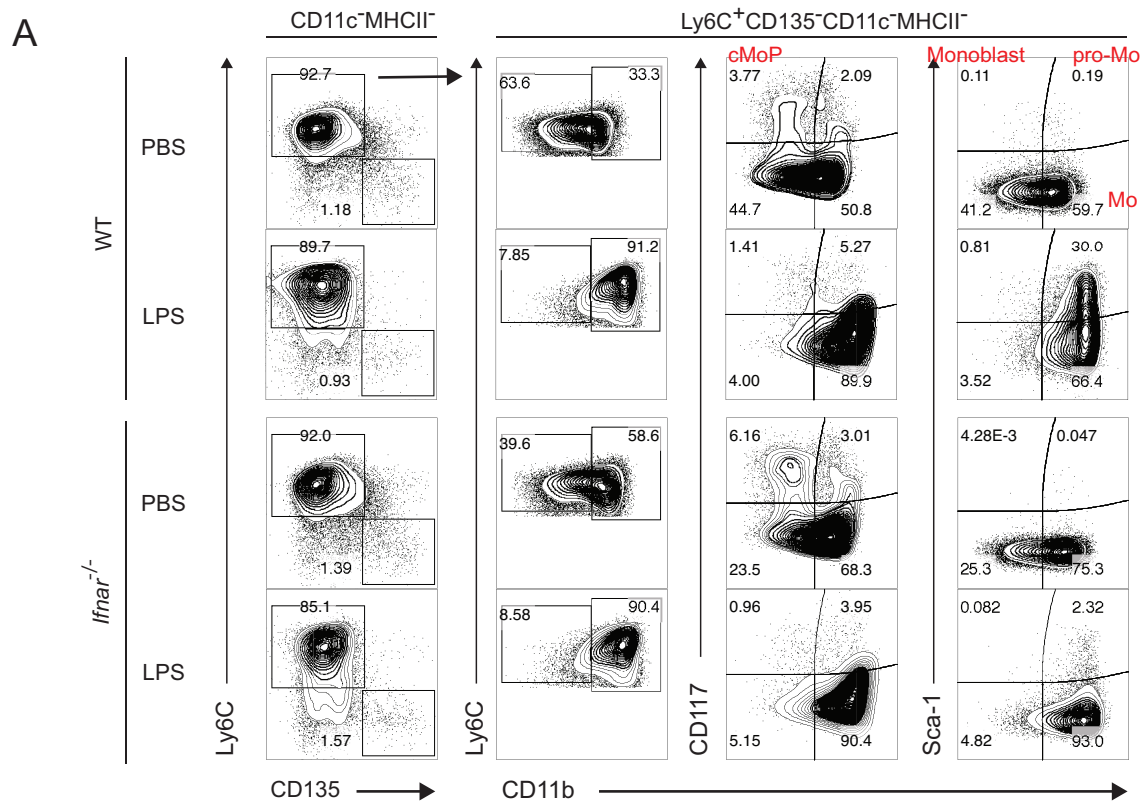


A

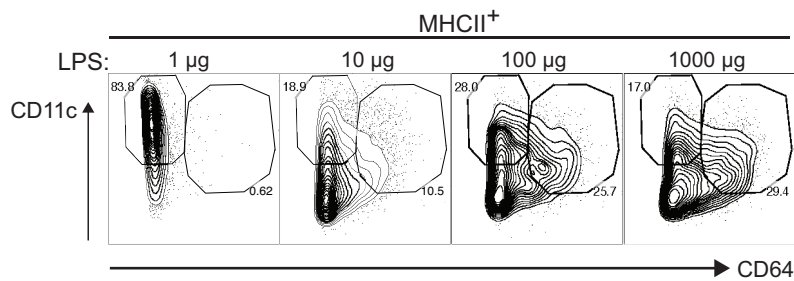


B



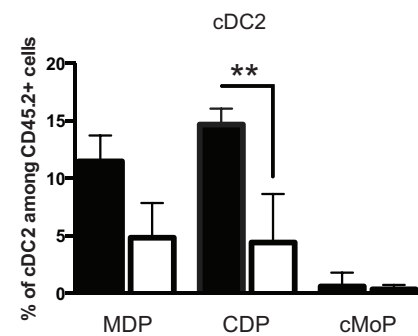
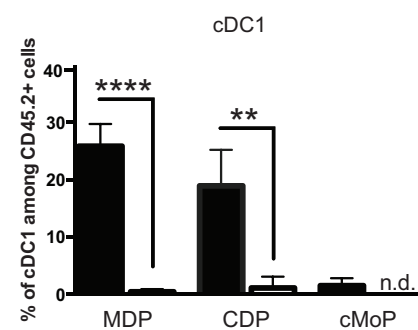
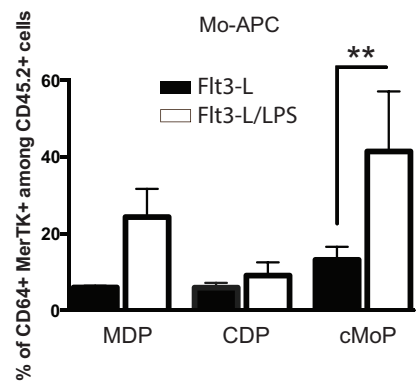
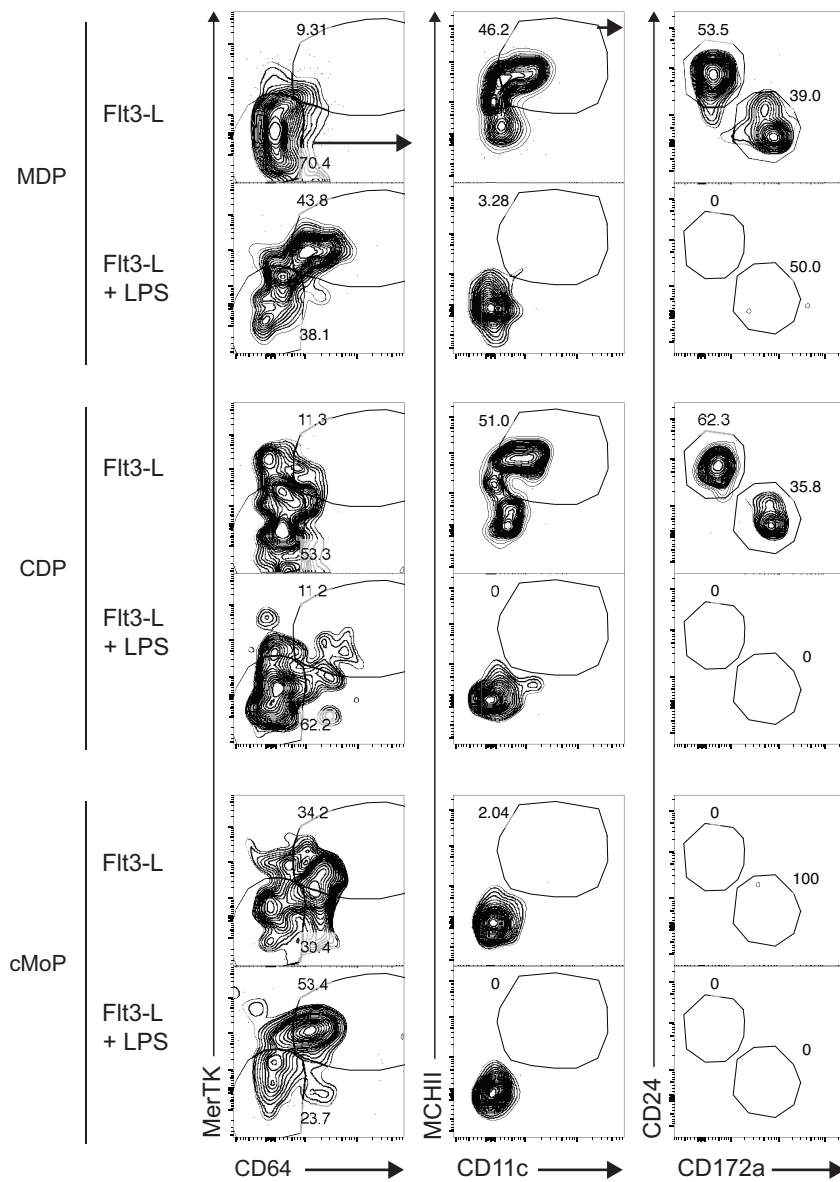


A

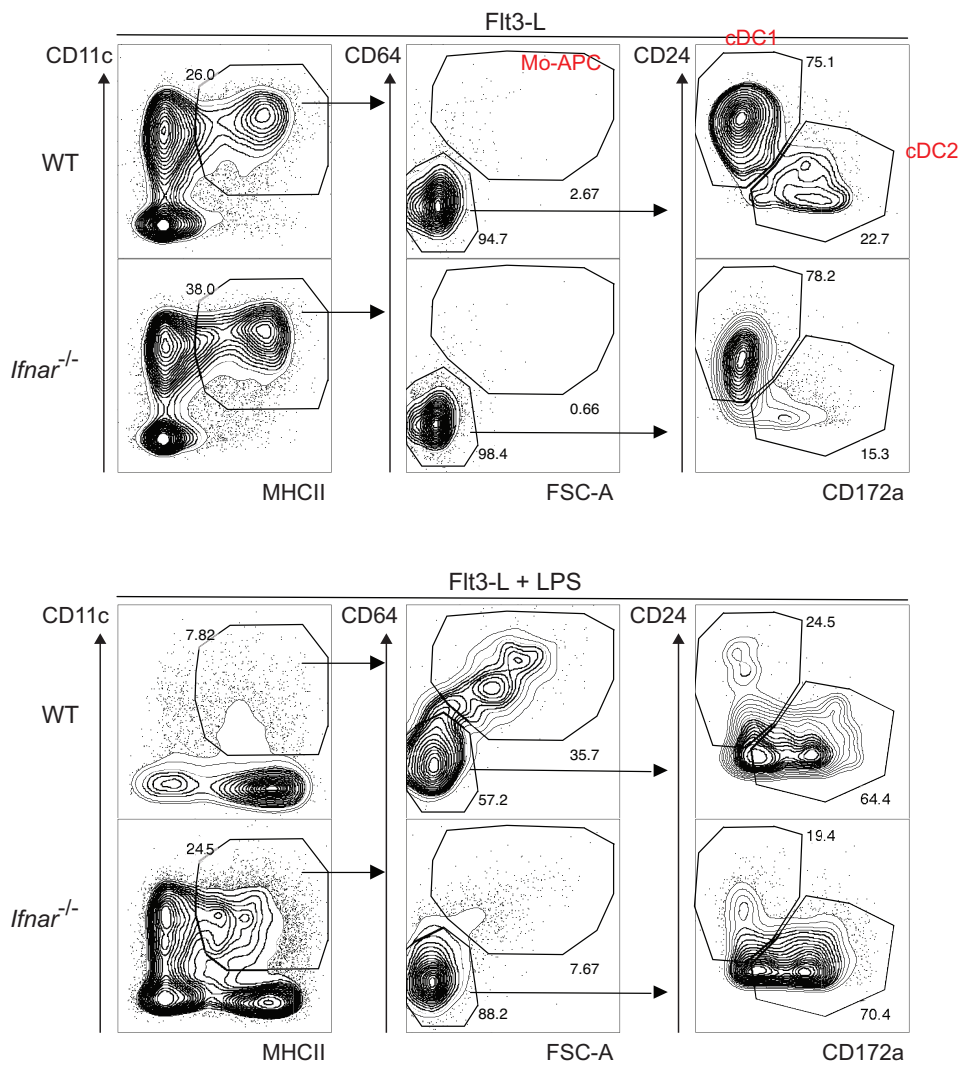


B

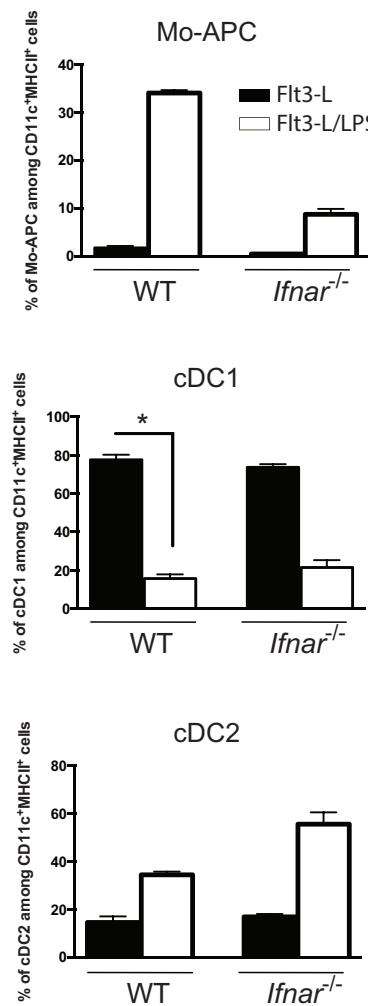
CD45.2⁺ progeny of precursor cells



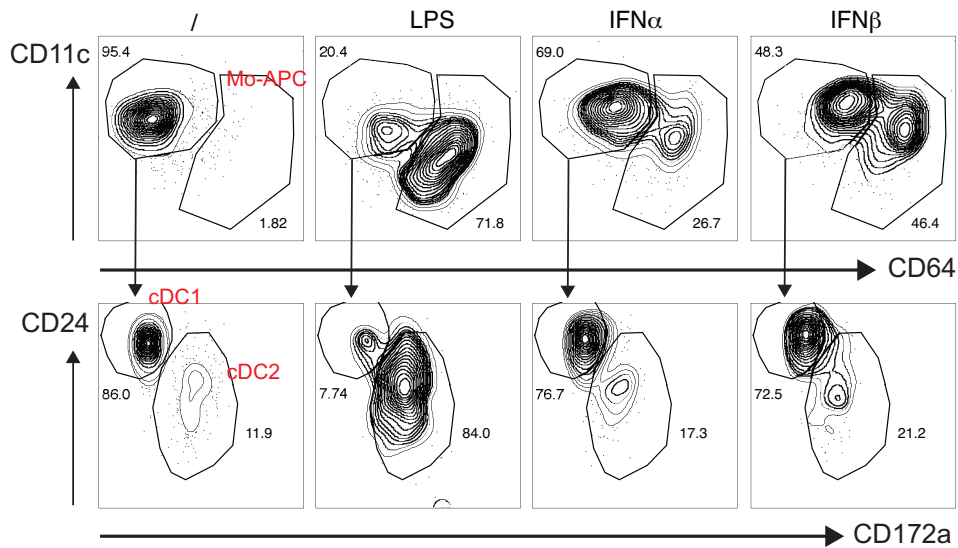
A



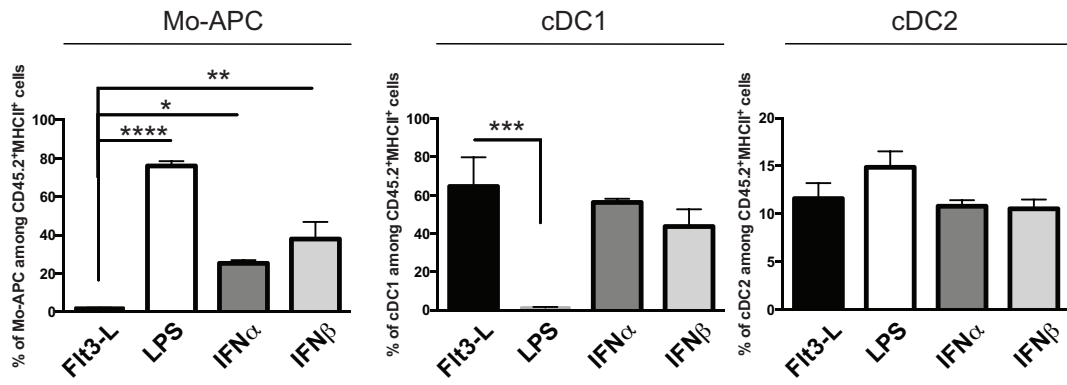
B



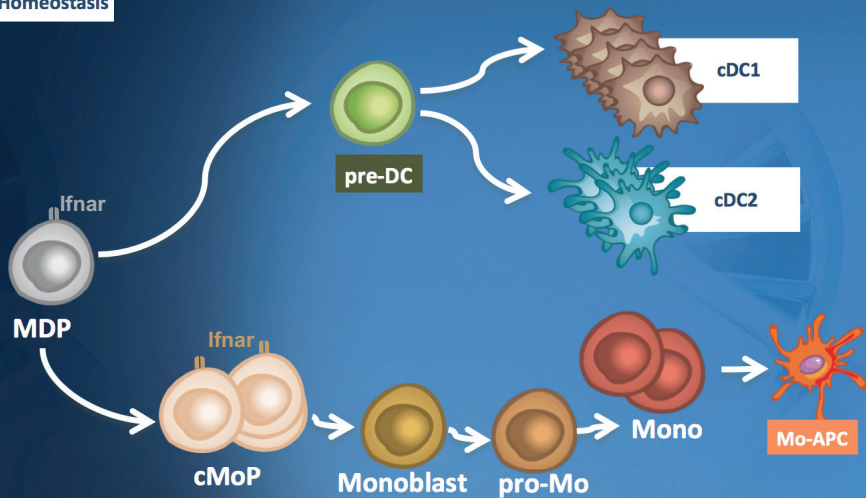
A

CD45.2⁺ MHCII⁺ progeny of precursor cells

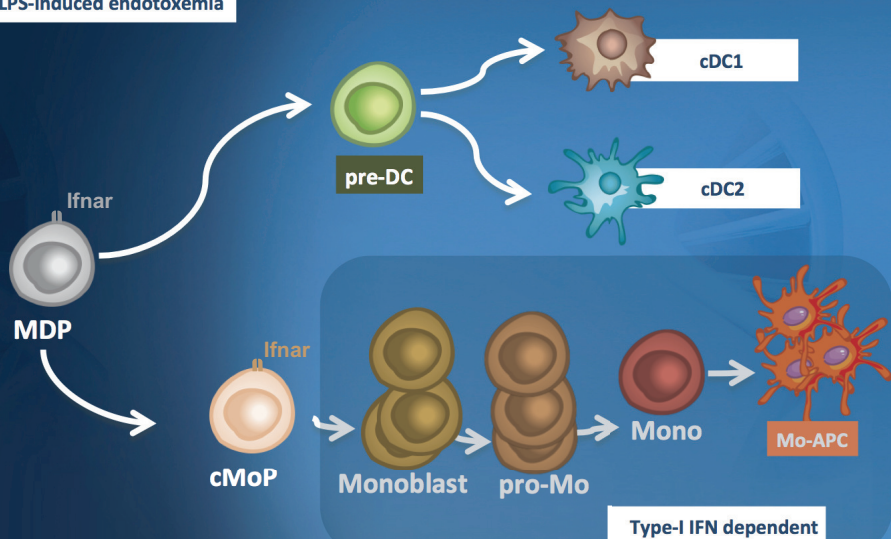
B



Homeostasis



LPS-induced endotoxemia



Supplementary Information

Type I interferons drive inflammasome-independent emergency monocytopoiesis during endotoxemia

Corentin Lasseaux¹, Marie-Pierre Fourmaux¹, Mathias Chamaillard¹, Lionel Franz Poulin¹

¹Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR

8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille,

France

Figure S1. Type I IFN dependent induction of bone marrow monocyte-derived antigen presenting cells during LPS-induced endotoxemia. Wild-type (WT), *Ifnar*-KO and *Caspase-1/11*-KO mice were treated as described in Figure 1. Bone marrow cells were collected and analyzed by flow cytometry 24h after LPS injection. Mo-APC were gated as Lin⁻ CD135⁻ CD11b⁺ CD64⁺ (A) and the expression of Ly6C and MHCII by Lin⁻ CD11b⁺ CD64⁺ myeloid cells has been assessed (B). Data are representative of three independent experiments. Bars indicate mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by non-parametric Mann-Whitney test. P<0.001 (***) and P<0.0001 (****) were considered statistically significant.

Figure S2. LPS-induced Mo-APCs are IL-18- and Asc-independent. A. As in Figure 1, Wild-type (WT), *Ifnar*-KO, and *Caspase-1/11*-KO mice were injected intravenously (IV) with a non-lethal dose of ultrapure LPS from *E. coli* O111:B4 (25 μ g/mouse), or PBS. IL-18 ELISA were done on blood serum collected 24h after LPS injection. B. As described in Figure 5, LPS ultrapure from *E. coli* O111:B4 (100 ng/ml) were added or not at day 0 in Flt3-L-dependent in vitro dendritic cells cultures generated with WT or *Pycard*-KO bone marrow cells. After 7 days, the Flt3-L-treated bone marrow cells were analyzed by flow cytometry for the presence of Mo-APC (gated as MHCII⁺ CD11c⁺ CD64⁺) (left panel). The frequency of

this population was calculated for each condition (right panel). Data are representative of at least 2 independent experiments (A) and of at least 3 donor bone marrow mice done in quadruplicate. Bars indicate mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA/Bonferroni posttest. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) and $P < 0.0001$ (****) were considered statistically significant.

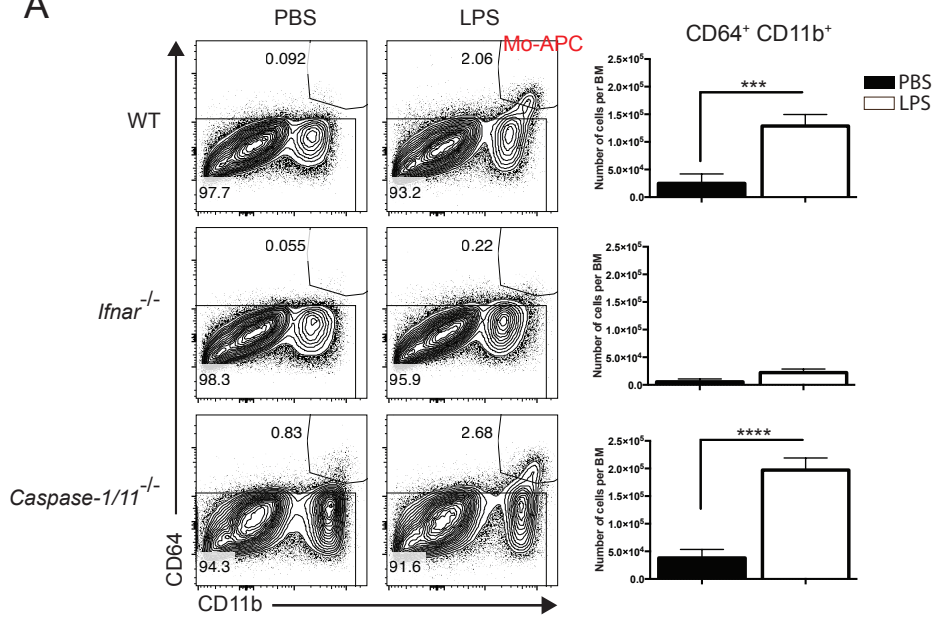
Figure S3. Decrease of blood monocytes numbers during endotoxemia. WT and *Ifnar*-KO mice were treated as described in Figure 1. Blood was collected 24h after LPS injection and blood cells were analyzed by flow cytometry. Blood monocytes were gated as SSC^{low} FSC^{low} Lin^- $Ly6C^+$ $CD11b^+$ and their numbers per blood ml was calculated. Bars indicate mean \pm SEM.

Figure S4. LPS-induced LSK cells proliferation is type I IFN independent. WT and *Ifnar*-KO mice were treated as described in Figure 1. Bone marrows were collected 24h after LPS injection and analyzed by flow cytometry. Bone marrow LSK cells were gated as Lin^- $CD135^-$ $Ly6C^-$ $CD11b^-$ $MHCII^-$ $CD11c^-$ $CD117^+$ $Sca1^+$ (A and B) and their proliferation was assessed by in vitro BrdU incorporation (B). Plots are representative of three independent experiments done in triplicate (A). Bars indicate mean \pm SEM from 3 independent experiments (B). Statistical significance was assessed by non-parametric Mann-Whitney test. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) and $P < 0.0001$ (****) were considered statistically significant.

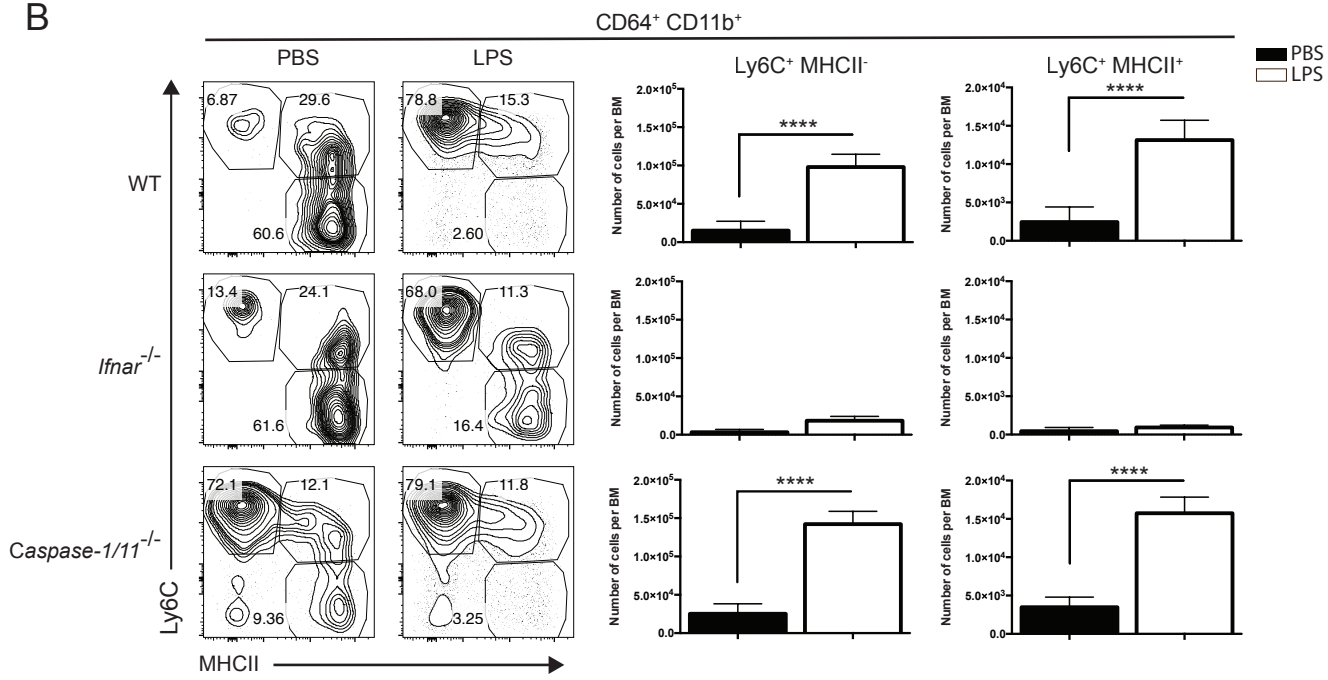
Figure S5. *Ifnar* expression on monocyte precursors is required for LPS-induced Mo-APCs. A. Transcript levels of *Ifnar1* (left panel), and *Ifnar2* (right panel) gene measured in MDP, cMoP, and monocytes extracted from the bone marrow of untreated wild-type mice. B. As described in Figure 6, WT or *Ifnar*-KO $CD45.2^+$ MDP (gated as described in Figure 4) or cMoP (gated as described in Figure 3) sorted by flow cytometry were co-cultured with $CD45.1^+$ bone marrow filler cells at day 0 in Flt3-L-dependent dendritic cells cultures. Cultures were supplemented with LPS (100ng/ml), $IFN\alpha$ (100ng/ml) or $IFN\beta$ (10ng/ml) at

day 0 and the DC and Mo-APC composition after 7 days was measured by flow cytometry among either the progeny of precursor cells or filler cells, the later used as an internal control (left panel). The frequencies of each population among the precursor-derived CD45.2⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ or filler-derived CD45.1⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ cells were calculated (right panel). Data are representative of at least 3 independent experiments (A, B) done in quadruplicate (B). Bars indicate mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA/Bonferroni posttest. P<0.05 (*), P<0.01 (**), P<0.001 (***) and P<0.0001 (****) were considered statistically significant.

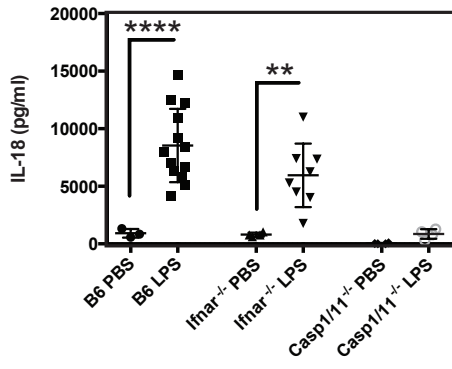
A



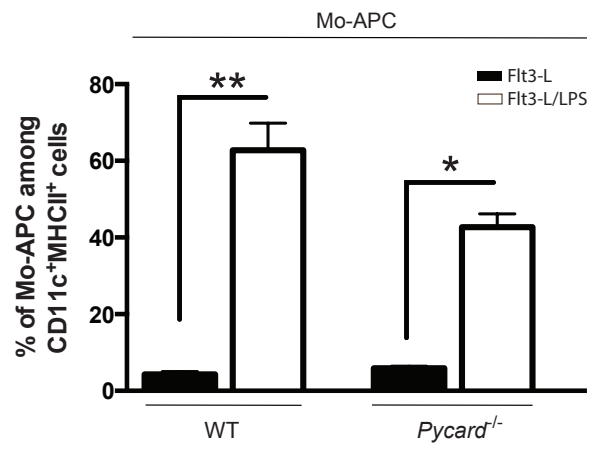
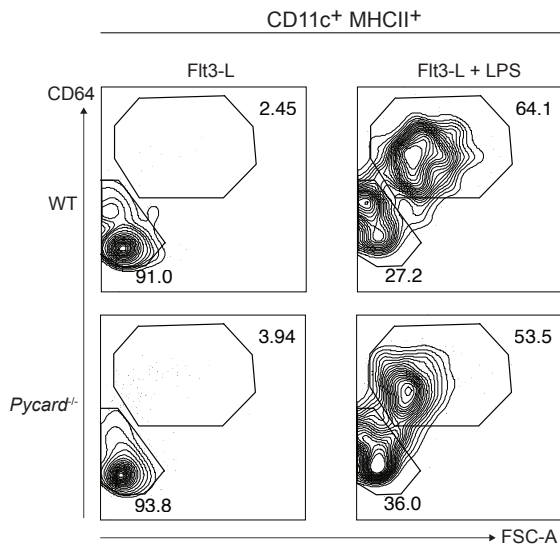
B

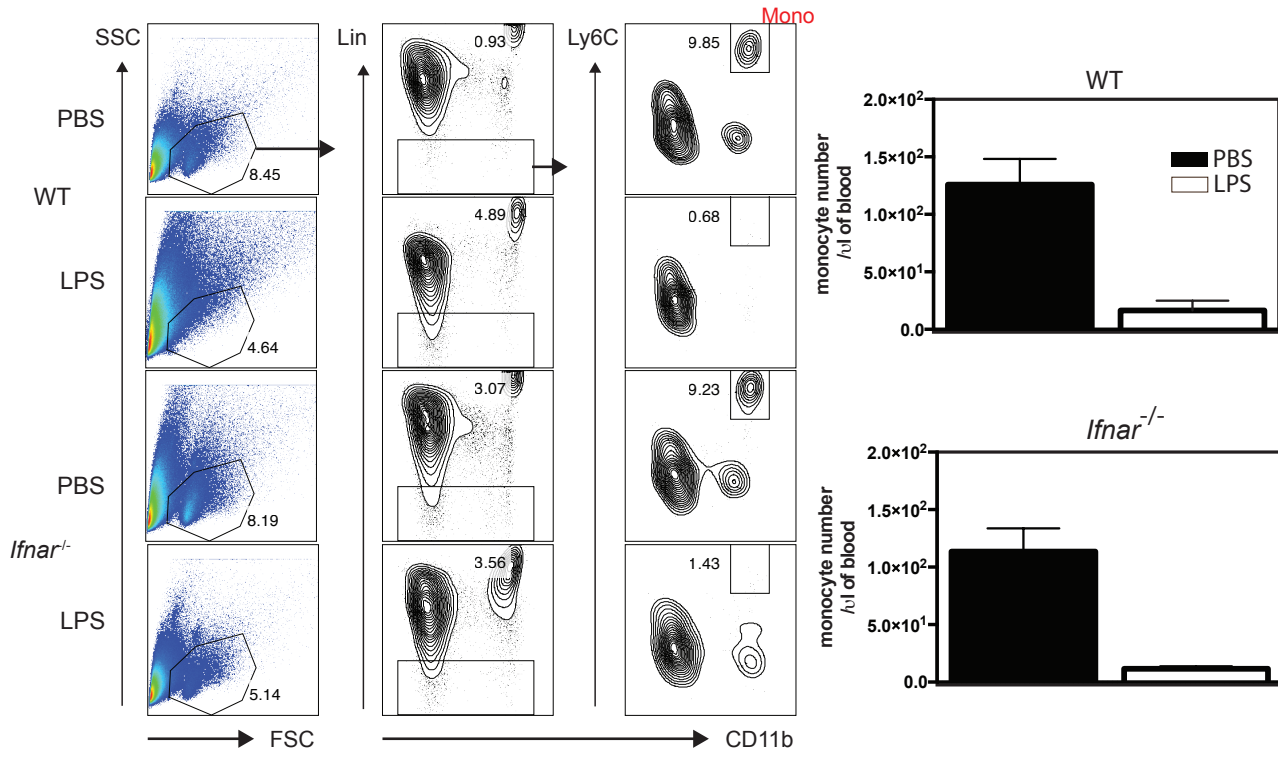


A

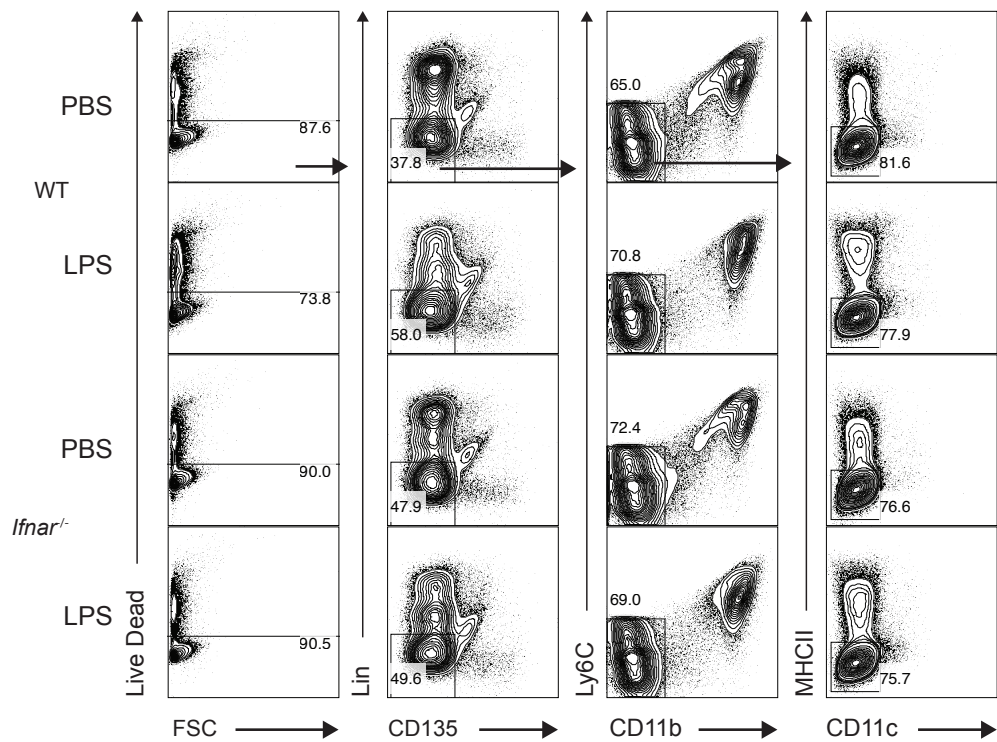


B

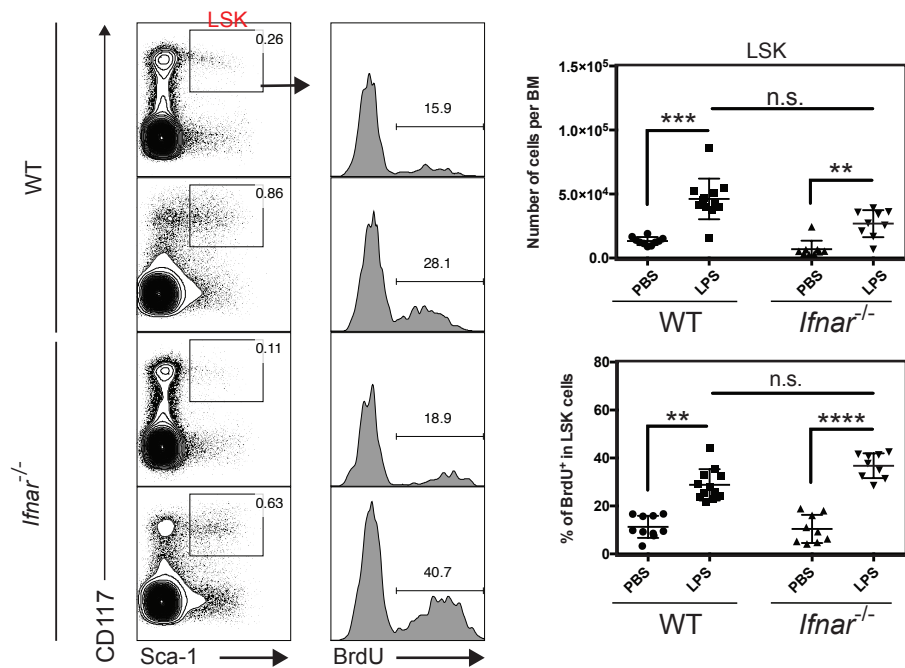




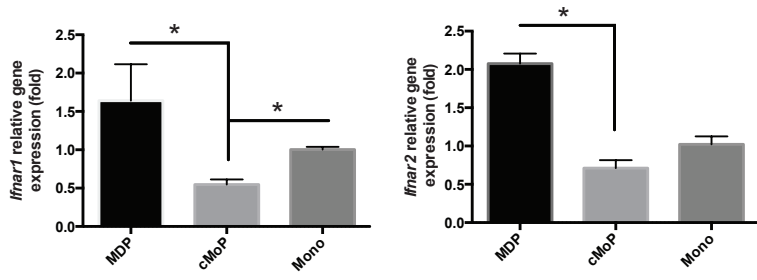
A



B



A



B

