

Mise en évidence d'une altération fonctionnelle du récepteur soluble de l'immunité innée PTX3 dans la mucoviscidose

Yveline Hamon

▶ **To cite this version:**

Yveline Hamon. Mise en évidence d'une altération fonctionnelle du récepteur soluble de l'immunité innée PTX3 dans la mucoviscidose. Immunologie. Université d'Angers, 2013. Français. NNT : . tel-00843818

HAL Id: tel-00843818

https://theses.hal.science/tel-00843818

Submitted on 12 Jul 2013

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

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

Thèse de Doctorat

Yveline HAMON

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

Discipline : Biologie-Santé
Spécialité : Immunologie
Laboratoire : Unité INSERM 892/CNRS 6299

Soutenue le 8 Février 2013

École doctorale : Angers
Thèse n° : 1281

Mise en évidence d'une altération fonctionnelle du récepteur soluble de l'immunité innée PTX3 dans la mucoviscidose

JURY

Rapporteurs :	**M. Philippe Gosset**	Chargé de Recherche, CIIL, Institut Pasteur de Lille
	M. Mustapha SI TAHAR	Directeur de Recherche, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Université de Tours
Examinateurs :	**M. Alain MOREL**	Professeur, Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers
	M. Yves DELNESTE	Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers
Directeur de thèse :	**M. Yves DELNESTE**	Directeur de Recherche, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers

A mon père

Remerciements

Professeur Alain MOREL,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse. Recevez mes sincères remerciements.

Docteur Philippe GOSSET,

Docteur Mustapha SI-TAHAR,

Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce mémoire. Je vous suis sincèrement reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Docteur Yves DELNESTE, chef

Sans toi, ce travail n'existerait pas. Je te remercie d'avoir supervisé mon travail de thèse. Merci de m'avoir initiée à la recherche, depuis maintenant quelques années… Merci de tes conseils, de ton soutien, de ta disponibilité, et pas seulement dans le cadre de la thèse. Merci d'avoir toujours été là, de m'avoir encouragée et supportée (je sais, je suis parfois un peu râleuse…). La PTX3 vaincra !!!!

Je remercie l'ensemble de l'équipe 7 de l'unité INSERM 892, les nouveaux comme les anciens :

Merci au Professeur Pascale Jeannin d'avoir consacré du temps à la relecture de l'article, de tes conseils et de ton dynamisme.

Merci au Professeur Dominique Couez pour tes cours d'immunologie en licence.

Merci au Docteur Laurent Marsollier de faire le café le matin… Ah non c'est moi ça… Merci Laurent d'avoir rejoint notre équipe, de ta bonne humeur, de tes blagues.

Un grand Merci à Isa, tu as été la première à m'initier aux techniques de recherche à mon arrivée au laboratoire en Master 1. Tu m'as prise sous ton aile à mes débuts, à mes premiers pas dans l'équipe. Merci de ta bonne humeur.

Je remercie sincèrement Céline, tu as été très présente dans des moments difficiles. Je suis désolée que tu aies du assister à ces moments. Je te dis merci pour ce que tu as fait, ta présence, ta douceur, ta générosité. Un grand MERCI.

Merci à notre super duo : Erwan et Simon. Tout d'abord, merci Erwan de m'avoir aidée dans les manips, d'être là, d'être toujours à l'écoute, de me conseiller, merci pour le café, pour tes blagues, ta bonne humeur, merci de t'être toujours intéressé à ce que je faisais. Merci Simon, sans toi le labo serait perdu… En 42, ça ne se serait pas passé comme ça, chaque chose à sa place !

Merci à Laurence, notre coach de jogging. Désolée d'avoir été une élève indisciplinée, je n'ai pas réussi à devenir une accroc de la course. Heureusement Julie est là pour t'accompagner sur les bords de Maine. Merci à Julie de m'avoir coachée pour la soutenance.

Merci aux étudiants de l'équipe. Merci Estelle pour toutes les soirées cinéma, shopping, James Joyce et même Boléro. J'espère que tu me tiendras au courant de tous les potins… Bientôt ton tour, je te dis m… pour la fin de la thèse. Merci Charline (ou Cha pour les intimes), tu es

la prochaine ! Merci Etienne ou « the beau Goss » ou encore « le lionceau », attention Laurence n'est jamais bien loin.

Merci à Marie, je suis ravie d'avoir pu te connaître avant de partir. Merci pour les pauses cigarettes, café, papotages.

Merci à l'électron libre Antoine, préviens-moi quand ton « Nature » sera accepté.

Merci aux récents « anciens » : Ulrich le petit chat mignon, Laurent expatrié chez les Ch'ti, the « double D » Pierre bon courage aux States, Thomas notre futur médecin, Estelle et ses punaises, bonne pêche au Bénin.

Merci aux plus « anciens » (la liste est longue) : Merci à Chacha (dur dur de passer après toi dans le labo), Merci à Mimi et félicitations pour le futur pti bout chou, Merci à Dorothée pour avoir partagé les longues soirées au labo, de m'avoir initiée au Body-combat. Merci Zaza, tu nous auras bien fait rire avec tes « zazaïsmes », Merci Bibine. Merci Murielle. Merci Mari, je me souviens encore de ta tarte au chocolat, excellente. Merci à Ulrich le Gabonais, un jour peut-être ministre du Gabon. Merci à Fang. Merci à Sabrina, ma binôme d'animalerie.

Merci à nos fantastiques secrétaires Céline et Patricia. Toujours là pour tout gérer. Merci Céline pour les Mac Do, le jogging, la zumba (pas sûre que ces trois activités aillent ensemble…).

Merci à Coco, je suis désolée pour ces 8 ans d'absence, mais on s'est bien rattrapée, non ? Et il y aura encore pleins d'autres moments à partager. Merci à RV, mon cat-sitter. Merci à Matthieu pour les WE où nous avons débarqué chez toi sans savoir quand on repartait. Tous les 4, RDV pour de nouvelles aventures…

Merci Titi, Ah Titi, que de souvenirs, que d'escapades, que de fous rires. Mes premiers festivals (me perdre à Carhaix), le boléro (rester à la porte de chez moi), le coteau à flots, les confidences, les joies, les peines, des heures à discuter, je t'avoue tout ça me manque. Il va falloir remédier à ça !!!

Merci à ma famille (oncles et tantes, cousines, marraine) de faire partie de ma vie.

Merci à Erick et Philippe pour tous les moments partagés, les bons comme les plus tristes, les escapades, notre futur voyage. Merci de m'avoir encouragée tout au long de la thèse ainsi que dans mes projets.

Un grand Merci à Béa et Baptiste, vous m'avez fait le plus beau cadeau du monde… Merci à vous pour toutes les soirées, les week-end passés chez vous, pour tous les moments joyeux ou tristes, vous avez toujours été là pour moi. Merci à Flavy, tu es une petite fille extraordinaire, jolie, intelligente, marrante, surtout reste comme tu es. Merci à Elora de faire notre bonheur, quelques mois et déjà tu nous charmes par tes sourires. Je promets d'être toujours là pour toi.

Merci à Phoenix, mon compagnon félin.

Maman, c'est à toi que je dois ce travail. Tu as toujours été là pour moi et je t'en remercie. Même si on ne se le dit pas souvent, tu sais que je t'aime et j'espère que tu seras fière de ton pti cœur… Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée.

Papa, tu es parti trop tôt, beaucoup trop tôt… Tu t'es toujours intéressé à ma vie au laboratoire, à mon travail, je sais que tu en étais fier. Mais, en cours de chemin, tu m'as laissée seule. J'aurais tellement aimé te montrer ce manuscrit, que tu sois présent à ma soutenance, que tu partages ces moments avec moi…

Tu me manques…

Sommaire

Index des figures et tableaux 3

Abréviations 4

Introduction 7

1. L'immunité innée 9

A. Les cellules de l'immunité innée 9

1. Les épithéliums 9

2. Les cellules d'origine lymphoïde 10

a) Les cellules Natural Killer 10

b) Les cellules NKT 12

c) Les lymphocytes T γδ 13

3. Les cellules d'origine myéloïde 13

a) Les monocytes et les macrophages 13

b) Les cellules dendritiques 15

c) Les mastocytes 17

d) Les granulocytes 19

B. Les récepteurs de l'immunité innée 32

1. Les récepteurs d'endocytose 32

a) La famille des Scavenger Receptors (SRs) 32

b) La famille des récepteurs aux lectines de type C 35

2. Les récepteurs de signalisation 37

a) La famille des TLRs 37

b) La famille des NLRs 38

c) La famille des RLRs 39

3. Les récepteurs solubles 39

a) Les ficolines 39

b) Les collectines 40

c) Les pentraxines 41

2. La mucoviscidose 51

A. Le gène et la protéine CFTR 51

1. Structure du gène CFTR 51

2. Structure et fonctions de la protéine CFTR 52

a) Canal ionique 53

b) Récepteur pour *Pseudomonas aeruginosa* 53

3. Les classes de mutations 53

4. Les relations génotype/phénotype 55

B. Présentation clinique et approches thérapeutiques 55

1. Dépistage et diagnostique 55

2. Signes cliniques 56

a) Atteintes pulmonaires 57

b) Atteintes digestives 59

c) Atteintes endocrines 60

d) Atteintes génitales 60

3. Les thérapies 61

a) Les traitements symptomatiques 63

b) Les traitements correcteurs 65
C. L'immunité innée dans la mucoviscidose 68
1. L'épithélium 68
2. Monocytes, macrophages et cellules dendritiques 70
3. Neutrophiles 71
a) Chimiotaxie et migration du neutrophile 72
b) Phagocytose du neutrophile et dégranulation 72
c) Explosion respiratoire 75
d) Apoptose du neutrophile 76
4. Les récepteurs de l'immunité innée 77

Objectifs 81

Résultats 83

Discussion 87

Bibliographie 98

Annexe 1 *« Breast milk contains the prototypic long pentraxin PTX3 that may rapidly spread in neonate tissues »* ***..... 115***

Annexe 2 *« Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages »* ***..... 119***

Index des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Les mécanismes de défense de l'épithélium pulmonaire lors d'une infection virale. 10
Figure 2 : Reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK : Balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs. 12
Figure 3 : Les différentes sous-populations de macrophages. 15
Figure 4 : Les voies d'internalisation et de présentation des antigènes par les cellules dendritiques. 17
Figure 5 : La communication cellulaire par les mastocytes favorise les défenses de l'hôte. 19
Figure 6 : Rôle des éosinophiles au sein de l'immunité innée et leurs contributions dans la défense de l'hôte. ... 21
Figure 7 : La maturation du neutrophile. 22
Figure 8 : Les différentes étapes de la migration trans-endothéliale du neutrophile. 28
Figure 9 : Représentation schématique de la phagocytose d'un micro-organisme par le neutrophile. 29
Figure 10 : Génération de ROS par le complexe de la NADPH oxydase dans le phagosome suite à l'ingestion d'une bactérie. 30
Figure 11 : Les mécanismes impliqués dans la formation des NETs. 31
Figure 12 : Représentation schématique des différentes classes de Scavenger Receptors. 33
Figure 13 : Représentation schématique des récepteurs aux lectines de type C. 35
Figure 14 : Représentation schématique des pentraxines humaines courtes et longues. 42
Figure 15 : Structure du gène et de la protéine CFTR. 52
Figure 16 : Les différentes classes de mutations affectant le gène codant pour la protéine CFTR. 54
Figure 17: La mucoviscidose, une maladie polyviscérale. 57
Figure 18 : Graphique représentant les germes respiratoires en fonction de l'âge des patients atteints de mucoviscidose. 59
Figure 19 : Importance de la balance protéases/anti-protéases au niveau des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. 75
Figure 20 : Augmentation du stress oxydatif dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. 76
Figure 21 : Signalisation et expression des TLRs altérées au niveau de l'épithélium des voies respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. 79

Tableaux

Tableau 1 : Contenu des différents granules du neutrophile. 23
Tableau 2 : Principales caractéristiques de l'élastase du neutrophile, de la protéinase 3 et de la Cathepsine G. 25
Tableau 3 : Exemples de ligands dérivés de micro-organismes pour les molécules TLR humaines. 38
Tableau 4 : Principales caractéristiques des ficolines humaines. 40
Tableau 5 : Micro-organismes reconnus par les collectines. 41
Tableau 6 : Principaux ligands décrits pour les pentraxines. 47
Tableau 7 : Signes et symptômes associés à la mucoviscidose. 56
Tableau 8. Comparaison entre le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le CFRD. 60
Tableau 9 : Exemples d'essais cliniques en cours dans le traitement palliatif de la mucoviscidose. 62
Tableau 10 : Exemples d'actions de l'élastase du neutrophile. 74
Tableau 11. Phénotypes pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose, des souris déficientes en CFTR et des souris transgéniques ENaC. 95

Abréviations

AAT : alpha$_1$-antitrypsine
ABPA: aspergillose bronchopulmonaire allergique
ACAMPs: « apoptotic cell-associated molecular patterns »
ADCC: « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity »
ADN: acide désoxyribonucléique
ARN: acide ribonucléique
ASL : « airway surface liquid »
BDCA-2: « blood dendritic cell antigen-2 »
BPI: « bactericidal/permeability increasing protein »
CatG: cathepsine G
CD: « cluster of differenciation »
CFRD: « cystic fibrosis-related diabetes »
CFTR: « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator »
CMH-I: complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II: complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CMV : cytomégalovirus
CPA: cellule présentatrice d'antigènes
CRD: « carbohydrates recognition domain »
CRP: « C-reactive protein »
DC: « dendritic cell»
DCL-1: « DEC-205-associated C-type lectin-1 »
DC-SIGN: « Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin »
DIOS: « distal intestinal obstruction syndrome »
ECP: « eosinophilic cationic protein »
EDN: « eosinophil-derived neurotoxin »
ENaC: « Epithelial sodium channel »
EPO: « eosinophil peroxydase »
FcR: récepteur aux fragments Fc
fMLP: « formylmethionyl-leucylphenylalanine »
G-CSF: « granulocyte colony-stimulating factor »
GM-CSF: « granulocyte macrophage colony-stimulating factor »
hCAP-18: « human Cationic Antimicrobial Peptide 18 kDa »
HNE: « human neutrophil elastase »
HNP: « human neutrophil peptides »
HSP: « heat shock protein »
IFN: interféron
Ig: immunoglobuline
IL: interleukine
ILT7: « immunoglobulin-like transcript 7 »
KIRs: « killer immunoglobulin-like receptors »
LBA: lavage broncho-alvéolaire

LDL: « low-density lipoprotein »
LIF: « Leukemia Inhibitory Factor »
LPS: lipopolysaccharide
LTA: acide lipotéichoïque
LTB4: leucotriène B4
MASP: « MBL-associated serine proteases »
MBL: « mannan-binding lectin »
MBP: « major basic protein »
MC: « mast cell »
MDA-5: « melanoma differentiation associated gene-5 »
mDC: « myeloid dendritic cell »
MMP: métalloprotéase
MPO: myéloperoxydase
MR: « mannose receptor »
NETs: « neutrophil extracellular traps »
NGAL: « neutrophil gelatinase-associated lipocalin »
NLR: « NOD-like receptor »
NOD: « nucleotide-binding, oligomerization domain »
NK: « natural killer »
NRAMP-1: « natural resistance-associated macrophage protein 1 »
NSP: « neutrophil serine proteases »
OmpA: « outer membrane protein A »
ORCC : « Outwartly Rectifying Chloride Channel »
Ox-LDL: « oxidized low-density lipoprotein »
PAF: « platelet-activating factor »
PAMP: « pathogen-associated molecular pattern »
pDC: « plasmacytoid dendritic cell »
PNN: polynucléaire neutrophile
PR3: protéinase 3
PRR: « pattern recognition receptor »
PTX: pentraxine
RIG-1: « retinoic acid-inducible gene-I »
RLR: « RIG-I-like receptors »
RNI: « reactive nitrogen intermediates »
ROCK-I: « Rho-associated kinase-I »
ROS: « reactive oxygen species »
SAP: « serum amyloid P »
SCF: « stem cell factor »
SNP : « single nucleotide polymorphism »
SLPI : « secretory leukocyte protease inhibitor »
SR: « scavenger receptor »
TCR: « T-cell receptor »
TGF-β: « transforming growth factor beta »
TLR: « toll-like receptor »

TNF-α: « tumor necrosis factor alpha »
TRAIL: « TNF-related apoptosis-inducing ligand »
TSLP: « thymic stromal lymphopoietin »
VEMS: volume expiré maximal en une seconde
VRS: virus respiratoire syncytial

Introduction

La fonction principale du système immunitaire est de protéger l'organisme contre une multitude de microbes afin de prévenir ou de protéger des infections. La protection contre les pathogènes repose sur des interactions complexes entre les cellules et les molécules qui composent le système immunitaire. Ce système comprend deux grands mécanismes de défense : (i) l'immunité innée et (ii) l'immunité adaptative.

Le terme d'immunité innée couvre l'ensemble des mécanismes de défenses antimicrobiennes non-spécifiques d'antigènes et qui sont utilisés par l'hôte immédiatement ou dans les heures qui suivent l'exposition à un micro-organisme. La première ligne de défense de l'immunité innée est constituée par les barrières épithéliales. Les épithéliums représentent des barrières physiques (e.g. cils, mucus, jonctions serrées), chimiques (e.g. acides gras, enzymes, peptides antimicrobiens) et microbiologiques (e.g. compétition de la flore commensale pour les nutriments et l'attachement à l'épithélium) contre les pathogènes. Les cellules immunitaires de l'immunité innée jouent également un rôle prépondérant : les cellules d'origine myéloïde (e.g. monocytes, macrophages, cellules dendritiques (DC), mastocytes et granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles)) et les cellules d'origine lymphoïde (e.g. cellules « Natural killer » (NK) ; cellules NKT et lymphocytes T γδ). Chez les vertébrés, l'immunité innée est complétée par l'immunité adaptative qui intervient plus tardivement dans l'infection. L'immunité adaptative permet d'initier des réponses immunitaires spécifiques d'antigènes et d'établir une mémoire immunitaire responsable de la protection à plus long terme. L'immunité adaptative découle des mécanismes initiés par le système immunitaire inné. L'immunité adaptative est organisée autour de deux classes de cellules spécialisées : les lymphocytes B et les lymphocytes T, qui expriment des répertoires de récepteurs de l'ordre de 10^{14} pour les lymphocytes B et de 10^{18} pour les lymphocytes T [1], codés par réarrangements géniques.

Une des étapes cruciales dans l'initiation des réponses immunitaires est la capacité des cellules de l'organisme à reconnaître les microbes. Cette reconnaissance se fait via une famille de récepteurs appelés « Pattern Recognition Receptor » ou PRRs. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires très conservés, exprimés exclusivement par les micro-organismes et appelés « Pathogen-Associated Molecular Pattern » ou PAMPs [2] ; citons, à titre d'exemple le lipopolysaccharide (LPS), l'acide lipotéichoïque (LTA), les manannes et les

glucanes. Les PRRs sont également impliqués dans la reconnaissance du soi modifié (lipoprotéines de faible densité oxydées (OxLDL), cellules apoptotiques), soulignant le rôle des PRRs dans la détection de composants représentant des signaux de danger pour le système immunitaire, qu'ils soient d'origine endogène (cellules mortes) ou d'origine exogène (microbes). Les PRRs sont classés en trois familles sur la base de leurs fonctions et de leurs profils d'expression : les récepteurs d'endocytose et les récepteurs de signalisation (associés aux cellules) et les récepteurs solubles.

L'immunité innée participe à l'élimination des pathogènes (e.g. phagocytose, sécrétion de peptides antibactériens, activation du complément) et à l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative spécifique du pathogène rencontré. L'importance du système immunitaire apparaît de façon dramatique chez les personnes qui, présentant un déficit immunitaire constitutif (e.g. déficits cellulaires, déficits moléculaires), sont sensibles à des infections graves menaçant souvent le pronostic vital.

Au fil de cette introduction, nous nous intéresserons plus particulièrement aux acteurs cellulaires et moléculaires composant l'immunité innée. Nous porterons une attention plus particulière aux neutrophiles, acteurs majeurs de l'inflammation liée à la mucoviscidose. Concernant les acteurs moléculaires, nous évoquerons les trois classes de récepteurs en insistant plus particulièrement sur le récepteur soluble pentraxine 3 (PTX3), molécule au cœur des travaux que j'ai réalisés. Puis nous évoquerons quelques généralités sur la mucoviscidose avant de nous intéresser à la place de l'immunité innée au sein de cette maladie. Cette dernière partie sera une transition vers les travaux présentés dans la partie « résultats » qui concernent l'implication de la molécule PTX3 dans les infections associées à la mucoviscidose. En discussion, je replacerai les résultats obtenus dans un contexte plus général et évoquerai les perspectives de ce travail.

Les autres travaux que j'ai réalisés ou auxquels j'ai participé seront présentés en annexe.

1. L'immunité innée

A. Les cellules de l'immunité innée

Dans cette section, nous aborderons les composantes cellulaires de l'immunité innée : les épithéliums, les cellules d'origine lymphoïde et les cellules d'origine myéloïde.

1. Les épithéliums

Les portes d'entrée les plus fréquentes des micro-organismes, à savoir la peau, le tractus respiratoire, le tractus gastro-intestinal et le tractus génito-urinaire, sont protégées par des épithéliums qui constituent des barrières physiques contre les microbes. Les épithéliums sont en première ligne face aux micro-organismes et sont capables de jouer un rôle important dans la détection des pathogènes et l'activation d'une réponse immunitaire par l'hôte afin de les éliminer. L'épithélium est tapissé par une couche de mucus qui diffère largement au niveau de sa composition et de sa structure en fonction de sa localisation : le mucus est épais et adhérent au niveau de l'épithélium intestinal et mince et mobile au niveau des voies respiratoires (Figure 1). Les mucines, principales glycoprotéines constituant le mucus, possèdent une variété de chaînes carbohydrates capable de fixer les hémagglutinines et les adhésines de divers pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou *Staphylococcus aureus*, pour faciliter l'élimination mucociliaire [3]. Les cellules épithéliales sont capables de libérer une variété de cytokines (interleukine 6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-1β), de chimiokines (telles que CCL20 (recrutement des cellules dendritiques immatures), CXCL8 (recrutement des neutrophiles), CCL5 (recrutement des éosinophiles) et CCL3 (recrutement des lymphocytes, des monocytes et des éosinophiles) [3]) et de facteurs de croissance (granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), transforming growth factor-β (TGF-β)) en réponse à divers stimuli (cytokines pro-inflammatoires, pathogènes), pour recruter et activer les cellules de l'immunité (Figure 1). A titre d'exemple, les cellules épithéliales intestinales, en réponse à une infection à *Vibria cholera*, sécrètent les cytokines pro-inflammatoires IL-1α, IL-1β, IL-6, CCL2, GM-CSF, TNF-α, et CXCL5 avec une réduction simultanée des cytokines anti-inflammatoires, telles que le TGF-β [4]. Les épithéliums sécrètent également des peptides antimicrobiens tels que les défensines, les cathélicidines, le lysozyme et la lactoferrine. La production des défensines de type β peut être constitutive, comme pour hBD-1 au niveau des épithéliums pulmonaires et intestinaux, ou régulée par des médiateurs inflammatoires, comme pour hBD-2, hBD-3 et hBD-4 [3, 5].

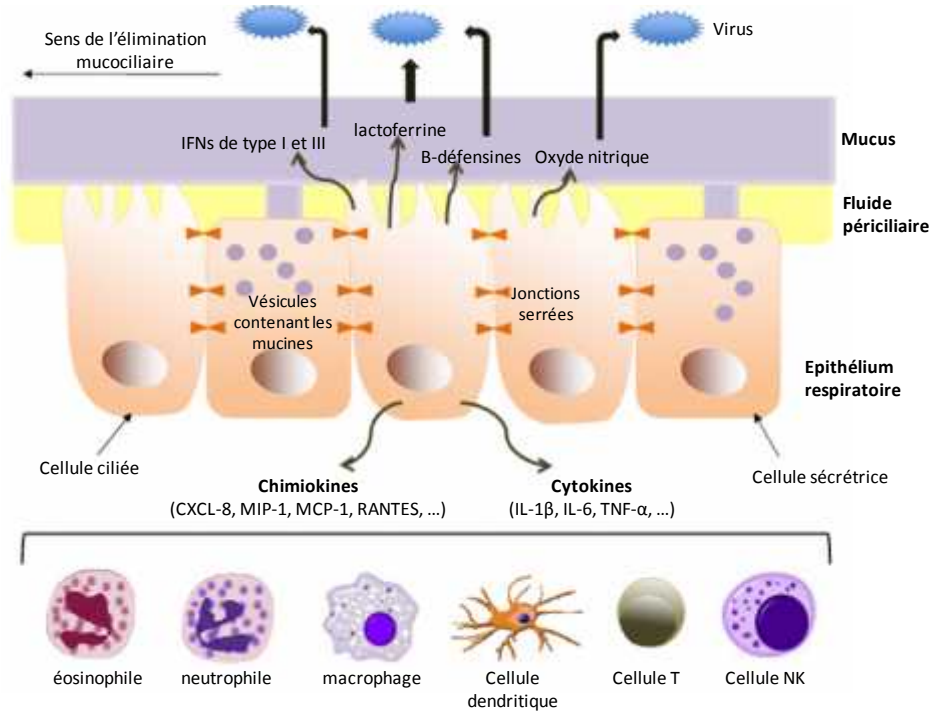


Figure 1 : Les mécanismes de défense de l'épithélium pulmonaire lors d'une infection virale. Les cellules épithéliales agissent comme une barrière contre les pathogènes. L'appareil mucociliaire (cils et mucus) et les jonctions serrées (maintien de l'intégrité des cellules épithéliales) ajoutent une protection mécanique, biologique et chimique à l'épithélium. L'épithélium respiratoire régule également les réponses de l'immunité innée par la production de substances antivirales telles que les interférons (IFN), la lactoferrine, les β-défensines et l'oxyde nitrique dans le mucus, la production de cytokines et chimiokines qui recrutent et activent les cellules immunitaires dans la sous-muqueuse. Adapté de Vareille *et al*, 2011 [6].

2. Les cellules d'origine lymphoïde

Les cellules d'origine lymphoïde de l'immunité innée comprennent les cellules NK, les cellules NKT et une sous-population de cellules T, les lymphocytes T γδ.

a) Les cellules Natural Killer

Depuis leur identification en 1975, les cellules NK ont été classées comme lymphocytes sur la base de leur morphologie (grands lymphocytes granuleux), l'expression de divers marqueurs lymphoïdes et leur origine puisqu'elles proviennent d'un progéniteur commun lymphoïde [7]. Les cellules NK représentent environ 15 % de la population lymphocytaire circulante et se définissent phénotypiquement par l'expression de CD56 et l'absence d'expression de CD3 [8]. Elles sont également présentes dans divers organes, tels que le foie, les poumons et la rate. Les cellules NK sont divisées en deux sous-populations selon l'expression du CD56 qui peut être faible ($CD56^{dim}$) ou forte ($CD56^{bright}$). La majorité des cellules NK (~90 %) sont $CD56^{dim}$ $CD16^{bright}$ et expriment la perforine. Ces cellules NK

sont cytotoxiques et produisent de l'IFN-γ après interaction avec des cellules tumorales in vitro. Les autres cellules NK (~10 %) sont $CD56^{bright}$ $CD16^{dim}$ ou $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$ et n'expriment pas la perforine. Ces cellules produisent rapidement de l'IFN-γ en réponse à des stimulations par des cytokines, telles que IL-12, -15 et -18.

Les cellules NK sont capables de reconnaître et de détruire des cellules infectées par des micro-organismes (principalement des virus) ou des cellules tumorales. Les cellules NK sont caractérisées par deux principales fonctions effectrices : la cytotoxicité et la sécrétion de cytokines et de chimiokines. La cytotoxicité des cellules NK emprunte deux voies :

- La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (« Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity »): les immunoglobulines se fixent au CD16 via leur région constante et à un antigène exprimé par la cellule cible. Le pont créé entre les deux cellules induit la libération de médiateurs cytotoxiques qui déclenchent la mort de la cellule cible [8].

- La cytotoxicité dite naturelle : Ce mécanisme comprend (i) la sécrétion de protéines cytotoxiques contenues dans les granules, telles que la perforine qui agit directement sur la membrane de la cellule cible en permettant la formation de pores, ou les granzymes qui induisent l'apoptose des cellules cibles par activation de la voie mitochondriale et de la voie des caspases [9] ; et (ii) l'expression de protéines membranaires appartenant à la superfamille du TNF, telles que le ligand de Fas (FasL) et le TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Ces deux protéines interagissent respectivement avec Fas et le récepteur de TRAIL (TRAIL-R) exprimés par les cellules cibles. Cette interaction permet la trimérisation de ces récepteurs et l'activation de leur domaine de mort, ce qui aboutit à l'activation des caspases et l'apoptose des cellules cibles [9].

En plus de leurs fonctions cytotoxiques, les cellules NK possèdent des fonctions immunorégulatrices via la production de cytokines et de chimiokines (e.g. IFN-γ, TNF-α, IL-13, IL-10, GM-CSF, MIP-1α (CCL3) et RANTES (CCL5)) [10], en réponse à divers stimuli, régulant ainsi les réponses immunitaires innée et adaptative.

La fonction des cellules NK est contrôlée par des combinaisons de récepteurs activateurs et de récepteurs inhibiteurs présents à leur surface. L'intégration des signaux de signalisation issus de ces récepteurs après contact avec une cellule cible détermine l'état d'activation des cellules NK. Parmi ces récepteurs, les récepteurs « Killer Immunoglobulin-like Receptors » (KIRs) sont soit inhibiteurs, soit activateurs, tandis que les récepteurs de

cytotoxicité naturelle, comme NKp30, NKp44 et NKp46, sont activateurs. In vivo, les cellules NK sont constitutivement sous l'influence dominante des récepteurs inhibiteurs des ligands endogènes des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Ainsi, les fonctions effectrices des cellules NK ne sont activées que lorsque les signaux issus des récepteurs activateurs l'emportent sur ceux des récepteurs inhibiteurs (Figure 2).

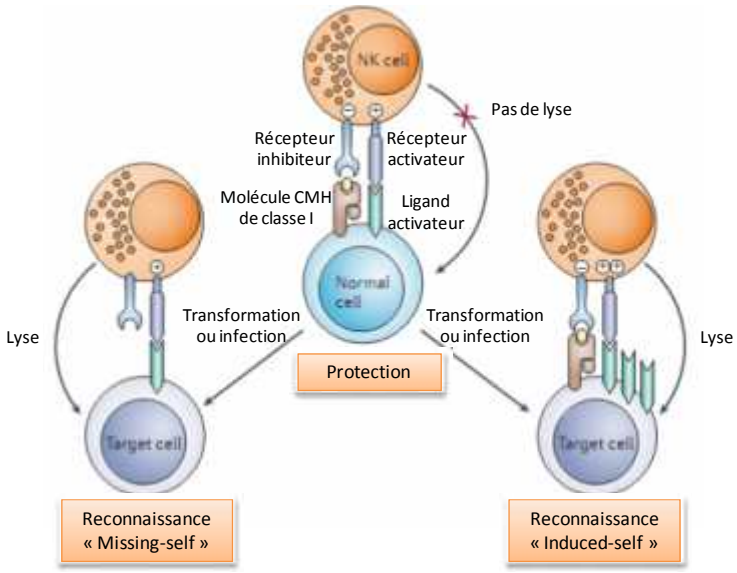


Figure 2 : Reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK : Balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs. Les cellules normales sont protégées de la lyse par les cellules NK quand les signaux activateurs reçus sont contre-balancés par les signaux inhibiteurs émis par les molécules CMH de classe I. Cependant, une cellule cible (ou target cell) peut perdre l'expression des molécules CMH-I (cas des cellules tumorales ou infectées par un virus), le signal activateur ne sera pas contre-balancé conduisant à l'activation de la cellule NK et donc à la lyse de la cellule cible (reconnaissance « missing-self »). La transformation ou l'infection des cellules peuvent également augmenter l'expression de ligands stimulateurs conduisant ainsi à la lyse des cellules cibles (reconnaissance « induced-self »). Adapté de Raulet and Vance, 2006 [11].

b) Les cellules NKT

Les cellules NKT sont une sous-classe unique de lymphocytes qui expriment des marqueurs de cellules NK (CD56, CD161, CD94), ainsi qu'un TCR (« T-cell receptor ») α/β. Au contraire des lymphocytes T conventionnels, le TCR des cellules NKT n'interagit pas avec les peptides antigéniques présentés par les molécules CMH de classe I et II, mais reconnaît des glycolipides présentés dans une molécule de CMH-I non conventionnelle, la molécule CD1d [12]. Les ligands des cellules NKT sont notamment le glycolipide synthétique α-galactosylceramide et les glycosphingolipides bactériens, tels que l'α-glucuronosylceramide et l'α-galacturosylceramide [12]. Les cellules NKT sont impliquées dans la réponse

immunitaire contre un certain nombre d'infections (e.g. infections virales et malaria), dans la réponse anti-tumorale ainsi que dans certaines maladies auto-immunes, telles que le diabète, l'athérosclérose et le lupus [12].

c) Les lymphocytes T γδ

Les lymphocytes T γδ expriment un TCR composé des chaînes γ et δ contrairement aux lymphocytes conventionnels qui possèdent un TCR αβ. Les lymphocytes T γδ sont localisés en majorité dans les épithéliums des muqueuses digestives et respiratoires. Dans le sang périphérique d'un individu adulte sain, les lymphocytes T γδ représentent 1-10 % des cellules T circulantes. Différents micro-organismes ainsi que les cellules tumorales sont capables d'activer les lymphocytes T γδ par le biais de molécules impliquées dans la synthèse du cholestérol et appelées phospho-antigènes. Ces cellules T possèdent des fonctions cytotoxiques (sécrétion de perforine-granzyme et expression de protéines de mort (e.g. FasL)), semblables aux cellules NK. Les lymphocytes T γδ sécrètent également des granulysines et des cathélicidines qui jouent un rôle antiviral et antibactérien. Les lymphocytes T γδ activés par des phospho-antigènes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 (e.g. IFN-γ et TNF-α). Ils peuvent également sécréter des cytokines de type Th2 (e.g. IL-4), comme observé pour les cellules T γδ dans les lavages broncho-alvéolaires de patients présentant un asthme allergique (pour revue [13]).

3. Les cellules d'origine myéloïde

Les cellules d'origine myéloïde de l'immunité innée comprennent les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et les granulocytes.

a) Les monocytes et les macrophages

Les monocytes prennent leur origine des cellules progénitrices myéloïdes $CD34^+$ de la moelle osseuse. Ils sont ensuite libérés dans la circulation sanguine sous forme de cellules non différenciées et circulent dans le sang pendant 1 à 3 jours [14]. Les monocytes circulants représentent 5-10 % des leucocytes sanguins périphériques et présentent une hétérogénéité morphologique. Les monocytes humains se divisent en trois sous-classes sur la base de l'expression en surface des molécules CD14 (co-récepteur au LPS) et CD16 [15]. Les monocytes $CD14^{++}$ $CD16^-$ (monocytes classiques) représentent 80 à 90 % des monocytes circulants et expriment fortement les récepteurs CCR2 et faiblement CX3CR1 et CCR5 [16]. Les monocytes $CD14^{++}$ $CD16^+$ (monocytes dits intermédiaires) expriment les récepteurs aux Ig (FcR) CD64 et CD32, possèdent une activité phagocytique et produisent du TNF-α et de

l'IL-1 en réponse au LPS [17]. Les monocytes $CD14^{+}$ $CD16^{++}$ (monocytes dits non classiques) ont une plus faible activité phagocytique [16]. Ils produisent du TNF-α, de l'IL-1 et du CCL3 en réponse aux virus [18].

Après recrutement dans les tissus, les monocytes peuvent se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques myéloïdes [19].

Les macrophages représentent une population cellulaire hétérogène et dynamique. Par analogie avec la classification Th1/Th2, les macrophages ont été classés en cellules M1 et M2. Les motifs bactériens (LPS) et l'IFN-γ (cytokine de type Th1) polarisent les macrophages vers un phénotype activateur M1. Les macrophages M1 sont caractérisés par leur capacité à sécréter de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-23 et TNF-α), RNI (« reactive nitrogen intermediates »), ROS (« reactive oxygen species »), leur forte expression en molécules CMH de classe II et de molécules costimulatrices, une présentation antigénique efficace et une activité antimicrobienne et anti-tumorale. En revanche, la polarisation M2 est induite en réponse aux cytokines de type Th2, telle que l'IL-4. Ils possèdent une forte activité phagocytique, une plus forte expression des récepteurs d'épuration (« scavenger receptors » ou SR), des récepteurs au mannose et au galactose comparativement aux cellules M1, et produisent peu d'IL-12 mais beaucoup d'IL-10 après stimulation. En général, ces cellules participent à l'élaboration d'une réponse immunitaire de type Th2 pour favoriser l'élimination des parasites, réduire l'inflammation, favoriser le remodelage tissulaire et le développement tumoral. Ces cellules possèdent également des fonctions immunorégulatrices. Trois catégories de macrophages M2 ont été identifiées: les macrophages M2a induits par l'IL-4 ou l'IL-13 ; M2b induits par des complexes immuns, des ligands des récepteurs de type Toll (TLRs) ou IL-1R ; et M2c induits par l'IL-10 et les hormones glucocorticoïdes [20-23] (Figure 3). Une nouvelle catégorie de macrophages M2 a récemment été décrite, les macrophages associés aux tumeurs ou M2d [24]. Ils sont générés en présence des cytokines IL-6 et LIF (« Leukemia Inhibitory Factor ») présentes dans l'environnement tumoral [24].

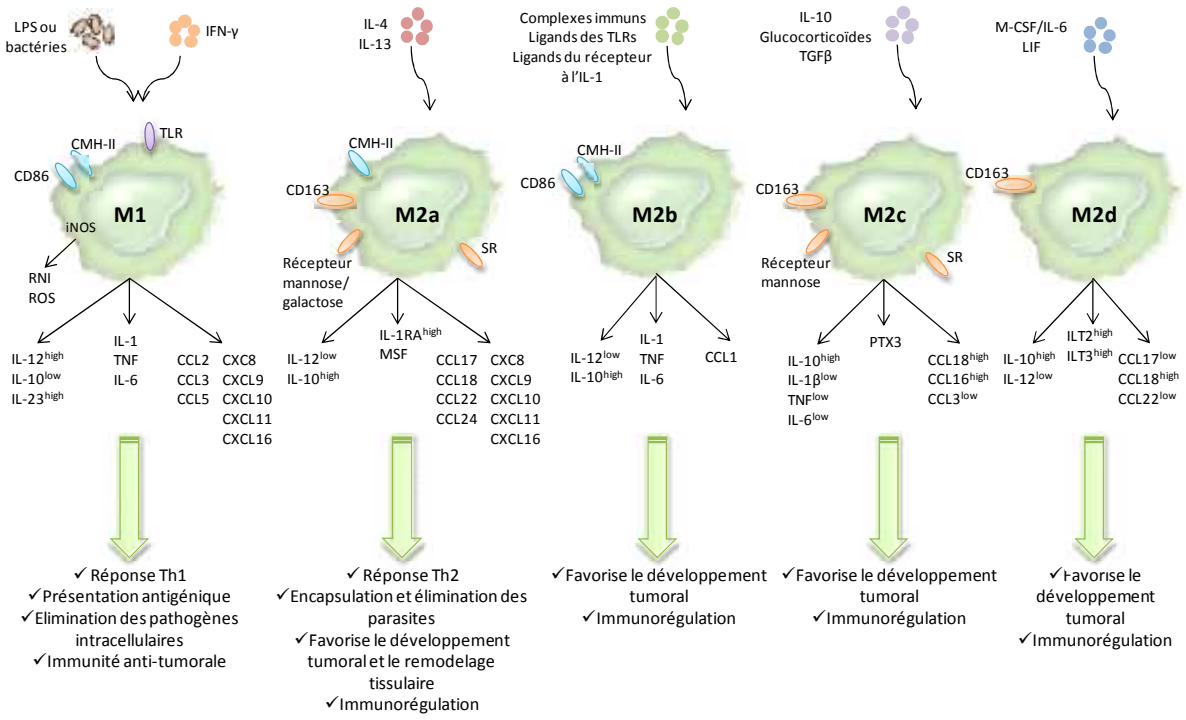


Figure 3 : Les différentes sous-populations de macrophages. Les macrophages se polarisent et acquièrent différentes fonctions en réponse à des signaux environnementaux. L'exposition des macrophages à l'IFN-γ et au LPS conduit à une polarisation de type M1, avec un fort potentiel cytotoxique et des propriétés anti-tumorales, alors que les macrophages M2 sont en général plus immunorégulateurs et ont des fonctions pro-tumorales. Les macrophages M2a (induits par l'IL-4 et l'IL-13) et M2b (induits par des complexes immuns et des ligands des TLRs ou IL-1R) exercent des fonctions immunorégulatrices et entrainent une réponse de type Th2, alors que les M2c (induits par l'IL-10) sont davantage liés à l'immunosuppression et le remodelage tissulaire. Les M2d ou macrophages associés aux tumeurs sont générés en présence d'IL-6 et de LIF présentes dans l'environnement tumoral. Abréviations: RNI, reactive nitrogen intermediates; ROS, reactive oxygen species; SR, Scavenger receptor; TLR, Toll-like receptor. Adapté de Mantovani *et al*, 2004, 2010 et 2012, Benoit *et al*, 2008 et Duluc *et al*, 2007 [20-24].

b) Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et jouent un rôle primordial dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives.

Chez l'homme, les DC sont classées en deux sous-types : les DC myéloïdes (mDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). In vivo, les mDC existent au moins dans trois compartiments : les DC résidentes des tissus périphériques, les DC résidentes des organes lymphoïdes secondaires et les mDC du sang. Dans la peau, deux types de mDC sont retrouvées : les cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme et les DC interstitielles, au niveau du derme [25]. Les pDC sont d'origine lymphoïde et sont caractérisées par l'expression de CD123

(chaîne α du récepteur à l'IL-3), de BDCA-2 (blood dendritic cell antigen-2) et de ILT7 (immunoglobulin-like transcript 7). Après activation, les pDC représentent une source importante d'interféron de type I [26]. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles capables d'activer les lymphocytes T naïfs [27]. Dans les tissus sains, les DC sont dans un état immature et sont caractérisées par une importante capacité de phagocytose et une faible expression des molécules du CMH de classe II et des molécules de costimulation [27]. Les DC immatures sont capables de capturer une grande variété de molécules et de micro-organismes et les apprêter sous forme de peptides antigéniques. Différents mécanismes peuvent être utilisés par les DC pour capturer les antigènes : l'endocytose, la phagocytose ou la pinocytose (Figure 4). En effet, les DC expriment divers récepteurs facilitant l'internalisation des antigènes, tels que les récepteurs au mannose, les récepteurs d'épurations (scavenger receptors) et les lectines de type C (cf section 1 B). Après capture des antigènes et activation, les DC vont entamer un processus de maturation [25] caractérisé par: (i) des changements morphologiques avec perte des structures adhésives, la réorganisation du cytosquelette et la capacité de migrer ; (ii) la perte des récepteurs d'endocytose/phagocytose ; (iii) la sécrétion de chimiokines pour attirer d'autres cellules immunitaires ; (iv) l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation (notamment CD40, CD80 et CD86) ; (v) l'expression des molécules CMH de classe II; et (vi) la sécrétion de cytokines pour la différenciation et la polarisation des cellules T effectrices. Les DC migrent jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles vont présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs. Classiquement, un antigène exogène internalisé par les DC est présenté dans les molécules CMH de classe II aux lymphocytes T $CD4^+$ alors qu'un antigène endogène est présenté dans les molécules CMH de classe I aux lymphocytes T $CD8^+$. Cependant, dans certaines conditions, les DC peuvent présenter des antigènes exogènes dans les molécules CMH de classe I, processus appelé présentation antigénique croisée [28] (Figure 4).

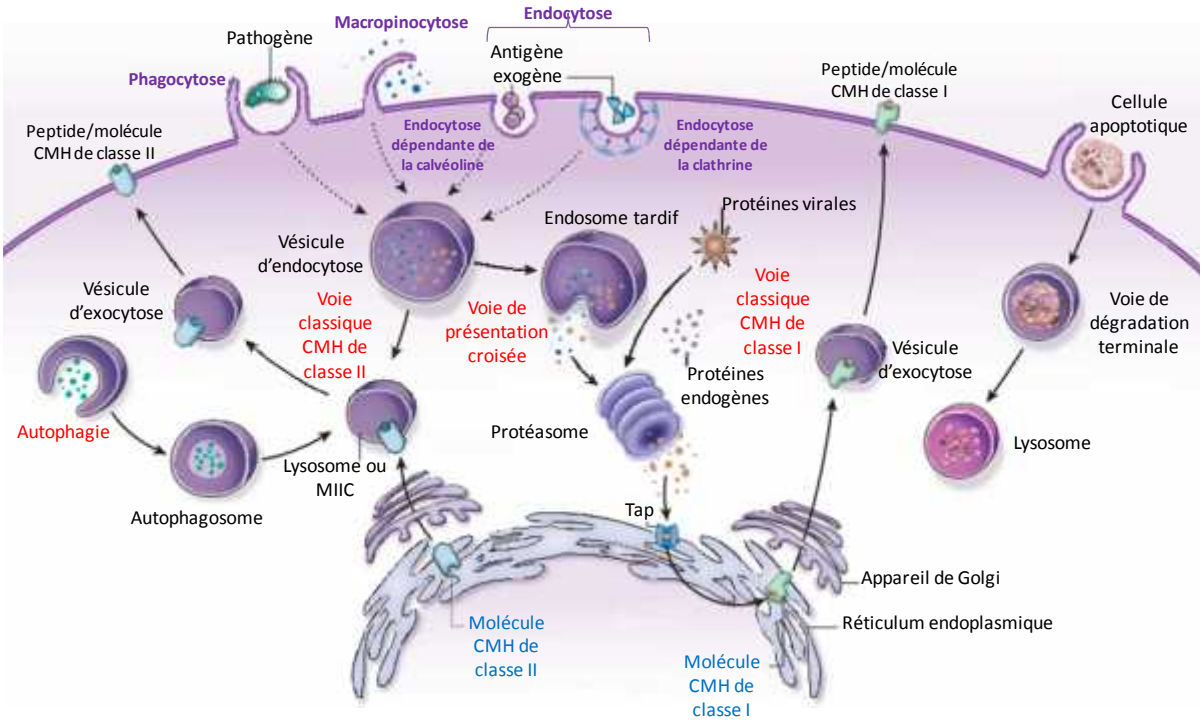


Figure 4 : Les voies d'internalisation et de présentation des antigènes par les cellules dendritiques. Les éléments exogènes (protéines ou microbes) sont internalisés par phagocytose (particules >0,5 µm de diamètre), par macropinocytose (particules de 0,5 à 5 µm de diamètre) ou par endocytose dépendante de la clathrine (particules ~ 100 nm de diamètre) ou dépendante de la calvéoline (particules ~ 60 nm de diamètre). Les antigènes exogènes sont ensuite apprêtés dans les vésicules d'endocytose puis chargés dans les molécules CMH de classe II au niveau des lysosomes ou des compartiments CMH de classe II (MIIC). Les complexes peptide/molécule CMH-II sont présentés à la surface des DC aux LT $CD4^+$. Les protéines endogènes ou virales sont chargées dans les molécules CMH de classe I puis le complexe peptide/molécule CMH-I est transporté à la surface de la cellule. Des antigènes exogènes peuvent être également présentés dans les molécules CMH de classe I, processus appelé présentation antigénique croisée. Adapté de Hubbell *et al*, 2009 et de Underhill and Goodridge, 2012 [29, 30].

c) Les mastocytes

La génération des mastocytes (mast cell ou MC) est contrôlée par le SCF ou « stem cell factor ». Les mastocytes humains sont hétérogènes et sont classifiés selon le type de protéases à sérine contenues dans leurs granules. Les cellules possédant seulement des tryptases sont appelées MC_T (essentiellement retrouvées dans la muqueuse du petit intestin et au niveau des alvéoles pulmonaires), alors que les mastocytes ayant seulement des chymases sont connus sous le nom de MC_C (présents dans les tissus synoviaux). Les mastocytes possédant ces deux types de protéases sont appelés MC_{TC} et sont principalement retrouvés dans la peau, les ganglions et la sous-muqueuse digestive [31]. Différents microbes ou motifs

microbiens activent les mastocytes par divers récepteurs, tels que les récepteurs FcγR et FcεRI, les TLRs et les récepteurs du complément. Les mastocytes sont les principaux acteurs de la réaction allergique. Lorsqu'ils sont en contact avec un allergène et qu'ils présentent à leur surface des IgE spécifiques, ils libèrent rapidement des médiateurs, par un mécanisme d'exocytose. Selon le type et les combinaisons de stimuli que les mastocytes reçoivent, ils peuvent sécréter divers médiateurs (préformés ou néo-synthétisés) biologiquement actifs qui vont permettre de déclencher, d'orienter ou de supprimer la réponse immunitaire (Figure 5).

Les mastocytes sont impliqués dans la réponse protectrice de type Th2 contre les helminthes, par la régulation de l'IL-25, l'IL-33 et TSLP (« thymic stromal lymphopoietin ») [32]. Les mastocytes ont également un rôle important contre les infections bactériennes telles que *Klebsiella pneumionae*, *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa* [33-35]. Après activation par ces bactéries, les mastocytes sécrètent des cytokines, telles que le TNF-α, l'IL-6 ou l'IL-1β pour permettre le recrutement des neutrophiles, leur activation et l'élimination des pathogènes. Tout comme les neutrophiles, les mastocytes sont capables de générer des NETs (« Neutrophil Extracellular Traps ») (voir section 1.A.d) qui contiennent entre-autre des protéases et des peptides antimicrobiens (LL-37) [36].

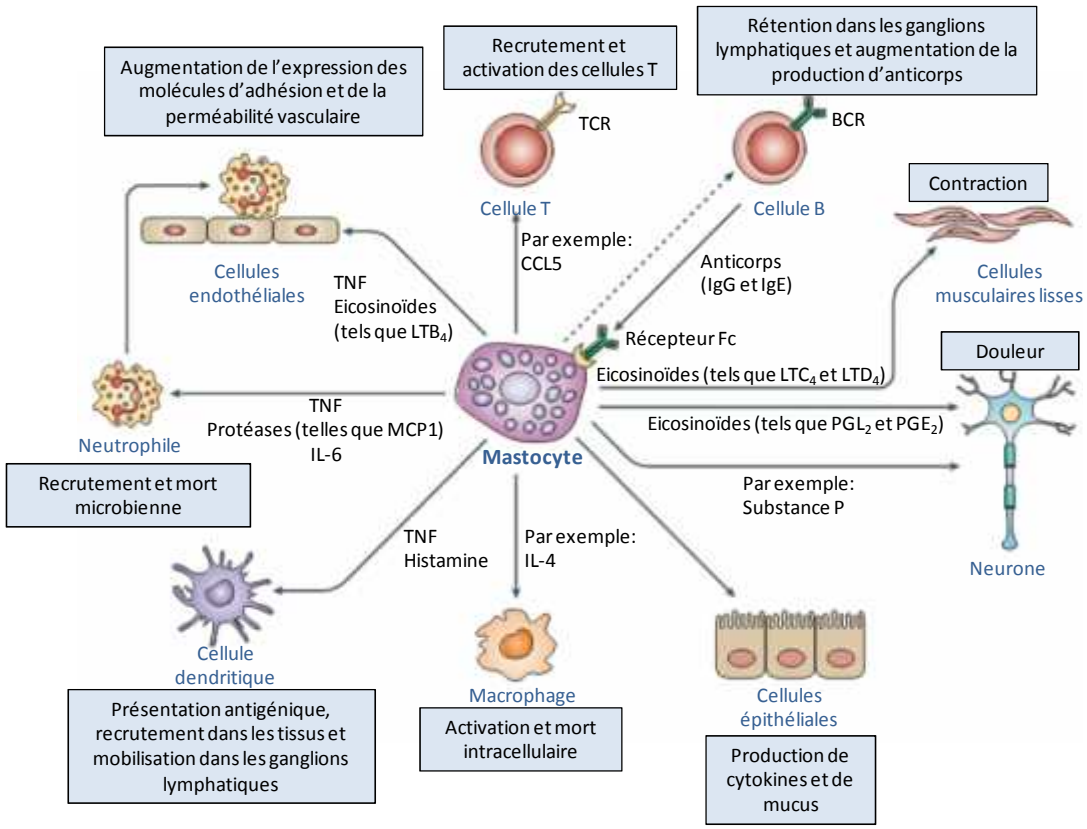


Figure 5 : La communication cellulaire par les mastocytes favorise les défenses de l'hôte. Les mastocytes communiquent avec divers types cellulaires, incluant les cellules immunitaires (telles que les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles), les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Ces interactions contribuent à la surveillance des pathogènes, l'immunité antimicrobienne et d'autres mécanismes d'élimination des micro-organismes de l'hôte. Les cellules cibles des mastocytes sont localisées à la fois au niveau du site d'infection et à distance des ganglions. Des exemples des conséquences fonctionnelles de la communication cellulaire par les mastocytes sont représentés sur le schéma ainsi que les médiateurs, libérés par les mastocytes, impliqués dans ces interactions. Abréviations : BCR, B cell receptor ; CCL5, CC-chemokine ligand 5; IL, interleukin; LT, leucotriène; MCP1, mast cell protease 1 ; PG, prostaglandine ; TCR, T cell receptor ; TNF, tumor necrosis factor. D'après Abraham and John, 2010 [37].

d) Les granulocytes

Le terme de granulocyte regroupe un ensemble de cellules caractérisées par un noyau polylobé. Ils sont également caractérisés par la présence de granules dans leurs cytoplasmes. Les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles peuvent être distingués sur leurs affinités tinctorielles et leurs granulations spécifiques. La coloration de May-Grünwald Giemsa contient un colorant acide (éosine) marquant les composés basiques des cellules et des colorants basiques (bleu de méthylène et azur de méthylène) marquant les composés acides des cellules. Cette technique permet de distinguer les éosinophiles fixant l'éosine (coloration

des granules en rouge), des granules des basophiles colorés en bleu et des granules des neutrophiles ne fixant pas ou peu les colorants (cytoplasme rose ; ces cellules restent neutres).

✓ Les basophiles

Les basophiles représentent moins de 1 % des leucocytes circulants chez l'homme. Ils peuvent être activés par divers signaux incluant ceux fournis par des cytokines (IL-3, IL-18, IL-33), des immunoglobulines (IgE, IgD), des protéases, des ligands des TLRs et des facteurs du complément [38]. Bien qu'ils expriment différents TLRs, notamment les TLR1, 2, 4, 6 et 9, seuls les ligands du TLR2 sont capables d'activer les basophiles (induction d'IL-4 et d'IL-13) [39]. Les basophiles expriment également des récepteurs au complément (CR1, CR3 et CR4). Après activation, les basophiles produisent de l'histamine, des cytokines et des chimiokines. Ils sont connus pour être une importante source d'IL-4 favorable au développement d'une réponse T $CD4^+$ de type Th2. Récemment, il a été montré que les basophiles présentent des propriétés de cellules présentatrices d'antigènes : internalisation d'antigènes solubles et de complexes allergènes/IgE, expression de molécules CMH de classe II ainsi que des molécules costimulatrices, migration vers les ganglions lymphatiques et génération de cellules Th2 in vitro et in vivo [40-42].

✓ Les éosinophiles

Les granulocytes éosinophiles représentent 1-3 % des leucocytes circulants. La prolifération et la différenciation de ces cellules impliquent principalement trois cytokines : IL-3, GM-CSF et IL-5. Leurs granules contiennent notamment des protéines cationiques, telles que la protéine basique majeure (MBP), la protéine cationique de l'éosinophile (ECP), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) et la peroxydase de l'éosinophile (EPO). La MBP possède une activité cytotoxique contre certaines bactéries (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) mais aussi contre les helminthes (tels que *Schistosoma mansoni*). L'EDN et l'ECP sont des ribonucléases possédant une activité antivirale (virus respiratoire syncytial ou VRS). L'ECP est également une toxine puissante contre *Schistosoma mansoni*. L'EPO, en présence d'H_2O_2 et d'halides (Cl^-, Br^- ou I^-), tue une variété de micro-organismes, de parasites ainsi que des cellules tumorales [43]. Les éosinophiles ont la capacité d'internaliser, apprêter et présenter les peptides antigéniques dans les molécules CMH de classe II, de fournir des signaux costimulateurs aux cellules T par l'expression en surface de molécules, telles que CD80, CD86 et CD40, et d'interagir directement avec les cellules T $CD4^+$ [43] (Figure 6). Les éosinophiles peuvent également sécréter des pièges extracellulaires contenant de l'ADN

mitochondrial et des protéines, telles que l'ECP et la MBP, pour limiter l'invasion bactérienne [44] (Figure 6).

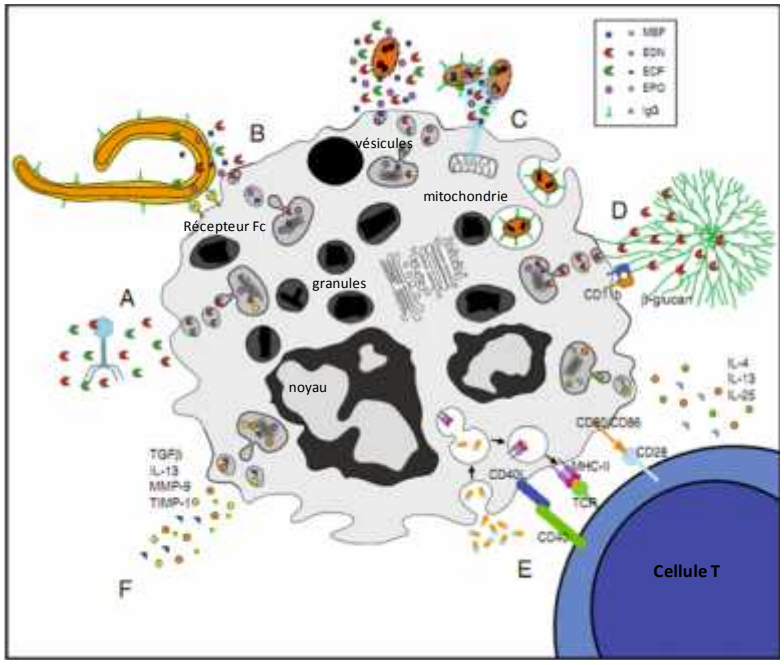


Figure 6 : Rôle des éosinophiles au sein de l'immunité innée et leurs contributions dans la défense de l'hôte. (A) L'interaction éosinophile-virions extracellulaires entraîne leurs destructions par les ribonucléases associées aux éosinophiles. (B) La fixation par les récepteurs FcγII des helminthes opsonisés par les immunoglobulines IgG1 et IgG3 favorise l'activation des éosinophiles et leur dégranulation. (C) Les éosinophiles stimulés par le LPS libèrent des pièges extracellulaires contenant de l'ADN mitochondrial et des protéines dérivées des granules pour éradiquer l'infiltration bactérienne. Les bactéries peuvent également être éliminées par les protéines contenues dans les granules et la phagocytose. (D) L'adhérence des β-glucanes aux intégrines CD11c induit la libération vésiculaire de l'EDN en réponse aux infections par des champignons. (E) Les éosinophiles agissent comme des immunomodulateurs, favorisent directement la différenciation des cellules T et fonctionnent comme des cellules présentatrices d'antigènes. (F) Les éosinophiles sécrètent de nombreux médiateurs qui ont des effets sur le remodelage tissulaire (TGFβ, IL-13 et des métalloprotéases). Adapté de Shamri *et al*, 2011 [45].

✓ Les neutrophiles

Après introduction du pathogène dans l'organisme, les neutrophiles sont les premières cellules de l'immunité innée à migrer du sang circulant vers le site d'infection pour contenir et éliminer les pathogènes, ceci par divers mécanismes (e.g. phagocytose, dégranulation, NETs). La biologie des neutrophiles est importante dans le projet et sera donc détaillée dans cette section.

Définition:

Les neutrophiles, encore appelés polynucléaires neutrophiles (ou PNN), sont les leucocytes sanguins les plus abondants ; ils représentent 40 à 80 % des globules blancs totaux.

Le nombre moyen de neutrophiles circulants dans le sang est d'environ 2.5-7.5x10^9/L et leur demi-vie est de 6 à 8 h. Les neutrophiles proviennent de la moelle osseuse, qui produit chaque jour environ 10^{11} neutrophiles. Les neutrophiles sont de taille moyenne, de 10 à 14 µm de diamètre.

Les neutrophiles se différencient à partir de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les stades cellulaires successifs sont le myéloblaste (MB), le promyélocyte (PMC), le myélocyte (MC), le métamyélocyte (MMC), le neutrophile non segmenté ou band cell (BC) et le neutrophile segmenté (Seg) (Figure 7). Ces différents stades sont régulés par plusieurs cytokines et facteurs de transcription.

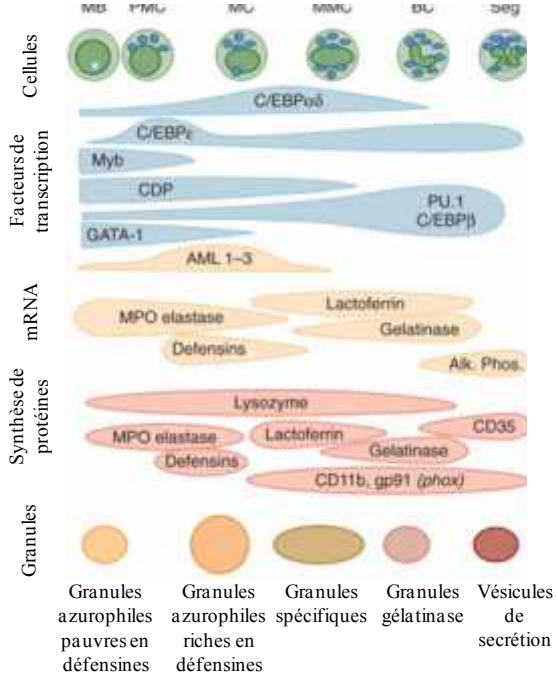


Figure 7 : La maturation du neutrophile. La maturation du neutrophile et le contrôle de la biosynthèse des protéines contenues dans les granules sont atteints par l'action combinée et séquentielle de facteurs de transcription spécifiques, incluant notamment PU.1, C/EBP. Les granules formés à une étape donnée de la maturation seront composées des protéines synthétisées au même moment. Abréviations: MB, myéloblaste; PMC, promyélocyte; MC, myélocyte; MMC, métamyélocyte; BC, band cell; Seg, segmented cell. Adapté de Orkin *et al*, Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, Volume 1, 7th edition, 2009.

Les granules du neutrophile :

Les granules se différencient par leur contenu en protéines (Tableau 1) dont l'expression est sous le contrôle de divers facteurs de transcription exprimés au cours de la différenciation du neutrophile (Figure 7).

	Granules azurophiles (primaires)	Granules spécifiques (secondaires)	Granules gélatinase (tertiaires)	Vésicules de secrétion
Protéines de la membrane	CD63 CD68 Preseniline 1 Stomatine ATPase H^+ de type V	CD11b/CD18 CD15 CD66 CD67 Cytochrome b_{558} fMLP-R Fibronectine-R Laminine-R Sous-unité de la protéine Gα Leucolysine Antigène NB1 Protéine 19 kDa Protéine 155 kDa Rap1, Rap2 SCAMP SNAP-23, -25 Stomatine Thrombospondine-R TNF-R uPA-R VAMP-2 Vibronectine-R Gp91phox/p22phox	CD11b/CD18 CD67 Cytochrome b_{558} fMLP-R ATPase H^+ de type V Leucolysine SCAMP SNAP-23, -25 TNF-R uPA-R VAMP-2 Gp91phox/p22phox MMP25 Nramp-1	CD11b/CD18 CD13, CD14, CD16, CD45, CR1, CD10, CD35, CD67 MMP25 Nramp-1 Gp91phox/p22phox VAMP-2, SNAP-23 Phosphatase alcaline C1q-R Cytochrome b_{558} DAF, MyD88 fMLP-R Leucolysine ATPase H^+ de type V IFNα-R1, IFNα-R2 IFNγ-R1, IFNγ-R2 TNFR1, TNFR2 Récepteur de l'IL-(1,4,6,10,13,17,18) CXCR-1, CXCR-2, CXCR-4 CCR-1, -2, -3 Récepteur Fc Ig(G, A, E) TREM-1, MD-2 LIR1-4, -6, -7, -9 TGF-βR2 TLR-1, -2, -4, -6, -8
Protéines de la matrice	Elastase Cathepsine G Protéinase 3 Lysosymes, défensines BPI, MPO, azurocidine Ubiquitine Sialidase α-mannosidase β-glucoronidase β-glycérophosphatase Acide mucopolysaccharide *N*-acetyl-β-glucosaminidase α1-antitrypsine	β_2-Microglobuline Collagenase CRISP-3 Gélatinase hCAP-18 Histaminase Héparanase Lactoferrine Lysosyme NGAL uPA Sialidase Transcobalamine-I Cystatine C et F Haptoglobine Prodéfensine α1-antitrypsine SLPI Orosomucoïde Pentraxine 3	Acétyltransférase β_2-Microglobuline CRISP-3 Gélatinase Lysosyme Arginase-1	Protéines plasmatiques

Tableau 1 : Contenu des différents granules du neutrophile. Modifié à partir de Faurshchou and Borregaard, 2003 et de Borregaard *et al*, 2007 [46, 47].

Les granules azurophiles (ou granules primaires) sont principalement impliqués dans la dégradation intracellulaire des microbes dans le phagolysosome. Ces granules sont définis par leur forte concentration en myéloperoxydase (MPO), défensines et serprocidines (ou protéases à sérine avec une activité microbicide). La MPO, représentant entre 2 et 5 % des protéines cellulaires totales [48], peut notamment réagir avec le H_2O_2, dérivé de la NADPH-

oxydase, pour donner l'acide hypochloreux (HOCl), dérivé très toxique pour les micro-organismes. Les peptides du neutrophile humain (Human Neutrophil Peptides ou HNPs), encore appelés défensines de type alpha (ou alpha-défensines), sont une famille de peptides antimicrobiens cationiques (environ 3,5 kDa) [49] représentant environ 5 % du contenu en protéines des neutrophiles [49]. Les alpha-défensines possèdent une activité antimicrobienne contre différentes espèces de bactéries (telles que *Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae*) [50], champignons (tels que *Candida albicans*) [50] et virus (influenza) [51]. Les défensines exercent leur activité antimicrobienne notamment en perméabilisant les membranes des pathogènes [52, 53]. La molécule « Bactericidal/permeability increasing protein » (BPI) représente 0,5 à 1 % des protéines totales du neutrophile. La BPI provoque un arrêt de la croissance bactérienne et une perméabilité de la membrane externe, qui entrainent des dommages au niveau de la membrane interne de l'enveloppe bactérienne [54]. La famille des serprocidines regroupe principalement trois protéases à sérine du neutrophile (Neutrophil serine proteases ou NSPs): la protéinase 3 (PR3), la cathepsine G (CatG) et l'élastase du neutrophile (Human Neutrophil Elastase ou HNE). Les principales caractéristiques de ces trois protéases sont présentées dans le tableau 2. Les NSPs sont couramment décrites comme des enzymes multifonctionnelles impliquées dans la mort des pathogènes et dans la régulation de l'inflammation [55].

	Elastase	Protéinase 3	Cathepsine G
Classification	EC 3.4.21.37	EC 3.4.21.76	EC 3.4.21.20
Localisation et structure du gène	19p13.3 5 exons 4 introns	19p13.3 5 exons 4 introns	14q11.2 5 exons 4 introns
Nombre d'acides aminés	218	222	235
Masse moléculaire (kDa)	29-33	29-32	28.5
pI	~10,5	~9,5	~12
Nombre de sites de glycosylation	2	2	1
Nombre de ponts disulphures	4	4	3
pH optimun d'activité	8-8,5	~8	~7,5
Spécificité du substrat	Petits résidus hydrophobes en P1 : Val, Cys, Ala, Met, Ile, Leu, Ser	Petits résidus hydrophobes en P1 : Val, Cys, Ala, Met, Ser, Leu	Résidus aromatiques ou chargés positivement en P1 : Phe, Tyr, Lys, Arg
Localisation dans les neutrophiles	- Granules azurophiles - Enveloppe nucléaire - A la surface des neutrophiles après activation - NETs	- Granules azurophiles - Granules spécifiques - Vésicules de sécrétion - A la surface des neutrophiles activés ou non - NETs	- Granules azurophiles - A la surface des neutrophiles après activation - NETs
Sources cellulaires	Neutrophiles Monocytes	Neutrophiles Monocytes Basophiles	Neutrophiles Monocytes Mastocytes
Inhibiteurs endogènes	α2-Macroglobuline α1-PI/MNEI/PI9 SLPI/Elafine/pré-élafine	α2-Macroglobuline α1-PI/MNEI Elafine/pré-élafine	α2-Macroglobuline ACT/MNEI/α1-PI/PI6 SLPI
Fonctions biologiques	- Dégradation des composants de la matrice extracellulaire - Propriétés bactéricides - Clivage de médiateurs inflammatoires - Clivage de récepteurs - Induction de cytokines et chimiokines - Induction de la sécrétion des glandes submucosales	- Dégradation des composants de la matrice extracellulaire - Propriétés bactéricides - Clivage de médiateurs inflammatoires - Clivage de récepteurs - Induction de l'apoptose des cellules endothéliales - Rétrocontrôle négatif de la granulopoïèse	- Dégradation des composants de la matrice extracellulaire - Propriétés bactéricides - Clivage de médiateurs inflammatoires - Clivage de récepteurs - Activation des plaquettes - Induction de la sécrétion des glandes submucosales
Rôles pathophysiologiques dans les maladies	Maladies inflammatoires Syndrome de Papillon-Lefèvre Neutropénie héréditaire	Maladies inflammatoires Syndrome de Papillon-Lefèvre Granulomatose de Wegener	Maladies inflammatoires Syndrome de Papillon-Lefèvre

Tableau 2 : Principales caractéristiques de l'élastase du neutrophile, de la protéinase 3 et de la Cathepsine G. Abréviations : NETs, « neutrophil extracellular traps » ; α1-PI, « α1-protease inhibitor » ; MNEI, « monocyte neutrophil elastase inhibitor » ; SLPI, « secretory leukocyte protease inhibitor » ; ACT, «α1-antichymotrypsin ». Modifié à partir de Korkmaz *et al*, 2008, [56].

Les granules spécifiques (ou secondaires) sont impliqués dans l'activité antimicrobienne, la dégradation, la migration et dans les processus d'activation cellulaire. Ces granules sont riches en protéines antimicrobiennes (e.g. lactoferrine, protéine hCAP-18

(« human cationic antimicrobial peptide 18 kDa ») et protéine NGAL (« neutrophil gelatinase-associated lipocalin »)) et en récepteurs aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine et la thrombospondine (Tableau 1). La lactoferrine est à la fois bactériostatique et bactéricide. Elle exerce son activité bactériostatique par la privation en fer (compétition avec les sidérophores bactériens pour la séquestration du fer libre). En séquestrant le fer libre, la lactoferrine inhibe également la formation de biofilms par *Pseudomonas aeruginosa* [57] ou la croissance de spores d'*Aspergillus fumigatus* [58]. Son activité bactéricide s'exerce par sa capacité à se fixer directement aux LPS, aux acides lipotéichoïques ou aux porines pour fragiliser la membrane des bactéries. Des peptides dérivés de la lactoferrine possèdent eux-aussi un fort pouvoir antimicrobien, notamment la lactoferricine [59] et la lactoferrampine [60]. La protéine hCAP-18 est la seule cathélicidine humaine. Le peptide antimicrobien LL-37, situé au niveau du domaine C-terminal de la protéine hCAP-18, est libéré après clivage de la protéine par la protéinase 3 [61]. La LL-37 a des propriétés antibactériennes et antifongiques. Une étude a montré que la LL-37, en interagissant avec les carbohydrates, inhibe l'adhérence de *Candida albicans* aux cellules épidermales orales [62]. Cette protéine a aussi la capacité d'inhiber la formation de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* [63]. En plus de ses activités antimicrobiennes, la LL-37 possède des propriétés chimioattractives pour les neutrophiles, les monocytes et les cellules T $CD4^+$ et favorise l'angiogénèse ainsi que la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires [64]. La protéine NGAL, également appelée siderocaline ou lipocaline-2, possède des propriétés bactériostatiques. De nombreux micro-organismes sécrètent des sidérophores capables de piéger le fer, indispensable à leur croissance. La NGAL subvertit ce système en fixant les complexes sidérophores-fer de type catécholates ou salicylates comme l'entérobactine sécrétée par *Escherichia coli* [65] ou la mycobactine sécrétée par *Mycobacterium tuberculosis* [66]. Le lysozyme est présent dans chaque type de granules, mais en concentration plus importante dans les granules spécifiques [67, 68]. Il dégrade les polymères de peptidoglycanes de la paroi cellulaire des bactéries et exerce son activité bactéricide contre les bactéries Gram+, telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* [69] et *Bacillus subtilis* [70]. Le lysozyme est également fongicide notamment pour *Candida albicans* [50] et *Aspergillus fumigatus* [71].

Les granules contenant la gélatinase (ou granules tertiaires) servent surtout de réservoirs d'enzymes dégradant la matrice et de récepteurs membranaires nécessaires pour l'extravasation du neutrophile et la diapédèse. Après dégranulation du neutrophile, la protéine

NRAMP-1 (« Natural resistance-associated macrophage protein 1 »), se retrouve transportée à la surface de la membrane du phagosome. C'est un transporteur de cations divalents essentiel pour priver les micro-organismes présents dans la vacuole phagocytique de métaux, tels que Fe^{2+}, Mn^{2+} et Zn^{2+} [72].

Trois métalloprotéases (MMPs) sont exprimées dans les neutrophiles : la collagénase (MMP-8), localisée dans les granules spécifiques ; la gélatinase (MMP-9), localisée principalement dans les granules tertiaires ; et la leucolysine (MT6-MMP/MMP-25), localisée dans les granules spécifiques (~10 %), les granules tertiaires (~40 %), les vésicules de sécrétion (~30 %) et à la membrane plasmique (~20 %) [47]. Les MMPs sont stockées sous des pro-formes inactives qui, suite à l'exocytose, vont subir une activation protéolytique. Les MMPs sont capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire incluant le collagène, la fibronectine, les protéoglycanes, la laminine et la gélatine. Elles jouent un rôle important dans la dégradation des membranes basales vasculaires et des structures interstitielles lors de l'extravasation et la migration des neutrophiles [47].

Les vésicules de sécrétion sont créées par endocytose pendant la maturation tardive du neutrophile. Ces vésicules incorporent leurs membranes à la surface du neutrophile en réponse à divers stimuli (« formylmethionyl-leucylphenylalanine » (fMLP), TNF-α, IL-8, GM-CSF, leucotriène B4 (LTB4) et « platelet-activating factor » (PAF) [73]) et sont totalement intégrées à la membrane du neutrophile pendant la migration trans-endothéliale des neutrophiles. Les membranes des vésicules de sécrétion sont riches en β2-intégrines CD11b/CD18 (MAC-1, CR3), récepteurs au complément CR1, récepteurs au fMLP, CD14, CD16 et en leucolysine (Tableau 1), tous vont être incorporés à la membrane plasmique après exocytose. Cette mobilisation est accompagnée par l'apparition de la L-sélectine à la surface du neutrophile, ce qui va notamment permettre le premier contact entre le neutrophile et l'endothélium.

L'ordre d'exocytose des granules, observé après une élévation progressive du calcium cytosolique induite par du ionophore, commence par les vésicules de sécrétion, les granules tertiaires, les granules spécifiques et enfin les granules azurophiles [74].

Le neutrophile et la réponse inflammatoire :

- *La migration du neutrophile :*

Le recrutement des neutrophiles joue un rôle majeur dans la réponse immunitaire vis-à-vis des pathogènes infectieux et pendant les troubles inflammatoires et autoimmuns. La migration du neutrophile du sang vers les tissus inflammés nécessite une cascade complexe d'évènements entre les neutrophiles et l'endothélium, incluant le roulement du neutrophile, son adhésion aux cellules endothéliales et sa migration trans-endothéliale (Figure 8).

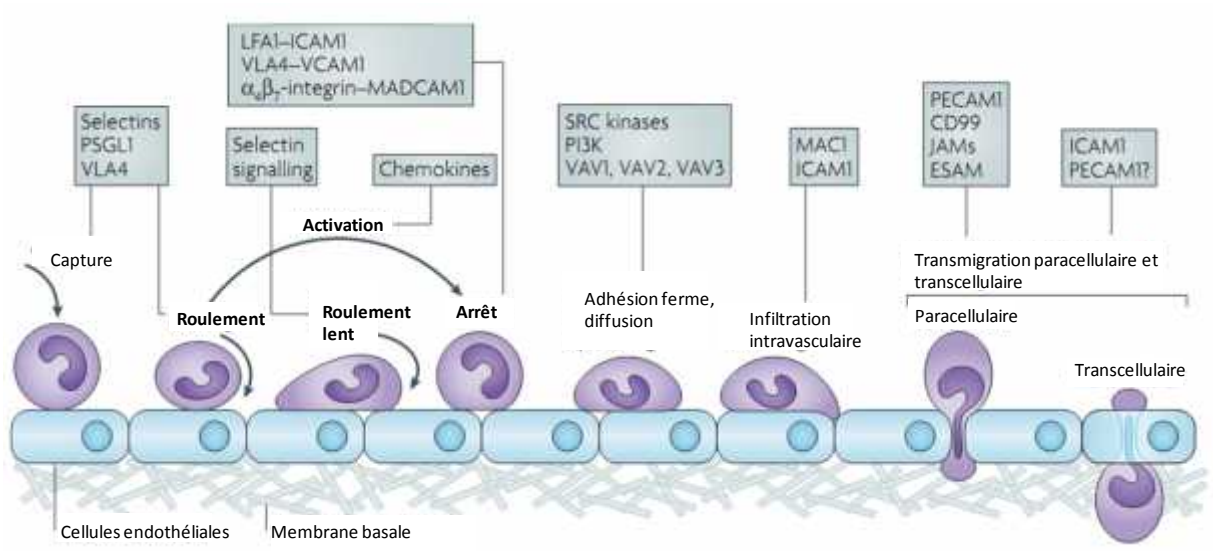


Figure 8 : Les différentes étapes de la migration trans-endothéliale du neutrophile. Les trois premières étapes décrites sont indiquées en gras : le roulement, qui est médié par les sélectines, l'activation, par les chimiokines et l'arrêt, par les intégrines. Puis d'autres étapes ont par la suite été décrites : la capture, le roulement lent, l'adhésion ferme et la diffusion, l'intégration intravasculaire et la transmigration paracellulaire et transcellulaire. Les molécules clés pour chaque étape sont indiquées dans les encadrés. Abréviations: ESAM, endothelial cell-selective adhesion molecule ; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1 ; JAM, junctional adhesion molecule ; LFA1, lymphocyte function-associated antigen 1 ; MAC1, macrophage antigen 1 ; MADCAM1, mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1 ; PSGL1, P-selectin glycoprotein ligand 1 ; PECAM1, platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1 ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase ; VCAM1, vascular cell-adhesion molecule 1 ; VLA4, very late antigen 4. D'après Ley, 2007, [75].

- *La phagocytose et la dégranulation :*

La phagocytose est le mécanisme majeur qui permet l'élimination des microbes et des débris cellulaires. C'est un processus actif, médié par des récepteurs, pendant lequel la particule va être internalisée dans une vacuole appelée phagosome (Figure 9). Comme pour les autres phagocytes, l'internalisation dépend du type d'interaction entre le neutrophile et le micro-organisme. L'interaction peut être directe, c'est-à-dire par la reconnaissance des

PAMPs par les PRRs exprimés par le neutrophile, ou indirecte par des opsonines qui se fixent aux pathogènes et qui seront ensuite reconnues par le neutrophile. La phagocytose peut impliquer deux classes différentes de récepteurs : (i) les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines, tels que FcγRIIa (CD32), FcγRIIIb (CD16) et FcγRIV qui sont exprimés de manière constitutive, et FcγRI (CD64) dont l'expression est induite après stimulation au G-CSF ; et (ii) les récepteurs aux compléments CR1 (CD35) et CR3 (intégrine CD11b/CD18) (Figure 9).

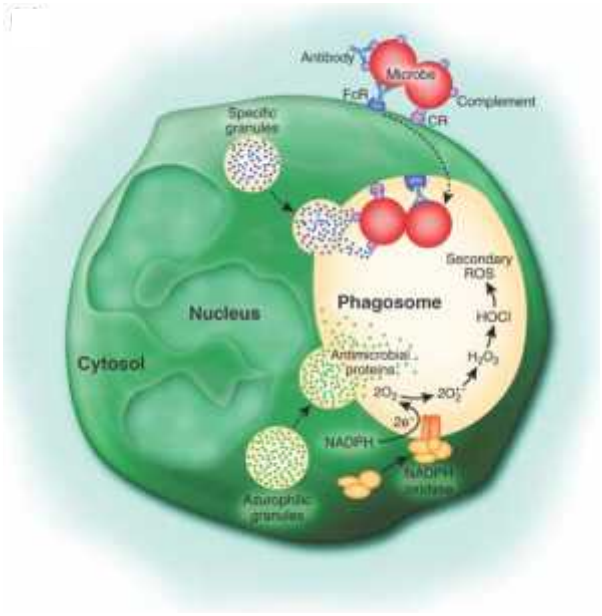


Figure 9 : Représentation schématique de la phagocytose d'un micro-organisme par le neutrophile. Abréviations : FcR, récepteur aux fragments Fc ; CR, récepteur au complément ; ROS, « reactive oxygen species ». D'après Kobayashi and DeLeo, 2009 [76].

Après la fixation aux récepteurs Fcγ, des pseudopodes se forment autour de la particule et l'ingèrent. De façon concomitante, les particules opsonisées par les protéines du complément fixent les intégrines CD11b/CD18 et sont internalisées dans la cellule [77]. La séquestration de micro-organismes dans le phagosome conduit à l'activation de deux systèmes distincts mais complémentaires impliqués dans l'élimination du pathogène : le système non-oxydatif (sécrétion de molécules antimicrobiennes par les granules cytoplasmiques) et le système oxydatif (production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la NADPH oxydase).

- *L'explosion respiratoire :*

Après activation, les neutrophiles produisent des ROS par un processus appelé « respiratory burst » ou explosion respiratoire. L'assemblage de la NADPH oxydase se fait au

niveau de la membrane plasmique ou de la membrane du phagosome lors de la phagocytose. Cet assemblage facilite le transfert d'un électron à travers la membrane vers l'oxygène pour générer des anions superoxydes (O_2^-) qui vont ensuite « dismuter » en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Après dégranulation dans le phagosome, la MPO va réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour produire diverses espèces réactives, notamment l'acide hypochloreux (HOCl) (Figure 10) qui agit comme un puissant bactéricide [78]. L'importance clinique de la NADPH oxydase et de ses produits est très bien représentée dans la granulomatose septique chronique, pathologie caractérisée par de sévères infections fongiques et bactériennes très difficile à traiter dues à un défaut dans l'une des sous-unités composant la NADPH oxydase [79].

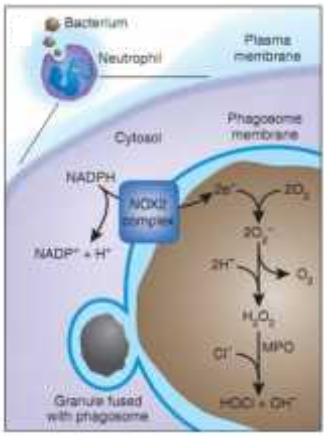


Figure 10 : Génération de ROS par le complexe de la NADPH oxydase dans le phagosome suite à l'ingestion d'une bactérie. La NADPH est activée à la membrane du phagosome, les électrons sont transportés de la NADPH vers l'oxygène pour générer des radicaux superoxydes qui vont être dismutés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La libération de myéloperoxydase (MPO) va permettre de générer l'acide hypochloreux (HOCl). D'après Winterbourn, 2008 [80].

- *Les pièges neutrophiliques :*

En 2004, Brinkman et Zychlinsky décrivent la formation de structures fibreuses contenant des composants nucléaires (ADN et histones), structures qu'ils ont appelées « Neutrophil Extracellular Traps » ou NETs [81]. Ils contiennent également des protéines issues des granules primaires (MPO et élastase), secondaires (lactoferrine et PTX3) et tertiaires (MMP-9 et la protéine PGRP-S (« peptidoglycan recognition protein short »)) [81-83]. Les NETs sont capables d'emprisonner des micro-organismes, tels que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* et *Candida albicans* [81, 84, 85]. La formation des NETs commence par la production d'oxydants par le neutrophile,

suivie par la dégradation de l'enveloppe nucléaire et la libération d'ADN dans la cellule au moment de la lyse du neutrophile, 3-4 h après activation par le PMA ou par des bactéries [86]. Ce phénomène associé à la mort cellulaire, est appelé NETosis (Figure 11). D'autres études ont montré que les neutrophiles peuvent libérer l'ADN dans le milieu extracellulaire, mais que cette source d'ADN n'est pas nucléaire, mais proviendrait des mitochondries [87] (Figure 11). Les NETs peuvent se former plus rapidement (30-60 min) suite à une stimulation par CXCL8 ou le LPS [81], ou par certaines bactéries, telles que *Staphylococcus aureus* [88]. Ce dernier mécanisme est indépendant des oxydants, de la lyse des neutrophiles ou de la libération d'ADN mitochondrial (Figure 11).

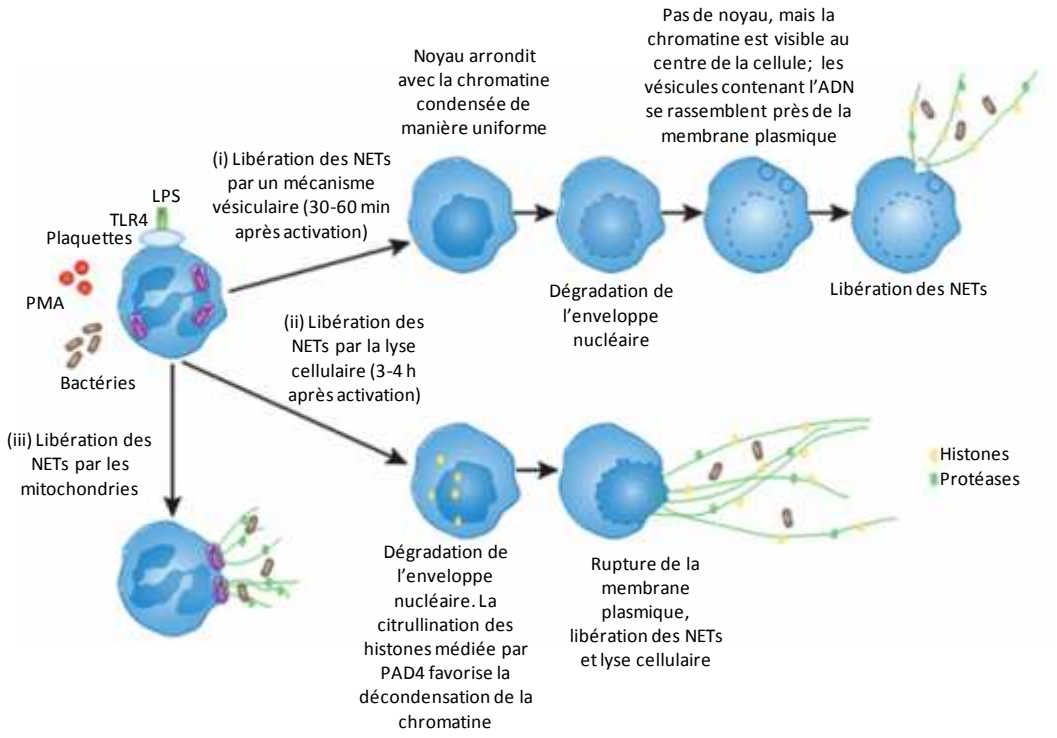


Figure 11 : Les mécanismes impliqués dans la formation des NETs. (i) Les NETs peuvent être libérés par un mécanisme vésiculaire. Tout d'abord, les neutrophiles s'arrondissent et contiennent une chromatine condensée de manière uniforme, puis l'enveloppe nucléaire se dégrade. Dans ces cellules, de petites vésicules contenant l'ADN vont se rapprocher de la membrane plasmique et fusionner, les NETs vont alors être libérés hors de la cellule. (ii) Les NETs peuvent également être libérés après la lyse de la cellule ; ce mécanisme est plus long que celui médié par les vésicules. L'enveloppe nucléaire est dégradée, les histones sont citrullinées* ce qui conduit à la décondensation de la chromatine. (*La citrullination est une réaction catalysée par la peptidyl-arginine désiminase (PAD) et aboutit à la transformation de l'acide aminé arginine en citrulline.) (iii) La libération de NETs par les mitochondries a également été observée, bien que les étapes de ce processus restent mal caractérisées. Adapté de Phillipson and Kubes, 2011 [89].

Les NETs apparaissent être une nouvelle forme de réponse innée qui permet la fixation des micro-organismes, empêchent leur diffusion et assure une forte concentration locale d'agents

antimicrobiens [81, 84, 86]. D'après ces études, les NETs sont associés à la mort des microbes. Cependant, une étude suggère que les micro-organismes emprisonnés dans les NETs restent vivants, aucune activité microbicide n'étant retrouvée associée aux NETs. Les auteurs suggèrent que les NETs serviraient juste à piéger les micro-organismes pour éviter leur dissémination et stopper l'infection [90]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour établir si, et dans quelles conditions, les NETs peuvent jouer un rôle dans la mort des micro-organismes.

B. Les récepteurs de l'immunité innée

La reconnaissance des micro-organismes par les cellules de l'immunité innée se fait par une famille de récepteurs appelés « Pattern Recognition Receptors » ou PRRs. Ces PRRs reconnaissent des molécules aux motifs structuraux très conservés et exprimés principalement par les pathogènes (tels que le LPS associé aux bactéries ou les β-glucanes associés aux champignons) ; ces motifs sont appelés « Pathogen-Associated Molecular Pattern » ou PAMPs [91].

Les PRRs peuvent également reconnaitre des motifs moléculaires associés aux cellules apoptotiques ou « Apoptotic Cell-Associated Molecular Patterns » (ACAMPs) [92].

Les PRRs peuvent être classés en trois familles sur la base de leurs fonctions : (i) les récepteurs d'endocytose, exprimés à la surface des cellules, permettent la reconnaissance et l'internalisation des micro-organismes et/ou des motifs microbiens ; (ii) les récepteurs de signalisation, intracellulaires ou en surface des cellules, sont impliqués dans l'activation cellulaire en réponse à divers motifs microbiens ; et (iii) les récepteurs solubles ou d'opsonisation, facilitent la reconnaissance et l'élimination de ces ligands par les phagocytes. Certains récepteurs solubles peuvent aussi être impliqués dans la voie d'activation du complément.

1. Les récepteurs d'endocytose

a) La famille des Scavenger Receptors (SRs)

Les récepteurs faisant partie de la famille des SRs ne présentent aucune homologie de structure (Figure 12), leur seul point commun étant qu'ils fixent les lipoprotéines de faible densité (« low-density lipoproteins » ou LDL) modifiées, telles que les LDL oxydées

(OxLDL), et sont donc impliqués dans la formation de cellules graisseuses (ou foam cells) et dans l'athérosclérose. Ils fixent également de nombreux ligands du soi modifié (cellules apoptotiques, Heat Shock Protein (HSP), ADN, ARN) et du non soi (bactéries, virus, champignons,…). Les SRs sont exprimés à la surface des macrophages, des monocytes, des DCs, des cellules endothéliales et quelques autres types cellulaires [93]. Il existe huit familles de SRs classés sur la base de leurs structures (Figure 12).

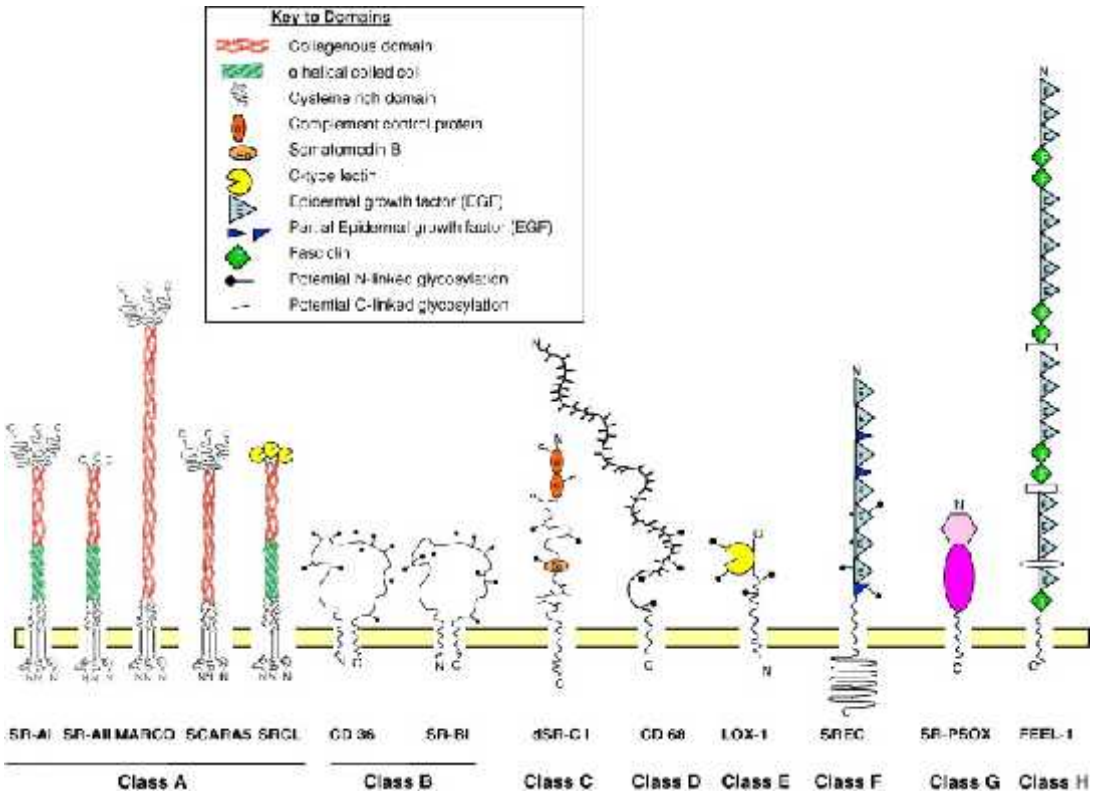


Figure 12 : Représentation schématique des différentes classes de Scavenger Receptors. D'après Plüddemann *et al*, 2007 [94].

Les fonctions des SRs sont redondantes. Nous illustrerons donc leurs principales fonctions au travers de 3 exemples, les molécules SR-A, MARCO et LOX-1.

SR-A est exprimé par les macrophages, les mastocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses [94]. SR-A fixe notamment les Ox-LDL, les bactéries Gram positif (e.g. *Staphylococcus aureus*) [95] et négatif (e.g. *Escherichia coli* et *Neisseria meningitidis*) [96, 97], les levures (*Saccharomycetes cerevisiae* et *Candida albicans*) [98] et les molécules chaperonnes (e.g. Calreticulin (CRT), gp96 et des membres de la famille des Hsp70) [99, 100]. SR-A semble également contribuer, par sa liaison aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire (ECM), à l'adhérence des macrophages au niveau des plaques d'athérome [101]. L'importance de SR-A dans les défenses contre les infections bactériennes a été

démontré dans les souris déficientes en SR-A (SR-$A^{-/-}$). L'équipe de Suzuki a montré que les souris SR-$A^{-/-}$ sont significativement plus sensibles aux infections par *Listeria monocytogenes* que les souris sauvages [102]. SR-A protège également les souris des infections par *Staphylococcus aureus* [103], *Streptococcus pneumoniae* [104] *et Neisseria meningitidis* [105].

MARCO est exprimé de manière constitutive sur certaines sous-populations de macrophages, mais son expression est fortement régulée par divers stimuli microbiens. Comme pour SR-A, MARCO agit comme un récepteur de phagocytose pour certaines bactéries comme *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis* [106]. Une étude très récente a montré l'implication de MARCO dans l'internalisation de levures, telles que *Candida albicans* et *Saccharomycetes cerevisiae* (zymosan) par des macrophages pré-traités par des oligodéoxynucléotides contenant des motifs CpG (CpG-ODN) [107]. In vivo, l'implication de MARCO dans les défenses de l'hôte contre les infections bactériennes a été démontrée par l'équipe d'Arredouani qui a observé que les souris MARCO$^{-/-}$ sont significativement plus sensibles aux infections par *Streptococcus pneumoniae* que les souris sauvages [108].

LOX-1 est exprimé par les cellules endothéliales [109], les macrophages, les monocytes, les cellules musculaires lisses [110, 111], les plaquettes [112] et les DC myéloïdes [113]. LOX-1 lie différents ligands du soi tels que les plaquettes activées [114], les monocytes [115] et la fibronectine [116] ainsi que des ligands du soi modifié, tels que les Ox-LDL [109], les cellules apoptotiques [117, 118] et Hsp70 [113]. Il fixe également des ligands du non soi, tels que les bactéries Gram négatif (e.g. *Escherichia coli*) et Gram positif (e.g. *Staphylococcus aureus*) [119].

De nombreuses études ont souligné le rôle des SRs dans l'internalisation d'antigènes exogènes conduisant à leur présentation croisée dans les molécules CMH de classe I. A titre d'exemple, la présentation in vitro, de peptides issus de l'ovalbumine, vectorisée par une molécule chaperonne (Hsp70), à des cellules T $CD8^+$ possédant un récepteur T spécifique de l'ovalbumine, est inhibée par un anticorps anti-LOX-1 neutralisant [113]. In vivo, le ciblage de l'antigène vaccinal vers LOX-1, à l'aide d'un anticorps anti-LOX-1, en présence d'un signal de stress immunologique (adjuvant incomplet de Freund), induit une réponse anti-tumorale protectrice [113]. Les SRs peuvent aussi servir de co-récepteurs aux TLRs, en particulier TLR2. Récemment, il a été montré que SR-AI et SREC-I coopèrent avec le

récepteur de type Toll (ou Toll-like receptor) TLR2 dans la reconnaissance et la présentation croisée de la protéine NS3 de l'hépatite C [120].

b) La famille des récepteurs aux lectines de type C

Les lectines de type C sont des protéines membranaires caractérisées par un ou plusieurs domaines de reconnaissance des carbohydrates appelés CRD pour « Carbohydrate Recognition Domain » (Figure 13). Le CRD interagit de manière dépendante du calcium avec des glycoprotéines possédant un mannose ou un galactose. Les lectines de type C sont exprimées essentiellement par les DC et les macrophages. Elles sont fonctionnellement diversifiées et peuvent être impliquées dans divers processus, tels que l'adhérence cellulaire, l'activation des plaquettes, l'activation du complément, la reconnaissance de pathogènes, l'endocytose et la phagocytose [121]. La capacité des lectines de type C à reconnaitre les micro-organismes est dépendante de la densité des PAMPs présents à la surface du microbe et du degré de multimérisation des récepteurs aux lectines. L'arrangement de plusieurs CRDs en multimères projette les sites de liaison dans une direction commune afin de permettre les interactions avec les carbohydrates des surfaces microbiennes.

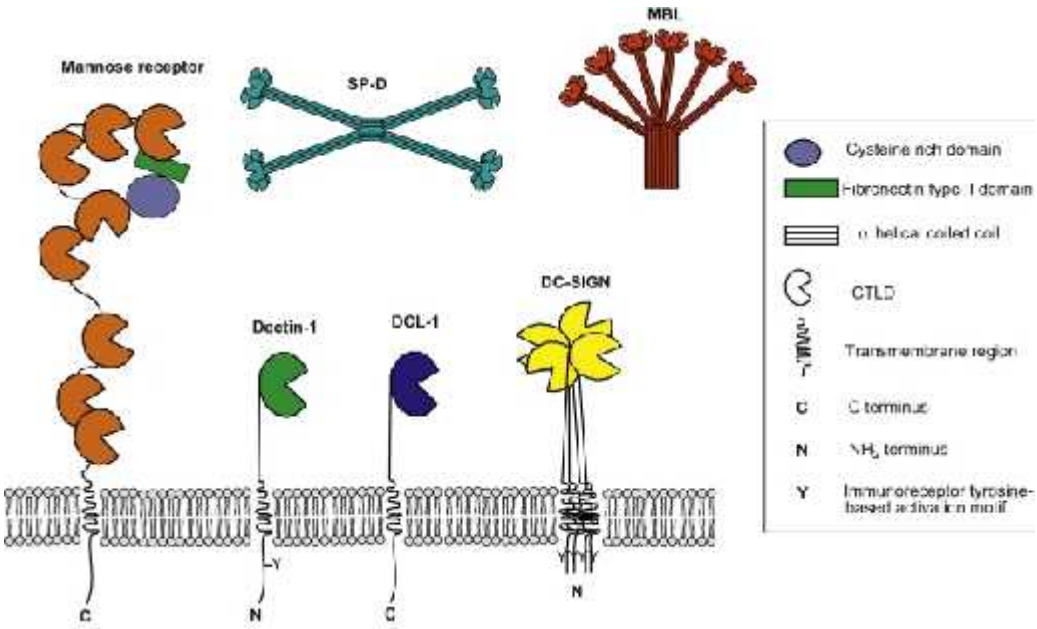


Figure 13 : Représentation schématique des récepteurs aux lectines de type C. Abréviations : DC-SIGN, « Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin » ; DCL-1, « DEC-205-associated C-type lectin-1 » ; MBL, « Mannan-Binding Lectin » ; SP-D, « Surfactant protein D ». D'après Kerrigan and Brown, 2009 [121].

Le récepteur au mannose (MR ou CD206) est exprimé par les macrophages, les DC dérivées de monocytes, les épithéliums hépatiques et lymphatiques, les cellules mésengliales du rein, les cellules musculaires lisses trachéales et les épithéliums pigmentaires rétiniens [121]. Ce récepteur reconnaît divers pathogènes comme *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), mais aussi des protéines du soi et du soi modifié : les hydrolases lysosomales, la thyroglobuline, la L-sélectine et MUC-1 [122].

Les récepteurs Dectin-1 et Dectin-2 sont des protéines transmembranaires de type II glycosylées avec un seul domaine CRD. Dectin-1, exprimé par les macrophages, les DC et les neutrophiles, fixe les β-glucanes présents dans la paroi des champignons, de manière indépendante du calcium, contrairement aux autres lectines de type C [123]. Dectin-2 est exprimé par les cellules de Langerhans, les DC et les macrophages. Dectin-2 est un PRR pour certains champignons (e.g. *Candida albicans*, *Microsporum audouinii* et *Trichophyton rubrum*) et qui coopère avec le récepteur FcγR pour induire l'internalisation, l'activation de NF-κB et la production de TNF-α et de IL-1ra [124].

DC-SIGN (« Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin » ou CD209) est exprimée par les DC immatures, les endothéliums et par certaines sous-populations de macrophages. DC-SIGN a tout d'abord été identifié comme un récepteur pour ICAM-3 (« intercellular adhesion molecule-3 »), permettant l'interaction des DC avec les lymphocytes T. C'est aussi un récepteur pour ICAM-2, facilitant ainsi la migration transendothéliale des DC. DC-SIGN interagit avec différents micro-organismes incluant des virus (HIV-1, HCV et CMV), des bactéries (*Mycobacterium tuberculosis* et *Helicobacter pylori*), des champignons (*Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*) et des parasites (*Schistosoma mansoni* et *Leishmania*) [125].

Le récepteur DEC-205 est fortement exprimé par les DC myéloïdes, les monocytes et les lymphocytes B, et plus faiblement par les cellules NK, les DC plasmacytoïdes et les lymphocytes T [126]. Le ciblage in vivo du récepteur DEC-205 par un antigène couplé à un anticorps anti-DEC-205 augmente significativement la présentation de cet antigène. En l'absence de signaux d'activation, cette présentation d'antigène conduit à une tolérance immunologique envers celui-ci [127]. Cependant, en présence de signaux d'activation, tels que des agonistes du CD40, ce processus engendre une réponse lymphocytaire T $CD4^+$ et $CD8^+$ spécifique de l'antigène [128, 129].

Le récepteur DCL-1 (« DEC-205-associated C-type lectin-1 ») est exprimé par les monocytes, les macrophages, les DC et les granulocytes [130]. Ce récepteur est une lectine de type C non conventionnelle qui n'intervient pas seulement comme récepteur d'endocytose/phagocytose mais qui semblerait aussi jouer un rôle dans la migration et l'adhérence des cellules présentatrices d'antigènes.

2. Les récepteurs de signalisation

Après la reconnaissance des PAMPs, les PRRs initient le programme de signalisation qui exécute la première ligne de défense de l'hôte nécessaire pour tuer les micro-organismes. De plus, la signalisation des PRRs induit simultanément la maturation des DCs qui sont responsable de l'induction de la seconde ligne de défense, l'immunité adaptative. Les récepteurs de signalisation comprennent les familles des TLRs (« Toll-like receptors »), des NLRs (« Nucleotide-binding, oligomerization domain (NOD)-like receptor ») et des RLRs (« retinoic acid-inducible gene-I (RIG-1)-like receptors »).

a) La famille des TLRs

Les TLRs ont été les premiers PRRs décrits. Ces PRRs, qui reconnaissent une grande variété de PAMPs (Tableau 3), sont les mieux caractérisés. Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I et possèdent une partie extracellulaire ou « ectodomain » composé de motifs répétés riches en leucine permettant la reconnaissance des PAMPs, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire homologue à celui du récepteur de l'IL-1 appelé domaine TIR (Toll-IL-1 receptor). Ces récepteurs sont exprimés soit à la surface cellulaire (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) soit associés à des vésicules intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9). A ce jour, 10 et 12 TLRs fonctionnels ont été identifiés, respectivement, chez l'homme et la souris. Récemment, il a été montré que TLR11 est aussi exprimé dans les compartiments intracellulaires [131]. Chez la souris, TLR13 est exprimé dans les vésicules intracellulaires mais ses PAMPs n'ont pas encore été identifiés [132]. Chaque TLR détecte différents PAMPs dérivés de virus, de bactéries, de champignons ou de parasites. Ceci inclue les lipoprotéines (reconnues par TLR1, TLR2 et TLR6), les ARNs doubles brins (double-stranded RNA ou dsRNA) (TLR3), le LPS (TLR4), la flagelline (TLR5), les ARNs simple brin (simple-stranded RNA ou ssRNA) (TLR7 et TLR8) et l'ADN (TLR9) (tableau 3). Après reconnaissance des PAMPs, les TLRs recrutent un set spécifique de molécules adaptatrices qui possèdent un domaine TIR, telles que MyD88 et TRIF, puis initient la signalisation sous-jacente qui conduit à la sécrétion de cytokines inflammatoires, d'IFN de type I, de chimiokines et de peptides antimicrobiens [133]. De plus, l'activation des

TLRs conduit à la maturation des DCs, contribuant ainsi à l'induction de l'immunité adaptative.

TLRs	Ligands	Origine des ligands
TLR1	Triacyl lipopeptides	Bactéries et mycobactéries
	Facteurs solubles	*Neisseria meningiditis*
TLR2	Lipoprotéines/lipopeptides	Divers pathogènes
	Peptidoglycanes	Bactéries Gram+
	Acide lipotéichoïque	Bactéries Gram+
	Lipoarabinomannane	mycobactéries
	Glycolipides	*Treponema maltophilum*
	Porines	*Neisseria*
	Zymosan	Champignons
	OmpA	Bactéries Gram-
TLR3	ARN double brin	Virus
TLR4	LPS	Bactéries Gram-
	Taxol	Plantes
	Protéines virales	Virus respiratoire syncytial
	Phosphatidylinositol mannosides	mycobactéries
TLR5	Flagelline	Bactéries
TLR6	Diacyl lipopeptides	Mycoplasmes
	Acide lipotéichoïque	Bactéries Gram+
TLR7	ARN simple brin	Virus
TLR8	ARN simple brin	Virus
TLR9	ADN hypométhylé	Bactéries
TLR10	Di-acétyl peptide ?	Non déterminé

Tableau 3 : Exemples de ligands dérivés de micro-organismes pour les molécules TLR humaines. Adapté de Takagi, 2011 et de Delneste *et al*, 2007 [134, 135].

b) La famille des NLRs

Les protéines NLRs constituent une famille de protéines caractérisées par un domaine de liaison des nucléotides (nucleotide-binding domain ou NBD) et un domaine de répétition riche en leucine (leucine-rich repeat (LRR) domain). Des domaines propres aux NLRs sont présents: les domaines de recrutement et d'activation des caspases (CARDs) ou les domaines pyrines (PYDs).

Deux récepteurs NLRs contenant un domaine CARD (NOD-like receptor containing a CARD domain ou NLRC) ont été largement étudiés : NOD1 et NOD2. Ces deux récepteurs, localisés dans le cytoplasme, sont fortement exprimés par les CPAs, telles que les monocytes, les macrophages et les DCs. NOD1 est aussi exprimé par certaines cellules épithéliales alors que l'expression de NOD2 semble plus restreinte à des cellules spécialisées, telles les cellules de Paneth au niveau du petit intestin [136]. Ces récepteurs interagissent avec le peptidoglycane, constituant majeur de la paroi cellulaire des bactéries Gram + notamment. Le rôle de NOD1 dans la réponse anti-bactérienne in vivo a tout d'abord été décrit dans des infections à

Helicobacter pylori ; les souris déficientes pour le récepteur NOD1 sont plus sensibles à des infections par ce pathogène [137]. NOD1 est aussi impliqué dans la reconnaissance d'autres pathogènes tels que *Clostridium difficile*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa* [136]. Des études in vitro ont montré l'implication de NOD2 dans différents modèles d'infection par *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Mycobacterium tuberculosis* [136].

c) La famille des RLRs

Les protéines RIG-1 («retinoic acid-inducible gene-I» ou DDX58) et MDA-5 («melanoma differentiation associated gene-5» ou helicard ou IFIH1) font partie de la famille des RLRs, encore appelés RLHs (RIG-1-like helicases). Les RLRs sont des protéines cytoplasmiques capables de fixer les ARNs doubles brins (dsRNA ou double-stranded RNA) viraux, conduisant à la production d'IFN de type I par les cellules infectées. La reconnaissance des dsRNA par ces protéines est dépendante du type cellulaire. Des études sur des souris déficientes en RIG-I ou MDA-5 ont révélé que les DC, les macrophages et les fibroblastes isolés de ces souris ont un défaut de production d'IFN après une infection virale, alors que la production d'IFN est toujours observée dans les DC plasmacytoïdes (pDC) [138]. Dans les DC, les macrophages et les fibroblastes, les RLRs sont les principaux récepteurs pour les dsRNA viraux alors que dans les pDC, ce sont les TLRs qui jouent un rôle majeur. Ces deux RLRs détectent des virus distincts : alors que RIG-I participe à la reconnaissance des Paramyxoviruses (Newcastle disease virus (NDV), Sendai virus (SeV)), rhabdovirus (vesicular stomatitis virus (VSV)), flavivirus (hepatitis C (HCV)) et orthomyxovirus (Influenza), MDA-5 est essentiel pour la reconnaissance des picornavirus (encephalo-myocarditis virus (EMCV)) [139].

3. Les récepteurs solubles

Les récepteurs solubles, ou composants de l'immunité humorale, regroupent les collectines, les ficolines et les pentraxines. Ces récepteurs solubles sont capables d'opsoniser des micro-organismes, d'activer la voie du complément, de participer à la reconnaissance et à l'élimination des cellules apoptotiques et enfin de moduler la réponse inflammatoire.

a) Les ficolines

Les ficolines sont une famille de protéines oligomériques possédant un domaine N-terminal de type collagène et un domaine C-terminal globulaire de type fibrinogène, similaire

au domaine CRD des lectines de type C. Chez l'homme, trois types de ficolines sont décrites : les ficolines L, H et M (tableau 4), qui reconnaissent les motifs GlcNAc (N-acetylglucosamine) largement exprimés par une variété de pathogènes mais pas par les cellules humaines. Ces trois ficolines sont également capables de s'associer aux protéines MASPs (« MBL-associated serine proteases »), suggérant donc un rôle dans l'activation du complément par la voie des lectines.

Ficolines	Expression ARNm	Expression protéine	Ligands	Fonctions
L	Foie	Sérum/plasma	GlcNAc (groupe acétyle); β-(1]3)-D-glucan; acide *N*-acétylneuraminique; acide lipotéichoique; CRP; fibrinogène, fibrine; ADN; élastine;corticostéroide	Activation du complément, opsonine
H	Foie, poumon, cellules de gliome	Sérum/plasma, Cellules épithéliales biliaires, bronchiques et alvéolaires	GlcNAc, GalNAc, fucose; lipopolysaccharide; préparations de polysaccharide	Activation du complément, opsonine
M	Poumon, monocytes, Rate, neutrophiles	Plasma, monocytes Neutrophiles et cellules épithéliales alvéolaires	GlcNAc, GalNAc; acide sialique	Activation du complément, récepteur de phagocytose

Tableau 4 : Principales caractéristiques des ficolines humaines. Abréviations : GlcNAc : N-acetylglucosamine ; GalNAc : N-acetylgalactosamine. Adapté de Endo *et al*, 2011 et de Matsushita, 2010 [140, 141].

b) Les collectines

La famille des collectines contient neuf membres : les protéines du surfactant SP-A et SP-D, la protéine MBL (« mannan-binding lectin »), les collectines du rein CL-K1 (« collectin kidney 1 »), du foie CL-L1 (« collectin liver 1 ») et du placenta CL-P1 (« collectin placenta 1 »), ainsi que trois collectines sériques spécifiques des bovins, CL-43, CL-46 et la conglutinine. CL-K1 et CL-L1 sont aussi connues sous le nom de collectine-10 et collectine-11 car leur expression n'est pas restreinte à ces organes. La collectine CL-P1 est aussi référencée sous le nom de SRCL (« scavenger receptor C-type lectin »).

La liaison des collectines aux micro-organismes est dépendante du calcium. L'association des MBL et des MASPs induit l'activation du système du complément qui va permettre au complément de se déposer à la surface microbienne pour induire l'internalisation du pathogène par les récepteurs au complément. La protéine MBL peut également directement opsoniser le micro-organisme en se fixant aux carbohydrates, pour ensuite interagir avec les récepteurs aux MBL à la surface des phagocytes, permettant l'internalisation du pathogène.

La protéine MBL peut aussi influencer l'expression d'autres PRRs. A titre d'exemple, Ono *et al* ont montré que la MBL, par l'augmentation de l'expression de SR-A à la surface des cellules, favorise l'internalisation de *S. aureus* [142]. Les protéines du surfactant (SP-A et SP-D) ont une structure similaire à MBL (Figure 13). SP-A et SP-D sont synthétisées dans les poumons par les cellules alvéolaires de type II et les cellules de clara. Ces protéines sont secrétées dans l'espace alvéolaire où elles deviennent les principaux constituants du surfactant pulmonaire. Ces deux protéines interagissent avec différentes variétés de carbohydrates et de glycolipides permettant la fixation de différents pathogènes (Tableau 5). Contrairement à MBL, les protéines du surfactant ne peuvent pas activer le système du complément. Cependant, elles se comportent comme des opsonines en se fixant aux carbohydrates microbiens et interagissent avec les récepteurs du surfactant sur les phagocytes. De nombreux récepteurs au surfactant ont été décrits, tels que la calreticuline et les TLRs. In vivo, les souris déficientes en SP-A et SP-D sont sensibles aux infections pulmonaires par *Pseudomonas aeruginosa* [143].

Collectines	Ligands bactériens	Ligands fongiques	Ligands viraux
MBL	*S. aureus, E. coli, espèces de Klebsiella, H. influenzae, S.pneumoniae, b-hemolytic streptococci*	*S. cerevisiae, A. fumigatus, C. albicans, C. neoformans, C. parapsilosis, B. dermatitidis*	HIV IAV RSV
SP-A	*S. aureus, type 25 pneumococci, H. influenzae, S. pneumoniae, E. coli, Mycoplasma pulmonis, K. pneumoniae, group A Streptococcus*	*S. cerevisiae, A. fumigatus, C. neoformans, P. carinii, C. albicans*	IAV RSV HSV-1
SP-D	*M. tuberculosis, P. aeruginosa, E. coli, K. pneumoniae*	*S. cerevisiae, A. fumigatus, C. albicans, P. carinii, C. neoformans B. dermatitidis*	IAV RSV rotavirus

Tableau 5 : Micro-organismes reconnus par les collectines. Abréviations: HIV, Human immunodeficiency virus; IAV, Influenza A virus; RSV, respiratory syncytial virus; HSV-1, herpes simplex virus-type 1. Adapté de Brummer and Stevens, 2010 et de Gupta *et al*, 2007 [144, 145].

c) Les pentraxines

Les pentraxines constituent une superfamille de protéines conservées pendant l'évolution, caractérisées par une structure multimérique et cyclique et par la présence au

niveau C-terminal d'un domaine pentraxine de 200 acides aminés, avec une signature moléculaire de 8 acides aminés (HxCxS/TWxS, où x correspond à n'importe quel acide aminé) (Figure 14) [146]. Sur la base de leur structure primaire, les pentraxines ont été divisées en deux sous-familles : les pentraxines courtes et les pentraxines longues. Les protéines de la phase aigüe de l'inflammation, CRP (« C-reactive protein ») et SAP (« serum amyloid P ») font partie des pentraxines courtes. La famille des pentraxines longues regroupe PTX3, PTX4, NP (« neuronal pentraxin ») 1, NP2 et NPR (« neuronal pentraxin receptor »).

Les pentraxines courtes CRP et SAP et surtout la pentraxine longue PTX3 vont être détaillées dans cette section, puisqu'elles constituent mon travail de thèse.

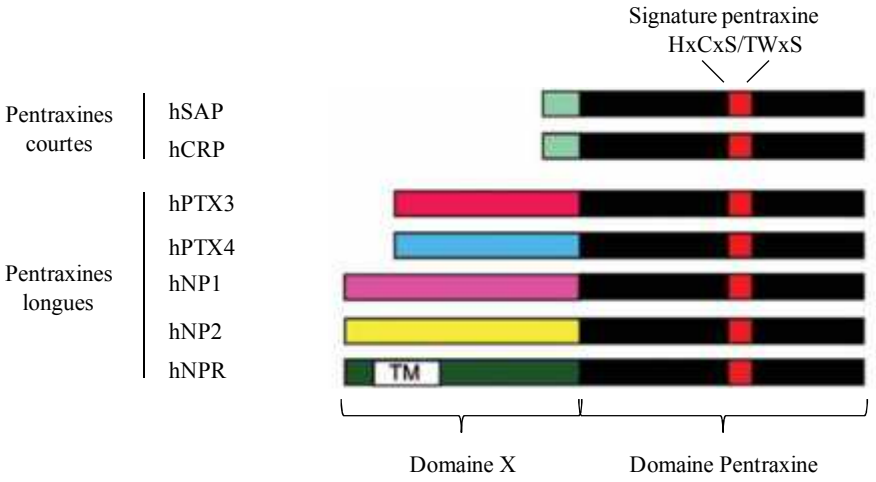


Figure 14 : Représentation schématique des pentraxines humaines courtes et longues. Abréviation : TM, domaine transmembranaire. Adapté de Garlanda *et al*, 2005 [146].

✓ Les pentraxines courtes

CRP a été la première pentraxine décrite dans les années 1930 comme une protéine de la phase aigüe de l'inflammation, produite par le foie en réponse à une infection. SAP a ensuite été identifiée comme une protéine similaire à CRP puisque ces deux protéines possèdent 51 % d'identité de séquence en acides aminés [147].

Structure :

Le gène codant la protéine CRP est localisé sur le chromosome 1q23 et est organisé en deux exons, le premier codant pour le peptide signal et les deux premiers acides aminés de la protéine mature, puis le second exon codant pour le reste des 204 acides aminés. CRP est composée de 5 protomères non-glycosylés identiques avec un poids moléculaire total de 115

kDa. La séquence en acides aminés inclue 2 cystéines (en position 36 et 97) conservées chez tous les membres de la famille pentraxine, et impliquées dans la formation de ponts disulfures intra-chaîne. Le monomère SAP comprend 204 acides aminés et a un poids moléculaire de 25,462 kDa qui s'assemble pour former un pentamère de 127 kDa. Deux pentamères peuvent également s'assembler face à face pour former un décamère [148].

Production :

La concentration de CRP dans le plasma d'un individu sain est à peine détectable (≤ 3 mg/l), mais augmente fortement (x 1000) lors d'une inflammation aigüe [149]. La CRP circulante est uniquement produite par les hépatocytes [149] en réponse à l'IL-6 et son expression est potentialisée par l'IL-1β [150] . D'autres cellules, telles que les lymphocytes et les monocytes/macrophages, peuvent synthétiser CRP, mais ces cellules ne contribuent pas de manière significative à la concentration plasmatique en CRP. SAP est produite exclusivement par les hépatocytes et est la principale protéine de la phase aigüe de l'inflammation chez la souris. La SAP est présente de manière constitutive dans le sérum humain (30 à 50 mg/l) [146].

Ligands et fonctions :

CRP fixe différents micro-organismes, tels que des champignons, des levures, des bactéries et des parasites (Tableau 6) par la phosphorylcholine et les structures carbohydrates de la paroi de ces pathogènes, favorisant ainsi la phagocytose et la résistance à ces infections [151]. Cependant, la fixation aux bactéries n'est pas nécessaire pour la protection, car CRP peut protéger les souris des infections à *Salmonella typhimurium* alors que CRP n'a pas la capacité de fixer ce pathogène [152]. Tout comme CRP, SAP fixe divers pathogènes, mais ces interactions ont des conséquences contrastées sur l'immunité innée [153, 154]. SAP fixe le phosphorylethanolamine et le LPS de diverses bactéries, telles que *Streptococcus pyogenes* et *Neisseria meningitidis* (Tableau 6) [153] et empêche l'activation classique du complément médiée par le LPS [155]. De plus, SAP fixe *Streptococcus pneumoniae* et joue un rôle important dans la réponse immunitaire médiée par le complément [154]. Cependant, pour certains micro-organismes qui se fixent à SAP, tels que *Streptococcus pyogenes* et certaines souches rugueuses de *Escherichia coli*, SAP augmente la virulence en protégeant la bactérie de la phagocytose. En revanche, SAP peut protéger de l'infection contre certains micro-organismes ne s'y fixant pas, par exemple *Listeria monocytogenes* [153].

Les pentraxines reconnaissent les cellules endommagées et leurs constituants et sont impliquées dans l'élimination des cellules apoptotiques in vivo. CRP fixe les phospholipides présents à la membrane des cellules endommagées et des cellules apoptotiques pendant la phase tardive de l'apoptose, ainsi que des petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires et la chromatine qui sont localisées à la membrane plasmique lors de l'apoptose tardive [147]. Une étude a montré in vivo la fixation de SAP à la chromatine [156].

Les pentraxines CRP et SAP, agrégées ou attachées à la plupart de leurs ligands, interagissent avec C1q [157]. Les pentraxines courtes participent donc à l'activation des trois voies du complément (classique, lectine et alternative) en interagissant avec C1q (CRP et SAP), les ficolines (CRP) et le facteur H (CRP). L'activation du complément par les pentraxines peut favoriser l'élimination de débris apoptotiques, avec de potentielles implications dans la prévention de l'apparition de maladies autoimmunes [158]. Des liaisons spécifiques et saturables des trois classes de récepteurs Fcγ ont été démontrées pour CRP et SAP, ce qui permet non seulement la phagocytose de cellules apoptotiques et de micro-organismes [159], mais permet aussi d'engendrer une réponse immunitaire protectrice [160]. Dans une étude récente, une structure tridimensionnelle de la SAP en complexe avec le domaine extracellulaire du récepteur FcγRIIa a été générée, ce qui suggère que les pentraxines courtes et les IgG ont le même site de liaison sur les récepteurs Fcγ [161]. Conforme à ces observations, CRP et SAP se révèlent efficaces pour inhiber la phagocytose médiée par les complexes immuns [161]. Les pentraxines peuvent donc activer le complément et les récepteurs Fcγ, ce qui ressemble aux propriétés fonctionnelles des anticorps.

- ✓ Les pentraxines longues

La famille des pentraxines longues regroupe PTX3, PTX4, NP (« neuronal pentraxin ») 1, NP2 et NPR (« neuronal pentraxin receptor »).

PTX4 a été récemment décrite [162]. Le « pattern » d'expression de l'ARNm PTX4 est unique. Pour le moment, contrairement aux NPTXs, l'expression de PTX4 est faible dans le cerveau. Contrairement à CRP et SAP et malgré son expression dans le foie, PTX4 ne se comporte pas comme un gène de la phase aigüe. La forte expression dans le stroma thymique et la rate est unique parmi les pentraxines [162].

Les pentraxines neuronales, particulièrement exprimées par les neurones, incluent les pentraxines solubles NP1 et NP2 et la pentraxine transmembranaire NPR. Les NPs sont des protéines multifonctionnelles impliquées dans la plasticité synaptique et la formation des

synapses (en raison de leur implication dans l'élimination des débris synaptiques lors de leur remodelage) [163]. Il a récemment été observé que NP2 possède des effets anti-tumoraux, in vitro, sur des lignées cellulaires issues de cancers pancréatiques en favorisant l'apoptose et en inhibant la prolifération des cellules tumorales, la migration et l'invasion (principales caractéristiques des tumeurs malignes) [164].

Pour cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement à PTX3 puisque la majorité des travaux ont été réalisés sur cette molécule.

Structure et expression

Le gène codant PTX3 est localisé sur le chromosome 3q25 et est organisé en trois exons. Les deux premiers exons codent, respectivement, pour le peptide signal et le domaine N-terminal (acides aminés 18 à 179), alors que le troisième exon code pour le domaine C-terminal contenant la signature pentraxine (acides aminés 179 à 381) (Figure 14). L'alignement du domaine C-terminal de PTX3 avec les pentraxines courtes indique que 57 % des acides aminés sont conservés et 17 % d'acides aminés sont identiques. La structure primaire de PTX3 indique la présence d'un site unique de glysosylation au niveau de l'asparagine 220 ce qui explique le poids moléculaire plus élevé observé en SDS-PAGE sous conditions réduites (45 kDa observé pour 40 kDa prédit) [165]. En conditions natives, PTX3 est retrouvée sous forme de décamères avec un poids moléculaire apparent de 440 kDa ; ces structures peuvent s'assembler pour former des eicosamères avec un poids moléculaire apparent de 900 kDa [165].

Différents types cellulaires expriment PTX3 après exposition à des signaux pro-inflammatoires, tels que des cytokines (IL-1β, TNF-α) [166], des agonistes des TLRs, des motifs microbiens (LPS, OmpA, lipoarabinomannanes) ou des micro-organismes [167, 168]. Alors que les DC myéloïdes sont la source majeure de PTX3 [169], cette molécule est aussi exprimée par les fibroblastes [170], les cellules endothéliales [166], les monocytes/macrophages [167], les cellules musculaires lisses [171], les cellules épithéliales rénales [172], les cellules synoviales [173], les chondrocytes, les adipocytes [174] et les cellules épithéliales alvéolaires [175]. En revanche, l'expression de PTX3 est indétectable dans les lymphocytes T et B, les cellules NK et les DCs plasmacytoïdes [167, 169]. Bien que l'expression de l'ARNm de PTX3 soit absent des neutrophiles, il a été montré que la protéine PTX3 mature est stockée dans leurs granules spécifiques et est libérée en réponse à des micro-organismes ou des agonistes des TLRs [83]. La production de PTX3 par les DCs et par les

monocytes/macrophages est réduite par l'IFNγ. L'IL-10 et le CD40 ligand amplifient la production de PTX3 par les DC en réponse au LPS, alors que l'IL-4, la vitamine D3, le dexaméthasone et la prostaglandine E2 l'inhibent [176].

Ligands et fonctions de PTX3

L'une des premières fonctions de PTX3 reportée est sa capacité à fixer certains pathogènes (Tableau 6). PTX3 reconnaît les conidies d'*Aspergillus fumigatus* [177], certaines bactéries Gram négatif et positif (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella typhimurium*) [177, 178], *Paracoccidioides brasiliensis* [179] et plusieurs souches virales [180, 181]. Alors que PTX3 ne fixe pas les spores de *Candida albicans* [177], la présence de MBL permet sa fixation à *Candida albicans* [182]. Le complexe MBL-PTX3 à la surface de *Candida albicans* permet le recrutement de C1q et le dépôt des protéines C3 et C4, favorisant ainsi la phagocytose du pathogène [182]. Parmi les motifs microbiens testés, PTX3 fixe OmpA, un constituant majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatif, alors que PTX3 ne fixe pas le LPS, le LTA, les entérotoxines A et B, l'exotoxine A et le MDP (N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamine) [183]. Les souris déficientes en PTX3 sont sensibles aux aspergilloses pulmonaires invasives [177]. Cette sensibilité est associée à une faible réponse antifongique de type Th1 couplée à une réponse Th2 inappropriée. Le traitement de ces souris par de la PTX3 exogène permet de restaurer une réponse antifongique protectrice Th1 [177]. Une récente étude a montré que la reconnaissance des conidies se fait par le domaine N-terminal de PTX3, mais que la présence des deux domaines de la protéine PTX3 est nécessaire pour la phagocytose [184]. De plus, un modèle in vivo d'aspergillose pulmonaire invasive chez des souris déficientes en récepteurs FcγRIIA/CD32 a permis de mettre en évidence que PTX3 agit comme une opsonine, facilitant la reconnaissance des conidies et la phagocytose de manière dépendante des récepteurs Fcγ et du complément. Par sa fixation aux récepteurs FcγRIIA/CD32, PTX3 favorise l'activation du récepteur CR3 et donc la phagocytose des conidies opsonisées par C3b [184]. Des résultats récents montrent l'activité thérapeutique de PTX3 dans des infections pulmonaires chroniques dues à *Pseudomonas aeruginosa*. Il en résulte une augmentation de l'élimination bactérienne, une diminution de l'afflux de neutrophiles dans les voies pulmonaires et une diminution du taux de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires dans les poumons. Les résultats concernant la phagocytose suggèrent que le complément et les récepteurs Fcγ sont impliqués dans cette activité « anti-pseudomonas » médiée par PTX3 [185].

	CRP	SAP	PTX3
Composants du complément			
C1q	+	+	+
Facteur H	+		+
« C4-binding protein »		+	+
Matrice extracellulaire			
TSG-6			+
« Inter-α-trypsin inhibitor »	-		+
Acide hyaluronique			-
Laminine	+	+	-
Collagène IV		+	-
Fibronectine	+	+	-
Facteurs de croissance			
FGF2	+/-		+
FGF1			-
FGF4			-
Motifs membranaires			
Phosphocholine	+	-	-
Phosphoéthanolamine	-	+	-
LPS	-	+	-
OmpA			+
galactomannane			+
Champignons/levures			
Aspergillus fumigatus	+		+
Paracoccidioides brasiliensis			+
Zymosan	+	+	+
Bactéries			
Pseudomonas aeruginosa	-		+
Staphylococcus aureus	-		+
Echerichia coli	-	+/-	-
Haemophilus influenza	-	+	
Salmonella typhimurium			+
Virus			
Influenza		+	+
Autres ligands			
Cellules apoptotiques	+	+	+
Histones	+	+	+
Héparine	-	+	-
Ficoline-2 (L)	+		+
Ficoline-1 (M)	+		+
MBL	-	+	+
P-sélectine			+

Tableau 6 : Principaux ligands décrits pour les pentraxines. Abréviations: FGF, fibroblast growth factor; MBL, mannose binding lectin; TSG-6, TNF-stimulated gene-6. D'après Garlanda *et al* [146] et Deban *et al* [186] et complété à partir de [182, 187, 188].

Le zymosan induit l'expression de PTX3, qui en retour fixe ce composant microbien. Les macrophages surexprimant PTX3 montrent une activité phagocytaire plus importante du zymosan et de *Paracoccidioides brasiliensis* que les macrophages provenant de souris sauvages [179]. En réponse au zymosan, ces macrophages présentent également une augmentation de l'expression du récepteur dectin-1. De même l'ajout de PTX3 augmente la phagocytose du zymosan par les macrophages provenant de souris sauvages. Cet effet résulte

d'une opsonisation du zymosan par PTX3 qui favorise alors la phagocytose médiée par dectin-1 [179].

La reconnaissance de composés microbiens par PTX3 peut aussi amplifier la réponse inflammatoire, comme observé pour l'interaction de PTX3 et de OmpA. La protéine OmpA est reconnue par les SRs LOX-1 et SREC-1 et induit une réponse pro-inflammatoire par une coopération avec TLR2. OmpA induit l'expression de PTX3 par les DC et les monocytes, qui, en retour, fixe ce composé microbien [178]. A l'inverse du zymosan, PTX3 n'affecte ni la reconnaissance in vitro de OmpA par les SRs, ni l'activation des cellules en réponse à OmpA. Cependant, PTX3 améliore la réponse inflammatoire en réponse à OmpA, en terme de recrutement cellulaire et de production de cytokines [178]. Cet effet est dépendant du complément et est supprimé après traitement avec des inhibiteurs du complément [189]. La protéine PTX3 représente une boucle d'amplification humorale non redondante de la réponse inflammatoire locale induite par OmpA. Mais cette boucle d'amplification n'est pas un mécanisme général, puisque PTX3 ne modifie pas la réponse inflammatoire induite par le LPS, motif microbien non reconnu par PTX3 [189].

La protéine PTX3 est également impliquée dans la résistance contre certaines infections virales. PTX3 fixe à la fois le cytomegalovirus (CMV) humain et murin et réduit l'infection virale des DC in vitro. Les souris déficientes en PTX3 présentent effectivement une plus grande sensibilité au CMV que les souris sauvages mais le traitement de ces souris avec de la PTX3 recombinante réduit le titre viral. De plus, PTX3 protège les souris infectées par le CMV d'une surinfection à *Aspergillus fumigatus* et favorise la production d'IL-12 et d'IFN-γ, respectivement, par les DC et les cellules T $CD4^+$. Cet effet protecteur de PTX3 est absent dans les souris $TLR3^{-/-}$, $TLR2^{-/-}$ ou $TLR4^{-/-}$ infectées par le CMV mais conservé chez les souris $TLR9^{-/-}$ ou $MYD88^{-/-}$ reflétant ainsi l'activation de l' « interferon regulatory factor » 3 (IRF3) médiée par une voie indépendante de TLR9 et MYD88 [180]. PTX3 fixe également le virus de l'influenza H3N2 mais pas H1N1 [181, 190]. PTX3 inhibe l'hémagglutination induite par H3N2, l'activité de la neuramidase virale et neutralise l'infection des cellules par H3N2 [181]. Les souris $PTX3^{-/-}$ sont plus sensibles aux infections par le virus H3N2 que les souris sauvages et le traitement de ces souris avec la PTX3 recombinante réduit la mortalité et la charge virale de ces souris [181].

Lors d'infections telles que les chocs septiques, la tuberculose, une infection par le virus de la dengue, la méningococcie, il est observé une concentration élevée de la protéine PTX3

circulante [191-194]. Dans certaines de ces situations, le taux de PTX3 est corrélé à la sévérité de la maladie.

PTX3 est capable d'interagir avec différentes protéines du complément. PTX3 fixe le premier composant de la voie classique du complément, la protéine C1q [165]. Contrairement aux pentraxines courtes, PTX3 fixe C1q de manière indépendante du calcium. PTX3 n'influence pas de la même manière le complément selon qu'elle soit soluble ou associée à la membrane. En effet, la fixation de PTX3 à la surface des cellules apototiques augmente l'opsonisation des cellules par les protéines C1q et C3, favorisant ainsi l'activation de la voie classique du complément [195]. En revanche, la protéine PTX3 soluble inhibe l'activation du complément en bloquant l'interaction de C1q avec les immunoglobulines [195]. Une autre étude a montré que PTX3 pouvait également fixer la protéine régulatrice du complément C4BP, protéine qui, en agissant sur le facteur I, inhibe l'activation du complément. PTX3, en se fixant aux cellules apoptotiques ou à la matrice extracellulaire dérivée de cellules endothéliales, permet le recrutement de C4BP pour ainsi limiter une activation excessive du complément [187]. PTX3, tout comme CRP, interagit avec le facteur H (régulateur soluble de la voie alterne du complément), favorisant l'opsonisation par le facteur H de cellules apoptotiques, limitant ainsi une activation exagérée du complément [196]. PTX3 intervient également dans l'activation de la voie des lectines en interagissant avec les ficolines 1 et 2 [197, 198]. PTX3 favorise la fixation de la ficoline 2 sur *Aspergillus fumigatus* (et inversement), mais favorise aussi l'opsonisation du pathogène par la protéine du complément C4 [198].

Contrairement aux pentraxines CRP et SAP qui reconnaissent les cellules apoptotiques et facilitent leur élimination [149, 156], l'opsonisation des cellules apototiques par PTX3 inhibent leur élimination [199]. De plus, PTX3 inhibe la présentation croisée des antigènes dérivés de cellules apoptotiques aux cellules T $CD8^+$ [200]. PTX3 empêche la fixation de C1q sur les cellules apototiques, inhibant ainsi leur élimination médiée par C1q [200]. Lors de l'apoptose des neutrophiles, les granules vont fusionner avec la membrane plasmique. Cette fusion conduit à la translocation de PTX3 contenue dans les granules à la surface des neutrophiles apoptotiques, qui va alors servir de signal « eat-me » pour la reconnaissance des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et ainsi faciliter leur phagocytose [201].

PTX3 interagit avec les protéines de la matrice extracellulaire, telles que le « TNF-α-induced protein 6 » (TSG-6) et l'inhibiteur de la trypsine (« inter-α trypsin inhibitor » (IαI)).

La liaison de PTX3 à ces deux protéines est essentielle pour une correcte organisation de la matrice du cumulus oophorus. Il a été montré que l'absence de PTX3 chez des souris femelles est associée à un défaut de fertilité due à l'instabilité de la matrice du cumulus [202, 203]. De plus, une étude récente montre qu'un polymorphisme de PTX3 est associé à la fertilité femelle [204].

L'ensemble de ces données montre que PTX3 est un PRR soluble multifonctionnel à la croisée des chemins entre l'immunité innée, l'inflammation et la fertilité femelle [146].

2. La mucoviscidose

« Malheur à l'enfant qui laisse un goût salé lorsqu'on l'embrasse sur le front, on lui a jeté un sort, il en mourra bientôt »

Dès le Moyen Âge, le sort funeste du nouveau-né dont la mère remarquait le « baiser salé », c'est-à-dire le goût salé laissé par un baiser sur le front de l'enfant, était connu. En 1936, la maladie est décrite pour la première fois sous le nom de « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie » par le pédiatre Guido Fanconi. En 1938, la mucoviscidose a été décrite comme une maladie à part entière par le docteur Dorothy Hansine Anderson, après autopsie sur des enfants souffrant de malnutrition qui ont révélé des obstructions des canaux glandulaires par du mucus. Le terme « mucoviscidose » créé à partir des termes « mucus » et « visqueux », fut utilisé pour la première fois en 1943 par le docteur Sydney Farber. En 1946, Anderson et Hodges précisent leurs observations et apportent des preuves convaincantes que la maladie est d'ordre génétique, résultat d'une mutation autosomique récessive. C'est en 1953, après observation d'un état de prostration chez des enfants atteints de mucoviscidose lors des vagues de chaleurs à New York, que le docteur Paul di Sant' Agnese montre que la sueur possède une teneur excessive en sels [205]. En 1983, Paul M. Quinton décrit le défaut de perméabilité aux ions chlorures au niveau des cellules épithéliales des glandes sudoripares [206]. La même année, Knowles observe le même phénomène au niveau de l'épithélium pulmonaire [207]. En 1989, le gène impliqué dans la mucoviscidose a été identifié par l'équipe de Riordan [208]. Ce gène code pour la protéine CFTR ou « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator », un canal chlore. Cette protéine est la principale voie de sécrétion du chlorure. Son absence ou son dysfonctionnement entraîne une déshydratation des sécrétions des muqueuses au niveau de divers organes (poumons, pancréas, intestin), une inflammation excessive et une colonisation microbienne des voies respiratoires.

A. Le gène et la protéine CFTR

1. Structure du gène CFTR

Le gène *CFTR* est situé sur le bras long du chromosome 7, en position q31, et s'étend sur environ 250 kb. Le gène est constitué de 27 exons. La protéine CFTR, de 1480 acides aminés, présente un poids moléculaire de 170 kDa (Figure 15).

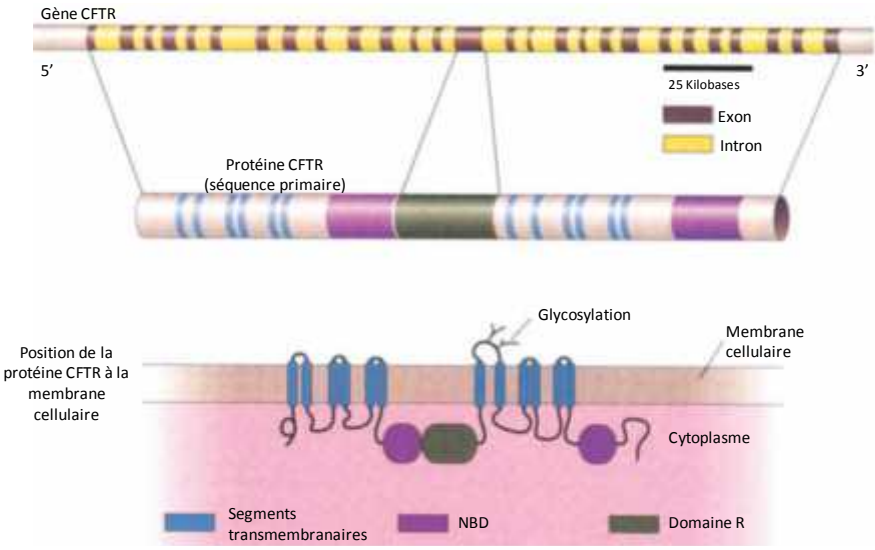


Figure 15 : Structure du gène et de la protéine CFTR. Le gène codant la protéine CFTR (en haut) se situe sur le bras long du chromosome 7 et comprend 27 exons qui codent pour une protéine de 1480 acides aminés (au milieu). La protéine mature, après glycosylation et insertion dans la membrane, est représentée en bas. La protéine CFTR est un membre de la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Elle contient deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD, nucleotide binding domain) qui fixent et hydrolysent l'ATP, deux ensembles de double segments transmembranaires qui forment le canal, et un domaine cytoplasmique (domaine R). Le domaine R, propre à CFTR, est hautement chargé avec de nombreux sites de phosphorylation pour les protéines kinase A ou C. D'après Gibson *et al*, 2003 [209].

2. Structure et fonctions de la protéine CFTR

La protéine CFTR est exprimée à la membrane apicale des épithéliums sécrétoires de différents organes. De part sa structure moléculaire, cette protéine appartient à la superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) et comprend cinq domaines : deux segments transmembranaires, deux domaines de fixation des nucléotides (NBD) et un large domaine accessoire hydrophile (domaine R) (Figure 15). La protéine CFTR a pour principale fonction d'être un canal chlore. L'ouverture et la fermeture du canal CFTR sont contrôlées par une balance des activités kinases et phosphatases à l'intérieur de la cellule et par les taux cellulaires d'ATP. Les NBD vont hydrolyser l'ATP pour réguler le canal. La phosphorylation du domaine R va permettre de réguler l'activité du canal. L'activation des protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) entraîne la phosphorylation de multiples résidus sérine au niveau du domaine R. Une fois le domaine R phosphorylé, l'ouverture du canal est régulée par l'hydrolyse de l'ATP au niveau des domaines NBD. Pour finir, les phosphatases vont déphosphoryler le domaine R et le canal va retrouver son état de repos.

a) Canal ionique

La protéine CFTR est un canal chlorure qui fait sortir les ions Cl^- de la cellule. La protéine CFTR est également perméable pour d'autres anions, tels que le bicarbonate (rôle dans le maintien du pH physiologique) [210] et le glutathion [211]. La protéine CFTR peut également réguler d'autres canaux ioniques. En effet, CFTR active un autre canal chlore appelé ORCC (« Outwartly Rectifying Chloride Channel ») permettant la sécrétion d'ions chlorures. En revanche, la protéine CFTR régule négativement le canal sodium ENaC (« Epithelial sodium channel »), canal responsable de l'absorption d'ions sodium au pôle apical de la cellule épithéliale. Une absorption augmentée ou continue d'ions sodium par le canal ENaC entraîne une déshydratation de la surface des voies respiratoires aboutissant à une élimination mucociliaire défectueuse [212].

b) Récepteur pour Pseudomonas aeruginosa

La protéine CFTR a été décrite comme un récepteur cellulaire pour *Pseudomonas aeruginosa* [213]. La fixation du LPS de la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* non-mucoïde à la première boucle extracellulaire de CFTR [214] initie la formation des radeaux lipidiques incorporant des protéines, telles que la calvéoline et la MVP (« major vault protein »), nécessaires pour l'internalisation de la bactérie [215, 216]. L'internalisation de *Pseudomonas aeruginosa* par les cellules épithéliales induit la production d'IL-1β qui, par effet autocrine, induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, CXCL8 et CCL1 impliquées dans le recrutement des neutrophiles [217].

3. Les classes de mutations

A ce jour, plus de 1900 mutations ont été identifiées sur le gène codant la protéine CFTR (The Cystic Fibrosis Mutation Database ; www.genet.sickkids.on.ca). La plupart de ces mutations sont très rares, à l'exception de la délétion de trois paires de bases qui résulte en une perte de l'acide aminé phénylalanine à la position 508 de la protéine CFTR. Cette mutation, appelée F508del, représente environ 70 % des mutations dans la mucoviscidose [218].

Les études sur la synthèse et les fonctions de la protéine CFTR ont permis d'identifier six mécanismes différents concernant les mutations (Figure 16).

La classe I comprend les mutations qui altèrent la production de la protéine CFTR. Ces mutations introduisent des codons stop prématurés au sein du gène *CFTR*. Cette classe inclut les mutations non-sens, les insertions-délétions, et les anomalies d'épissage. Dans certains cas, l'ARNm muté est instable et donc la protéine n'est pas produite. Dans d'autres

cas, il y a production de protéines tronquées ou aberrantes qui sont souvent instables et donc rapidement dégradées [218, 219].

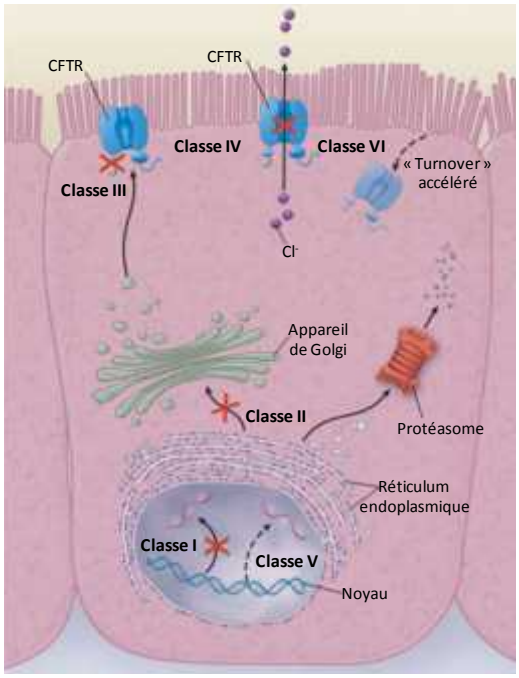


Figure 16 : Les différentes classes de mutations affectant le gène codant pour la protéine CFTR. Les classes de mutations au niveau du gène *CFTR* incluent l'absence de synthèse (classe I) ; la maturation défectueuse de la protéine et sa dégradation prématurée (classe II) ; la régulation désordonnée, telle que la diminution de la fixation de l'ATP et l'hydrolyse (classe III) ; la conductance défectueuse du canal (classe IV) ; le nombre réduit de transcript *CFTR* dû à des défauts au niveau du promoteur ou de l'épissage (classe V) ; et l'accélération du cycle de synthèse/dégradation (turnover) des protéines (classe VI). Adapté de Rowe *et al*, 2005 [220].

Les mutations de classe II, comprenant notamment la mutation F508del, perturbent le processus de maturation et le transport intracellulaire de la protéine. La protéine CFTR « normale » est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) avant d'être transportée dans l'appareil de Golgi puis libérée au niveau de la membrane apicale. A l'inverse, F508del, reconnue comme un mutant dû à sa mauvaise conformation, est retenue dans le RE puis dégradée dans le protéasome. Ainsi, la protéine est soit absente, soit en quantité réduite à la membrane apicale [218, 219].

Les mutations de la classe III sont responsables d'un défaut de régulation de la protéine CFTR. Ces mutations se situent principalement au niveau des domaines de fixation de l'ATP (domaines NBD) (Figure 16). L'ATP ne pouvant plus se fixer, ces mutations entraînent donc un défaut de régulation de l'ouverture du canal chlore [218, 219].

La classe IV regroupe les mutations qui diminuent le temps d'ouverture du canal chlore ou qui modifient sa sélectivité aux ions (conductance altérée). Ces mutations sont

localisées au niveau des domaines transmembranaires de la protéine CFTR, impliqués dans la formation du pore du canal [218, 219].

La classe V comprend des mutations au niveau du promoteur qui réduisent la transcription du gène cftr et des mutations entrainant un épissage anormal ou alternatif du transcript *CFTR* [218, 219].

Les mutations de la classe VI affectent la stabilité de la protéine CFTR à la membrane plasmique. Ces mutations, situées au niveau de la région C-terminale de la protéine, n'affectent pas la fonction et la localisation de la protéine CFTR, mais induisent une internalisation et une dégradation rapide de la protéine [221].

4. Les relations génotype/phénotype

Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, il existe une grande diversité de tableaux cliniques, même parmi les patients porteurs des mêmes mutations. La littérature indique que la relation entre génotype et phénotype est complexe : d'une part, la diversité des mutations ne répond qu'en partie à celle des phénotypes et, d'autre part, le mécanisme de perte de fonction de CFTR de nombreuses mutations n'est pas connu, ce qui ne permet pas de les classer. De plus, certaines mutations peuvent avoir plusieurs conséquences fonctionnelles et donc appartenir à plusieurs classes. Certaines études ont mis en évidence une relation génotype/phénotype sur la fonction pancréatique. En effet, les formes avec insuffisance pancréatique sont le plus souvent associées avec des mutations de classes I, II, III et VI. Les classes IV et V conduisent en général à des phénotypes plus modérés de mucoviscidose et une fonction pancréatique normale [222, 223]. La relation génotype/phénotype au niveau de la fonction pulmonaire n'est pas totalement déterminée.

L'expression clinique de la maladie serait influencée par d'autres facteurs, tels que l'environnement ou les gènes modificateurs. Parmi les gènes pouvant moduler la sévérité de l'atteinte pulmonaire, nous retrouvons les gènes codant pour le TGF-β1, la « mannose binding lectin 2 », CXCL8, l'IL-10 et les glutathion-S-transferase (GST) [224].

B. Présentation clinique et approches thérapeutiques

1. Dépistage et diagnostique

Le diagnostique de la mucoviscidose doit être considéré chez un enfant ou un adulte présentant des signes ou des symptômes listés dans le tableau 7.

Général (tout âge)	Antécédents familiaux de mucoviscidose, sensation de saveur salée de la peau, toux avec expectorations, présence de *P. aeruginosa* mucoïde dans les sécrétions des voies respiratoires, hypochlorémie et alcalose métabolique
Nouveau-né	Iléus méconial, ictère néonatal prolongé, calcifications abdominales ou scrotales, atrésie intestinale
Petite enfance	Syndrome bronchique persistant sur les radiographies thoraciques, retard staturo-pondéral, syndrome œdémateux généralisé ou hypoprotéinémie, diarrhée chronique, distension abdominale, pneumonie à *S. aureus*, hypertension intracrânienne idiopathique (déficit en vitamine A), anémie hémolytique (déficit vitamine E)
Enfance	Pansinusite chronique ou polypose nasale, stéatorrhée, prolapsus rectal, syndrome d'occlusion distale de l'intestin, pancréatite idiopathique récurrente ou chronique, atteintes hépatiques (cirrhose biliaire, atrésie de la vésicule biliaire et lithiase du cholédoque)
Adolescence et âge adulte	Aspergillose bronchopulmonaire allergique, Pansinusite chronique ou polypose nasale, bronchectasie, hémoptysie, pancréatite idiopathique récurrente, hypertension portale, puberté retardée, azoospermie secondaire à une agénésie congénitale bilatérale des canaux déférents

Tableau 7 : Signes et symptômes associés à la mucoviscidose. Adapté de O'Sullivan and Freedman, 2009 [225].

Le dépistage néonatal de la mucoviscidose repose sur le dosage de la trypsine immunoréactive (TIR), une enzyme du pancréas, effectué à partir de quelques gouttes de sang séché prélevé sur papier buvard 72 h après la naissance (test de Guthrie). Pour les nouveaux-nés ayant une TIR élevée, une étude génétique visant à rechercher les mutations du gène *CFTR* sera réalisée. En routine, seule une trentaine de mutations est recherchée alors qu'il a été décrit plus de 1900 mutations sur le gène *CFTR*. C'est pourquoi le diagnostic de la maladie se fait généralement par le test de la sueur. Ce test consiste en la transpiration par iontophorèse à la pilocarpine (passage d'un faible courant à travers la peau pour faire passer la pilocarpine, substance qui stimule la sécrétion de sueur par les glandes sudoripares). La concentration en chlore est alors analysée dans la sueur recueillie. A l'état normal, la concentration en chlore ne dépasse pas les 40 mmol/L. Le diagnostic de mucoviscidose peut être posé chez un patient présentant des signes cliniques évocateurs si la concentration en chlore dans la sueur est supérieure à 60 mmol/L ou si la concentration est intermédiaire (30-59 mmol/L pour les enfants de moins de 6 mois, 40-59 mmol/L pour les individus plus âgés), et dans le cas de deux mutations identifiées [225].

2. Signes cliniques

La mucoviscidose est une maladie à atteinte polyviscérale qui conduit à des modifications pathologiques dans les organes exprimant CFTR, tels que les poumons, les sinus, le foie, le pancréas et l'appareil reproducteur [225, 226] (Figure 17).

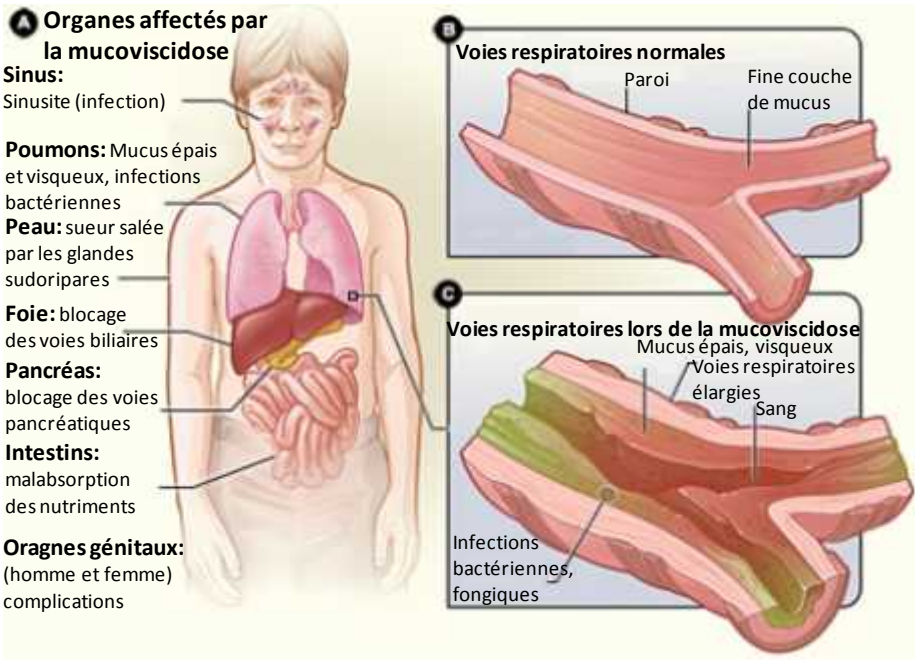


Figure 17: La mucoviscidose, une maladie polyviscérale. (A) Représentation des divers organes pouvant être affectés chez les patients atteints de mucoviscidose. (B) Coupe transversale des voies aériennes normales (B) comparée à celles des patients (C). Les voies respiratoires sont encombrées de mucus épais et visqueux contenant du sang et des pathogènes. Adapté de http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cf/

Nous préciserons en particulier les atteintes pulmonaires (organe majoritairement touché lors de la mucoviscidose), les atteintes digestives (qui peuvent apparaître dès la naissance), les atteintes endocrines (telles que le diabète), et les atteintes génitales.

a) Atteintes pulmonaires

Les insuffisances pulmonaires sont responsables d'environ 90 % des décès associés à la mucoviscidose. Ces complications pulmonaires sont associées à une inflammation excessive des voies respiratoires et à des infections récurrentes. Les poumons des enfants atteints de mucoviscidose sont en apparence normaux à la naissance mais sont rapidement infectés et inflammés. L'inflammation des voies respiratoires chez l'enfant apparaît très tôt, même en l'absence d'infection, par l'accumulation de neutrophiles et une concentration excessive de CXCL8 et de protéases [227]. La colonisation et l'infection des voies respiratoires se caractérisent par une flore diversifiée. Peu de temps après la naissance, des infections par *Haemophilus influenzae* et/ou *Staphylococcus aureus*, apparaissent suivies par *Pseudomonas aeruginosa* (Figure 18). La fréquence des cultures positives pour *Pseudomonas aeruginosa* augmente avec l'âge, touchant presque 80 % des patients âgés de plus de 18 ans (Figure 18). D'autres pathogènes émergent chez les patients atteints de mucoviscidose, tels que les bactéries *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter*

xylosoxidans [228], *Staphylococcus aureus résistant à la méticilline* (MRSA) [229] ou les champignons, tels que *Aspergillus fumigatus* [230], *Candida albicans* [231] ou *Scedosporium apiospermum* [232]. La colonisation par *Aspergillus fumigatus* et/ou par *Candida* est principalement retrouvée chez des patients plus âgés, mais la relevance pathophysiologique reste encore mal connue à ce jour. Dans le contexte de la mucoviscidose, *Aspergillus fumigatus* apparaît responsable de diverses maladies, telles que l'asthme, la bronchite, l'aspergillome et notamment l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) qui est retrouvée chez environ 1 à 11 % des patients selon la localisation géographique [233]. Des mycobactéries atypiques sont parfois retrouvées dans les sécrétions respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Selon une étude multicentrique sur la prévalence des mycobactéries non tuberculeuses (NTM) chez les patients atteints de mucoviscidose issue de 21 centres aux Etats-unis, nous retrouvons principalement *Mycobacterium avium* (72 %) et *Mycobacterium abcessus* (16 %) [234]. Les infections virales sont souvent associées à de graves symptômes respiratoires et un déclin de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Chez 40 % des patients avec exacerbations pulmonaires, un virus est détecté, contre seulement 9 % chez les patients présentant une fonction respiratoire stable [235]. Les virus les plus fréquemment détectés chez les patients atteints de mucoviscidose sont le virus respiratoire syncytial (VRS), les virus influenza A et B et certains virus parainfluenza et adénovirus [235]. Les infections virales semblent faciliter les infections et les colonisations bactériennes, notamment en favorisant l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales [236].

D'autres complications de l'appareil respiratoire peuvent survenir, telles que les hémoptysies (expectorations de sang) et les pneumothorax (épanchements d'air dans la cavité pleurale). L'ensemble de ces complications pulmonaires peuvent aboutir à l'arrêt respiratoire [237].

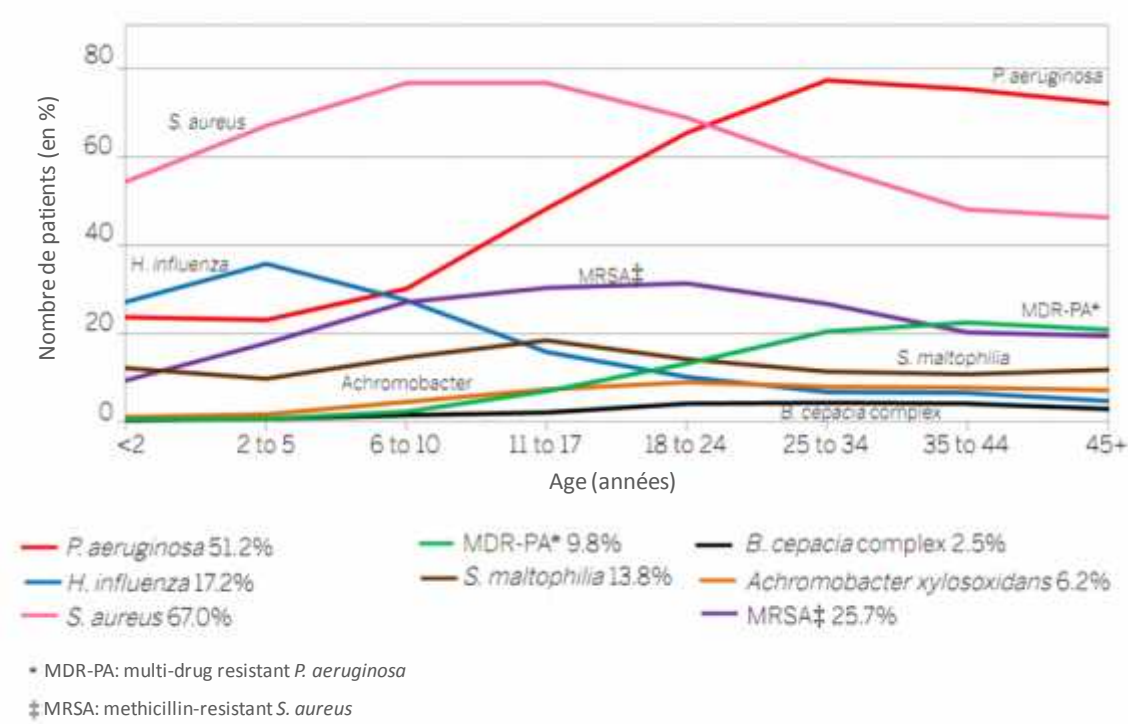


Figure 18 : Graphique représentant les germes respiratoires en fonction de l'âge des patients atteints de mucoviscidose. Adapté à partir de Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010, http://www.cff.org.

b) Atteintes digestives

Les manifestations digestives sont fréquentes ; elles surviennent à différents stades de la maladie et tout au long de la vie du patient atteint de mucoviscidose (Tableau 7). L'iléus méconial néonatal, le syndrome d'occlusion distale de l'intestin (« distal intestinal obstruction syndrome » ou DIOS) et la constipation sont les conséquences de l'augmentation de la viscosité du mucus intestinal et du temps de transit intestinal prolongé dans la mucoviscidose [238]. L'iléus méconial apparaît à la naissance dans 13-17 % des cas et est caractérisé par la complète obstruction intestinale due à l'accumulation de méconium adhérent et desséché. Parmi les enfants atteints de mucoviscidose, 85-90 % d'entre eux développent des insuffisances pancréatiques qui peuvent être présentes dès la naissance ou évoluer au cours de la première année de vie [225]. Les insuffisances pancréatiques conduisent à une maldigestion des graisses responsables d'une stéatorrhée et d'une diarrhée chronique, une carence en vitamines liposolubles (A, D, E et K) et une malnutrition par malabsorption [225]. Les complications hépatobiliaires sont la troisième cause de mortalité dans la mucoviscidose (après les complications pulmonaires et les complications des greffes), représentant 2,5 % de la mortalité globale chez les patients atteints de mucoviscidose [239].

c) *Atteintes endocrines*

Le diabète associé à la mucoviscidose (« cystic fibrosis-related diabetes » ou CFRD) touche 2 % des enfants, 20 % des adolescents et 40 à 50 % des adultes, avec une incidence et une prévalence plus élevées chez les femmes âgées de 30 à 39 ans [240]. Le CFRD est lié à l'âge, aux mutations sévères du gène codant la protéine CFTR, aux infections et inflammations respiratoires, à la malnutrition, aux dysfonctions du foie et aux insuffisances pancréatiques [241]. Il peut également être iatrogène notamment secondaire à l'utilisation de corticostéroïdes [241]. Le CFRD fait parti d'un continuum d'anomalies pour la tolérance au glucose, allant d'une tolérance au glucose normale, d'une intolérance aux hydrates de carbone, d'un CFRD sans hyperglycémie à jeun à un CFRD avec hyperglycémie à jeun [241]. Le CFRD est un type de diabète unique qui partage des caractéristiques avec les diabètes classiques de type 1 (insulino-dépendant) et de type 2 (insulino-résistant) (Tableau 8).

	Diabète de type 1	**Diabète de type 2**	**CFRD**
Prévalence dans la population	0.2 %	11 %	35 %
Pic d'âge de début	Enfants et adolescents	Adultes	18-24 ans
Anticorps (+)	Oui	Non	Probablement non
Sécrétion d'insuline	Peut être nulle	Diminuée	Sévèrement diminuée mais pas nulle
Sensibilité à l'insuline	Un peu diminuée	Sévèrement diminuée	Un peu diminuée*
Traitement	Insuline	Régime, traitements oraux, insuline	Insuline
Complications micro-vasculaires	Oui	Oui	Oui mais moins
Complications macro-vasculaires	Oui	Oui	Non
Cause du décès	Atteinte cardiovasculaire, néphropathie	Atteinte cardiovasculaire	Atteinte pulmonaire

Tableau 8. Comparaison entre le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le CFRD. (* : Sensibilité à l'insuline sérieusement diminuée au cours d'une maladie aigüe). Adapté de O'Riordan *et al*, 2009 et de Moran *et al*, 2010 [241, 242].

d) *Atteintes génitales*

La plupart des hommes atteints de mucoviscidose (>95 %) ont une azoospermie obstructive qui les rend infertiles. Cette obstruction est due à une agénésie congénitale bilatérale des canaux déférents (« congenital bilateral absence of the vas deferent » ou CBAVD) [243]. Les femmes atteintes de mucoviscidose sont fertiles. Bien qu'il y ait une

certaine controverse à propos de la grossesse chez les patientes atteintes de mucoviscidose, le consensus est que les femmes qui ont une nutrition et une réserve pulmonaire adéquates peuvent mener à terme leur grossesse [244].

3. Les thérapies

La survie des patients s'est considérablement améliorée, passant de 7 ans en 1965 à une médiane de survie de 36 ans en 2011, d'après le rapport annuel des données 2011 de la Cystic Fibrosis fundation (http://www.cff.org). Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la mucoviscidose et des avancées thérapeutiques majeures ont contribué à une amélioration de la survie des patients. La prise en charge thérapeutique de la mucoviscidose est complexe au vu de la diversité des atteintes cliniques. Les traitements sont principalement symptomatiques (Tableau 9). La kinésithérapie respiratoire reste une intervention essentielle pour permettre le désencombrement des voies respiratoires afin de faciliter l'élimination mucociliaire. Ces interventions peuvent être manuelles ou instrumentales. Ces techniques de désencombrement des voies respiratoires incluent notamment la kinésithérapie respiratoire conventionnelle ou le drainage postural associé à des percussions et vibrations thoraciques, le drainage autogène, la pression expiratoire positive et les compressions thoraciques à haute fréquence [245].

Dans ce paragraphe, nous verrons quelques exemples de traitements utilisés en pratique quotidienne ainsi que certains traitements en cours de développement (Tableau 9). Ces traitements concernent majoritairement les atteintes respiratoires associées à la mucoviscidose.

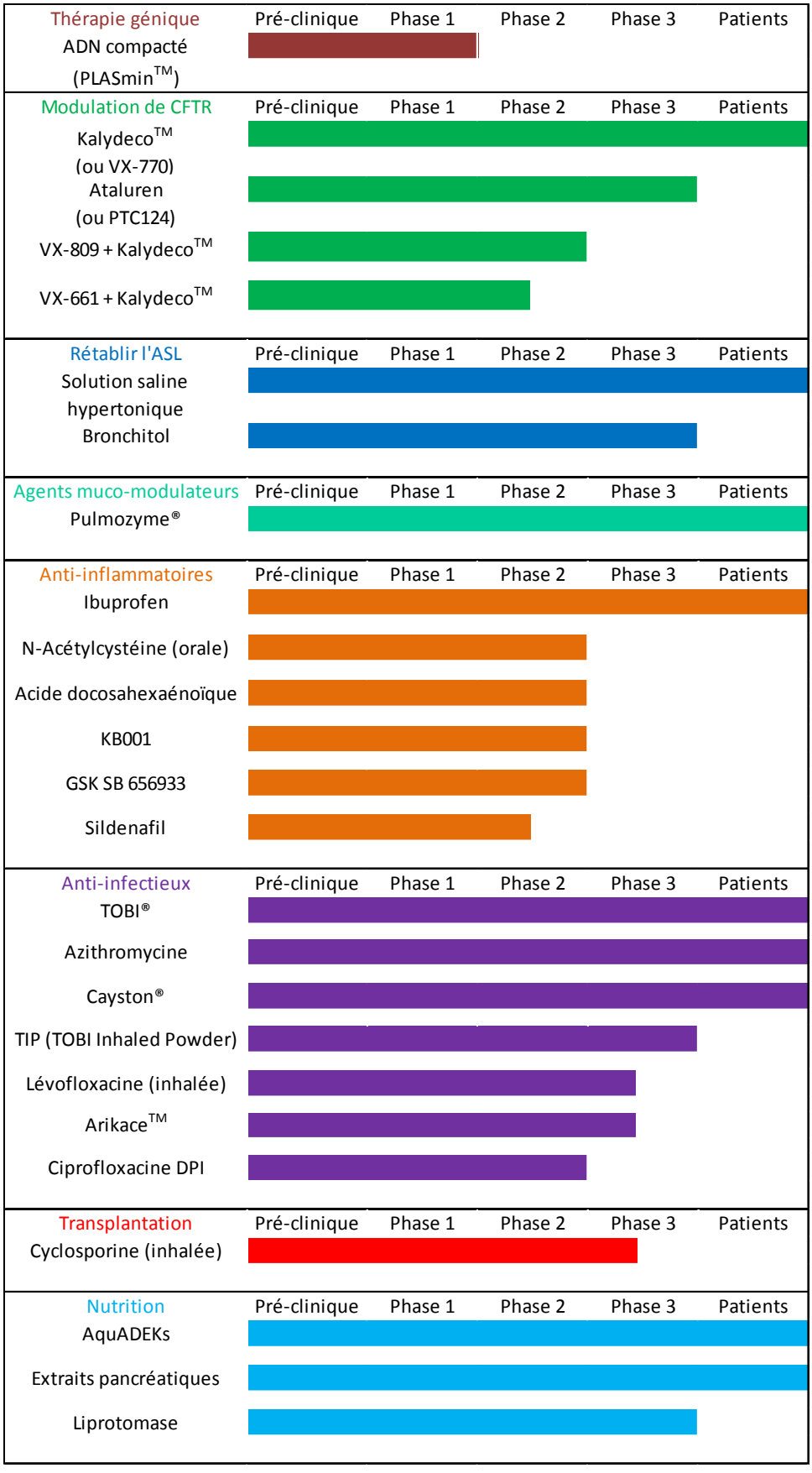


Tableau 9 : Exemples d'essais cliniques en cours dans le traitement palliatif de la mucoviscidose. Modifié à partir de la Cystic Fibrosis fundation (site : www.cff.org).

a) Les traitements symptomatiques

✓ Agents muco-modulateurs

La normalisation de la composition du mucus par des agents muco-modulateurs favorise l'amélioration de la clairance mucociliaire et limite ainsi la progression de l'atteinte pulmonaire. Le Pulmozyme® est une DNase recombinante humaine (rhDNase) qui est capable d'hydrolyser l'ADN issu des bactéries et des polynucléaires et ainsi de réduire la viscosité et la quantité de mucus. Ce traitement permet non seulement une réduction de la fréquence des exacerbations mais possède aussi une action anti-inflammatoire. Un traitement à la rhDNase empêche la progression du nombre de neutrophiles, de CXCL8 et d'élastase ainsi qu'une diminution de la concentration des MMPs dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de mucoviscidose [246, 247].

Le sérum salé hypertonique régule l'osmolarité du mucus, améliore la fonction pulmonaire et diminue les exacerbations bronchiques, mais son inhalation est mal tolérée et est associée à des bronchospasmes [248]. En revanche, il semblerait que l'inhalation d'une solution saline hypertonique contenant de l'acide hyaluronique (Hyaneb) induit moins d'effets indésirables qu'une solution saline hypertonique seule [249].

Le Bronchitol® (Mannitol) est un autre agent osmotique, présenté sous forme d'une poudre sèche à inhaler. Deux études de phase III ont montré une amélioration durable de la fonction respiratoire (amélioration de la VEMS ou volume expiré maximal en une seconde) [250, 251].

✓ Thérapeutiques anti-infectieuses

L'antibiothérapie doit être précoce, à doses élevées, selon un rythme et un mode d'administration adaptés, en surveillant les effets indésirables éventuels. La prise d'antibiotiques peut être intraveineuse, orale ou par aérosol.

La tobramycine inhalée (Tobi®) est indiquée dans le traitement au long cours des infections pulmonaires chroniques dues à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose, âgés de six ans et plus, et ayant un VEMS entre 25 et 75 % [252]. La tobramycine est un antibiotique de la famille des aminosides. Ce bactéricide agit en altérant la perméabilité de la membrane cellulaire, entraînant la rupture progressive de l'enveloppe puis éventuellement la mort de la cellule. Une nouvelle formulation de la tobramycine est en cours de développement : TIP (TOBI Inhaled Powder). C'est une préparation sous forme de poudre sèche unique, utilisant la technologie PulmoSphere® qui permet d'obtenir des particules

légères et poreuses capables de pénétrer en profondeur dans les poumons. L'essai clinique EAGER a montré un profil d'innocuité et d'efficacité comparable entre Tobi® et TIP, mais TIP offre une option de traitement plus rapide et plus pratique pour les patients atteints de mucoviscidose infectés par *Pseudomonas aeruginosa* [253].

L'azithromycine est un antibiotique oral ayant également des propriétés anti-inflammatoires. Cet antibiotique réduit de manière significative le nombre d'exacerbations respiratoires ainsi que le déclin de la fonction pulmonaire, améliorant ainsi la qualité de vie. Il réduit également la viscosité des expectorations, l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa* aux voies respiratoires et perturbe la capacité de la bactérie à produire de l'alginate [254]. Chez les patients non infectés par *Pseudomonas aeruginosa*, l'azithromycine réduit de manière significative le nombre de neutrophiles et de marqueurs sériques inflammatoires dans les 28 jours suivant le début du traitement [255]. L'azithromycine est également associée à une réduction des exacerbations pulmonaires et un gain de poids chez les patients non infectés par *Pseudomonas aeruginosa* [256].

L'aztréonam en solution pour inhalation (Cayston®) est un antibiotique de la classe des monobactanes capable de se lier aux protéines liant la pénicilline des bactéries sensibles (telles que *Pseudomonas aeruginosa*) entraînant l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne et une lyse des cellules [257].

La colonisation des voies respiratoires par *Aspergillus fumigatus* chez les patients atteints de mucoviscidose est fréquente et peut conduire à une ABPA. Le traitement de l'ABPA repose sur la corticothérapie orale mais comporte certains effets indésirables comme le diabète, l'ostéopénie et le retard statural. L'association à un anti-fongique (itraconazole, voriconazole ou posaconazole) permet une diminution de la charge antigénique et une épargne corticoïde. Les azoles entraînent une diminution de l'éosinophilie dans les expectorations, des IgE sériques et des exacerbations [258]. Un traitement par omalizumab (anticorps anti-IgE recombinant) permettrait de diminuer les doses de corticoïdes. Une étude clinique (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT00787917) est en cours pour évaluer l'innocuité et l'efficacité de l'omalizumab.

- ✓ Thérapeutiques anti-inflammatoires

L'ibuprofène est un anti-inflammatoire non-stéroïdien qui, à haute dose, a un effet bénéfique sur le déclin de la fonction respiratoire [259] et réduit la quantité de neutrophiles dans les poumons [260] chez les patients atteints de mucoviscidose.

La diminution de la sécrétion de glutathion, observée chez les patients atteints de mucoviscidose, favorise l'inflammation et aggrave le stress oxydatif. Une étude de phase II a montré que de fortes doses de N-acétylcystéine par voie orale tend à augmenter la concentration de glutathion extracellulaire au niveau des expectorations [261]. Une autre étude de phase I a montré qu'après 4 semaines de traitements avec la N-acétylcystéine à forte dose, une diminution significative de l'activité de l'élastase du neutrophile au niveau des voies respiratoires est observée chez les patients atteints de mucoviscidose [262].

Les neutrophiles libèrent des protéases telles que l'élastase qui, en temps normal, est neutralisée par l'alpha$_1$-antitrypsine (AAT), un inhibiteur endogène. Or, chez les patients atteints de mucoviscidose, la balance protéases/anti-protéases est déséquilibrée, permettant aux protéases de dégrader l'épithélium respiratoire, de favoriser les infections et la production de mucus. Une étude pilote de 2006 a montré que l'AAT humaine recombinante, administrée par inhalation pendant 4 semaines à 39 patients atteints de mucoviscidose, est bien tolérée mais possède des effets bénéfiques limités sur l'activité de l'élastase et de quelques autres marqueurs de l'inflammation [263]. L'étude menée par l'équipe de Griese *et al* en 2007 montre que l'inhalation d'AAT chez des patients atteints de mucoviscidose entraîne une augmentation de la concentration d'AAT au niveau des expectorations dès deux semaines de traitement. Après quatre semaines de traitements, une diminution de l'activité de l'élastase libre dans les expectorations est observée ainsi qu'une diminution du pourcentage de neutrophiles et une diminution du nombre de colonies de *Pseudomonas aeruginosa* [264]. En revanche aucune amélioration du VEMS n'est observée après quatre semaines de traitement. Il est à noter que la principale limite de cette étude est le manque d'un groupe contrôle traité avec un placebo.

b) Les traitements correcteurs

- ✓ Les voies alternatives de sécrétion ionique

Cette thérapeutique est centrée sur la mise au point de molécules modulant l'activité d'autres transporteurs ioniques (autres que CFTR) de la membrane apicale.

Le Denufusol stimule les voies de sécrétion de chlore (indépendantes de CFTR) en activant le récepteur purinergique P2Y$_2$. Des résultats intéressants ont été obtenus lors d'une étude de phase III (TIGER-1) montrant une amélioration de la fonction respiratoire après 24 semaines de traitement avec le Denufusol [265]. En revanche, une autre étude de phase III, (TIGER-2), comprenant un traitement de Denufusol pendant 48 semaines, ne montre pas

d'amélioration des fonctions pulmonaires ou de réduction de l'incidence des exacerbations [266].

Le Lancovutide (Moli1901 ou Duramycin®) est un polypeptide polycyclique de 19 acides aminés dérivé de *Streptomyces cinnamoneous* capable d'élever les taux de calcium intracellulaire pour ainsi activer les canaux chlorures non CFTR. Les résultats d'une étude de phase II (nébulisations de doses croissantes chez 24 patients, 5 jours consécutifs) montrent une bonne tolérance et une amélioration significative du VEMS [267].

Une autre voie de recherche vise à diminuer l'absorption excessive de sodium des épithéliums des voies respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, un modèle murin surexprimant le canal ENaC présente une maladie pulmonaire similaire à celle retrouvée chez les patients (diminution du volume de l'ASL ou « airway surface liquid », augmentation du mucus, défaut d'élimination mucociliaire…) [268]. Ce modèle animal a permis de mettre en évidence le rôle délétère de l'excès de réabsorption de sodium via le canal ENaC dans la mucoviscidose. L'amiloride, inhibiteur classique du canal ENaC, administré par inhalation chez les patients atteints de mucoviscidose, ne montre pas d'effets thérapeutiques bénéfiques. L'absence d'effet résulterait d'une demi-vie très courte de l'amiloride [269]. De nouveaux antagonistes du canal ENaC sont en cours d'étude.

- ✓ La thérapie protéique

La thérapie protéique s'attaque directement à l'anomalie moléculaire elle-même. Comme les mutations du gène *CFTR* ont des conséquences fonctionnelles différentes, la pharmacothérapie doit être adaptée pour cibler des mutations spécifiques. Une liste exhaustive des différentes thérapies protéiques en cours de développement est présentée ci-dessous, dont l'une d'entre elles a été récemment approuvée pour le traitement de certains patients atteints de mucoviscidose.

En janvier 2012, l'ivacaftor (Kalydeco ou VX-770), un potentialisateur du canal CFTR, a été approuvé par la FDA pour le traitement oral de patients (de 6 ans et plus) atteints de mucoviscidose ayant une mutation G551D (mutation de classe III, voir partie 2.A.3) [270]. Cette molécule semble interagir directement avec CFTR pour permettre l'ouverture du canal par un mécanisme qui serait indépendant de l'ATP [271]. Ce traitement améliore les fonctions pulmonaires, normalise la concentration de chlore dans la sueur, mais améliore également d'autres symptômes liés à la mucoviscidose, tels que la toux, les difficultés respiratoires ou le poids [270].

De nombreuses mutations conduisent à un défaut de repliement de la protéine CFTR et favorisent sa dégradation par la voie du protéasome (cas de la mutation F508del). Le miglustat, médicament oral utilisé pour le traitement de la maladie de Gaucher, est un inhibiteur de la 1-2 glucosidase. Il a été montré, in vitro et in vivo chez des souris $CFTR^{F508del/F508del}$ que le miglustat, en empêchant l'interaction entre la protéine CFTR mutée (F508del) et la calnexine, prévient la destruction de la protéine CFTR-F508del et permet son adressage à la membrane [272]. En revanche, ce traitement oral chez des patients atteints de mucoviscidose ne semble pas avoir d'effets significatifs sur le transport des ions chlorures [273]. Un autre composé, le VX-809, semble plus prometteur pour augmenter la quantité de protéine CFTR-F508del au pôle apical des cellules épithéliales des voies aériennes. L'administration orale du VX-809 à 89 patients homozygotes pour la mutation F508del pendant 4 semaines est bien tolérée et a un impact positif sur la fonction de CFTR au niveau des glandes sudoripares (contenu en chlore diminué dans la sueur) [274]. Cependant, ce traitement n'améliore pas les fonctions respiratoires. Des essais cliniques combinant le VX-809 et le VX-770 sont en cours. Les premiers résultats de l'étude de phase 2 (NCT01225211) montrent une amélioration significative des fonctions respiratoires chez les patients porteurs de la mutation F508del.

Les mutations de classe I (mutations non-sens, insertions-délétions, anomalies d'épissage) altèrent la production de la protéine CFTR. Certains aminosides (comme la gentamycine) ou la molécule PTC 124 permettent, en court-circuitant les mutations stop, une lecture complète de l'ARN messager et donc la synthèse de la protéine CFTR entière et fonctionnelle. Compte tenu des effets toxiques sur les reins et sur l'appareil auditif, le traitement par les aminosides n'est pas envisageable au long cours. En revanche, la molécule PTC 124 (ou Ataluren) semble prometteuse. Une étude de phase III multinationale (NCT00803205), sur 238 patients atteints de mucoviscidose âgés de 6 ans ou plus et ayant une mutation non-sens, a permis d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de l'Ataluren. Les résultats de phase III ne sont pas encore publiés mais les premières observations sont précisées par la « Cystic Fibrosis Fundation » (www.cff.org). Le premier critère d'évaluation a été la valeur relative du niveau de référence de la valeur prédictive du VEMS à 48 semaines de traitement qui montrent une tendance positive pour l'ataluren comparé au placebo, mais sans valeur statistique significative. Le critère d'évaluation secondaire concerne les taux d'exacerbations qui montrent une tendance positive en faveur de l'ataluren.

✓ La thérapie génique

Depuis la découverte du gène *CFTR* en 1989, la thérapie génique est apparue comme une stratégie thérapeutique privilégiée pour combattre la mucoviscidose. Cette thérapie a pour objectif de remplacer le gène *CFTR* défectueux par un gène sauvage et de rétablir ainsi une fonction normale. La question est de savoir quel vecteur doit être utilisé pour délivrer correctement le gène. Les adénovirus, les virus adéno-associés et les lipides cationiques sont les vecteurs les plus communément utilisés. Le transfert de gène dans les cellules épithéliales des voies respiratoires a été montré pour différents vecteurs in vitro et in vivo, mais l'expression de CFTR reste transitoire dans la plupart des études. Les vecteurs viraux semblent plus efficaces mais entraînent plus d'effets secondaires que les vecteurs liposomaux qui montrent une efficacité de transfection moindre. Comme la durée d'expression du gène est courte, la thérapie génique requiert des doses répétées, ce qui est problématique pour les vecteurs viraux car ils induisent une réponse immunitaire spécifique des virus. Cependant, le traitement par inhalation ou par voie orale semble plus pratique pour le patient qu'une thérapie génique répétée. Une autre question reste en suspens, celle de savoir à quel seuil minimal la fonction de CFTR doit être restaurée pour obtenir une réelle amélioration clinique [275].

C. L'immunité innée dans la mucoviscidose

Les complications pulmonaires associées à une inflammation excessive des voies respiratoires et à des infections récurrentes sont responsables d'environ 90 % des décès associés à la mucoviscidose. L'immunité innée pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose est caractérisée par une activation précoce et non-résolue du système immunitaire inné, qui se trouve dérégulé à différents niveaux. Dans cette partie, nous verrons un aperçu de l'immunité innée notamment au sein des maladies pulmonaires associées à la mucoviscidose, impliquant tout d'abord les dysfonctionnements de l'épithélium. Nous parlerons brièvement de l'implication des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques puis nous détaillerons les neutrophiles, responsables de l'inflammation excessive observée chez les patients atteints de mucoviscidose. Nous finirons par les récepteurs de l'immunité innée.

1. L'épithélium

La protéine CFTR est exprimée par les cellules épithéliales. Son dysfonctionnement entraîne un déséquilibre entre la sécrétion d'ions Cl^- et l'absorption des ions Na^+ médiée par le canal ENaC, résultant en une diminution de l'ASL [276]. La surface des voies respiratoires

est déshydratée, le mucus est épais et visqueux, empêchant les battements des cils et le transport du mucus, favorisant ainsi la colonisation des voies respiratoires par des pathogènes. In vivo, les souris surexprimant la sous-unité β du canal ENaC miment cette augmentation de l'absorption des ions Na^+ [277]. Dans ce modèle, le déséquilibre entre la sécrétion d'ions Cl^- et l'absorption des ions Na^+ cause une déplétion de l'ASL et une diminution de la clairance du mucus in vivo, et résulte en des complications pulmonaires similaires à celles apparaissant chez les patients atteints de mucoviscidose (obstruction des voies respiratoires par le mucus, diminution de l'élimination mucociliaire des pathogènes, inflammation neutrophilique chronique et emphysème) [277]. Ces résultats supportent l'idée qu'un dysfonctionnement de l'épithélium initie et maintient l'inflammation.

Les mutations du gène *CFTR* sont également associées à une activation constitutive des voies de signalisation pro-inflammatoires aussi bien en absence de stimuli microbiens apparents qu'en leur présence (Figure 20). Une analyse immunohistologique de poumons de fœtus âgé de 24 semaines et homozygote pour la mutation CFTR-ΔF508 a révélé une sur-expression de MMP-1, Groγ, ICAM-1 et Cox-2, quatre molécules connues pour réguler NF-κB, comparativement à deux fœtus non atteints de mucoviscidose [278]. Cette même étude montre une activation de NF-κB en l'absence d'infections, suggérant que les dysfonctionnements de CFTR conduisent à une activation de NF-κB qui, par la suite, augmente l'expression de cytokines pro-inflammatoires spécifiques [278] (Figure 21).

Les cellules épithéliales contrôlent les dommages oxydatifs par la production d'antioxydants, tels que le glutathion et le thiocyanate (SCN^-) présents dans l'ASL et pouvant contribuer à la modification de la viscosité du mucus. Le glutathion extracellulaire neutralise notamment les radicaux libres produits par les neutrophiles durant l'inflammation. La sécrétion de glutathion est très réduite chez les patients atteints de mucoviscidose (diminution de 5-10 % dans l'ASL et 50 % dans le plasma, comparativement à des sujets sains) [279] résultant d'un défaut de transport du glutathion, associé au dysfonctionnement de CFTR [280]. Il a également été observé un défaut de transport du SCN^- associé aux mutations de CFTR [281]. Le SCN^- possède également des propriétés antimicrobiennes. Les glandes sous-muqueuses des larges voies respiratoires sécrètent de la lactopéroxydase (homologue de la MPO) qui ne génère pas d'acide hypochloreux, mais qui, en présence d'H_2O_2, permet d'oxyder le SCN^- pour générer l'hypothiocyanite ($OSCN^-$) antimicrobienne. Ainsi, le défaut de transport du SCN^- à la surface apicale des cellules épithéliales rend le système oxydatif

inactif et diminue nettement l'élimination des micro-organismes (tels que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) [281] (Figure 20).

2. Monocytes, macrophages et cellules dendritiques

Le nombre de macrophages alvéolaires chez les jeunes patients atteints de mucoviscidose non infectés apparaît plus élevé que chez des individus sains, suggérant une inflammation mononucléaire précoce dans la mucoviscidose [282]. Cette augmentation du nombre de macrophages est corrélée à une augmentation de la concentration de MCP-1 [282].

La protéine CFTR est exprimée par les monocytes et les macrophages dérivés de monocytes ; son absence conduit à une altération de la mort des bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, par les macrophages humains [283]. Les macrophages jouent également un rôle crucial lors de la réponse immunitaire innée. L'équipe de Bruscia *et al* a montré qu'en réponse au LPS issu de *Pseudomonas aeruginosa*, les lavages broncho-alvéolaires de souris $CFTR^{-/-}$ présentent une forte concentration de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1α, IL-6, G-CSF et CXCL8, comparativement aux souris sauvages [284]. Les macrophages de patients atteints de mucoviscidose sont hyper-réactifs en réponse au LPS avec une augmentation de la transduction du signal via les voies NF-κB et MAPK (« mitogen-activated protein kinases ») [285-287] et une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que CXCL8, TNF-α, IL-6, MCP-1, G-CSF, GM-CSF, IL-1β [286]. L'efferocytose (ou phagocytose des cellules apoptotiques) est un mécanisme anti-inflammatoire qui, en évitant le passage de cellules apoptotiques à cellules nécrotiques, induit la libération de médiateurs anti-inflammatoires, tels que le TGF-β1 [288]. Or, chez les patients atteints de mucoviscidose, les neutrophiles apoptotiques et nécrotiques s'accumulent au niveau des voies respiratoires [289], suggérant un défaut d'efferocytose. En effet, il a été montré que l'élastase du neutrophile, contenue dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, clive les récepteurs de la phosphatidylsérine à la surface des macrophages, supprimant ainsi la phagocytose des neutrophiles apoptotiques [290]. Il a aussi été montré un défaut d'efferocytose par les cellules épithéliales des voies respiratoires déficientes en CFTR [291]. Toutes ces observations suggèrent que les macrophages de patients atteints de mucoviscidose possèdent plusieurs dysfonctionnements qui altèrent leurs capacités à contrôler l'inflammation et à éliminer les pathogènes. Dans les phases précoces de la mucoviscidose, le comportement inapproprié des macrophages peut contribuer à certaines conditions favorables à l'adaptation des bactéries à l'environnement pulmonaire, à des infections chroniques et à des dommages tissulaires [292].

La protéine CFTR est exprimée par les DCs. Les DCs de souris déficientes en CFTR présentent une diminution de l'expression de la calvéoline-1 et une augmentation de l'expression d'un régulateur négatif de l'expression de la calvéoline-1 (« sterol regulatory element binding protein » ou SREBP) [293]. Après infection de ces cellules par *Pseudomonas aeruginosa*, d'autres gènes apparaissent différemment régulés, notamment Dhcr7 et Scd2, deux enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique [293]. L'équipe de Xu *et al* a également montré que les cellules de la moelle osseuse de souris déficientes en CFTR présentent un délai dans la différenciation des DCs comparativement aux souris sauvages [293]. Il apparaît aussi que la maturation des DCs est inhibée par l'élastase du neutrophile présente dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose [294]. L'élastase semblerait également diminuer la capacité des DCs à présenter des antigènes aux cellules T ; cet effet est en partie dû au clivage de la molécule CD86 [294]. L'infection des DCs par le complexe *Burkholderia cepacia* (groupe de bactéries opportunistes entraînant de sérieuses infections chez les patients atteints de mucoviscidose) empêche leur maturation et favorise leur nécrose sans pour autant affecter la production de cytokines [295]. Ces différents résultats suggèrent que, dans la mucoviscidose, l'interaction entre les réponses immunitaires innée et adaptative, orchestrée par les DCs, peut aussi être compromise.

3. Neutrophiles

Une analyse par puce à ADN sur 1050 gènes a montré que 62 gènes sont surexprimés alors que l'expression de 27 gènes est diminuée dans les neutrophiles circulants de patients atteints de mucoviscidose, comparativement à des sujets sains [296]. Parmi les gènes dont l'expression est augmentée, se trouvent ceux codant pour : des chimiokines (telles que CXCL17 et CXCL18), certains récepteurs à interleukine (IL-3, -8, -10, -12), plusieurs facteurs de croissance (G-, M- et GM-CSF), des molécules impliquées dans la transduction du signal et quelques gènes sous contrôle de l'IFN-γ. En revanche, aucun des gènes codant pour les molécules d'adhérence ne sont modulés (tels que ICAM-1 et ICAM-2). Les neutrophiles circulants et les neutrophiles contenus dans les expectorations de patients ont aussi été comparés. Seulement deux gènes sont surexprimés dans les neutrophiles contenus dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose : l'amphireguline, ligand du récepteur à l'EGF (« epidermal growth factor »), qui contribue à la sécrétion de CXCL8 induite par le TNF par les cellules épithéliales des voies respiratoires, et, le récepteur au TNFp55 [296].

a) Chimiotaxie et migration du neutrophile

L'étape de roulement lors du processus de migration du neutrophile (Figure 8, section 1.A.3.d) est dérégulée chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, il est retrouvé un taux plus élevé de sélectines E et P circulantes chez ces patients que chez des sujets sains [297]. Le clivage de la sélectine L à la surface du neutrophile est nécessaire pour le roulement de la cellule. Or, il apparaît que la sélectine L est significativement moins clivée après activation du neutrophile par le fMLP et CXCL8 chez les patients atteints de mucoviscidose que chez des sujets sains [298]. Les auteurs suggèrent que cet effet n'est pas dû à une absence de sélectine L à la surface du neutrophile mais peut être le reflet de l'état inflammatoire du patient et la persistance d'une réponse aigüe accrue à *Pseudomonas aeruginosa* [298]. Les neutrophiles s'arrêtent et adhèrent fermement aux cellules endothéliales par l'activation des β-intégrines. Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires contenant des chaînes α (CD11a-d) et β (CD18) qui interagissent, entre-autres, avec les protéines ICAM-1 et ICAM-2 à la surface des cellules endothéliales. La concentration sérique d'ICAM-1 est élevée chez les patients atteints de mucoviscidose, même en période de stabilité clinique, suggérant un état inflammatoire persistant [297]. La migration des neutrophiles dans les poumons se fait par un mécanisme qui peut être dépendant ou indépendant de CD18/CD11. L'équipe de Mackarel *et al* a montré que la migration transendothéliale des neutrophiles, stimulée par la fraction soluble des expectorations de patients atteints de mucoviscidose, utilise préférentiellement la voie indépendante de CD18 [299]. Une inhibition sélective de cette voie pourrait représenter un moyen de réduire l'afflux de neutrophiles au niveau des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose.

b) Phagocytose du neutrophile et dégranulation

La première étape de la phagocytose est la reconnaissance des pathogènes opsonisés par divers récepteurs du neutrophile. Les récepteurs CR1 et CR3 reconnaissent les facteurs du complément C3b et C4b, alors que les récepteurs Fcγ (tels que FcRIIA et FcRIIB) reconnaissent les IgG fixées aux pathogènes (voir section 1.A.3.d). Même si l'expression de CR3 à la surface des neutrophiles de patients atteints de mucoviscidose apparaît normale, ainsi que sa signalisation, il a été montré une diminution de la phagocytose de particules opsonisées par iC3b par ces neutrophiles [300]. L'interaction entre les opsonines et leurs récepteurs peut être inhibée par l'élastase du neutrophile, présente en grandes quantités dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. En effet, l'élastase a la capacité de cliver les récepteurs Fcγ [301] et CR1 à la surface des neutrophiles ainsi que le facteur

iC3b opsonisé à la surface de *Pseudomonas aeruginosa* [302] réduisant ainsi la phagocytose des pathogènes. Les pathogènes, une fois internalisés, sont tués par deux mécanismes parallèles : la production des ROS par le complexe de la NADPH, et les peptides antimicrobiens libérés lors de la dégranulation du neutrophile (voir section 1.A.3.d).

Le processus de dégranulation des neutrophiles est altéré chez les individus atteints de mucoviscidose puisqu'une forte concentration de protéines issues des granules primaires (e.g. HNE et MPO) est retrouvée dans leurs expectorations et leurs lavages broncho-alvéolaires [303, 304]. HNE, PR3 et CatG sont retrouvées en quantités similaires dans les granules primaires ; cependant, la majorité des études cliniques et scientifiques se sont portées sur HNE (Tableau 10). En plus de cliver les protéines bactériennes au sein des vacuoles phagocytiques, l'élastase, sécrétée après une dégranulation dérégulée ou par les neutrophiles apoptotiques/nécrotiques, est la principale protéase préjudiciable entraînant la dégradation des protéines de structure (e.g. élastine, collagène et protéoglycans) [305, 306]. HNE permet également l'activation d'autres protéases, telles que les MMPs (e.g. MMP-9, MMP-3, MMP-2) ou les cathepsines (e.g. pro-cathepsine B). L'augmentation de la concentration de MMP-9 dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose corrèle avec la concentration d'HNE et est inversement corrélée à la FEV1 de ces patients [307]. La lactoferrine, présente dans les granules secondaires et impliquée dans l'inhibition de la croissance et la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, est non seulement clivée par HNE mais aussi par l'élastase sécrétée par *Pseudomonas aeruginosa* et la CatG [308].

	Actions de HNE	Références
Défaut d'élimination mucociliaire	↗ expression MUC5AC ↗ expression MUC1 et MUC4 ↗ sécrétion mucines ↘ fréquence des battements ciliaires Endommagements des cils	Pour revue [309]
Remodelage des voies aériennes	↗ expression p27 et ↘ expression ErbB2 → arrêt du cycle cellulaire	[310, 311]
	↗ perméabilité épithéliale Dégradation matrice extracellulaire	[305, 306]
Effets pro-inflammatoires	↗ expression IL-8 (activation TLR4 et EGFR)	[312, 313]
	Clivage CXCR1 → activation TLR2	[314]
	Activation pro-MMP-9 et dégradation TIMP-1	[315]
	Dégradation anti-protéases	[316-318]
	Clivage PS/inhibe phagocytose des neutrophiles apoptotiques	[290]
Altération immunité innée et adaptative	Clivage des opsonines et de leurs récepteurs : C3bi et CR1	[302]
	Clivage des opsonines SP-A, SP-D, IgG	[319-321]
	Dégradation lactoferrine	[308]
	Clivage marqueurs de surface des cellules T (e.g. CD2, -4, -8, -14) → ↘ réponse au LPS	[322, 323]
	↘ maturation des DC (CD80, CD86, CD40) → inhibition présentation antigénique	[294]

Tableau 10 : Exemples d'actions de l'élastase du neutrophile. Légende : ↗, augmentation ; ↘, diminution ; → à pour conséquence. Abréviation : PS, phosphatidylsérine. Adapté de Voynow *et al*, 2008 [309].

Dans un contexte physiologique normal, la balance entre la concentration des protéases et des anti-protéases est équilibrée pour une défense antibactérienne optimale avec un minimum de dégats tissulaires. Or, cette balance est dérégulée chez les patients atteints de mucoviscidose, en particulier suite aux dégradations protéolytiques des anti-protéases (e.g. AAT, élafine, SLPI ou « secretory leukocyte protease inhibitor »), notamment par HNE [316-318] (Figure 19).

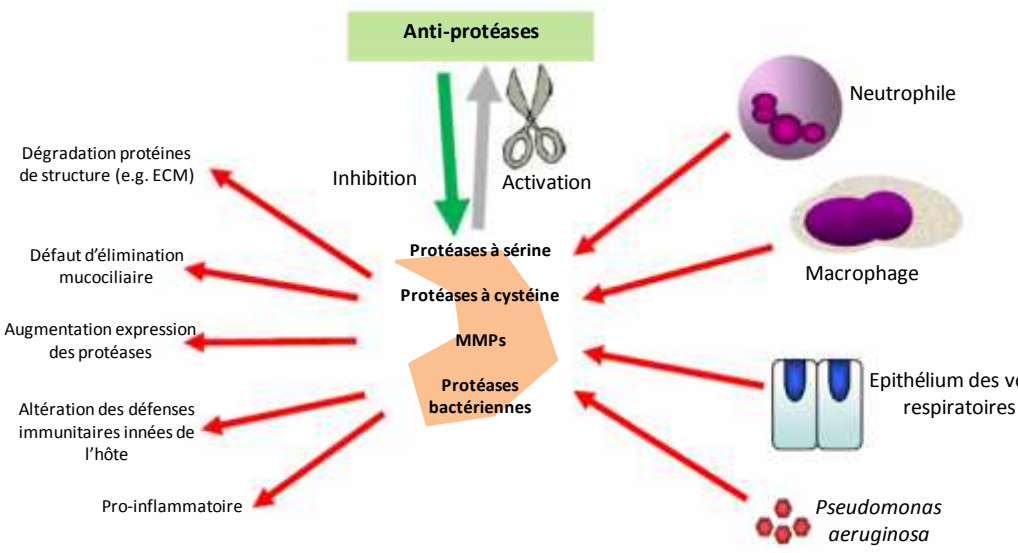


Figure 19 : Importance de la balance protéases/anti-protéases au niveau des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. L'excessive et dérégulée sécrétion de protéases de l'hôte et de protéases bactériennes inactive les anti-protéases conduisant à une exacerbation de la réponse inflammatoire et à une atteinte des poumons. Adapté de Quinn *et al*, 2010 [324].

c) Explosion respiratoire

Les neutrophiles de patients atteints de mucoviscidose génèrent spontanément de plus forts taux d'O_2^- après résolution de l'exacerbation, comparativement à des neutrophiles de sujets sains, indiquant donc une activité constitutive des neutrophiles de ces patients [325]. L'activation constitutive de la protéine NF-κB entraine une production excessive de chimiokines, telles que CXCL8, favorisant le recrutement et l'accumulation des neutrophiles et de leurs produits au niveau des voies respiratoires. L'augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (O_2, H_2O_2 et HOCl) est associée à l'augmentation de la production de CXCL8 et d'IL-6 en réponse à *Pseudomonas aeruginosa* [326], un défaut de phagocytose, une réduction de l'expression de CFTR [327] et un défaut d'élimination des bactéries (Figure 20).

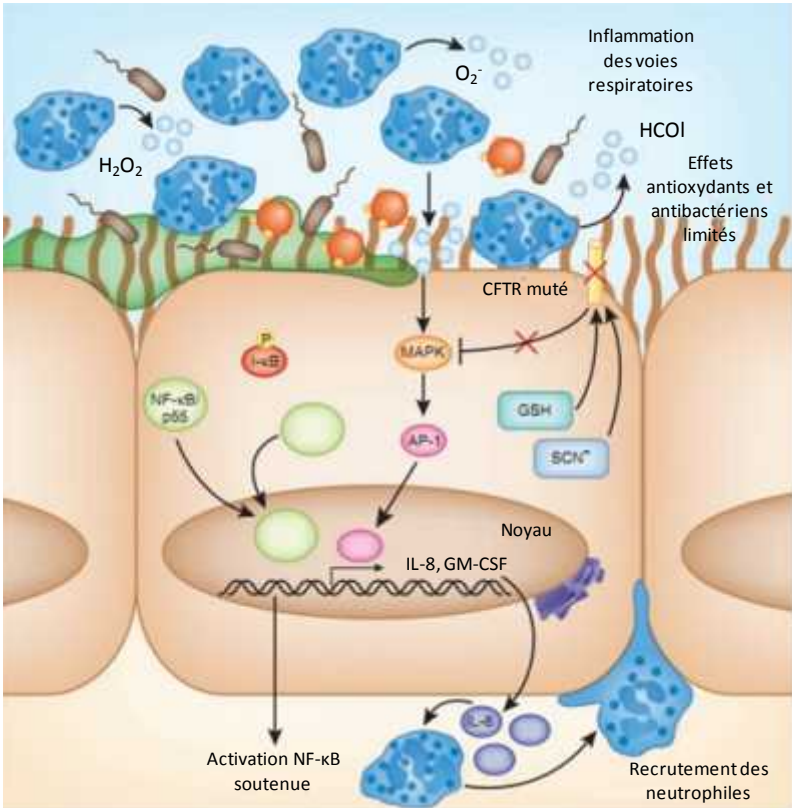


Figure 20 : Augmentation du stress oxydatif dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. La production de chimiokines médiée par l'activation constitutive de NF-κB, incluant CXCL8, conduit au recrutement des neutrophiles qui persistent au niveau des voies respiratoires, entraînant l'explosion respiratoire. Ce stress oxydatif active la voie de signalisation des MAPK, amplifiant la production de CXCL8 et, par conséquent, recrute des neutrophiles supplémentaires. La protéine CFTR mutée au niveau des cellules épithéliales est incapable de transporter les antioxydants (GSH et SCN^-) dans les voies respiratoires, limitant ainsi leurs capacités à contrer le stress oxydatif. Comme SCN- possède aussi des propriétés antimicrobiennes, l'élimination des bactéries est également diminuée. Adapté de Cohen and Prince, 2012 [328].

d) Apoptose du neutrophile

Un défaut d'apoptose du neutrophile entraîne des conséquences dévastatrices avec des dommages tissulaires. L'apoptose des neutrophiles peut être initiée par la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale activée par les signaux de dangers intracellulaires ou par le stress oxydatif) et la voie extrinsèque (déclenchée par l'activation des récepteurs de mort (tels que TNF-R1 ou « TNF-α death receptor » et Fas) par des ligands, tels que Fas ligand (FASL), TNF et TRAIL). Les neutrophiles isolés du sang périphérique de patients atteints de mucoviscidose ont une expression diminuée de Fas, FasL et TNF-R1 après une cure d'antibiotiques, diminuant l'apoptose [329]. Les neutrophiles contenus dans les expectorations présentent une diminution (non significative) de l'expression de FasL et de

TNF-R1 après une cure d'antibiotiques [329]. Les neutrophiles isolés du sang périphérique de patients atteints de mucoviscidose, cliniquement stables mais colonisés par *Pseudomonas aeruginosa*, présentent un retard d'apoptose [330, 331]. Cependant une étude récente a observé que les neutrophiles de patients en exacerbation présentent un taux plus élevé d'apoptose que des neutrophiles de sujets sains [332]. Il a également été montré que, chez des patients atteints de mucoviscidose colonisés par *Pseudomonas aeruginosa* ou *Burkholderia cepacia*, le pourcentage de neutrophiles en nécrose secondaire est plus élevé que chez des patients non infectés. De plus, certains pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* libèrent des toxines (pyocyanine et hémolysine, respectivement) qui induisent l'apoptose des neutrophiles [333, 334].

Les neutrophiles isolés du sang périphérique de patients atteints de mucoviscidose sont capables de former des NETs en réponse au PMA ou à *Pseudomonas aeruginosa* et sont également capables de tuer *Pseudomonas aeruginosa* [335]. Cependant, il a été observé que des isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* apparaissent résistants aux NETs, notamment sous leurs formes mucoïdes [335]. Les NETs représentent les principaux composants structurels extracellulaires des fluides des voies respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose [336]. L'élimination de la bactérie par les NETs est indépendante de la fonction de CFTR. Un défaut de réponse dans le contexte de la mucoviscidose semble donc dû à l'acquisition d'une résistance de la bactérie lorsqu'elle est sous forme mucoïde.

4. Les récepteurs de l'immunité innée

Plusieurs études ont décrit l'expression des TLRs sur les cellules épithéliales primaires des voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose et sur des cellules transformées (mutation du gène *CFTR*) [337-339]. Ces différentes études montrent que les molécules TLRs 1 à 10 et les protéines adaptatrices (MD2 et MyD88) sont exprimées par ces différentes cellules et sont fonctionnelles. Une stimulation bactérienne de ces cellules entraîne une augmentation de l'expression de TLR2, bien que réduite [339]. De même, TLR4 est exprimé à la surface des cellules épithéliales bronchiques mutées pour le gène *CFTR* et au niveau des tissus pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose, mais plus faiblement que chez des sujets sains [340]. L'équipe de Haubert *et al* a également montré que, sur des biopsies bronchiques de patients atteints de mucoviscidose, l'expression de TLR4 et de TLR2 est beaucoup plus faible que celle observée chez des sujets témoins [338]. Ces résultats suggèrent

que la perte d'expression des TLRs au niveau de l'épithélium contribue à l'altération de la première ligne de défense contre les micro-organismes. En effet, la diminution d'expression des TLRs résulte en une diminution des voies de signalisation par MyD88 et TRIF. A titre d'exemple, les cellules épithéliales bronchiques homozygotes pour la mutation ΔF508 stimulées par du LPS n'induisent pas d'IP-10 (ligand du récepteur CXCR3 impliqué dans la migration des cellules T notamment) dû à la diminution de l'expression en surface de TLR4 [341]. L'IP-10 est induit par le facteur de transcription IRF3 après activation de TLR4 et des molécules adaptatrices TRIF et TRAM par le LPS [341] (Figure 21).

TLR5 est un récepteur clé pour la reconnaissance de la flagelline de *Pseudomonas aeruginosa* [342]. TLR5 est également impliqué dans la réponse à *Burkholderia cenocepacia* [343]. L'inhibition de TLR5 par un anticorps anti-TLR5 empêche la production d'IL-6 et de CXCL8 normalement générée après stimulation des cellules épithéliales des voies respiratoires par *Pseudomonas aeruginosa*, identifiant TLR5 comme une cible thérapeutique potentielle contre l'inflammation pulmonaire associée à la mucoviscidose [344]. Une étude a montré que les adultes atteints de mucoviscidose porteurs d'un variant fonctionnel TLR5, TLR5 c.1174C>T SNP (« single nucleotide polymorphism ») codant pour un codon stop prématuré, présentent une réponse inflammatoire à la flagelline diminuée. En effet, la production d'IL-6 et de CXCL8 est diminuée respectivement de 76,3 et 45,5 % chez les patients hétérozygotes (génotype CT) comparativement aux sujets homozygotes (génotype CC) [345]. De plus, les patients porteurs de ce codon stop prématuré (génotype CT ou TT) présentent un meilleur indice de masse corporel que les patients homozygotes (génotype CC) ; en revanche, il n'y a pas de différence significative concernant les fonctions respiratoires. De nouvelles études sont nécessaires pour examiner plus spécifiquement les impacts de TLR5 sur l'état nutritionnel des patients.

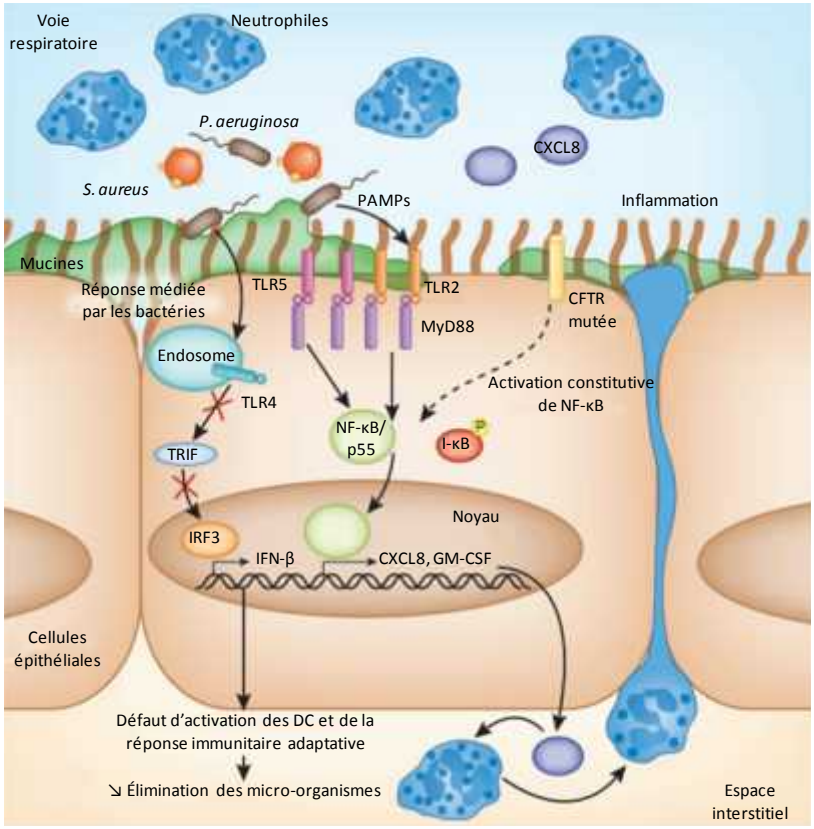


Figure 21 : Signalisation et expression des TLRs altérées au niveau de l'épithélium des voies respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. L'expression de TLR2 et de TLR5 est augmentée à la surface apicale, alors que l'expression de TLR4 est restreinte au niveau des endosomes. NF-κB est activé de manière constitutive dans les cellules épithéliales des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, entraînant la production de cytokines inflammatoires (e.g. CXCL8, GM-CSF) et le recrutement des neutrophiles, de manière indépendante de la voie TLR-MyD88. Après infection, les motifs bactériens (PAMPs) augmentent davantage la signalisation de NF- κB par l'activation de la voie TLR-MyD88. L'activation intracellulaire de TLR4 et de Trif dans l'endosome est altérée, inhibant la translocation de IRF3 dans le noyau et l'activation de la transcription des IFN de type I requis pour l'activation des DCs et l'élimination de certains micro-organismes associés à la mucoviscidose. Adapté de Cohen and Prince, 2012 [328].

Les protéines du surfactant, notamment SP-A et SP-D, sont des PRRs solubles impliqués dans la protection pulmonaire contre les micro-organismes. Les souris déficientes en SP-A et SP-D sont plus sensibles aux infections pulmonaires par *Pseudomonas aeruginosa*. Les patients atteints de mucoviscidose présentent une plus faible concentration de SP-A et SP-D dans les lavages broncho-alvéolaires [346]. Plusieurs études ont montré que les protéines du surfactant sont dégradées dans les expectorations des patients. En effet, les protéases à sérine sécrétées par les neutrophiles (e.g. élastase, protéinase 3 et cathepsine G) sont capables de dégrader SP-A et SP-D. Les protéases sécrétées par les micro-organismes,

telles que l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa*, dégradent SP-A et SP-D [347], empêchant ainsi leur opsonisation par les protéines du surfactant, suggérant donc un mécanisme d'échappement pour la phagocytose [348].

Récemment, une étude a montré que des polymorphismes au sein des gènes codant différents composants de la voie des lectines seraient associés à une colonisation précoce de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose [349]. En effet, des variants des gènes *MBL2*, *MASP-3* (« MBL-associated serine protease-3 »), *FCN1* et *FCN2* (ficolines) sont associés avec l'âge du début de la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* [349, 350].

Peu d'études ont porté sur l'expression des SRs dans la mucoviscidose. En 2009, l'équipe de Wright a montré que les expectorations de patients atteints de mucoviscidose contiennent une proportion (85 %) plus importante de macrophages de petite taille et exprimant faiblement le marqueur CD68, comparativement aux « petits macrophages » des expectorations de donneurs sains (11 %) [351]. Ils définissent les « petits macrophages » comme des cellules moins matures que les « grands macrophages » qui, lors de leur maturation, augmentent en taille et acquièrent l'expression du CD68. Ces cellules seraient des monocytes, nouvellement migrés du sang dans les poumons par l'action de CCL2. Les auteurs ont montré que l'expression de CD206 (récepteur au mannose) et MARCO est diminuée sur les « grands macrophages » de patients atteints de mucoviscidose comparativement à des sujets sains et absente des « petits macrophages » dans les deux cas. Comme ces dernières sont en nombre plus importants dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, l'expression totale de MARCO et CD206 est donc diminuée comparativement aux sujets sains [351]. De plus, les auteurs ont montré que les macrophages contenus dans les expectorations de patients ont une capacité fortement réduite d'internaliser des particules, comparativement à des macrophages de donneurs sains, qui résulte, en partie, à la diminution de l'expression du SR MARCO [351].

L'ensemble de ces données montre que la réponse immunitaire est inefficace et/ou inadaptée chez les patients atteints de mucoviscidose. Une meilleure connaissance des altérations immunitaires chez ces patients permettrait, à terme, de proposer des stratégies thérapeutiques innovantes.

Objectifs

La reconnaissance des micro-organismes par le système immunitaire met en jeu une famille de récepteurs de l'immunité innée appelés « Pattern recognition receptors » ou PRRs. Ces récepteurs reconnaissent des motifs (« Pathogen-associated molecular patterns » ou PAMPs) très conservés parmi les familles de micro-organismes, tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou l'acide lipotéichoïque (LTA). Les PRRs sont classés en deux familles sur la base de leur expression (associés aux cellules ou solubles) [1]. Les récepteurs associés aux cellules sont classés en deux sous-familles sur la base de leurs fonctions : (i) les PRRs d'endocytose (tels que les « scavenger receptors » et les récepteurs aux lectines de type C), impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation des micro-organismes et (ii) les PRRs de signalisation (TLR, RLR, NLR), impliqués dans l'activation cellulaire. Les PRRs solubles, représentés essentiellement par les pentraxines, les collectines et les ficolines, sont impliqués dans l'opsonisation des microbes, ce qui facilite leur reconnaissance et leur élimination par les phagocytes. Ces PRRs solubles se comportent donc comme des ponts moléculaires (opsonines) entre les micro-organismes et les récepteurs d'endocytose.

De nombreuses études ont souligné le rôle essentiel joué par les pentraxines dans la protection antimicrobienne et l'initiation des réponses inflammatoires et immunitaires. Sur la base de leur structure primaire, les pentraxines sont classées en deux familles, les pentraxines courtes et les pentraxines longues [147]. Les pentraxines courtes sont représentées par les protéines de la phase aigüe de l'inflammation, « C-Reactive Protein » (CRP) et « Serum Amyloid P » (SAP). Les pentraxines longues, représentées essentiellement par le prototype Pentraxine 3 (PTX3), présentent un domaine amino terminal (N-ter) additionnel par rapport aux pentraxines courtes et qui ne présente d'homologie de séquence avec aucune autre protéine. Alors que les pentraxines courtes sont exprimées exclusivement par le foie, les pentraxines longues sont exprimées par de nombreux types cellulaires, à l'exception des hépatocytes [147].

Tout au long de mon travail de thèse, je me suis focalisée sur la biologie de la molécule PTX3.

PTX3 est produite en réponse à un stimulus inflammatoire, tel que des micro-organismes, des cytokines (IL-1β, TNFα) ou des composants microbiens/agonistes des molécules TLR [166-168]. PTX3 est exprimée, entre-autre, par les cellules endothéliales, les cellules myéloïdes (monocytes, cellules dendritiques (DC), neutrophiles) et les cellules

épithéliales [83, 166, 167, 169-175]. PTX3 fixe de nombreux pathogènes, et notamment *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa*. En tant que PRR soluble, la fixation de PTX3 à ses cibles facilite leur élimination par les phagocytes [177, 184, 185]. Le rôle physiologique de PTX3 a été clairement illustré dans des souris déficientes ($PTX3^{-/-}$) [177]. Les macrophages alvéolaires de souris $PTX3^{-/-}$ ont une capacité réduite de phagocytose d'*Aspergillus fumigatus*, qui est rétablie par addition de PTX3 exogène. De plus, les souris $PTX3^{-/-}$ succombent rapidement à une infection par *Aspergillus fumigatus* (médiane de survie de 3 jours) alors que les souris sauvages ne sont pas sensibles à ce pathogène. La sensibilité des souris $PTX3^{-/-}$ est associée à un défaut d'initiation d'une réponse protectrice de type Th1 [177]. Les souris $PTX3^{-/-}$ sont protégées d'une infection par *Aspergillus fumigatus* par injection de PTX3 exogène [177].
L'ensemble de ces résultats montrent que la molécule PTX3 joue un rôle important dans l'immunité protectrice vis-à-vis de certaines infections, notamment par *Aspergillus fumigatus*.

Aspergillus fumigatus et *Pseudomonas aeruginosa* sont deux pathogènes fréquemment retrouvés lors des infections chroniques associées à la mucoviscidose. La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques dans les populations caucasiennes et d'évolution souvent fatale. Le gène responsable de cette maladie code pour une forme mutée de la protéine « cystic fibrosis transmembrane conductance » (CFTR) qui est un canal ionique impliqué dans le transport des ions chlorure [208]. A ce jour, plus de 1900 mutations ont été décrites sur le gène *CFTR*. Son absence ou son dysfonctionnement entraîne une déshydratation de la surface des voies respiratoires, une élimination mucociliaire inefficace, une inflammation excessive et une colonisation permanente des voies aériennes par divers micro-organismes. L'atteinte de l'appareil respiratoire est la principale cause de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose.

PTX3 participe à l'élimination et à l'initiation de réponses immunitaires spécifiques vis-à-vis de certains pathogènes, tels que *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa*, deux pathogènes opportunistes fréquemment retrouvés lors des infections chroniques associées à la mucoviscidose. De plus, l'absence de PTX3 confère une susceptibilité accrue à une infection par *Aspergillus fumigatus*. L'objectif de cette étude a donc été d'analyser le statut de PTX3 chez des patients atteints de mucoviscidose.

Résultats

Clivage protéolytique de la pentraxine longue PTX3 dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose

« Proteolytic cleavage of the long pentraxin PTX3 in the airways of cystic fibrosis patients »

Yveline Hamon, Sébastien Jaillon, Christine Person, Jean-Louis Giniès, Erwan Garo, Barbara Bottazzi, Sarah Ghamrawi, Thierry Urban, Jean-François Subra, Jean-Philippe Bouchara, Alberto Mantovani, Pascale Jeannin, Yves Delneste

Accepté pour publication dans la revue *Innate Immunity*

Introduction

La détection des micro-organismes par le système immunitaire inné est réalisée par une famille de récepteurs appelés « Pattern recognition receptors » ou PRRs. Ces récepteurs sont capables de reconnaître des motifs très conservés (« Pathogen-associated molecular patterns » ou PAMPs) et exprimés exclusivement par les micro-organismes. Les récepteurs associés aux cellules regroupent (i) les récepteurs d'endocytose, tels que les Scavenger receptors et les récepteurs aux lectines de type C, impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation des microbes et (ii) les récepteurs de signalisation, tels que les « Toll-like receptors », impliqués dans l'activation cellulaire. Les récepteurs solubles, tels que les collectines, les ficolines et les pentraxines, sont impliqués dans l'opsonisation des microbes, ce qui facilite leur reconnaissance et leur élimination par les phagocytes [1]. De nombreuses études ont souligné le rôle essentiel joué par les pentraxines dans la protection antimicrobienne et l'initiation des réponses inflammatoires et immunitaires. Sur la base de leur structure primaire, les pentraxines sont classées en deux familles, les pentraxines courtes CRP et SAP, exprimées par les hépatocytes et les pentraxines longues, telles que PTX3 qui est exprimée par divers types cellulaires à l'exception des hépatocytes [147].

La concentration sérique de PTX3 est augmentée lors d'infections, telles que la septicémie et les chocs septiques, la méningococcie, la tuberculose et lors d'infections par le virus de la dengue [191-194]. Dans certaines de ces situations, le taux de PTX3 est corrélé à la sévérité de la maladie. PTX3 est également impliquée dans la résistance contre certaines espèces de champignons, de bactéries et de virus. PTX3 fixe certains microbes, tels que *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa*, et facilite leur élimination par les phagocytes. Le rôle protecteur de PTX3 dans l'immunité a été clairement illustré dans des souris déficientes ($PTX3^{-/-}$) qui sont sensibles à une aspergillose pulmonaire invasive, du à un défaut de reconnaissance des conidies d'*Aspergillus fumigatus* par les phagocytes et un défaut d'initiation d'une réponse protectrice de type Th1 [177].

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive due à des mutations au niveau du gène *CFTR* ou « cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » codant pour la protéine CFTR qui est un canal chlore [208]. Les patients atteints de mucoviscidose souffrent d'infections pulmonaires récurrentes, en particulier dues à deux pathogènes opportunistes : *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa.* L'atteinte de l'appareil respiratoire est la principale cause de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose. Cette

atteinte pulmonaire est associée à un défaut du système immunitaire inné local (élimination mucociliaire défectueuse, inflammation, infections, …).

De précédentes études ont montré que les souris PTX3$^{-/-}$ sont sensibles à des infections par *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa* et que PTX3 protègent ces souris des infections causées par ces deux pathogènes. L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer le statut de PTX3 chez des patients atteints de mucoviscidose.

Matériels et méthodes

L'étude a été réalisée sur des expectorations et des sérums de patients atteints de mucoviscidose (23 adultes et 28 enfants) et de patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) (7 adultes).

Principaux résultats

Comparativement aux sujets sains, les patients atteints de mucoviscidose et de BPCO présentent une concentration plus élevée en PTX3 sérique, reflet d'une infection. De manière surprenante, la concentration de PTX3 dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose est, dans la plupart des cas, plus faible, comparativement à leur sérum ; alors que les patients BPCO présentent une concentration de PTX3 plus élevée dans leurs expectorations que dans leur sérum.

L'analyse par Western-blotting a montré que PTX3 est dégradée dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose et pas ou peu dégradée chez les patients BPCO. La dégradation de PTX3 est prévenue par des inhibiteurs des protéases à sérine. Afin d'identifier la (ou les) protéase (s) impliquée (s), nous avons évalué la sensibilité de PTX3 à des protéases sécrétées par le neutrophile ou par les pathogènes. Les résultats montrent que PTX3 est dégradée par les protéases du neutrophile (élastase (HNE), cathepsine G (CatG) et protéinase 3 (PR3)) et par des protéases sécrétées par *Aspergillus fumigatus*.

Conclusion

Cette étude montre que (i) la protéolyse sélective de PTX3 au niveau pulmonaire représente un mécanisme important pouvant expliquer les infections pulmonaires récurrentes observées chez les patients atteints de mucoviscidose, et (ii) suggère que les futures stratégies thérapeutiques basées sur PTX3 devront tenir compte de cette dégradation sélective et rapide.

Ces résultats suggèrent également que la dégradation locale de PTX3 est une caractéristique distinctive de la mucoviscidose.



Proteolytic cleavage of the long pentraxin PTX3 in the airways of cystic fibrosis patients

Journal:	*Innate Immunity*
Manuscript ID:	INI-12-0098.R1
Manuscript Type:	Original Manuscript
Date Submitted by the Author:	18-Dec-2012
Complete List of Authors:	Hamon, Yveline; Unit Inserm 892, Jaillon, Sébastien; Istituto Clinico Humanitas, Person, Christine; CHU d'Angers, pneumology Giniès, Jean-Louis; CHU d'Angers, pediatry Garo, Erwan; Unit Inserm 892, Bottazzi, Barbara; Istituto Clinico Humanitas, Ghamrawi, Sarah; Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Urban, Thierry; CHU d'Angers, pneumology Subra, Jean-François; CHU d'Angers - Service Nephrologi-Dialyse-Transplantation, Bouchara, Jean-Philippe; Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Mantovani, Alberto; Istituto Clinico Humanitas, Jeannin, Pascale; Unit Inserm 892, Delneste, Yves; Unit Inserm 892,
Keywords:	Aspergillus fumigatus, cystic fibrosis, elastase, pentraxin 3, protease activity
Abstract:	The prototypic long pentraxin PTX3, a soluble pattern recognition receptor, plays an important role in innate defense against selected pathogens, by favoring their elimination and the initiation of protective responses. PTX3 has notably beneficial effects in mice infected with Aspergillus fumigatus and Pseudomonas aeruginosa. Cystic fibrosis (CF), a severe inherited autosomal recessive disease, is characterized by recurrent lung infections, especially by these two pathogens. We thus hypothesized that the status of PTX3 may be altered in CF patients. Level and integrity of PTX3 were analyzed in the sputum samples from 51 CF patients and 7 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The levels of PTX3 were increased in serums from CF patients but low in their respiratory secretions. PTX3 concentrations in sputum samples were dramatically lower in CF patients than in COPD patients. The low concentration of PTX3

	resulted from a proteolysis cleavage by elastase and Aspergillus fumigatus proteases. Interestingly, the N-ter domain of PTX3, involved in the protection against Aspergillus fumigatus, is preferentially degraded by these proteases. These results indicate that the selective proteolysis of PTX3 in the CF lung may explain, in part, the recurrent lung infections by PTX3-sensitive pathogens in CF patients.

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

Proteolytic cleavage of the long pentraxin PTX3 in the airways of cystic fibrosis patients

Yveline Hamon[1,2,3], Sébastien Jaillon[4], Christine Person[5,6], Jean-Louis Giniès[7], Erwan Garo[1,2,3], Barbara Bottazzi[4], Sarah Ghamrawi[1,8], Thierry Urban[5,6], Jean-François Subra[1,2,3,9], Jean-Philippe Bouchara[1,8,10], Alberto Mantovani[4], Pascale Jeannin[1,2,3,11], Yves Delneste[1,2,3,11]

[1] LUNAM Université, Université d'Angers, Angers, France

[2] Inserm, Unit 892, Angers, France

[3] CNRS, Unit 6299, Angers, France

[4] Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Italy

[5] CHU d'Angers, CRCM, Angers, France

[6] CHU d'Angers, Département de pneumologie, Angers, France

[7] CHU d'Angers, Département de pédiatrie, Angers, France

[8] Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3132, Angers, France

[9] CHU d'Angers, Département de Néphrologie, Angers, France

[10] CHU d'Angers, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Angers, France

[11] CHU d'Angers, Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, Angers, France

Corresponding author:

Yves Delneste, Unité Inserm 892-CNRS 6299, CHU Angers, IBS/IRIS, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. E-mail address: yves.delneste@univ-angers.fr

Running title: PTX3 in cystic fibrosis

Abbreviations: CatG, cathepsin G; CF, cystic fibrosis; CFTR, CF transmembrane conductance regulator; CLR, C-type lectin receptor; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CRP, C-reactive protein; HNE, human neutrophil elastase; NLR, NOD-like receptor; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PR3, proteinase 3; PRR, pattern recognition receptor; PTX, pentraxin; RLR, RIG-I-like receptor; SAP, serum amyloid P.

For Peer Review

Abstract

The prototypic long pentraxin PTX3, a soluble pattern recognition receptor, plays an important role in innate defense against selected pathogens, by favoring their elimination and the initiation of protective responses. PTX3 has notably beneficial effects in mice infected with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Cystic fibrosis (CF), a severe inherited autosomal recessive disease, is characterized by recurrent lung infections, especially by these two pathogens. We thus hypothesized that the status of PTX3 may be altered in CF patients. Level and integrity of PTX3 were analyzed in the sputum samples from 51 CF patients and 7 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The levels of PTX3 were increased in serums from CF patients but low in their respiratory secretions. PTX3 concentrations in sputum samples were dramatically lower in CF patients than in COPD patients. The low concentration of PTX3 resulted from a proteolysis cleavage by elastase and *A. fumigatus* proteases. Interestingly, the N-ter domain of PTX3, involved in the protection against *A. fumigatus*, is preferentially degraded by these proteases. These results indicate that the selective proteolysis of PTX3 in the CF lung may explain, in part, the recurrent lung infections by PTX3-sensitive pathogens in CF patients.

Key words

Aspergillus fumigatus, cystic fibrosis, elastase, pentraxin 3

For Peer Review

Introduction

Innate immune cells recognize microbes via a limited number of pattern recognition receptors (PRRs). PRRs recognize highly conserved motifs (pathogen-associated molecular patterns), exclusively expressed by microbes. PRRs are either cell-associated or soluble.[1] Cell-associated PRRs can be subdivided into two groups: (i) endocytic PRRs (such as scavenger receptors and C-type lectin receptors (CLR)), involved in the binding and internalization of microbes, and (ii) signaling PRRs (i.e. members of the TLR, NLR and RLR families), involved in immune cell activation.

Soluble PRRs, including mainly pentraxins and the soluble CLRs collectins and ficolins, facilitate the clearance of microbes by phagocytes. Pentraxins, a family of evolutionarily conserved proteins characterized by a pentameric structure,[2] are classified into two groups depending on the primary structure of the protomer: (i) the short pentraxins CRP and SAP (produced by hepatocytes) and, (ii) the long pentraxins, that differ from the short pentraxins for the presence of an unrelated N-terminal domain (2). PTX3, the prototypic long pentraxin, is expressed by numerous cell types, including myeloid cells, endothelial cells and epithelial cells, but not by hepatocytes, upon stimulation with PRR agonists or proinflammatory cytokines.[2] PTX3 is also constitutively expressed by neutrophils.[3]

Increased levels of circulating PTX3 have been reported in various infections, including sepsis and septic shock, meningococcal disease, tuberculosis and dengue infection .[4-7] In all these situations, the levels of PTX3 are correlated with disease severity and have a prognostic value. PTX3 is involved in the resistance against a variety of fungi,[8,9] bacteria[10,11] and viruses .[12] PTX3 binds selected microbes, such as *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and facilitates their clearance by phagocytes.[8,10,13] The protective role played by PTX3 in immunity has been evidenced in $Ptx3^{-/-}$ mice which are susceptible to invasive pulmonary aspergillosis, due to a defective recognition of *A. fumigatus* conidia by phagocytes and the initiation of an inappropriate Th2-biased immune response.[8]

Cystic fibrosis (CF) is a severe inherited autosomal recessive disease, caused by mutations in the chloride channel CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene.[14] CF patients suffer from recurrent lung infections by the two opportunistic pathogens *A. fumigatus* and *P. aeruginosa*. Infections are one of the main causes of morbidity and mortality in CF. The local innate immune system in CF patients is profoundly impaired, as illustrated by an ineffective mucociliary clearance[15] and a dysregulated inflammatory response.[16-18]

For Peer Review

Studies reported that Ptx3$^{-/-}$ mice are susceptible to *A. fumigatus* and *P. aeruginosa* infections and that PTX3 protects mice against infections by these two pathogens.[8,10] The aim of this study was thus to evaluate whether a qualitative or quantitative defect of PTX3 may contribute to the increased susceptibility of CF patients to some PTX3-sensitive opportunistic pathogens.

For Peer Review

Materials and methods

Reagents

Recombinant PTX3, monoclonal anti-PTX3 Abs (clones MNB4 and 16B5) and polyclonal anti-PTX3 Ab have been previously described.[19] Recombinant SAP and CRP and anti-SAP mAb were from Millipore (Bedford, MA). The polyclonal anti-CRP Ab was from Abcam (Cambridge, MA). Recombinant PTX3 and SAP were biotinylated, according to the manufacturer's instruction (Pierce, Rockford, IL). Recombinant neutrophil elastase (HNE), the HNE specific inhibitor Ala-Ala-Pro-Ala-chloromethylketone (AAPA-CMK), proteinase 3 (PR3), and cathepsin G (CatG) were from Merck (Darmstadt, Germany). The CatG inhibitors α-chymotrypsin and Ala-Ala-Phe-chloromethylketone (AAF-CMK), HNE inhibitor Ala-Ala-Pro-Val-chloromethylketone (AAPV-CMK) and PR3 inhibitor were kindly provided by Dr Korkmaz (Tours, France). The protease inhibitors pefabloc SC, aprotinin, leupeptin, E-64, antipain, phosphoramidon, EDTA-Na_2, bestatin, chymostatin and pepstatin were from Roche (Mannheim, Germany). PMSF and GM6001 were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and Millipore, respectively. LPS (*Escherichia coli* serotype O111:B4) was from Sigma-Aldrich, IL-1β from Myltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) and TNF-α from Immunotools (Friesoythe, Germany).

Sputum and serum collection

Sputum and serum samples were collected from 51 CF patients (23 adults and 28 children) (cystic fibrosis care center, Angers University Hospital) and from 7 COPD patients (pneumology department, Angers University Hospital). Samples were obtained after written informed consent. Demographics and clinical data from CF and COPD patients are summarized in Table 1. The sputum samples were digested with Digest-Eur® (Eurobio, Coutaboeuf, France) (1:20 final dilution). After 10 min incubation at 4°C and centrifugation, a broad spectrum protease inhibitor cocktail (Complete®; Roche) was added or not to samples before storage at -80°C. Serums were collected at the time of sputum sampling. Serums from healthy subjects (n = 27) were obtained the blood collection center (Angers, France), respectively.

Culture of A. fumigatus

For Peer Review

Conidia of *A. fumigatus* strain CBS 113.26 were obtained from 5 d cultures on yeast extract-peptone-dextrose agar plates or on *Aspergillus* minimal medium (to induce synthesis of proteases), by scraping off the mycelium in sterile water. After filtration through 28 µm diameter pore-size filters, conidia were pelleted by centrifugation (1500 *g*, 5 min), washed and enumerated. Culture filtrates were stored at -20°C.

Epithelial cell culture

The human epithelial cells IB3-1 (derived from a CF patient with a ΔF508/W1282X genotype,[20]) and S9 (derived from the IB3-1 cell line in which the CF phenotype was corrected, [21]) were maintained in LHC-8 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 5% FCS (Biowest, Nuaillé, France) and cultured in fibronectin-coated flasks. Primary human bronchial epithelial cells were maintained in bronchial epithelial cell growth medium (both from Lonza, Verviers, Belgium). Epithelial cells were stimulated with LPS, IL-1β or TNF-α, at the indicated concentrations.

Isolation and activation of human neutrophils

Peripheral blood neutrophils were isolated from CF patients and healthy donors, as previously reported.[3] Neutrophils (2×10^6 cells/ml) were cultured in RPMI 1640 medium containing 2% FCS (to maintain cell viability) or no FCS (to induce cell apoptosis;[22]) and supplemented with antibiotics (all from Lonza). Cells were stimulated with LPS, IL-1β plus TNF-α or *A. fumigatus* conidia, at the indicated concentrations. Airway neutrophils from CF patients were isolated using a protocol adapted from Corvol et al.[23] Briefly, sputums were incubated for 30 min at 37°C with an equal volume of a 200 µg/ml EDTA - 170 U/ml trypsin solution (Life technologies, Saint Aubin, France). After filtration on a 40 µm diameter filter, sputums were centrifuged at 300 *g* for 5 min at 4°C. Neutrophils were isolated by depleting $CD14^+$ and $MHC\text{-}II^+$ cells (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany); the purity of neutrophils, based on CD66b expression, was > 99% (data not shown). Cell death was evaluated by Annexin V - propidium iodide labeling.

For Peer Review

Quantification of PTX3 by ELISA

PTX3 was quantified by ELISA, as previously described,[3] using the anti-PTX3 mAb MNB4 as a capture Ab and the anti-human PTX3 pAb as the detection Ab. Culture supernatants were incubated 2 h at 37°C, and sputum and serum samples overnight at 4°C. Recombinant PTX3 was used as a standard.

Elastase activity assay

The HNE activity was determined as previously described.[24] Briefly, the chromogenic substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNa (1 mM final concentration) (Sigma-Aldrich) was mixed with serial dilutions of sputum samples. Recombinant HNE was used as a standard. Plates were incubated in a 37°C warmed microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The absorbance at 405 nm was read every minute for 30 min. The change in optical density/min in samples was converted to nM elastase.

Western blotting analysis of protein proteolysis

Biotinylated PTX3, SAP and CRP were incubated at 37°C for the indicated times in CF or COPD sputum samples (diluted 1:3 in PBS), or in *A. fumigatus* culture filtrates, containing or not protease inhibitors. In other experiments, pentraxins were incubated with HNE, CatG or PR3, without or with their respective inhibitors. The pentraxin integrity was analyzed by Western blotting. Briefly, samples were electrophoretically separated on a 4-20% gel (Bio-Rad, Hercules, CA) in reducing conditions, and then transferred to an Immobilon membrane (Millipore). After saturation, membranes were incubated with 3 µg/ml anti-PTX3 pAb, anti-PTX3 mAbs (clones 16B5 or MNB4), anti-SAP mAb, anti-CRP pAb or with peroxydase-conjugated streptavidin (diluted 1:10000; Amersham Biosciences). After washing, membranes were incubated with 1 µg/ml peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, anti-rat IgG, anti-goat IgG or anti-mouse IgG Abs (Invitrogen), when appropriate. Bound Abs were detected by chemiluminescence (Thermo Scientific, Rockford, IL).

Statistical analysis

Data are shown as mean ± SD or mean ± SEM and comparisons between groups or individuals were carried out using one-tail Mann-Whitney test or one-tail Wilcoxon matched pairs test, respectively. Correlation of HNE activity and PTX3 degradation (scored from 0, multimeric PTX3, to 10, totally degraded) was assessed using the nonparametric Spearman rank correlation assay (correlation coefficient: r). Statistics were calculated using the Prism

For Peer Review

software (GraphPad Software, La Jolla, CA). A *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

For Peer Review

Results

Analysis of PTX3 expression in CF patients

PTX3 was quantified by ELISA in the serums from CF and COPD patients and from healthy subjects. The levels of PTX3 were significantly higher in the serums from CF patients (1.93 ± 1.55 ng/ml; mean ± SD, n = 51) than in the serums from healthy subjects (1.16 ± 0.51 ng/ml; n = 27) (Figure 1a). PTX3 was also elevated in COPD patients (2.03 ± 1.06 ng/ml; n = 7) (Figure 1a).

As CF primarily affects the respiratory tract, we also quantified PTX3 in sputum samples. Surprisingly, the concentrations of PTX3 were lower in the sputum samples from adults (0.73 ± 0.83 ng/ml; n = 23) and children CF (0.63 ± 0.59 ng/ml; n = 28) than in their serums (1.57 ± 1.46 ng/ml and 2.22 ± 1.58 ng/ml, respectively) (Figure 1b). Individual analysis revealed that, in most cases, PTX3 was lower in sputum samples than in serums in CF patients (Figure 1c). In contrast, the levels of PTX3 were higher in the sputum samples (6.94 ± 5.81 ng/ml, mean ± SD, n = 7) than in the serums (2.03 ± 1.06 ng/ml) of COPD patients (Figure 1c).

PTX3 is degraded in CF sputum

The low concentration of PTX3 in CF sputum samples may result from a local degradation or from a reduced production. We first analyzed by Western blotting the integrity of PTX3 in CF sputum samples (Figure 2a). In 44 of 51 samples, either the 90 ku dimeric (as illustrated in lanes 1, 4 and 5), the 50 ku monomeric (lanes 2-5) or both forms of PTX3 (lanes 4 and 5) were undetectable. In 43 of 51 samples, immunoreactive bands with apparent molecular masses lower than 40 ku, that may correspond to degraded forms of PTX3, were observed (Figure 2a and data not shown). In contrast, monomeric and dimeric forms of PTX3 were detected in 6/7 COPD patients, with only 4/7 samples exhibiting immunoreactive bands with a molecular mass lower than 40 ku (Figure 2a and data not shown). Recombinant PTX3 and PTX3 in saliva of healthy subjects gave rise to 90 and 50 ku immunoreactive bands (Figure 2a). To confirm the degradation of PTX3 in CF sputum samples, biotinylated PTX3 (bPTX3), allowing discrimination from endogenous PTX3, was added to sputum samples. A degradation of PTX3 was observed as early as 15 min incubation and no immunoreactive PTX3 was detected after 30 min (Figure 2b). In contrast, bPTX3 was not degraded or degraded more slowly in COPD sputum samples (Figure 2b and data not shown).

For Peer Review

We investigated whether the short pentraxins CRP and SAP may be also altered in respiratory secretions from CF patients. Multimeric forms of SAP and CRP were detected in CF and COPD sputum samples (Figure 2c), with no bands with a molecular weight lower than 25 ku. Accordingly, bSAP and bCRP, added in CF or COPD sputum samples, remained intact (Figure 2d).

In a second set of experiments, we analyzed the capacity of pulmonary epithelial cell lines and neutrophils from CF patients to produce PTX3. The epithelial cell lines IB3-1 and S9 produced similar amounts of PTX3 in response to LPS or proinflammatory cytokines (Figure 3b, left). As a control, and in agreement with a previous study,[25] we observed that human primary bronchial epithelial cells produce PTX3 in response to IL-1β ± TNF-α, but not to LPS (Figure 3b, right panel, and data not shown). Peripheral blood neutrophils from CF patients and healthy subjects (viability > 95%) produced equivalent amounts of PTX3 upon activation (Figure 3a, left). We next evaluated the ability of neutrophils isolated from the airways of CF patients to secrete PTX3. Results showed that no PTX3 was detected in the supernatants of neutrophils isolated from CF sputums and stimulated with LPS or IL-1β ± TNF-α (data not shown). Interestingly, Western blotting analysis showed that neutrophils, freshly isolated from CF sputums, contained PTX3 (Figure 3a, right panel). A similar Western blotting profile is observed in peripheral blood neutrophils from healthy subjects after *in vitro* stimulation (Figure 3a, right panel).

Serine proteases in CF sputum degrade PTX3

We investigated the nature of the proteases responsible for the local degradation of PTX3 in CF patients. The integrity of bPTX3 in CF sputum samples, containing or not protease inhibitors, was analyzed by Western blotting. Only the serine protease inhibitors PMSF and pefabloc protected bPTX3 from proteolysis (Figure 4). In contrast, the cysteine protease, metalloprotease, amino-peptidase, aspartate protease and chymotrypsin inhibitors, did not protect PTX3 from degradation (Figure 4).

For Peer Review

Neutrophil elastase is involved in the degradation of PTX3 in CF sputum

Neutrophils have a unique arsenal of serine proteases.[26] Moreover, activated and dying neutrophils, which persist in the lung of CF patients,[27] may release the serine proteases HNE, CatG and PR3 into the respiratory tract. We thus hypothesized that neutrophil-derived proteases may be involved in the degradation of PTX3 in CF patients. The specific HNE inhibitors, but not CatG and PR3 inhibitors, prevented the degradation of PTX3 in CF sputum samples (Figure 5a). As a control, these inhibitors protected recombinant PTX3 from the degradation by HNE, CatG and PR3 (Figure 5b and Supplemental Figure 1a). Supporting a role for HNE in the degradation of PTX3 in CF patients, (i) HNE activity was detected in sputum samples from CF adults (Figure 5c and Table 1) and in the supernatants of dying neutrophils (Supplemental Figure 2a), as previously reported[28] and, (ii) we observed a significant correlation between the HNE activity and the level of endogenous PTX3 degradation in CF sputum samples (Figure 5c; Spearman correlation coefficient, r = 0.507; *P* = 0.016). In agreement with the absence of degradation in CF sputum samples, HNE, CatG and PR3 did not degrade SAP and CRP (Supplemental Figure 1b).

Proteases secreted by* A. fumigatus *can degrade PTX3

Most CF patients are chronically infected, especially by *A. fumigatus*, one of the most frequent fungal colonizers in CF patients.[29] Results showed that PTX3 was rapidly degraded (< 30 min) in *A. fumigatus* culture filtrates (Figure 6a). *A. fumigatus* produces three main endoproteases :[30] the alkaline protease Alp, the aspartic protease Pep and the metalloprotease Mep. The degradation of PTX3 in *A. fumigatus* culture filtrates was inhibited by the serine protease inhibitors PMSF, antipain and chymostatin, but not by the aspartic-, metallo-, cysteine- and aminopeptidase protease inhibitors (Figure 6b). Moreover, *A. fumigatus* culture filtrates did not induce the proteolytic cleavage of SAP and CRP (data not shown).

HNE and* A. fumigatus *serine proteases degrade the N-ter domain of PTX3

SAP and CRP were resistant to proteolysis by *A. fumigatus* and neutrophil proteases, suggesting that the common C-ter domain of pentraxins is preserved. We therefore analyzed the degradation of the N-ter and C-ter domains of PTX3, by using the C-ter and N-ter specific mAbs 16B5 and MNB4, respectively. Interestingly, HNE (Figure 7a) and proteases secreted by *A. fumigatus* (Figure 7b) rapidly degraded the N-ter domain of PTX3 while, in contrast, a longer incubation time was required to induce the degradation of the C-ter domain. A similar

For Peer Review

profile of PTX3 degradation was observed with proteases released by dying neutrophils (Supplemental Figure 2b).

For Peer Review

Discussion

PTX3 plays a pivotal role in the resistance against selected pathogens, especially *A. fumigatus* and *P. aeruginosa*.[8,10] CF is characterized by chronic lung infections, prominently with these two pathogens. We thus hypothesized that the expression and/or function of PTX3 may be altered in CF patients. Results showed that endogenous PTX3 is locally degraded in CF patients and that its proteolysis can be mediated by elastase and microbial serine proteases.

The level of circulating PTX3 rapidly increases during infection and inflammation, especially in severe sepsis and septic shock.[6] PTX3 is now recognized as an early and robust indicator of shock in severe meningococcal infection[7] and a prognostic factor in patients with bacteremia.[31] We report that PTX3 is also elevated in CF patients. However, no correlation was evidenced between the levels of PTX3 and the clinical and biological parameters of CF patients.

CF patients suffer from chronic lung infections, suggesting that PTX3 may be elevated in the lung. Surprisingly, we observed that (i) the concentrations of PTX3 were, in most cases, lower in the sputum than in the serum of CF patients and (ii) that the low levels of PTX3 in the airways of CF patients were consecutive to a proteolysis by serine proteases and did not result from a defective production.

HNE, present in an active form in CF sputum, plays a major role in the degradation of PTX3. Previous studies reported that HNE is involved in the degradation of soluble PRRs, such as complement proteins and the collectins SP-A and SP-D.[32,33] HNE also cleaves opsonin receptors (such as CR1) expressed by phagocytes, resulting in an impaired phagocytosis of pathogens and persistence of infection.[34] However, PTX3 appears the most sensitive to serine proteases, as its degradation occurs within minutes. HNE is also involved in inflammation through the upregulation of CXCL8[35] which, in turn, increases the release of HNE.[36] The cleavage of the phosphatidylserine receptor by HNE impairs the clearance of apoptotic cells,[27] resulting in a vicious circle of neutrophil accumulation and excessive HNE activity in the airways. We also observed that serine proteases secreted by *A. fumigatus* degrade PTX3. Innate immune molecules, such as the complement proteins, are degraded by the *A. fumigatus* alkaline protease Alp1.[37] *A. fumigatus* proteases also degrade collagen, elastin and fibrinogen (reviewed in[38]), a process involved in inflammation and tissue remodeling. However, due to the lack of specific inhibitors, we were unable to identify the *A. fumigatus* serine protease(s) involved in the degradation of PTX3. We also observed that

For Peer Review

Scedosporium apiospermum, another major colonizer of the CF patient airways,[39] produces proteases able to degrade PTX3 (personal observation).

In contrast to CF patients, the levels of PTX3 were higher in the sputum samples than in the serums in COPD patients, used as a control group of patients with lung infection. Even though COPD patients exhibited lung infection associated with exacerbation, the degradation of PTX3 and the HNE activity in their sputum samples were reduced compared to CF patients. A recent study reported that COPD is associated with a reduced pulmonary interstitial expression of PTX3 and that PTX3 expression in small airways correlated significantly with FEV1.[40] However, and in agreement with our results, Pizzichini et al. reported increased levels of PTX3 in the sputum samples from COPD patients compared to controls.[41]

In contrast to PTX3, the short pentraxins CRP and SAP were not degraded in CF sputum samples and in the *A. fumigatus* culture filtrates. Moreover, in our experimental conditions, and in contrast to a previous study,[42,43] CRP and SAP were not degraded by HNE. The reason for such discrepancy is not clear. We observed that PTX3 is rapidly degraded by proteases. Thus, we cannot exclude that a long-time incubation is required to degrade the short pentraxins. PTX3 differs from CRP and SAP for the presence of an unrelated N-ter domain .[2] Interestingly, the N-ter domain of PTX3 was rapidly and preferentially degraded by HNE and *A. fumigatus* proteases while, in contrast, a longer incubation time was required to induce the degradation of the C-ter domain. This result is in agreement with the fact that the short pentraxins are less sensitive to proteases than the long pentraxin PTX3. Immunoreactive bands with apparent molecular weights lower than 40 ku were detected in the sputums of CF patients but not after incubation with HNE, suggesting that, in CF patients, both HNE and microbial proteases cooperate to degrade PTX3. The N-ter domain of PTX3 contains the binding site to *A. fumigatus* conidia,[44] suggesting that the preferential degradation of this domain may represent an important physiopathological process involved in the lung colonization by selected pathogens (such as *A. fumigatus*) and their persistent colonization in the lung consecutive to an impaired clearance. Previous studies suggested that the biology of lung neutrophils and macrophages can be modified in cystic fibrosis patients.[45,46] No PTX3 was detected in the supernatants of *in vitro* activated neutrophils isolated from CF sputums. Interestingly, Western blotting analysis revealed that PTX3 remained detectable in neutrophils freshly isolated from CF sputums. This result has to be analyzed in light of previously published results[3] showing that a part of the preformed stock of PTX3 remains associated to activated neutrophils, evan after a long time stimulation. These results suggest that

For Peer Review

neutrophils isolated from CF airways have already secreted PTX3 and are unresponsive, in term of PTX3 release, to a further in vitro stimulation. Concerning macrophages, we did not isolate enough cells to perform in vitro experiments. We observed that bronchial epithelial cells from CF patients also produce PTX3 upon stimulation, as reported for epithelial cells isolated from healthy subjects .[25] Collectively, these data suggest that the capacity to produce PTX3 is not impaired in CF patients, compared to healthy subjects.

PTX3 has important roles in the resistance to a variety of microbes, mainly via its capacity to facilitate their phagocytosis[8,10,12] and to favor the initiation of protective immune responses.[8,47] *In vivo* studies indicate that PTX3 protects mice from *A. fumigatus* pulmonary infection by reducing fungal burden and by increasing survival.[9,47] PTX3 reduces colonization and inflammation in models of aspergillosis and *P. aeruginosa* lung infection in $Ptx3^{-/-}$ mice.[8,10] A protective role of PTX3 was also found associated with a specific haplotype in CF patients.[48] Our study confirms that a defective activity of PTX3, as observed in CF patients, may have profound consequences on the local immunity.

In conclusion, this study shows that (i) the selective proteolysis of PTX3 in the lung may represent a pivotal mechanism for recurrent lung infections in CF patients and (ii) suggests that PTX3-based therapeutic strategies have to take account of its selective and rapid degradation. These results also suggest that the local degradation of PTX3 is a hallmark of CF.

For Peer Review

Acknowldgements

We sincerely acknowledge nurses from the University Hospital of Angers for their help in sample collection. We are grateful to Dr Korkmaz (Inserm Unit 618, Tours, France) for providing the neutrophil serine protease specific inhibitors. YH received a fellowship from the Conseil Général du Maine et Loire and from the French cystic fibrosis association "Vaincre la mucoviscidose" (Grant RF20110600452).

Funding

This work was supported by institutional grants from the University of Angers and from Inserm and by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (project Pentraximmune) and from the French Cystic Fibrosis association "Vaincre la mucoviscidose".

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

For Peer Review

References

1. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. The New England journal of medicine. 2000 Aug 3;343(5):338-44.
2. Agrawal A, Singh PP, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A. Pattern recognition by pentraxins. Adv Exp Med Biol. 2009;653:98-116.
3. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Fremaux I, Doni A, Moalli F, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. The Journal of experimental medicine. 2007 Apr 16;204(4):793-804.
4. Azzurri A, Sow OY, Amedei A, Bah B, Diallo S, Peri G, et al. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2005 Jan;7(1):1-8.
5. Mairuhu AT, Peri G, Setiati TE, Hack CE, Koraka P, Soemantri A, et al. Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections. Journal of medical virology. 2005 Aug;76(4):547-52.
6. Mauri T, Bellani G, Patroniti N, Coppadoro A, Peri G, Cuccovillo I, et al. Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality. Intensive care medicine. Apr;36(4):621-9.
7. Sprong T, Peri G, Neeleman C, Mantovani A, Signorini S, van der Meer JW, et al. Pentraxin 3 and C-reactive protein in severe meningococcal disease. Shock (Augusta, Ga. 2009 Jan;31(1):28-32.
8. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, et al. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. Nature. 2002 Nov 14;420(6912):182-6.
9. Gaziano R, Bozza S, Bellocchio S, Perruccio K, Montagnoli C, Pitzurra L, et al. Anti-*Aspergillus fumigatus* efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004 Nov;48(11):4414-21.
10. Moalli F, Paroni M, Veliz Rodriguez T, Riva F, Polentarutti N, Bottazzi B, et al. The Therapeutic Potential of the Humoral Pattern Recognition Molecule PTX3 in Chronic Lung Infection Caused by Pseudomonas aeruginosa. J Immunol. May 1;186(9):5425-34.
11. Soares AC, Souza DG, Pinho V, Vieira AT, Nicoli JR, Cunha FQ, et al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2006 Apr;8(5):1321-9.
12. Reading PC, Bozza S, Gilbertson B, Tate M, Moretti S, Job ER, et al. Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. J Immunol. 2008 Mar 1;180(5):3391-8.
13. Garlanda C, Bottazzi B, Salvatori G, De Santis R, Cotena A, Deban L, et al. Pentraxins in innate immunity and inflammation. Novartis Found Symp. 2006;279:80-6; discussion 6-91, 216-9.
14. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science (New York, NY. 1989 Sep 8;245(4922):1066-73.
15. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. Trends in molecular medicine. 2007 Jun;13(6):231-40.
16. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. Nature medicine. Apr;18(4):509-19.
17. Conese M. Cystic fibrosis and the innate immune system: therapeutic implications. Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets. Mar;11(1):8-22.

For Peer Review

18. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. J Cyst Fibros. Sep;11(5):363-82.
19. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, et al. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. The Journal of biological chemistry. 1997 Dec 26;272(52):32817-23.
20. Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, Cutting G, Stetten G, Kieffer KA, et al. A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. American journal of respiratory cell and molecular biology. 1991 Apr;4(4):313-9.
21. Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ, et al. Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. Nature. 1992 Aug 13;358(6387):581-4.
22. Jaillon S, Jeannin P, Hamon Y, Fremaux I, Doni A, Bottazzi B, et al. Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. Cell Death Differ. 2009 Mar;16(3):465-74.
23. Corvol H, Fitting C, Chadelat K, Jacquot J, Tabary O, Boule M, et al. Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 Jun;284(6):L997-1003.
24. Duvoix A, Mackay RM, Henderson N, McGreal E, Postle A, Reid K, et al. Physiological concentration of calcium inhibits elastase-induced cleavage of a functional recombinant fragment of surfactant protein D. Immunobiology. Jan-Feb;216(1-2):72-9.
25. Han B, Mura M, Andrade CF, Okutani D, Lodyga M, dos Santos CC, et al. TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. J Immunol. 2005 Dec 15;175(12):8303-11.
26. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2003 Nov;5(14):1317-27.
27. Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, et al. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. The Journal of clinical investigation. 2002 Mar;109(5):661-70.
28. McGreal EP, Davies PL, Powell W, Rose-John S, Spiller OB, Doull I, et al. Inactivation of IL-6 and soluble IL-6 receptor by neutrophil derived serine proteases in cystic fibrosis. Biochimica et biophysica acta. Jul-Aug;1802(7-8):649-58.
29. Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, Burgel PR, Sauter E, Kanaan R, et al. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. Med Mycol. Nov;48 Suppl 1:S32-6.
30. Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. Int J Med Microbiol. 2002 Oct;292(5-6):405-19.
31. Huttunen R, Hurme M, Aittoniemi J, Huhtala H, Vuento R, Laine J, et al. High plasma level of long pentraxin 3 (PTX3) is associated with fatal disease in bacteremic patients: a prospective cohort study. PloS one.6(3):e17653.
32. Hirche TO, Crouch EC, Espinola M, Brokelman TJ, Mecham RP, DeSilva N, et al. Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain. The Journal of biological chemistry. 2004 Jun 25;279(26):27688-98.
33. Rubio F, Cooley J, Accurso FJ, Remold-O'Donnell E. Linkage of neutrophil serine proteases and decreased surfactant protein-A (SP-A) levels in inflammatory lung disease. Thorax. 2004 Apr;59(4):318-23.

For Peer Review

34. Tosi MF, Zakem H, Berger M. Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. The Journal of clinical investigation. 1990 Jul;86(1):300-8.
35. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. FEBS letters. 2003 Jun 5;544(1-3):129-32.
36. Taggart C, Coakley RJ, Greally P, Canny G, O'Neill SJ, McElvaney NG. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. American journal of physiology. 2000 Jan;278(1):L33-41.
37. Behnsen J, Lessing F, Schindler S, Wartenberg D, Jacobsen ID, Thoen M, et al. Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. Infection and immunity. Aug;78(8):3585-94.
38. Abad A, Fernandez-Molina JV, Bikandi J, Ramirez A, Margareto J, Sendino J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Revista iberoamericana de micologia. Oct-Dec;27(4):155-82.
39. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. Med Mycol. 2009 Jun;47(4):387-97.
40. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Pauwels NS, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. COPD is associated with reduced pulmonary interstitial expression of pentraxin-3. Eur Respir J. Apr;39(4):830-8.
41. Pizzichini MM, T. K, F. ME, T. PJ, J. SL, C. RC, et al. Pentraxin 3 (PTX3): A new marker to study airway inflammation?. American journal of respiratory and critical care medicine. 2009;179:A2532.
42. Farberman MM, Akers KT, Malone JP, Erdman-Gilmore P, Townsend RR, Ferkol T. Airway proteins involved in bacterial clearance susceptible to cathepsin G proteolysis. Eur Respir J. Feb;35(2):410-7.
43. Kakuta Y, Aoshiba K, Nagai A. C-reactive protein products generated by neutrophil elastase promote neutrophil apoptosis. Archives of medical research. 2006 May;37(4):456-60.
44. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, et al. Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against Aspergillus fumigatus. Blood. Dec 9;116(24):5170-80.
45. Makam M, Diaz D, Laval J, Gernez Y, Conrad CK, Dunn CE, et al. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009 Apr 7;106(14):5779-83.
46. Tirouvanziam R, Gernez Y, Conrad CK, Moss RB, Schrijver I, Dunn CE, et al. Profound functional and signaling changes in viable inflammatory neutrophils homing to cystic fibrosis airways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008 Mar 18;105(11):4335-9.
47. D'Angelo C, De Luca A, Zelante T, Bonifazi P, Moretti S, Giovannini G, et al. Exogenous pentraxin 3 restores antifungal resistance and restrains inflammation in murine chronic granulomatous disease. J Immunol. 2009 Oct 1;183(7):4609-18.
48. Chiarini M, Sabelli C, Melotti P, Garlanda C, Savoldi G, Mazza C, et al. PTX3 genetic variations affect the risk of *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients. Genes and immunity. Dec;11(8):665-70.

For Peer Review

Figure legends

Figure 1. Status of PTX3 in CF serum and sputum samples. a,b, Quantification of PTX3 by ELISA in serum samples (a) and sputum samples (b) from 51 CF patients (23 adults + 28 children) and 7 COPD patients. The levels of PTX3 were also determined in serum samples from 27 healthy subjects (**a**). Bars represent means; *$P < 0.05$, **$P < 0.005$. **c**, Individual analysis of PTX3 in serum and sputum samples from 51 CF patients (23 adults + 28 children) and 7 COPD patients. Bars represent means; *$P < 0.05$ and ***$P < 10^{-4}$.

Figure 2. PTX3 is degraded in sputum samples from CF patients. a, Western blotting analysis of PTX3 integrity in 6 representative sputum samples from adult CF patients, 3 representative sputum samples from COPD patients and, 1 representative saliva sample from healthy donors. b, Biotinylated PTX3 (bPTX3) (50 ng) was incubated in CF or COPD sputum samples at 37°C for the indicated times and the integrity of bPTX3 was analyzed by Western blotting. Data are representative of 1 of 5 experiments using sputum samples from different CF and COPD patients in each experiment. c, Western blotting analysis of SAP and CRP integrity in 3 representative sputum samples from adult CF patients and 2 representative sputum samples from COPD patients. d, Biotinylated SAP (bSAP) and CRP (bCRP) (50 ng) were incubated for 2 h at 37°C in CF and COPD sputum samples. Biotinylated SAP and bCRP integrity was analyzed by Western blotting. Recombinant PTX3, SAP and CRP (a,c) and biotinylated PTX3, CRP and SAP (a,d) were used as controls.

Figure 3. The production of PTX3 is not altered in cells from CF patients. a, Peripheral blood neutrophils isolated from CF patients (n = 6) and healthy subjects (n = 4) were stimulated for 24 h with or without 100 ng/ml LPS, 20 ng/ml IL-1β + 40 ng/ml TNF-α or heat-inactivated *A. fumigatus* conidia (conidia per cell ratio = 5:1). The levels of PTX3 were determined by ELISA (mean ± SEM) (left). Western-blotting analysis of cell-associated PTX3 in non stimulated neutrophils isolated from CF airways (lanes 1 and 2) and in peripheral blood neutrophils from healthy subjects after 24 h activation with 100 ng/ml LPS (lanes 3 and 4) (right). b, The IB3-1 and S9 cell lines were stimulated for 24 h with LPS, IL-1β or TNF-α, at the indicated concentrations (left). Primary human bronchial epithelial cells were stimulated for 24 h with 10 µg/ml LPS or 200 ng/ml IL-1β plus 400 ng/ml TNF-α (right). The levels of PTX3 were determined by ELISA (mean ± SEM of 3 independent experiments).

For Peer Review

Figure 4. PTX3 is degraded by serine proteases present in CF sputum samples. Biotinylated PTX3 (50 ng) were incubated for 1 h at 37°C in CF sputum samples, containing or not proteases inhibitors. The integrity of PTX3 was analyzed by Western blotting. Results are representative of 3 experiments.

Figure 5. Correlation between HNE activity and PTX3 degradation in CF sputum samples. a, Specific HNE (0.5 mM AAPA-CMK or AAPV-CMK), CatG (1 µM α-Chym or 0.5 mM AAF-CMK) or PR3 (60 µM) inhibitors were added to CF sputum samples 15 min before addition of 50 ng bPTX3. **b**, Recombinant HNE, CatG and PR3 (125 mM) were incubated or not with their specific inhibitors (0.5 mM AAPA-CMK, 0.5 mM AAPV-CMK, 0.5 mM AAF-CMK, 1 µM α-Chym or 60 µM PR3 inhibitors) for 15 min at 37°C before addition of 50 ng rPTX3. a,b, After a further 30 min incubation at 37°C, the status of PTX3 was analyzed by Western blotting. Results are representative of 1 of 4 independent experiments. c, The activity of HNE was correlated with the integrity of PTX3 in adult CF sputum samples using the Spearman rank correlation assay. Degradation of PTX3 (determined by Western blotting) was scored from 0 (no degradation) to 10 (totally degraded). Correlation coefficient, r = 0.507, $P = 0.016$, n = 23.

Figure 6. Proteases secreted by *A. fumigatus* degrade PTX3. a, Recombinant PTX3 (50 ng) was incubated in *A. fumigatus* culture filtrates for the indicated times at 37°C. b, protease inhibitors were added to *A. fumigatus* culture filtrates for 30 min at 4°C before addition of 50 ng PTX3 for further 30 min incubation at 37°C. a,b, the status of PTX3 was evaluated by Western blotting using a specific polyclonal anti-PTX3 Ab. Recombinant PTX3 (rPTX3) was used as a control. Results are representative of 3 experiments.

Figure 7. HNE and *A. fumigatus* proteases degrade the N-ter domain of PTX3. a, Recombinant PTX3 (50 ng) was incubated with 250 nM HNE for 2 h at 37°C. b, Recombinant PTX3 (50 ng) was incubated at 37°C in *A. fumigatus* culture filtrates during the indicated times. a,b, The status of PTX3 was analyzed by Western blotting using the anti-PTX3 monoclonal Abs 16B5 or MNB4. Results are representative of 3 independent experiments. Recombinant PTX3 (rPTX3) was used as a control.

For Peer Review

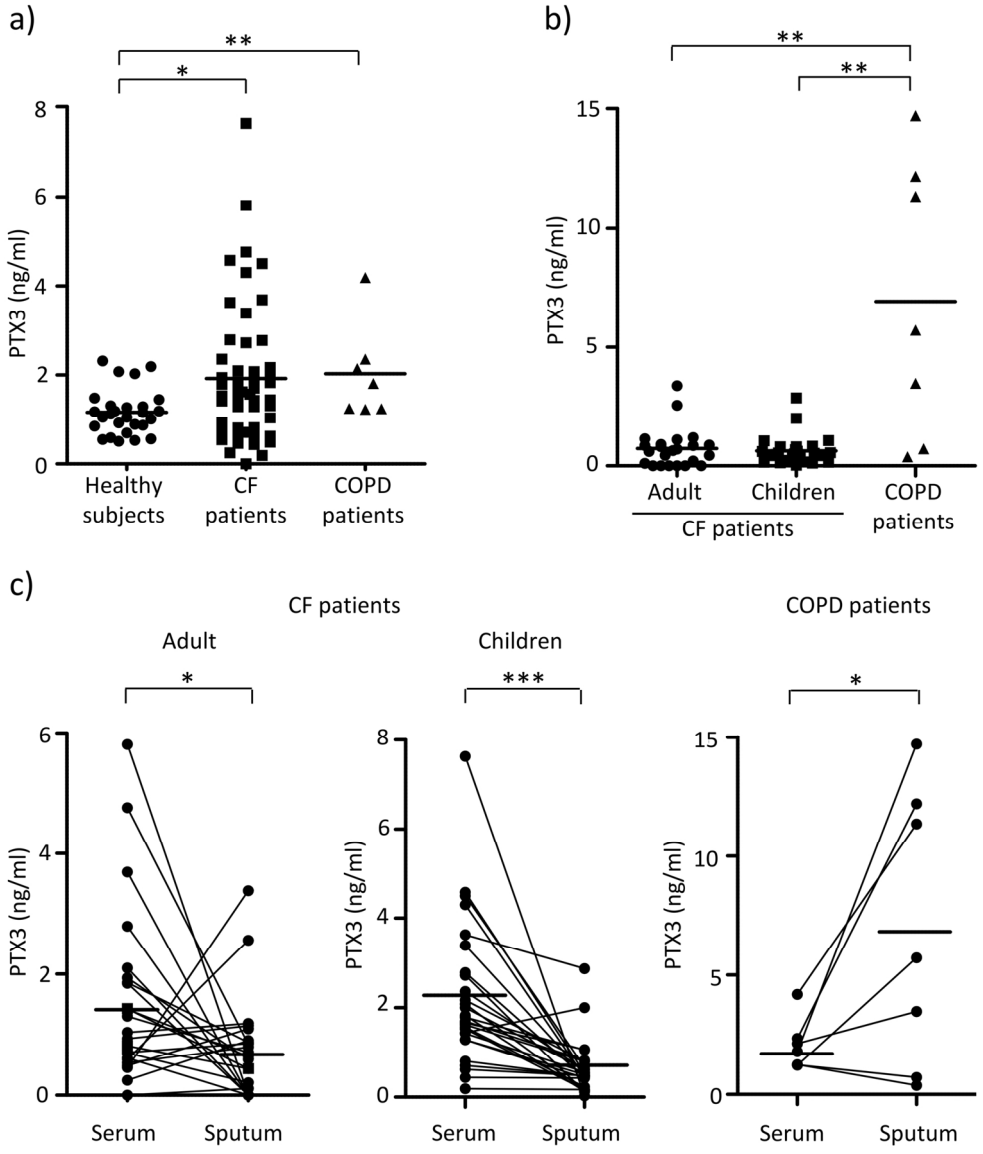


Figure1
166x194mm (300 x 300 DPI)

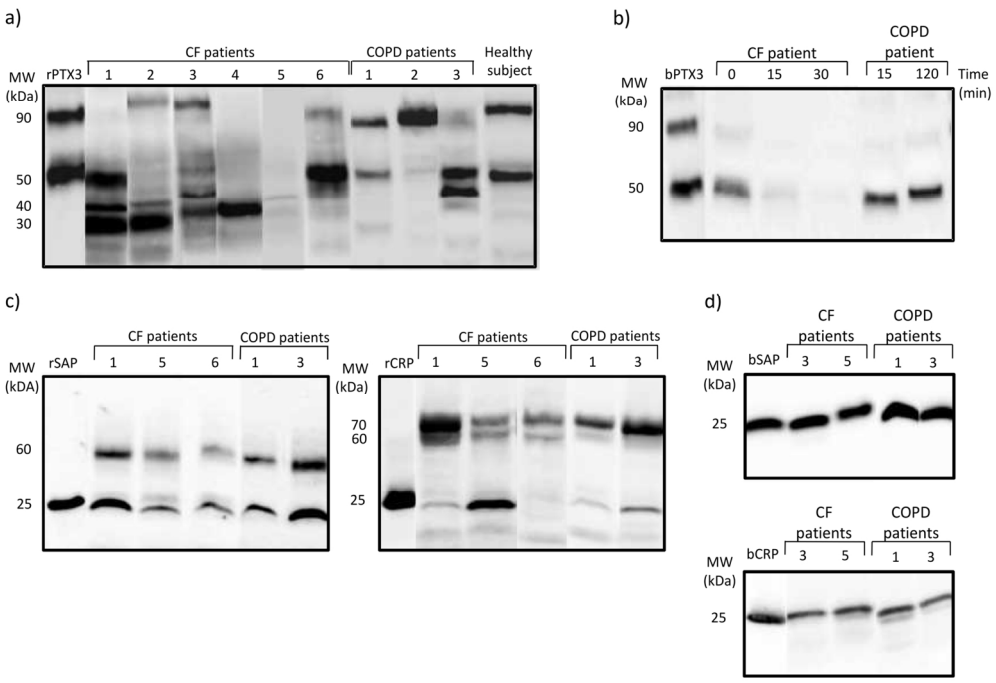


Figure2
157x107mm (300 x 300 DPI)

Review

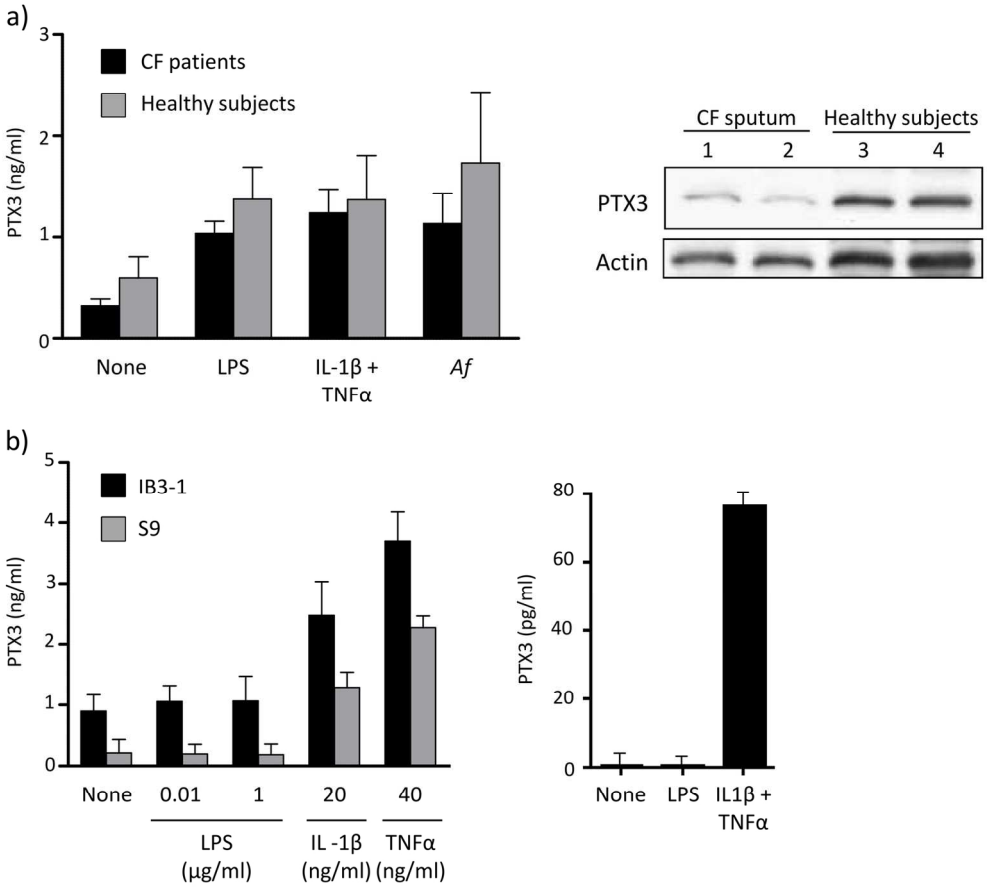


Figure3
150x135mm (300 x 300 DPI)

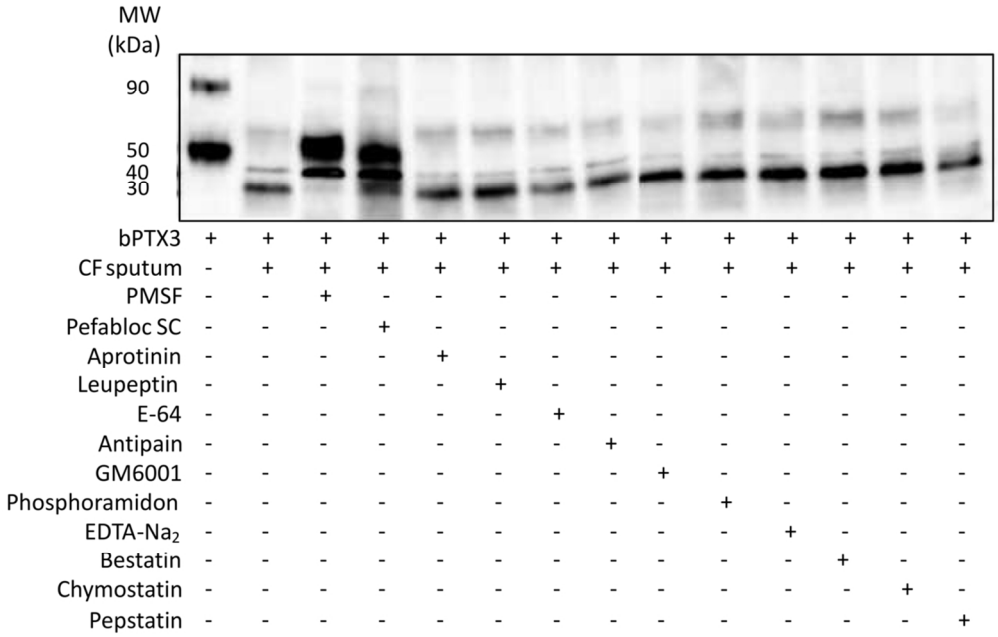


Figure4
110x71mm (300 x 300 DPI)

For Review

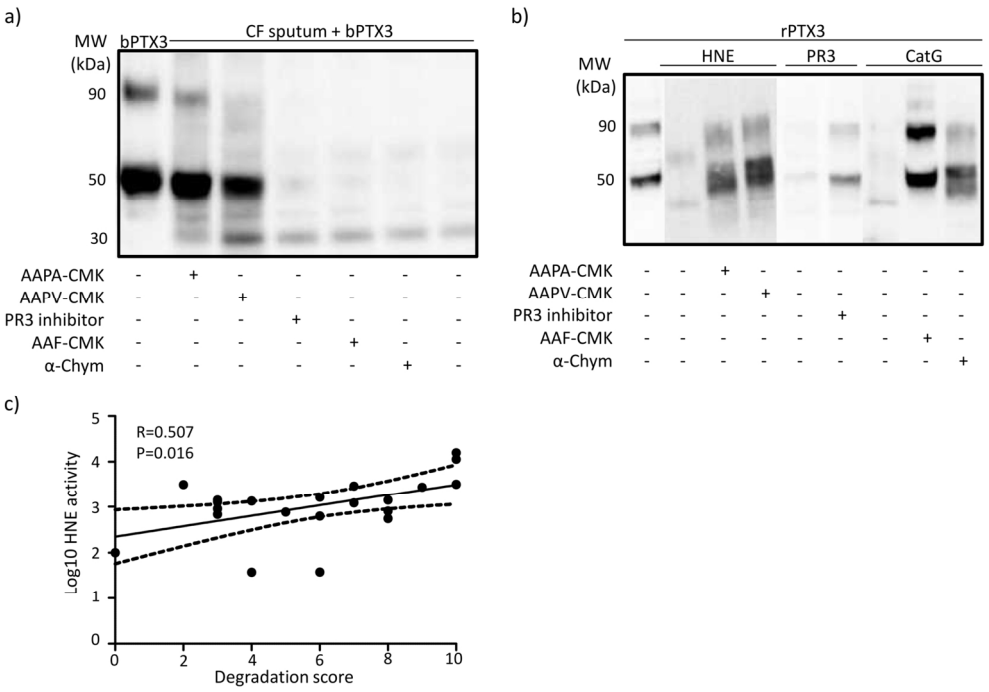
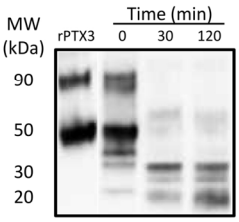


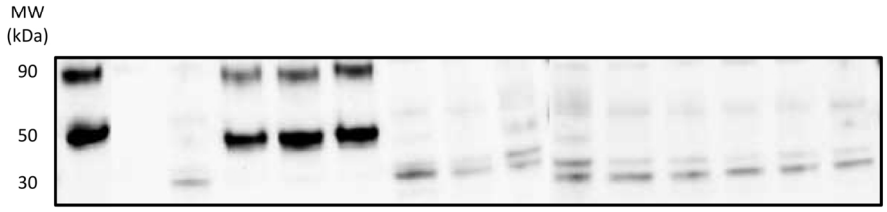
Figure5
153x105mm (300 x 300 DPI)

Review

a)



b)



rPTX3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Af filtrate	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PMSF	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antipain	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chymostatin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aprotinin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Leupeptin	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Pefabloc	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Pepstatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
EDTA-Na_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GM6001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Phosphoramidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
E-64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Bestatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Figure6
165x152mm (300 x 300 DPI)

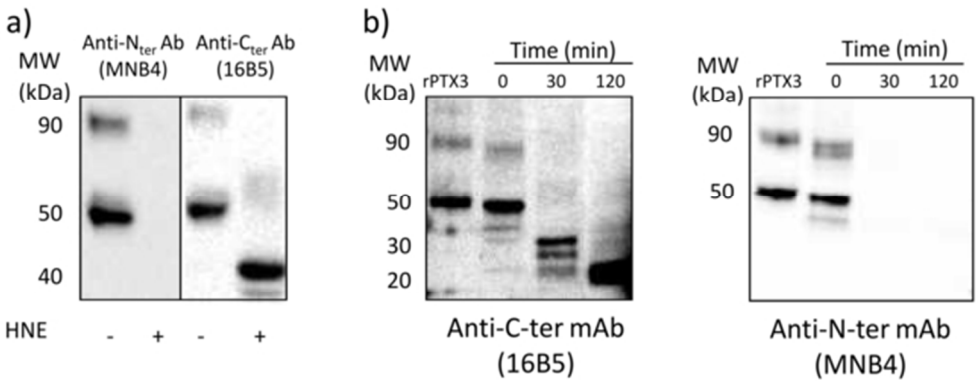


Figure7
55x21mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

Table 1.. Demographic and clinical characteristics of CF and COPD patients.

		Cystic fibrosis patients		
		Children	Adults	**COPD patients**
Number		28	23	7
Gender	Male/Female	18/10	9/14	5/2
Age (years)	Mean ± SD (range)	14.36 ±4.04 (6-20)	30.6 ± 12.05 (20-75)[e]	52.86 ± 15.27 (23-73)
FVC (% predicted)[a]	Mean ± SD	83.06 ± 14.85[c]	76.19 ± 23.85[e]	79.68 ± 7.18[f]
FEV1 (% predicted)[b]	Mean ± SD	72.88 ± 22.78[c]	52.94 ± 28.69[e]	46.63 ± 13.38[f]
FEV1/FVC	Mean ± SD	86.45 ± 18.51[c]	66.35 ± 20.01[e]	59.38 ± 15.57[f]
Neutrophil elastase activity in sputum (nM)	Mean ± SD	454.90 ± 746.07[d]	2575.67 ± 3724.36	56.09 ± 70.48
Infectious colonization :				
Pseudomonas aeruginosa	Number (%)	6 (21 %)	6 (28 %)[e]	1 (14 %)[g]
Aspergillus fumigatus	Number (%)	9 (32 %)	13 (56 %)[e]	0 (0 %)[g]

[a] FVC: forced vital capacity

[b] FEV1: forced expiratory volume in 1 s

[c] Data available for 25/28 children CF patients

[d] Data available for 26/28 children CF patients

[e] Data available for 20/23 adults CF patients

[f] Data available for 6/7 COPD patients

[g] Data available for 5/7 COPD patients

For Peer Review

Supplemental figures

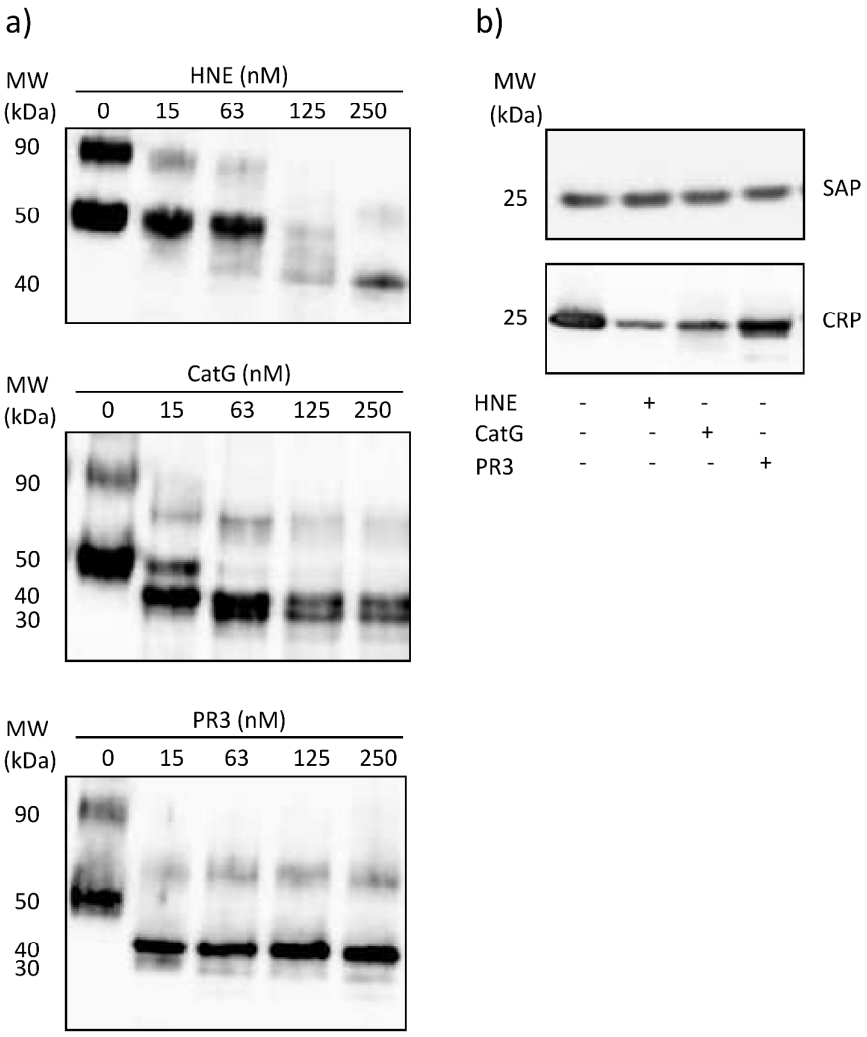


Figure S1. Neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3 degrade PTX3 in a dose-dependent manner. A, HNE, CatG and PR3 (at the indicated concentrations) were incubated with 50 ng recombinant PTX3 for 2 h at 37°C. The status of PTX3 was analyzed by Western blotting using a polyclonal anti-PTX3 antibody. b, Recombinant SAP and CRP (50 ng) were incubated with 250 nM HNE, CatG or PR3 for 2 h at 37°C. The status of SAP and CRP was analyzed by Western blotting using specific polyclonal antibodies. a,b, results are representative of 3 independent experiments.

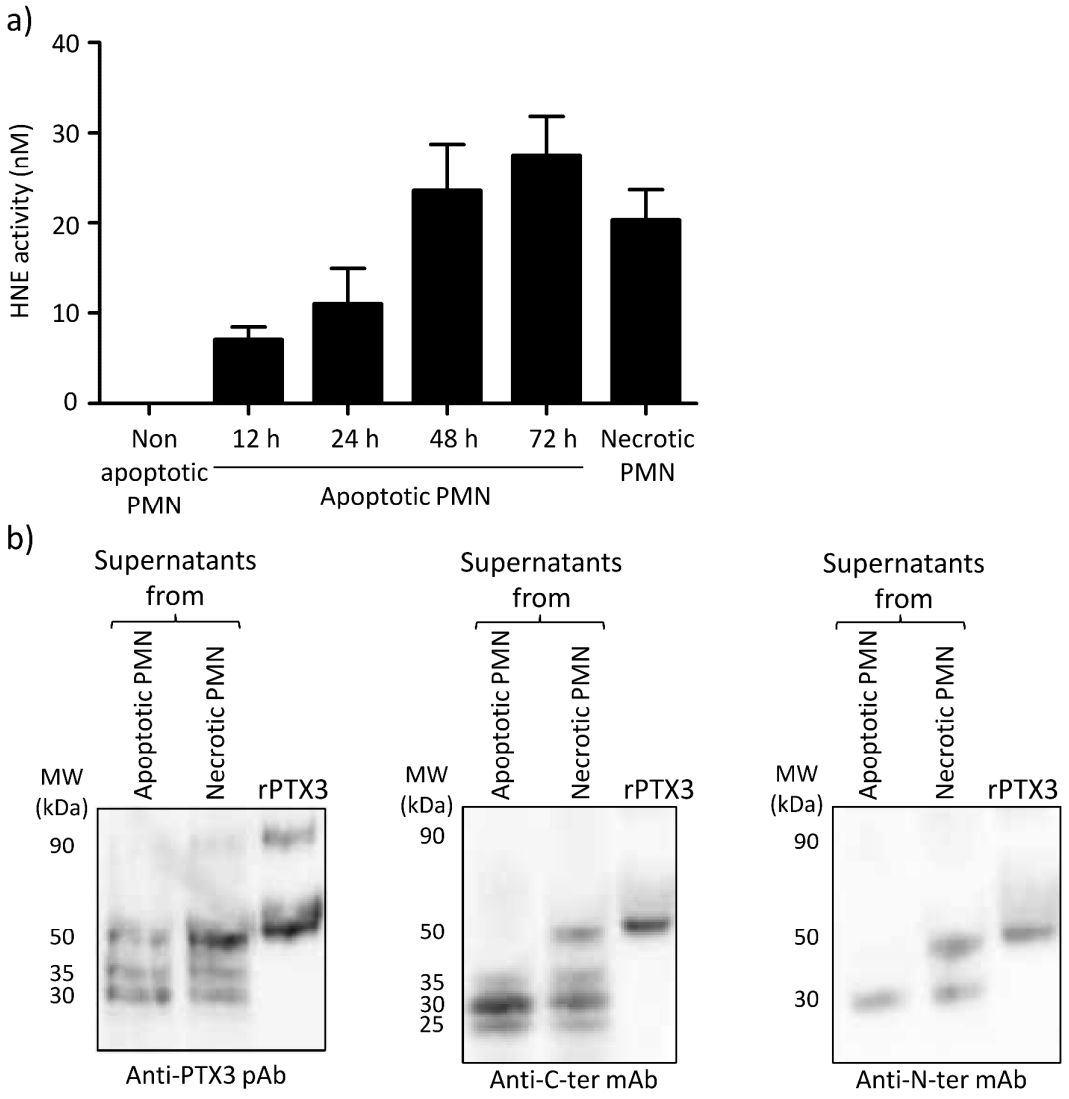


Figure S2. HNE released by apoptotic neutrophils degrade PTX3. a, HNE activity was measured in the supernatants of apoptotic cells (collected at the indicated times) and necrotic neutrophils. Results are expressed in nM (mean ± SD, n=5). b, Recombinant PTX3 (50 ng) was incubated for 2 h at 37°C in cell-free supernatants of apoptotic (spontaneous apoptosis obtained after 72 h culture) or necrotic neutrophils (necrosis induced by heating at 56°C). The integrity of recombinant PTX3 was analyzed by Western blotting using a polyclonal anti-PTX3 Ab, or the anti-PTX3 monoclonal Abs 16B5 or MNB4. Results are representative of 6 independent experiments. Recombinant PTX3 (rPTX3) was used as a control.

Discussion

Le système immunitaire comprend deux grands mécanismes de défense : (i) l'immunité innée et (ii) l'immunité adaptative. L'immunité innée couvre l'ensemble des mécanismes de défense antimicrobienne non spécifiques d'antigènes et intervient immédiatement ou dans les heures qui suivent l'exposition à un micro-organisme. Au contraire, la réponse immunitaire adaptative ou spécifique d'antigènes intervient plus tard ; elle constitue le support de la mémoire immunologique et découle de mécanismes initiés par le système immunitaire inné.

Les PRRs, récepteurs exprimés notamment par les cellules de l'immunité innée, reconnaissent des motifs moléculaires hautement conservés durant l'évolution, exprimés exclusivement par les micro-organismes et appelés PAMPs [2]. Les PRRs reconnaissent également des composants du soi-modifié, tels que les cellules apoptotiques. Ils sont classés en trois familles sur la base de leurs fonctions et de leurs profils d'expression : les récepteurs d'endocytose et les récepteurs de signalisation (associés aux cellules) et les récepteurs solubles. Les PRRs solubles, représentés essentiellement par les pentraxines, les collectines et les ficolines, se comportent comme des ponts moléculaires (opsonines) entre les micro-organismes et les récepteurs d'endocytose exprimés par les phagocytes.

PTX3 est produite en réponse à un stimulus inflammatoire, tel que des micro-organismes, des cytokines (IL-1β, TNFα) ou des composants microbiens/agonistes des molécules TLRs [166-168]. PTX3 est exprimée, entre-autre, par les cellules endothéliales [166], les cellules myéloïdes (monocytes, cellules dendritiques (DC), neutrophiles) [83, 167, 169] et les cellules épithéliales [175]. PTX3 fixe de nombreux pathogènes, et notamment *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa* [177]. La fixation de PTX3 à ses cibles facilite leur élimination par les phagocytes.

Le rôle physiologique de PTX3 a été clairement illustré dans des souris déficientes ($PTX3^{-/-}$). Les macrophages alvéolaires de souris $PTX3^{-/-}$ ont une capacité réduite de phagocytose d'*Aspergillus fumigatus*, qui est rétablie par addition de PTX3 exogène. De plus, les souris $PTX3^{-/-}$ succombent rapidement à une infection par *Aspergillus fumigatus* (médiane de survie de 3 jours) alors que les souris sauvages ne sont pas sensibles à ce pathogène. La sensibilité des souris $PTX3^{-/-}$ est associée à un défaut d'initiation d'une réponse protectrice de type Th1 [177]. Les souris $PTX3^{-/-}$ sont protégées d'une infection par *Aspergillus fumigatus* par injection de PTX3 exogène.

L'ensemble de ces résultats montrent que la molécule PTX3 joue un rôle important dans l'immunité protectrice vis-à-vis de certaines infections, notamment par *Aspergillus fumigatus*.

Il s'avère que les deux pathogènes, *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa*, sont fréquemment retrouvés lors des infections chroniques associées à la mucoviscidose.

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques dans les populations caucasiennes et d'évolution souvent fatale. La transmission de la mucoviscidose est autosomique-récessive. Le gène responsable de cette maladie, situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31), code pour une forme mutée de la protéine « cystic fibrosis transmembrane conductance » (CFTR) [208]. A ce jour, plus de 1900 mutations ont été décrites sur le gène *CFTR*. CFTR est un canal ionique impliqué dans le transport des ions chlorure. CFTR interagit avec d'autres canaux ioniques et inhibe notamment les canaux ENaC (« Epithelial sodium chanel »), impliqués dans l'absorption d'ions sodium et d'eau par les cellules épithéliales. L'altération de la fonction de CFTR tend à diminuer la sécrétion d'ions chlorure et d'eau et à favoriser l'absorption d'ions sodium, résultant en une hyperviscosité du mucus qui diminue l'élimination mucociliaire et favorise la colonisation bactérienne. L'atteinte de l'appareil respiratoire est la principale cause de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose. Une colonisation permanente des voies aériennes par *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus aureus* puis *Pseudomonas aeruginosa*, conduit à une succession d'épisodes inflammatoires et infectieux, aboutissant à l'insuffisance respiratoire. Les patients atteints de mucoviscidose sont également prédisposés à des complications broncho-pulmonaires, telles que l'aspergillose à *Aspergillus fumigatus*.

Statut de PTX3 chez les patients atteints de mucoviscidose

La concentration de PTX3 circulante augmente rapidement lors d'une infection ou d'une réponse inflammatoire (en réponse aux cytokines pro-inflammatoires et aux micro-organismes/motifs microbiens). De précédentes études ont rapporté une concentration élevée de PTX3 sérique lors de septicémies sévères et de chocs septiques [193, 352]. PTX3 est proposé comme un indicateur précoce de choc chez les patients atteints de méningococcie sévère [194]. Pendant les premiers jours après le diagnostic de la bactériémie, PTX3 présente une meilleure valeur pronostique, comparativement à la CRP [353]. Dans certains cas, le taux de PTX3 peut être corrélé à la sévérité de la maladie. Dans notre étude, aucune corrélation n'a été établie entre les concentrations de PTX3 dans les sérums ou les expectorations et les

données cliniques des patients, telles que la VEMS, suggérant que le taux de PTX3 n'est pas associé à la sévérité de la maladie.

Une des difficultés de notre étude consistait à identifier un groupe contrôle. Au même titre que les patients atteints de mucoviscidose, les patients atteints de BPCO souffrent d'infections pulmonaires chroniques. Nous avons donc comparé les taux de PTX3 chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients atteints de BPCO. En raison de leurs statuts infectieux, nous avons observé une augmentation de la concentration sérique de PTX3 chez les patients atteints de mucoviscidose et de BPCO. Des bactéries, telles que *Haemophilus influenza*, sont détectées dans les poumons d'environ 25 % des patients atteints de BPCO stable et dans plus de 50 % de patients en exacerbation. Chez les patients atteints de BPCO sévère, les exacerbations peuvent également être causées par *Pseudomonas aeruginosa* [354]. Des colonisations pulmonaires par *Chlamydophila pneumoniae* et *Pneumocystis jiroveci* sont également fréquentes [355, 356]. De plus, d'autres infections graves, telles que l'aspergillose pulmonaire invasive, émergent chez les patients atteints de BPCO [357]. Nous avons observé que la concentration de PTX3 dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose est significativement plus faible, comparativement aux patients BPCO. Contrairement aux patients atteints de mucoviscidose, la concentration de PTX3 dans les expectorations de patients atteints de BPCO est plus importante que dans leurs sérums. Même si ces patients présentent des infections pulmonaires avec exacerbation, la dégradation de PTX3 et l'activité de l'élastase du neutrophile dans leurs expectorations sont réduites, comparativement aux patients atteints de mucoviscidose. Une étude récente a montré que la BPCO est associée à une expression interstitielle pulmonaire de PTX3 réduite et une expression de PTX3 au niveau des petites voies aériennes qui corrèle de manière significative avec la VEMS des patients [358]. Contrairement à cette étude, mais en accord avec l'étude de Pizzichini *et al*, nous observons une concentration élévée de PTX3 dans les expectorations de patients atteints de BPCO [359].

Sur la base de cette observation, nous avons donc émis deux hypothèses : soit la production de PTX3 est altérée chez les patients atteints de mucoviscidose, soit PTX3 est dégradée localement. Afin d'évaluer la première hypothèse, nous avons analysé la production de PTX3 par des neutrophiles isolés du sang périphérique de patients, comparativement à des sujets sains, et par des cellules épithéliales pulmonaires déficientes en CFTR (lignée IB-3) ou non déficientes (lignée S9). Afin d'évaluer la deuxième hypothèse, nous avons analysé par Western-blotting le statut de la molécule PTX3 dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, comparativement aux patients atteints de BPCO. Nos données montrent que le

faible taux de PTX3 dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose résulte d'une dégradation protéique et non d'un défaut de production.

Implication des protéases de l'hôte et des protéases microbiennes dans la dégradation de PTX3

Nous avons observé que les protéases à sérine, présentes dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, sont responsables de la dégradation de PTX3.

Les lésions pulmonaires associées à la mucoviscidose sont principalement provoquées par les protéases de l'hôte et les protéases microbiennes. La plupart des protéases de l'hôte présentes au niveau des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose sont libérées par les neutrophiles. Bien que la concentration et l'activité de l'élastase prédomine dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) des patients atteints de mucoviscidose, de forts taux de cathepsine G et de protéinase 3 sont également détectés [303, 304]. Ces trois protéases sont contenues dans les granules primaires des neutrophiles. Nos résultats suggèrent que l'élastase, présente dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, est la principale protéase responsable de la dégradation de PTX3. De précédentes études ont montré le rôle délétère de l'élastase dans la mucoviscidose [309]. L'élastase maintient l'inflammation en (i) augmentant la production de CXCL8 [312] (principal facteur chimiotactique des neutrophiles) qui, en retour, favorise la sécrétion d'élastase par les neutrophiles [360], et (ii) en clivant les récepteurs à la phosphatidylsérine à la surface des phagocytes, inhibant ainsi l'élimination des cellules apoptotiques [290]. Ces effets contribuent à maintenir le cercle vicieux inflammation neutrophilique-excès d'élastase au niveau des voies respiratoires. De plus, l'élastase altère les fonctions immunitaires innées en dégradant les protéines anti-microbiennes, telles que les protéines du surfactant SP-A et SP-D [321, 361]. L'élastase est également responsable de la dégradation des protéines du complément et de leurs récepteurs, tels que les récepteurs Fcγ [301] et CR1 à la surface des neutrophiles ainsi que le facteur iC3b opsonisé à la surface de *Pseudomonas aeruginosa* [302]. Ces effets ont pour conséquence de réduire la phagocytose des pathogènes.

En plus de l'élastase du neutrophile, nous avons démontré que des protéases à sérine sécrétées par *Aspergillus fumigatus* sont capables de dégrader PTX3. Les micro-organismes sécrètent des protéases pour favoriser la colonisation et échapper à l'immunité de l'hôte. *Aspergillus fumigatus* sécrète principalement trois endoprotéases : la protéase à sérine de type subtilisine, encore appelée protéase alcaline (Alp) [362], la protéase aspartique Pep1 [363] et la métalloprotéase Mep [362]. Les molécules de l'immunité, telles que les protéines du

complément, sont dégradées par la protéase alcaline Alp1 [364]. Ces protéases dégradent également le collagène, l'élastine et le fibrinogène (pour revue [365]). Cependant, en raison du manque d'inhibiteurs spécifiques, nous n'avons pas pu identifier précisément quelle (s) protéase (s) à sérine sécrétée (s) par *Aspergillus fumigatus* est (ou sont) impliquée (s) dans la dégradation de PTX3. En revanche, nous avons observé que *Scedosporium apiospermum*, un autre champignon colonisant les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose [233], produit des protéases capables de dégrader PTX3. *Scedosporium apiospermun* produit une protéase à sérine de la famille des subtilisines ayant des propriétés semblables à celle identifiée chez *Aspergillus fumigatus* [366].

D'autres micro-organismes, présents dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, sont également capables de sécréter des protéases qui vont altérer les défenses de l'hôte. A titre d'exemple, *Pseudomonas aeruginosa* sécrète une métalloprotéase, la pseudolysine, et la protéase à sérine IV. La pseudolysine, en dégradant les mucines, favorise la colonisation bactérienne [367]. La pseudolysine et la protéase IV dégradent les protéines du surfactant SP-A et SP-D [347, 368] et les protéines du complément (C1q et C3) [369], altérant ainsi les défenses immunitaires innées de l'hôte. Les données de la littérature et nos résultats sur la sensibilité de PTX3 aux protéases à sérine, suggèrent que les protéases de *Pseudomonas aeruginosa*, et en particulier la protéase IV, doivent être capables de dégrader PTX3. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence la dégradation de PTX3 par les protéases sécrétées par *Pseudomonas aeruginosa*. Nous avons testé différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi qu'un isolat clinique dans différents milieux de culture dont certains décrits pour favoriser la sécrétion des protéases. Dans les différentes conditions expérimentales, la protéine SP-D, utilisée comme contrôle [368], n'a jamais été dégradée. Commercialement, seule la pseudolysine est disponible. Dans mes expériences, la pseudolysine commerciale n'a dégradé ni PTX3 ni SP-D.

L'excessive activité des protéases à sérine du neutrophile altère les médiateurs immuns, tels que PTX3, participant à la défense de l'hôte. Nos travaux ont également permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'échappement des pathogènes par la dégradation de PTX3 par les protéases sécrétées par *Aspergillus fumigatus*, permettant une colonisation persistante des micro-organismes.

Dégradation du domaine N-terminal de PTX3 par les protéases

De manière intéresssante, nos résultats montrent que la dégradation de PTX3 par les protéases s'oppère de manière préférentielle au niveau du domaine N-terminal, alors que le

domaine C-terminal reste intact ou est dégradé plus tardivement. PTX3 diffère des pentraxines courtes CRP et SAP par la présence de ce domaine N-terminal. Nos résultats montrent que les expectorations de patients atteints de mucoviscidose et de BPCO contiennent ces pentraxines courtes qui ne semblent pas dégradées. De précédentes études avaient également montré la présence de CRP dans les expectorations de patients souffrant de bronchites (aigües ou chroniques) ou de pneumonies [370], et de SAP dans les LBA de patients souffrant de pneumonie [371]. Dans nos conditions, SAP et CRP ne sont dégradées ni par les protéases à sérine du neutrophile, ni par les protéases sécrétées par *Aspergillus fumigatus*. Deux précédentes études ont montré que CRP et SAP sont dégradées, respectivement, par l'élastase et la cathepsine G [188, 372], données qui sont contraires à nos résultats. En effet, dans nos conditions expérimentales (2 h d'incubation à 37 °C), seule PTX3 est dégradée mais pas CRP et SAP. En revanche, nous pouvons imaginer qu'une incubation plus longue des pentraxines courtes avec les protéases induirait une dégradation [188]. Toutefois, nos données soulignent que PTX3 est beaucoup plus sensible que les pentraxines courtes à la dégradation par les protéases présentes dans l'environnement infectieux chez les patients atteints de mucoviscidose.

Implication de PTX3 dans l'inflammation et l'infection

PTX3 joue un rôle important dans la résistance contre divers micro-organismes (bactéries, champignons, virus) [177-181], notamment par sa capacité à faciliter leur phagocytose mais aussi en influençant l'initiation et la polarisation des réponses immunitaires adaptatives. En effet, la sensibilité des souris $PTX3^{-/-}$ est en partie due à l'incapacité à générer une réponse protectrice Th1 [177]. Plus récemment, il a été montré que PTX3 régule l'inflammation en contrôlant le recrutement des neutrophiles [373]. Les auteurs ont montré que la molécule PTX3 endogène, sécrétée par les cellules hématopoïétiques, empêche un recrutement excessif des neutrophiles médié par les P-sélectines [373]. Ces études suggèrent qu'un défaut (fonctionnel ou quantitatif) de PTX3, comme observé chez les patients atteints de mucoviscidose, peut avoir d'importantes conséquences sur les réponses immunitaires locales, non seulement lors de la réponse antimicrobienne, mais aussi dans l'initiation des réponses immunitaires protectrices.

Dans une première étude, il a été montré que les souris infectées par *Pseudomonas aeruginosa* et traitées par de la PTX3 exogène présentent une colonisation réduite des voies respiratoires, une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires CXCL1, CXCL2, CCL2 et IL-1β, une activité réduite de la MPO et une diminution du nombre de

leucocytes dans les LBA, comparativement aux souris non traitées [185]. Les auteurs ont également observé que cette résistance de PTX3 à *Pseudomonas aeruginosa* est dépendante du complément, en particulier C3, indépendante de C1q, et que la reconnaissance et la phagocytose des micro-organismes est facilitée par l'interaction entre le complément et les récepteurs FcγRs [185]. Cette étude suggère que PTX3 a un effet thérapeutique potentiel sur les infections chroniques à *Pseudomonas aeruginosa*. Une deuxième étude a analysé le rôle thérapeutique de PTX3 dans des souris $CFTR^{-/-}$ infectées par *Pseudomonas aeruginosa* [374]. Ces souris ne présentent pas de différences significatives en ce qui concerne l'activité de la MPO dans les LBA mais présentent un nombre plus important de neutrophiles dans les LBA et une plus forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, CCL2, CXCL1 et CXCL2), comparativement aux souris contrôles [374]. Après traitement par la PTX3, les auteurs observent une diminition du nombre de CFU dans les poumons, une diminution du nombre de neutrophiles dans les LBA ainsi qu'une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires dans ces souris, comparativement aux souris contrôles [374]. In vitro, les neutrophiles de souris $CFTR^{-/-}$ présentent des propriétés phagocytiques semblables aux neutrophiles de souris sauvages. En revanche, la pré-opsonisation de *Pseudomonas aeruginosa* avec de la PTX3 recombinante augmente de manière significative leur internalisation et leur élimination par les neutrophiles de souris $CFTR^{-/-}$, expliquant la charge bactérienne réduite dans les poumons de souris $CFTR^{-/-}$, comparativement aux souris sauvages [374].

PTX3 semble donc représenter une nouvelle voie thérapeutique pour les infections associées à la mucoviscidose. D'après nos résultats, PTX3 est dégradée notamment par l'élastase du neutrophile, ce qui suggère que, lorsqu'un patient atteint de mucoviscidose sera traité avec de la PTX3 exogène, elle sera elle aussi dégradée. Or, dans l'étude de Paroni *et al*, le traitement des souris $CFTR^{-/-}$ par de la PTX3 les protège effectivement des infections. Cependant, nous ne savons pas si les souris $CFTR^{-/-}$ présentent une activité de l'élastase semblable à celle retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, la concentration et l'activité de l'élastase n'a pas été analysée dans cette étude.

La question que nous nous posons est de savoir quel modèle animal de mucoviscidose nous pouvons utiliser pour étudier l'effet thérapeutique de PTX3. Ce modèle doit ressembler de près aux patients atteints de mucoviscidose, notamment concernant les protéases présentes au niveau des voies respiratoires.

Perspectives

Différentes perspectives à notre étude peuvent être envisagées. Tout d'abord, il est important de déterminer précisément le ou les sites de clivage de PTX3 par les protéases à sérine. Le domaine N-terminal de PTX3 est dégradé par l'élastase et par les protéases d'*Aspergillus fumigatus*, suggérant que la perte du domaine N-terminal de PTX3 peut conduire à une altération fonctionnelle, illustrée entre autre par une incapacité de PTX3 à éliminer *Aspergillus fumigatus*. Pour vérifier cela, il faudra purifier par immuno-affinité le fragment généré après dégradation de la PTX3 recombinante par les protéases, et évaluer par ELISA sa capacité de fixation aux pathogènes (tels que les conidies *d'Aspergillus fumigatus*). Si le fragment purifié est toujours capable de se fixer aux pathogènes, il serait alors intéressant d'évaluer les conséquences de cette fixation sur leur phagocytose par les macrophages. Pour déterminer le site de clivage, il est possible, à partir du fragment généré par les protéases, de déterminer la séquence N-terminal du fragment purifié par la dégradation d'Edman.

Il est également important d'évaluer le bénéfice potentiel de PTX3 sur la protection vis-à-vis des pathogènes dans des modèles animaux de mucoviscidose. Comme cité précédemment, l'équipe de Paroni *et al* a montré le bénéfice thérapeutique de la PTX3 exogène dans un modèle de souris $CFTR^{-/-}$ [374]. En revanche, nous n'avons aucune donnée concernant la présence et/ou l'activité de protéases dans cette étude, ni le statut de la PTX3 endogène au niveau pulmonaire de ces souris. Il est à noter que, en plus des souris $CFTR^{-/-}$, les souris sur-exprimant la sous unité *Scnn1b* du canal sodique épithélial (souris transgénique βENaC), constituent un autre modèle d'étude de mucoviscidose avec des signes cliniques pulmonaires se rapprochant de ceux observés chez les patients atteints de mucoviscidose (Tableau 11). Le modèle porcin $CFTR^{-/-}$ semble également intéressant. Contrairement aux souris $CFTR^{-/-}$, les porcs $CFTR^{-/-}$ développent spontanément les symptômes caractéristiques des atteintes pulmonaires associées à la mucoviscidose, tels que l'inflammation des voies respiratoires, le remodelage tissulaire, l'accumulation de mucus et les infections bactériennes [375]. Récemment, une étude a comparé les protéases à sérine du neutrophile porcin et humain [376]. La stimulation de ces neutrophiles par le calcium ionophore A23187 induit la libération des protéases à sérine du neutrophile (NSPs), de manière similaire aux neutrophiles humains [376]. De plus, les inhibiteurs physiologiques (α1-Pi ou « α1-proteinase inhibitor » et ACT ou « α1-antichymotrypsin ») des NSPs humaines inhibent également les NSPs porcines [376]. Les auteurs ont également montré qu'en réponse à *Staphylococcus aureus* ou

Pseudomonas aeruginosa, les neutrophiles porcins sécrètent des NETs comme les neutrophiles humains et que les NSPs se retrouvent associées à ces NETs [376]. Les NSPs humaines et porcines sont semblables, les inhibiteurs des NSPs humaines fonctionnent sur les NSPs porcines, il serait donc intéressant d'analyser ces NSPs chez le porc $CFTR^{-/-}$ (concentration, activité dans les LBA) pour ensuite étudier le statut de PTX3 au niveau pumonaire et voir si nous retrouvons les mêmes observations que nous avons faites chez les patients atteints de mucoviscidose. Mais, à ce jour, nous ne disposons pas de sondes pour analyser PTX3. Nous savons juste que, récemment, une séquence partielle de l'ARNm PTX3 chez le porc a été décrite (« *Sus scrofa* pentraxin-3-like (PTX3) mRNA partial sequence » numéro d'accession GQ412351) et présente 84 % d'identité avec la séquence humaine [377].

	Patients atteints de mucoviscidose	**Souris mutantes pour le gène cftr**	**Souris transgéniques βENaC**
Défaut génétique	Mutations du gène cftr	Invalidation génique de cftr (CFTR KO)	Sur-expression βENaC
Transport ionique	Augmentation de l'absorption de Na^+ médiée par le canal ENaC Défaut de sécrétion de Cl^- dépendante de l'AMPc	Absorption normale de Na^+ médiée par le canal ENaC Sécrétion normale de Cl^- dépendante de l'AMPc	Augmentation de l'absorption de Na^+ médiée par le canal ENaC Sécrétion normale de Cl^- dépendante de l'AMPc
Homéostasie de l'ASL	Augmentation de la concentration du mucus Volume réduit du PCL (in vitro)	Non déterminé	Augmentation de la concentration du mucus Volume réduit du PCL (in vivo)
Elimination mucociliaire	Réduite	Normale	Réduite
Obstruction des voies respiratoires par le mucus	Obstruction par le mucus Métaplasie des cellules caliciformes	Absente	Obstruction par le mucus Métaplasie des cellules caliciformes
Inflammation des voies respiratoires	Neutrophilie chronique	Absente	Neutrophilie chronique Eosinophilie transitoire
Infection des voies respiratoires	Infections bactériennes chroniques	Pas d'infections spontanées	Pas d'infections spontanées
Mortalité dues aux maladies	>90 % de mortalité due aux maladies pulmonaires	Pas de mortalité due aux maladies pulmonaires Taux de mortalité variable suite aux maladies gastro-intestinales	~50 % de mortalité due aux maladies pulmonaires

Tableau 11. Phénotypes pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose, des souris déficientes en CFTR et des souris transgéniques ENaC. Abbréviation : PCL, liquide périciliaire. D'après Zhou et al, 2011 [277].

Tout d'abord, il faudrait comparer l'expression et le statut de la molécule PTX3 endogène au niveau pulmonaire (e.g. lavages bronchoalvéolaires) et périphérique de ces trois modèles infectés (e.g. *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa*) ou non, comparativement à leurs modèles sauvages respectifs. En parallèle, il est nécessaire d'analyser la concentration et

l'activité des protéases au niveau pulmonaire de ces trois modèles animaux pour voir quel modèle se rapproche le plus de ce que nous avons observé chez les patients atteints de mucoviscidose. Une fois le modèle sélectionné, il faudra évaluer le rôle protecteur de la PTX3 exogène vis-à-vis des infections à *Aspergillus fumigatus* ou *Pseudomonas aeruginosa*.

Sur la base des données de la littérature, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'administration de PTX3 aura probablement un rôle protecteur vis-à-vis des infections chez les patients atteints de mucoviscidose. Cependant, les doses administrées devront certainement être élevées afin de pallier la dégradation de PTX3 par les protéases, et seront donc, probablement, incompatibles avec des doses thérapeutiques chez l'homme. De plus, le défaut fonctionnel étant local, le rôle protecteur de la molécule PTX3 exogène sera optimal par administration dans le poumon. Il reste donc à définir des stratégies thérapeutiques basées sur l'administration locale de PTX3. Trois axes de recherche peuvent être envisagés :

- Générer une forme recombinante de PTX3 non sensible à la protéolyse par les pathogènes. PTX3 présente une structure globulaire, suggérant que la dégradation de PTX3 pourrait être initiée par une première attaque dans la zone de jonction entre les domaines N-terminal et C-terminal, cette première étape rendant accessible d'autres sites de protéolyse dans le domaine N-terminal et donc sa protéolyse complète. Afin d'évaluer cette hypothèse, l'identification du site de clivage par séquençage de l'extrémité N-terminal du fragment C-terminal purifié après clivage sera nécessaire. Ce site pourra ensuite être éliminé par mutagénèse dirigée pour rendre PTX3 insensible à la protéolyse.

- Injecter localement la molécule recombinante PTX3 associée à des nanoparticules. L'association de PTX3 à des nanoparticules permettra de la protéger de la protéolyse, d'induire une libération progressive et prolongée et d'atteindre une concentration locale efficace. Les nanoparticules pourraient également contenir des inhibiteurs de protéases.

- Identifier des inhibiteurs de protéases à sérine inhibant le plus sélectivement possible la dégradation de PTX3. Mais à ce jour, les essais cliniques utilisant des inhibiteurs de protéases n'obtiennent pas de résultats concluants.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence une déficience locale de PTX3 chez les patients atteints de mucoviscidose, expliquant, en partie, les infections pulmonaires récurrentes chez ces patients. Les résultats mettent en évidence de nouveaux mécanismes d'altération des défenses immunitaires chez ces patients. De plus, la dégradation de PTX3 par les protéases sécrétées par *Aspergillus fumigatus* révéle un nouveau mécanisme d'échappement du pathogène aux défenses de l'hôte.

Nous pouvons imaginer que le traitement des patients atteints de mucoviscidose avec PTX3 aura des effets bénéfiques sur (i) la réduction de la charge microbienne au niveau des voies respiratoires en favorisant leur élimination, (ii) la réduction de l'inflammation en empêchant un recrutement excessif de neutrophiles au niveau des voies respiratoires, ce qui aurait pour conséquence une diminution de la concentration locale des protéases à sérine du neutrophile, et (iii) sur la génération de réponses immunitaires protectrices locales contre certains pathogènes.

PTX3 représente donc une nouvelle cible thérapeutique pour de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes dirigées contre les infections associées à la mucoviscidose.

Bibliographie

1. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity.* N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
2. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
3. Proud, D. and R. Leigh, *Epithelial cells and airway diseases.* Immunol Rev. **242**(1): p. 186-204.
4. Bandyopadhaya, A., M. Sarkar, and K. Chaudhuri, *Transcriptional upregulation of inflammatory cytokines in human intestinal epithelial cells following Vibrio cholerae infection.* Febs J, 2007. **274**(17): p. 4631-42.
5. Maldonado-Contreras, A.L. and B.A. McCormick, *Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity.* Cell Tissue Res. **343**(1): p. 5-12.
6. Vareille, M., et al., *The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses.* Clin Microbiol Rev. **24**(1): p. 210-29.
7. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells.* Science. **331**(6013): p. 44-9.
8. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells.* Blood, 1990. **76**(12): p. 2421-38.
9. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity.* Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 501-10.
10. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets.* Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
11. Raulet, D.H. and R.E. Vance, *Self-tolerance of natural killer cells.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 520-31.
12. Balato, A., D. Unutmaz, and A.A. Gaspari, *Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions.* J Invest Dermatol, 2009. **129**(7): p. 1628-42.
13. Beetz, S., et al., *Innate immune functions of human gammadelta T cells.* Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 173-82.
14. Tacke, F. and G.J. Randolph, *Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets.* Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 609-18.
15. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.* Blood. **116**(16): p. e74-80.
16. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 669-92.
17. Grage-Griebenow, E., et al., *Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes.* Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 48-56.
18. Cros, J., et al., *Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors.* Immunity. **33**(3): p. 375-86.
19. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells.* Science. **327**(5966): p. 656-61.
20. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections.* J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3733-9.
21. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm.* Nat Immunol. **11**(10): p. 889-96.
22. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.* Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
23. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.* J Clin Invest. **122**(3): p. 787-95.

24. Duluc, D., et al., *Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells.* Blood, 2007. **110**(13): p. 4319-30.
25. Ueno, H., et al., *Dendritic cell subsets in health and disease.* Immunol Rev, 2007. **219**: p. 118-42.
26. Ueno, H., et al., *Harnessing human dendritic cell subsets for medicine.* Immunol Rev. **234**(1): p. 199-212.
27. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
28. Bevan, M.J., *Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay.* J Exp Med, 1976. **143**(5): p. 1283-8.
29. Hubbell, J.A., S.N. Thomas, and M.A. Swartz, *Materials engineering for immunomodulation.* Nature, 2009. **462**(7272): p. 449-60.
30. Underhill, D.M. and H.S. Goodridge, *Information processing during phagocytosis.* Nat Rev Immunol. **12**(7): p. 492-502.
31. Gri, G., et al., *Mast cell: an emerging partner in immune interaction.* Front Immunol. **3**: p. 120.
32. Hepworth, M.R., et al., *Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines.* Proc Natl Acad Sci U S A. **109**(17): p. 6644-9.
33. Gekara, N.O. and S. Weiss, *Mast cells initiate early anti-Listeria host defences.* Cell Microbiol, 2008. **10**(1): p. 225-36.
34. Lin, T.J., et al., *Pseudomonas aeruginosa activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4522-30.
35. Sutherland, R.E., et al., *Mast cell IL-6 improves survival from Klebsiella pneumonia and sepsis by enhancing neutrophil killing.* J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5598-605.
36. von Kockritz-Blickwede, M., et al., *Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation.* Blood, 2008. **111**(6): p. 3070-80.
37. Abraham, S.N. and A.L. St John, *Mast cell-orchestrated immunity to pathogens.* Nat Rev Immunol. **10**(6): p. 440-52.
38. Siracusa, M.C., M.R. Comeau, and D. Artis, *New insights into basophil biology: initiators, regulators, and effectors of type 2 inflammation.* Ann N Y Acad Sci. **1217**: p. 166-77.
39. Bieneman, A.P., et al., *Toll-like receptor 2 ligands activate human basophils for both IgE-dependent and IgE-independent secretion.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(2): p. 295-301.
40. Perrigoue, J.G., et al., *MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity.* Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 697-705.
41. Sokol, C.L., et al., *Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response.* Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 713-20.
42. Yoshimoto, T., et al., *Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells.* Nat Immunol, 2009. **10**(7): p. 706-12.
43. Kita, H., *Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease.* Immunol Rev. **242**(1): p. 161-77.
44. Yousefi, S., et al., *Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense.* Nat Med, 2008. **14**(9): p. 949-53.
45. Shamri, R., J.J. Xenakis, and L.A. Spencer, *Eosinophils in innate immunity: an evolving story.* Cell Tissue Res. **343**(1): p. 57-83.
46. Borregaard, N., O.E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins.* Trends Immunol, 2007. **28**(8): p. 340-5.
47. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.* Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.

48. Malle, E., et al., *Myeloperoxidase: a target for new drug development?* Br J Pharmacol, 2007. **152**(6): p. 838-54.
49. Quinn, K., et al., *Human neutrophil peptides: a novel potential mediator of inflammatory cardiovascular diseases.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(5): p. H1817-24.
50. Cederlund, A., B. Agerberth, and P. Bergman, *Specificity in killing pathogens is mediated by distinct repertoires of human neutrophil peptides.* J Innate Immun. **2**(6): p. 508-21.
51. Salvatore, M., et al., *alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s).* J Infect Dis, 2007. **196**(6): p. 835-43.
52. Lehrer, R.I., et al., *Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity.* J Clin Invest, 1989. **84**(2): p. 553-61.
53. Wimley, W.C., M.E. Selsted, and S.H. White, *Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores.* Protein Sci, 1994. **3**(9): p. 1362-73.
54. Elsbach, P. and J. Weiss, *Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence.* Curr Opin Immunol, 1998. **10**(1): p. 45-9.
55. Pham, C.T., *Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 541-50.
56. Korkmaz, B., T. Moreau, and F. Gauthier, *Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions.* Biochimie, 2008. **90**(2): p. 227-42.
57. Singh, P.K., et al., *A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development.* Nature, 2002. **417**(6888): p. 552-5.
58. Zarember, K.A., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes inhibit Aspergillus fumigatus conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion.* J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6367-73.
59. Orsi, N., *The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives.* Biometals, 2004. **17**(3): p. 189-96.
60. Haney, E.F., et al., *Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin.* Biochimie, 2009. **91**(1): p. 141-54.
61. Sorensen, O.E., et al., *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3.* Blood, 2001. **97**(12): p. 3951-9.
62. Tsai, P.W., et al., *Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of Candida albicans by interacting with yeast cell-wall carbohydrates.* PLoS One. **6**(3): p. e17755.
63. Overhage, J., et al., *Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation.* Infect Immun, 2008. **76**(9): p. 4176-82.
64. Mendez-Samperio, P., *The human cathelicidin hCAP18/LL-37: a multifunctional peptide involved in mycobacterial infections.* Peptides. **31**(9): p. 1791-8.
65. Goetz, D.H., et al., *The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition.* Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1033-43.
66. Holmes, M.A., et al., *Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration.* Structure, 2005. **13**(1): p. 29-41.
67. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 989-95.
68. Lollike, K., et al., *Lysozyme in human neutrophils and plasma. A parameter of myelopoietic activity.* Leukemia, 1995. **9**(1): p. 159-64.
69. Parker, D. and A. Prince, *Innate immunity in the respiratory epithelium.* Am J Respir Cell Mol Biol. **45**(2): p. 189-201.
70. Selsted, M.E. and R.J. Martinez, *Lysozyme: primary bactericidin in human plasma serum active against Bacillus subtilis.* Infect Immun, 1978. **20**(3): p. 782-91.
71. Woods, C.M., et al., *Human lysozyme has fungicidal activity against nasal fungi.* Am J Rhinol Allergy. **25**(4): p. 236-40.

72. Jabado, N., et al., *Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane.* J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1237-48.
73. Sengelov, H., et al., *Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils.* J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1467-76.
74. Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard, *Control of exocytosis in early neutrophil activation.* J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1535-43.
75. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
76. Kobayashi, S.D. and F.R. DeLeo, *Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach.* Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2009. **1**(3): p. 309-33.
77. Greenberg, S. and S. Grinstein, *Phagocytosis and innate immunity.* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 136-45.
78. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.* Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
79. Babior, B.M., *NADPH oxidase.* Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 42-7.
80. Winterbourn, C.C., *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species.* Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 278-86.
81. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
82. Cho, J.H., et al., *Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity.* Blood, 2005. **106**(7): p. 2551-8.
83. Jaillon, S., et al., *The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps.* J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 793-804.
84. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms.* Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 668-76.
85. Yost, C.C., et al., *Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates.* Blood, 2009. **113**(25): p. 6419-27.
86. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.* J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
87. Yousefi, S., et al., *Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps.* Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1438-44.
88. Pilsczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus.* J Immunol. **185**(12): p. 7413-25.
89. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation.* Nat Med. **17**(11): p. 1381-90.
90. Menegazzi, R., E. Decleva, and P. Dri, *Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore?* Blood. **119**(5): p. 1214-6.
91. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response.* Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
92. Savill, J., et al., *A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 965-75.
93. Murphy, J.E., et al., *Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors.* Atherosclerosis, 2005. **182**(1): p. 1-15.
94. Pluddemann, A., C. Neyen, and S. Gordon, *Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands.* Methods, 2007. **43**(3): p. 207-17.
95. Dunne, D.W., et al., *The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1863-7.
96. Peiser, L., et al., *The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for Neisseria meningitidis which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses.* Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5346-54.

97. Peiser, L., et al., *Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro.* Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 1953-63.
98. Wang, R. and R.Y. Chandawarkar, *Phagocytosis of fungal agents and yeast via macrophage cell surface scavenger receptors.* J Surg Res. **164**(2): p. e273-9.
99. Berwin, B., et al., *Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells.* Embo J, 2003. **22**(22): p. 6127-36.
100. Facciponte, J.G., X.Y. Wang, and J.R. Subjeck, *Hsp110 and Grp170, members of the Hsp70 superfamily, bind to scavenger receptor-A and scavenger receptor expressed by endothelial cells-I.* Eur J Immunol, 2007. **37**(8): p. 2268-79.
101. Santiago-Garcia, J., T. Kodama, and R.E. Pitas, *The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix.* J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 6942-6.
102. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection.* Nature, 1997. **386**(6622): p. 292-6.
103. Thomas, C.A., et al., *Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis.* J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 147-56.
104. Arredouani, M.S., et al., *The macrophage scavenger receptor SR-AI/II and lung defense against pneumococci and particles.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(4): p. 474-8.
105. Pluddemann, A., et al., *The macrophage scavenger receptor A is host-protective in experimental meningococcal septicaemia.* PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000297.
106. Areschoug, T. and S. Gordon, *Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis.* Cell Microbiol, 2009. **11**(8): p. 1160-9.
107. Jozefowski, S., et al., *Scavenger receptors and beta-glucan receptors participate in the recognition of yeasts by murine macrophages.* Inflamm Res. **61**(2): p. 113-26.
108. Arredouani, M., et al., *The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles.* J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 267-72.
109. Sawamura, T., et al., *An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein.* Nature, 1997. **386**(6620): p. 73-7.
110. Draude, G., N. Hrboticky, and R.L. Lorenz, *The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin.* Biochem Pharmacol, 1999. **57**(4): p. 383-6.
111. Moriwaki, H., et al., *Expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in human and murine macrophages: upregulated expression by TNF-alpha.* FEBS Lett, 1998. **440**(1-2): p. 29-32.
112. Chen, M., et al., *Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **282**(1): p. 153-8.
113. Delneste, Y., et al., *Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation.* Immunity, 2002. **17**(3): p. 353-62.
114. Kakutani, M., T. Masaki, and T. Sawamura, *A platelet-endothelium interaction mediated by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 360-4.
115. Hayashida, K., et al., *Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) supports adhesion of mononuclear leukocytes and a monocyte-like cell line THP-1 cells under static and flow conditions.* FEBS Lett, 2002. **511**(1-3): p. 133-8.
116. Shimaoka, T., et al., *Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) supports cell adhesion to fibronectin.* FEBS Lett, 2001. **504**(1-2): p. 65-8.
117. Murphy, J.E., et al., *LOX-1 scavenger receptor mediates calcium-dependent recognition of phosphatidylserine and apoptotic cells.* Biochem J, 2006. **393**(Pt 1): p. 107-15.
118. Oka, K., et al., *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9535-40.

119. Shimaoka, T., et al., *LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria.* J Immunol, 2001. **166**(8): p. 5108-14.
120. Beauvillain, C., et al., *The scavenger receptors SRA-1 and SREC-I cooperate with TLR2 in the recognition of the hepatitis C virus non-structural protein 3 by dendritic cells.* J Hepatol. **52**(5): p. 644-51.
121. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *C-type lectins and phagocytosis.* Immunobiology, 2009. **214**(7): p. 562-75.
122. Robinson, M.J., et al., *Myeloid C-type lectins in innate immunity.* Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1258-65.
123. Saijo, S. and Y. Iwakura, *Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi.* Int Immunol. **23**(8): p. 467-72.
124. Sato, K., et al., *Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses.* J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38854-66.
125. Svajger, U., et al., *C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity.* Cell Signal. **22**(10): p. 1397-405.
126. Kato, M., et al., *Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes.* Int Immunol, 2006. **18**(6): p. 857-69.
127. Bonifaz, L., et al., *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance.* J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1627-38.
128. Bonifaz, L.C., et al., *In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination.* J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 815-24.
129. Gurer, C., et al., *Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses.* Blood, 2008. **112**(4): p. 1231-9.
130. Kato, M., et al., *The novel endocytic and phagocytic C-Type lectin receptor DCL-1/CD302 on macrophages is colocalized with F-actin, suggesting a role in cell adhesion and migration.* J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6052-63.
131. Pifer, R., et al., *UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to Toxoplasma gondii.* J Biol Chem. **286**(5): p. 3307-14.
132. Blasius, A.L. and B. Beutler, *Intracellular toll-like receptors.* Immunity. **32**(3): p. 305-15.
133. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol. **11**(5): p. 373-84.
134. Delneste, Y., C. Beauvillain, and P. Jeannin, *[Innate immunity: structure and function of TLRs].* Med Sci (Paris), 2007. **23**(1): p. 67-73.
135. Takagi, M., *Toll-like receptor--a potent driving force behind rheumatoid arthritis.* J Clin Exp Hematop. **51**(2): p. 77-92.
136. Elinav, E., et al., *Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins.* Immunity. **34**(5): p. 665-79.
137. Viala, J., et al., *Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island.* Nat Immunol, 2004. **5**(11): p. 1166-74.
138. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response.* Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
139. Loo, Y.M. and M. Gale, Jr., *Immune signaling by RIG-I-like receptors.* Immunity. **34**(5): p. 680-92.
140. Endo, Y., M. Matsushita, and T. Fujita, *The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity.* Int J Biochem Cell Biol. **43**(5): p. 705-12.
141. Matsushita, M., *Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity.* J Innate Immun. **2**(1): p. 24-32.
142. Ono, K., et al., *Mannose-binding lectin augments the uptake of lipid A, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli by Kupffer cells through increased cell surface expression of scavenger receptor A.* J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5517-23.

143. LeVine, A.M. and J.A. Whitsett, *Pulmonary collectins and innate host defense of the lung.* Microbes Infect, 2001. **3**(2): p. 161-6.
144. Brummer, E. and D.A. Stevens, *Collectins and fungal pathogens: roles of surfactant proteins and mannose binding lectin in host resistance.* Med Mycol. **48**(1): p. 16-28.
145. Gupta, G. and A. Surolia, *Collectins: sentinels of innate immunity.* Bioessays, 2007. **29**(5): p. 452-64.
146. Garlanda, C., et al., *Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 337-66.
147. Bottazzi, B., et al., *An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm.* Annu Rev Immunol. **28**: p. 157-83.
148. Hutchinson, W.L., E. Hohenester, and M.B. Pepys, *Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum.* Mol Med, 2000. **6**(6): p. 482-93.
149. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update.* J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
150. Zhang, D., et al., *The effect of interleukin-1 on C-reactive protein expression in Hep3B cells is exerted at the transcriptional level.* Biochem J, 1995. **310 (Pt 1)**: p. 143-8.
151. Szalai, A.J., *The antimicrobial activity of C-reactive protein.* Microbes Infect, 2002. **4**(2): p. 201-5.
152. Szalai, A.J., et al., *Human C-reactive protein is protective against fatal Salmonella enterica serovar typhimurium infection in transgenic mice.* Infect Immun, 2000. **68**(10): p. 5652-6.
153. Noursadeghi, M., et al., *Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14584-9.
154. Yuste, J., et al., *Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to Streptococcus pneumoniae.* PLoS Pathog, 2007. **3**(9): p. 1208-19.
155. de Haas, C.J., et al., *Serum amyloid P component bound to gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation.* Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 1753-9.
156. Gillmore, J.D., et al., *Autoimmunity and glomerulonephritis in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene: SAP deficiency or strain combination?* Immunology, 2004. **112**(2): p. 255-64.
157. Roumenina, L.T., et al., *Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains.* Biochemistry, 2006. **45**(13): p. 4093-104.
158. Nauta, A.J., et al., *Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins.* Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 148-54.
159. Mold, C., R. Baca, and T.W. Du Clos, *Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fcgamma receptors.* J Autoimmun, 2002. **19**(3): p. 147-54.
160. Bickerstaff, M.C., et al., *Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity.* Nat Med, 1999. **5**(6): p. 694-7.
161. Lu, J., et al., *Structural recognition and functional activation of FcgammaR by innate pentraxins.* Nature, 2008. **456**(7224): p. 989-92.
162. Martinez de la Torre, Y., et al., *Evolution of the pentraxin family: the new entry PTX4.* J Immunol. **184**(9): p. 5055-64.
163. Osera, C., et al., *Pentraxins and Alzheimer's disease: at the interface between biomarkers and pharmacological targets.* Ageing Res Rev. **11**(2): p. 189-98.
164. Zhang, L., et al., *The neuronal pentraxin II gene (NPTX2) inhibit proliferation and invasion of pancreatic cancer cells in vitro.* Mol Biol Rep. **38**(8): p. 4903-11.
165. Bottazzi, B., et al., *Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component.* J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32817-23.

166. Breviario, F., et al., *Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component.* J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22190-7.
167. Alles, V.V., et al., *Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes.* Blood, 1994. **84**(10): p. 3483-93.
168. Vouret-Craviari, V., et al., *Expression of monocyte chemotactic protein-3 in human monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan.* Cytokine, 1997. **9**(12): p. 992-8.
169. Doni, A., et al., *Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells.* Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2886-93.
170. Goodman, A.R., et al., *Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(3): p. 387-95.
171. Klouche, M., et al., *Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells.* Atherosclerosis, 2004. **175**(2): p. 221-8.
172. Nauta, A.J., et al., *Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3.* Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 543-53.
173. Luchetti, M.M., et al., *Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA).* Clin Exp Immunol, 2000. **119**(1): p. 196-202.
174. Abderrahim-Ferkoune, A., et al., *Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells.* J Lipid Res, 2003. **44**(5): p. 994-1000.
175. Han, B., et al., *TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK.* J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8303-11.
176. Doni, A., et al., *Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 797-802.
177. Garlanda, C., et al., *Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response.* Nature, 2002. **420**(6912): p. 182-6.
178. Jeannin, P., et al., *Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors.* Immunity, 2005. **22**(5): p. 551-60.
179. Diniz, S.N., et al., *PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(4): p. 649-56.
180. Bozza, S., et al., *Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation.* Blood, 2006. **108**(10): p. 3387-96.
181. Reading, P.C., et al., *Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses.* J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3391-8.
182. Ma, Y.J., et al., *Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system.* J Biol Chem. **286**(5): p. 3405-17.
183. Moalli, F., et al., *Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3.* J Biomed Biotechnol. **2011**: p. 830421.
184. Moalli, F., et al., *Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against Aspergillus fumigatus.* Blood. **116**(24): p. 5170-80.
185. Moalli, F., et al., *The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by Pseudomonas aeruginosa.* J Immunol. **186**(9): p. 5425-34.
186. Deban, L., et al., *Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3.* Cell Tissue Res. **343**(1): p. 237-49.
187. Braunschweig, A. and M. Jozsi, *Human pentraxin 3 binds to the complement regulator c4b-binding protein.* PLoS One. **6**(8): p. e23991.
188. Farberman, M.M., et al., *Airway proteins involved in bacterial clearance susceptible to cathepsin G proteolysis.* Eur Respir J. **35**(2): p. 410-7.
189. Cotena, A., et al., *Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3.* J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6311-7.

190. Job, E.R., et al., *Pandemic H1N1 influenza A viruses are resistant to the antiviral activities of innate immune proteins of the collectin and pentraxin superfamilies.* J Immunol. **185**(7): p. 4284-91.
191. Azzurri, A., et al., *IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection.* Microbes Infect, 2005. **7**(1): p. 1-8.
192. Mairuhu, A.T., et al., *Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections.* J Med Virol, 2005. **76**(4): p. 547-52.
193. Mauri, T., et al., *Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality.* Intensive Care Med. **36**(4): p. 621-9.
194. Sprong, T., et al., *Pentraxin 3 and C-reactive protein in severe meningococcal disease.* Shock, 2009. **31**(1): p. 28-32.
195. Nauta, A.J., et al., *Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q.* Eur J Immunol, 2003. **33**(2): p. 465-73.
196. Deban, L., et al., *Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation.* J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8433-40.
197. Gout, E., et al., *M-ficolin interacts with the long pentraxin PTX3: a novel case of cross-talk between soluble pattern-recognition molecules.* J Immunol. **186**(10): p. 5815-22.
198. Ma, Y.J., et al., *Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition.* J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 28263-75.
199. van Rossum, A.P., et al., *The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(8): p. 2667-74.
200. Baruah, P., et al., *The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells.* J Leukoc Biol, 2006. **80**(1): p. 87-95.
201. Jaillon, S., et al., *Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages.* Cell Death Differ, 2009. **16**(3): p. 465-74.
202. Salustri, A., et al., *PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization.* Development, 2004. **131**(7): p. 1577-86.
203. Scarchilli, L., et al., *PTX3 interacts with inter-alpha-trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion.* J Biol Chem, 2007. **282**(41): p. 30161-70.
204. May, L., et al., *Genetic variation in pentraxin (PTX) 3 gene associates with PTX3 production and fertility in women.* Biol Reprod. **82**(2): p. 299-304.
205. Quinton, P.M., *Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective.* Physiol Rev, 1999. **79**(1 Suppl): p. S3-S22.
206. Quinton, P.M., *Chloride impermeability in cystic fibrosis.* Nature, 1983. **301**(5899): p. 421-2.
207. Knowles, M.R., et al., *Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium.* Science, 1983. **221**(4615): p. 1067-70.
208. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.* Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
209. Gibson, R.L., J.L. Burns, and B.W. Ramsey, *Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(8): p. 918-51.
210. Devor, D.C., et al., *Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells.* J Gen Physiol, 1999. **113**(5): p. 743-60.
211. Linsdell, P. and J.W. Hanrahan, *Glutathione permeability of CFTR.* Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. C323-6.
212. Boucher, R.C., *Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration.* Trends Mol Med, 2007. **13**(6): p. 231-40.

213. Pier, G.B., et al., *Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections.* Science, 1996. **271**(5245): p. 64-7.
214. Schroeder, T.H., et al., *CFTR is a pattern recognition molecule that extracts Pseudomonas aeruginosa LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(10): p. 6907-12.
215. Bajmoczi, M., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and caveolin-1 regulate epithelial cell internalization of Pseudomonas aeruginosa.* Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(2): p. C263-77.
216. Kowalski, M.P., et al., *Host resistance to lung infection mediated by major vault protein in epithelial cells.* Science, 2007. **317**(5834): p. 130-2.
217. Reiniger, N., et al., *Resistance to Pseudomonas aeruginosa chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor.* Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1598-608.
218. Becq, F., et al., *Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside.* J Cyst Fibros. **10 Suppl 2**: p. S129-45.
219. Kerem, E., *Mutation specific therapy in CF.* Paediatr Respir Rev, 2006. **7 Suppl 1**: p. S166-9.
220. Rowe, S.M., S. Miller, and E.J. Sorscher, *Cystic fibrosis.* N Engl J Med, 2005. **352**(19): p. 1992-2001.
221. Haardt, M., et al., *C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation.* J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21873-7.
222. *Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium.* N Engl J Med, 1993. **329**(18): p. 1308-13.
223. Kerem, E., et al., *The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508).* N Engl J Med, 1990. **323**(22): p. 1517-22.
224. Cutting, G.R., *Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis.* Ann N Y Acad Sci. **1214**: p. 57-69.
225. O'Sullivan, B.P. and S.D. Freedman, *Cystic fibrosis.* Lancet, 2009. **373**(9678): p. 1891-904.
226. Ratjen, F. and G. Doring, *Cystic fibrosis.* Lancet, 2003. **361**(9358): p. 681-9.
227. Khan, T.Z., et al., *Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 1995. **151**(4): p. 1075-82.
228. da Silva Filho, L.V., et al., *Identification of Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia complex, and Stenotrophomonas maltophilia in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR.* Pediatr Pulmonol, 2004. **37**(6): p. 537-47.
229. Turner, E., K.G. Brownlee, and M. Denton, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* J Cyst Fibros.
230. Bakare, N., et al., *Prevalence of Aspergillus fumigatus and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis.* Mycoses, 2003. **46**(1-2): p. 19-23.
231. Chotirmall, S.H., et al., *Sputum Candida albicans presages FEV(1) decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis.* Chest. **138**(5): p. 1186-95.
232. Cimon, B., et al., *Clinical significance of Scedosporium apiospermum in patients with cystic fibrosis.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. **19**(1): p. 53-6.
233. Pihet, M., et al., *Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review.* Med Mycol, 2009. **47**(4): p. 387-97.
234. Olivier, K.N., et al., *Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(6): p. 828-34.
235. van Ewijk, B.E., et al., *Viral respiratory infections in cystic fibrosis.* J Cyst Fibros, 2005. **4 Suppl 2**: p. 31-6.
236. Ramphal, R., et al., *Adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation.* Infect Immun, 1980. **27**(2): p. 614-9.
237. Flume, P.A., *Pulmonary complications of cystic fibrosis.* Respir Care, 2009. **54**(5): p. 618-27.

238. van der Doef, H.P., et al., *Intestinal obstruction syndromes in cystic fibrosis: meconium ileus, distal intestinal obstruction syndrome, and constipation.* Curr Gastroenterol Rep. **13**(3): p. 265-70.
239. Herrmann, U., G. Dockter, and F. Lammert, *Cystic fibrosis-associated liver disease.* Best Pract Res Clin Gastroenterol. **24**(5): p. 585-92.
240. Moran, A., et al., *Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality.* Diabetes Care, 2009. **32**(9): p. 1626-31.
241. Moran, A., et al., *Epidemiology, pathophysiology, and prognostic implications of cystic fibrosis-related diabetes: a technical review.* Diabetes Care. **33**(12): p. 2677-83.
242. O'Riordan, S.M., et al., *Management of cystic fibrosis-related diabetes in children and adolescents.* Pediatr Diabetes, 2009. **10 Suppl 12**: p. 43-50.
243. Popli, K. and J. Stewart, *Infertility and its management in men with cystic fibrosis: review of literature and clinical practices in the UK.* Hum Fertil (Camb), 2007. **10**(4): p. 217-21.
244. McMullen, A.H., et al., *Impact of pregnancy on women with cystic fibrosis.* Chest, 2006. **129**(3): p. 706-11.
245. Pisi, G. and A. Chetta, *Airway clearance therapy in cystic fibrosis patients.* Acta Biomed, 2009. **80**(2): p. 102-6.
246. Bellini, C., et al., *Biochemical diagnosis and outcome of 2 years treatment in a patient with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria.* Eur J Pediatr, 1992. **151**(11): p. 818-20.
247. Ratjen, F., et al., *Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha.* Thorax, 2002. **57**(11): p. 930-4.
248. Elkins, M.R., et al., *A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis.* N Engl J Med, 2006. **354**(3): p. 229-40.
249. Furnari, M.L., et al., *Nebulized hypertonic saline containing hyaluronic acid improves tolerability in patients with cystic fibrosis and lung disease compared with nebulized hypertonic saline alone: a prospective, randomized, double-blind, controlled study.* Ther Adv Respir Dis.
250. Aitken, M.L., et al., *Long-term inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an international randomized study.* Am J Respir Crit Care Med. **185**(6): p. 645-52.
251. Bilton, D., et al., *Inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an efficacy and safety study.* Eur Respir J. **38**(5): p. 1071-80.
252. Greally, P., P. Whitaker, and D. Peckham, *Challenges with current inhaled treatments for chronic Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis.* Curr Med Res Opin. **28**(6): p. 1059-67.
253. Konstan, M.W., et al., *Safety, efficacy and convenience of tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: The EAGER trial.* J Cyst Fibros. **10**(1): p. 54-61.
254. Cohen-Cymberknoh, M., D. Shoseyov, and E. Kerem, *Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life.* Am J Respir Crit Care Med. **183**(11): p. 1463-71.
255. Ratjen, F., et al., *Effect of azithromycin on systemic markers of inflammation in cystic fibrosis patients uninfected with Pseudomonas aeruginosa.* Chest.
256. Saiman, L., et al., *Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with Pseudomonas aeruginosa: a randomized controlled trial.* Jama. **303**(17): p. 1707-15.
257. O'Sullivan, B.P., U. Yasothan, and P. Kirkpatrick, *Inhaled aztreonam.* Nat Rev Drug Discov. **9**(5): p. 357-8.
258. Le Bourgeois, M., et al., *[Fungal infections in cystic fibrosis].* Arch Pediatr. **18 Suppl 1**: p. S15-21.
259. Konstan, M.W., et al., *Clinical use of Ibuprofen is associated with slower FEV1 decline in children with cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(11): p. 1084-9.

260. Konstan, M.W., et al., *Effect of ibuprofen on neutrophil migration in vivo in cystic fibrosis and healthy subjects.* J Pharmacol Exp Ther, 2003. **306**(3): p. 1086-91.
261. Dauletbaev, N., et al., *A phase II study on safety and efficacy of high-dose N-acetylcysteine in patients with cystic fibrosis.* Eur J Med Res, 2009. **14**(8): p. 352-8.
262. Tirouvanziam, R., et al., *High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(12): p. 4628-33.
263. Martin, S.L., et al., *Safety and efficacy of recombinant alpha(1)-antitrypsin therapy in cystic fibrosis.* Pediatr Pulmonol, 2006. **41**(2): p. 177-83.
264. Griese, M., et al., *alpha1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients.* Eur Respir J, 2007. **29**(2): p. 240-50.
265. Accurso, F.J., et al., *Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function.* Am J Respir Crit Care Med. **183**(5): p. 627-34.
266. Ratjen, F., et al., *Long term effects of denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis.* J Cyst Fibros.
267. Grasemann, H., et al., *Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis.* Chest, 2007. **131**(5): p. 1461-6.
268. Mall, M., et al., *Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice.* Nat Med, 2004. **10**(5): p. 487-93.
269. Pons, G., et al., *French multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial on nebulized amiloride in cystic fibrosis patients. The Amiloride-AFLM Collaborative Study Group.* Pediatr Pulmonol, 2000. **30**(1): p. 25-31.
270. Davis, P.B., U. Yasothan, and P. Kirkpatrick, *Ivacaftor.* Nat Rev Drug Discov. **11**(5): p. 349-50.
271. Eckford, P.D., et al., *Cftr Potentiator Vx-770 (Ivacaftor) Opens the Defective Channel Gate of Mutant Cftr in a Phosphorylation-Dependent but Atp-Independent Manner.* J Biol Chem.
272. Norez, C., et al., *Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat.* FEBS Lett, 2006. **580**(8): p. 2081-6.
273. Leonard, A., et al., *A randomized placebo-controlled trial of miglustat in cystic fibrosis based on nasal potential difference.* J Cyst Fibros. **11**(3): p. 231-6.
274. Clancy, J.P., et al., *Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation.* Thorax. **67**(1): p. 12-8.
275. Grasemann, H. and F. Ratjen, *Emerging therapies for cystic fibrosis lung disease.* Expert Opin Emerg Drugs. **15**(4): p. 653-9.
276. Matsui, H., et al., *Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease.* Cell, 1998. **95**(7): p. 1005-15.
277. Zhou, Z., et al., *The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease.* J Cyst Fibros. **10 Suppl 2**: p. S172-82.
278. Verhaeghe, C., et al., *Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus.* J Cyst Fibros, 2007. **6**(4): p. 304-8.
279. Roum, J.H., et al., *Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis.* J Appl Physiol, 1993. **75**(6): p. 2419-24.
280. Gao, L., et al., *Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia.* Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. L113-8.
281. Moskwa, P., et al., *A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(2): p. 174-83.
282. Brennan, S., et al., *Alveolar macrophages and CC chemokines are increased in children with cystic fibrosis.* Eur Respir J, 2009. **34**(3): p. 655-61.
283. Del Porto, P., et al., *Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against Pseudomonas aeruginosa.* PLoS One. **6**(5): p. e19970.
284. Bruscia, E.M., et al., *Macrophages directly contribute to the exaggerated inflammatory response in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-/- mice.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(3): p. 295-304.

285. Andersson, C., et al., *Alterations in immune response and PPAR/LXR regulation in cystic fibrosis macrophages.* J Cyst Fibros, 2008. **7**(1): p. 68-78.
286. Bruscia, E.M., et al., *Abnormal trafficking and degradation of TLR4 underlie the elevated inflammatory response in cystic fibrosis.* J Immunol. **186**(12): p. 6990-8.
287. Zaman, M.M., et al., *Interleukin 8 secretion from monocytes of subjects heterozygous for the deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation is altered.* Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(5): p. 819-24.
288. Henson, P.M., D.L. Bratton, and V.A. Fadok, *Apoptotic cell removal.* Curr Biol, 2001. **11**(19): p. R795-805.
289. Watt, A.P., et al., *Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis.* Thorax, 2005. **60**(8): p. 659-64.
290. Vandivier, R.W., et al., *Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis.* J Clin Invest, 2002. **109**(5): p. 661-70.
291. Vandivier, R.W., et al., *Dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits phagocytosis of apoptotic cells with proinflammatory consequences.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(4): p. L677-86.
292. Hartl, D., et al., *Innate immunity in cystic fibrosis lung disease.* J Cyst Fibros. **11**(5): p. 363-82.
293. Xu, Y., et al., *Influence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on expression of lipid metabolism-related genes in dendritic cells.* Respir Res, 2009. **10**: p. 26.
294. Roghanian, A., et al., *Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase.* Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(11): p. 1189-98.
295. MacDonald, K.L. and D.P. Speert, *Differential modulation of innate immune cell functions by the Burkholderia cepacia complex: Burkholderia cenocepacia but not Burkholderia multivorans disrupts maturation and induces necrosis in human dendritic cells.* Cell Microbiol, 2008. **10**(10): p. 2138-49.
296. Adib-Conquy, M., et al., *Neutrophils in cystic fibrosis display a distinct gene expression pattern.* Mol Med, 2008. **14**(1-2): p. 36-44.
297. De Rose, V., et al., *Circulating adhesion molecules in cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(4 Pt 1): p. 1234-9.
298. Russell, K.J., et al., *Neutrophil adhesion molecule surface expression and responsiveness in cystic fibrosis.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(3 Pt 1): p. 756-61.
299. Mackarel, A.J., et al., *Cystic fibrosis sputum stimulates CD18-independent neutrophil migration across endothelial cells.* Exp Lung Res, 2005. **31**(4): p. 377-90.
300. Morris, M.R., et al., *Reduced iC3b-mediated phagocytotic capacity of pulmonary neutrophils in cystic fibrosis.* Clin Exp Immunol, 2005. **142**(1): p. 68-75.
301. Tosi, M.F. and M. Berger, *Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies.* J Immunol, 1988. **141**(6): p. 2097-103.
302. Tosi, M.F., H. Zakem, and M. Berger, *Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch.* J Clin Invest, 1990. **86**(1): p. 300-8.
303. Goldstein, W. and G. Doring, *Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis.* Am Rev Respir Dis, 1986. **134**(1): p. 49-56.
304. Witko-Sarsat, V., et al., *Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 729-36.
305. Cavarra, E., et al., *Neutrophil recruitment into the lungs is associated with increased lung elastase burden, decreased lung elastin, and emphysema in alpha 1 proteinase inhibitor-deficient mice.* Lab Invest, 1996. **75**(2): p. 273-80.
306. McDonnell, J., et al., *Comparison of the proteoglycanolytic activities of human leukocyte elastase and human cathepsin G in vitro and in vivo.* Connect Tissue Res, 1993. **30**(1): p. 1-9.

307. Sagel, S.D., R.K. Kapsner, and I. Osberg, *Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis.* Pediatr Pulmonol, 2005. **39**(3): p. 224-32.
308. Rogan, M.P., et al., *Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis.* J Infect Dis, 2004. **190**(7): p. 1245-53.
309. Voynow, J.A., B.M. Fischer, and S. Zheng, *Proteases and cystic fibrosis.* Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1238-45.
310. Fischer, B.M., et al., *ErbB2 activity is required for airway epithelial repair following neutrophil elastase exposure.* Faseb J, 2005. **19**(10): p. 1374-6.
311. Fischer, B.M., et al., *Neutrophil elastase inhibition of cell cycle progression in airway epithelial cells in vitro is mediated by p27kip1.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L762-8.
312. Devaney, J.M., et al., *Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4.* FEBS Lett, 2003. **544**(1-3): p. 129-32.
313. Kuwahara, I., et al., *Neutrophil elastase induces IL-8 gene transcription and protein release through p38/NF-{kappa}B activation via EGFR transactivation in a lung epithelial cell line.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(3): p. L407-16.
314. Hartl, D., et al., *Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease.* Nat Med, 2007. **13**(12): p. 1423-30.
315. Jackson, P.L., et al., *Human neutrophil elastase-mediated cleavage sites of MMP-9 and TIMP-1: implications to cystic fibrosis proteolytic dysfunction.* Mol Med. **16**(5-6): p. 159-66.
316. Cantin, A., G. Bilodeau, and R. Begin, *Granulocyte elastase-mediated proteolysis of alpha 1-antitrypsin in cystic fibrosis bronchopulmonary secretions.* Pediatr Pulmonol, 1989. **7**(1): p. 12-7.
317. Guyot, N., et al., *Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis.* J Biol Chem, 2008. **283**(47): p. 32377-85.
318. Weldon, S., et al., *Decreased levels of secretory leucoprotease inhibitor in the Pseudomonas-infected cystic fibrosis lung are due to neutrophil elastase degradation.* J Immunol, 2009. **183**(12): p. 8148-56.
319. Duvoix, A., et al., *Physiological concentration of calcium inhibits elastase-induced cleavage of a functional recombinant fragment of surfactant protein D.* Immunobiology. **216**(1-2): p. 72-9.
320. Folds, J.D., H. Prince, and J.K. Spitznagel, *Limited cleavage of human immunoglobulins by elastase of human neutrophil polymorphonuclear granulocytes. Possible modulator of immune complex disease.* Lab Invest, 1978. **39**(4): p. 313-21.
321. Rubio, F., et al., *Linkage of neutrophil serine proteases and decreased surfactant protein-A (SP-A) levels in inflammatory lung disease.* Thorax, 2004. **59**(4): p. 318-23.
322. Doring, G., et al., *Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis.* J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4842-50.
323. Le-Barillec, K., et al., *Proteolysis of monocyte CD14 by human leukocyte elastase inhibits lipopolysaccharide-mediated cell activation.* J Clin Invest, 1999. **103**(7): p. 1039-46.
324. Quinn, D.J., S. Weldon, and C.C. Taggart, *Antiproteases as therapeutics to target inflammation in cystic fibrosis.* Open Respir Med J. **4**: p. 20-31.
325. Brockbank, S., et al., *Effect of cystic fibrosis exacerbations on neutrophil function.* Int Immunopharmacol, 2005. **5**(3): p. 601-8.
326. Berube, J., et al., *Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function enhances activation of p38 and ERK MAPKs, increasing interleukin-6 synthesis in airway epithelial cells exposed to Pseudomonas aeruginosa.* J Biol Chem. **285**(29): p. 22299-307.

327. Cantin, A.M., et al., *Oxidant stress suppresses CFTR expression.* Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(1): p. C262-70.
328. Cohen, T.S. and A. Prince, *Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome.* Nat Med. **18**(4): p. 509-19.
329. Downey, D.G., et al., *The effect of treatment of cystic fibrosis pulmonary exacerbations on airways and systemic inflammation.* Pediatr Pulmonol, 2007. **42**(8): p. 729-35.
330. McKeon, D.J., et al., *Prolonged survival of neutrophils from patients with Delta F508 CFTR mutations.* Thorax, 2008. **63**(7): p. 660-1.
331. Moriceau, S., G. Lenoir, and V. Witko-Sarsat, *In cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, neutrophil apoptosis is delayed and modulated by diamide or roscovitine: evidence for an innate neutrophil disturbance.* J Innate Immun. **2**(3): p. 260-6.
332. Montemurro, P., et al., *Increase in interleukin-8 production from circulating neutrophils upon antibiotic therapy in cystic fibrosis patients.* J Cyst Fibros.
333. Hutchison, M.L., I.R. Poxton, and J.R. Govan, *Burkholderia cepacia produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes.* Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 2033-9.
334. Usher, L.R., et al., *Induction of neutrophil apoptosis by the Pseudomonas aeruginosa exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection.* J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1861-8.
335. Young, R.L., et al., *Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of Pseudomonas aeruginosa: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR.* PLoS One. **6**(9): p. e23637.
336. Manzenreiter, R., et al., *Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy.* J Cyst Fibros. **11**(2): p. 84-92.
337. Greene, C.M., et al., *TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells.* J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1638-46.
338. Hauber, H.P., et al., *Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis.* Can Respir J, 2005. **12**(1): p. 13-8.
339. Muir, A., et al., *Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **30**(6): p. 777-83.
340. John, G., et al., *TLR-4-mediated innate immunity is reduced in cystic fibrosis airway cells.* Am J Respir Cell Mol Biol. **42**(4): p. 424-31.
341. John, G., et al., *Reduced surface toll-like receptor-4 expression and absent interferon-gamma-inducible protein-10 induction in cystic fibrosis airway cells.* Exp Lung Res. **37**(6): p. 319-26.
342. Zhang, Z., et al., *Human airway epithelial cells sense Pseudomonas aeruginosa infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5.* Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7151-60.
343. de, C.V.G.M., et al., *TLR 5, but neither TLR2 nor TLR4, is involved in lung epithelial cell response to Burkholderia cenocepacia.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2008. **54**(1): p. 37-44.
344. Blohmke, C.J., et al., *Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease.* J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7764-73.
345. Blohmke, C.J., et al., *TLR5 as an anti-inflammatory target and modifier gene in cystic fibrosis.* J Immunol. **185**(12): p. 7731-8.
346. Griese, M., P. Birrer, and A. Demirsoy, *Pulmonary surfactant in cystic fibrosis.* Eur Respir J, 1997. **10**(9): p. 1983-8.
347. Mariencheck, W.I., et al., *Pseudomonas aeruginosa elastase degrades surfactant proteins A and D.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(4): p. 528-37.
348. Kuang, Z., et al., *Pseudomonas aeruginosa elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A.* PLoS One. **6**(11): p. e27091.
349. Haerynck, F., et al., *Polymorphisms in the lectin pathway genes as a possible cause of early chronic Pseudomonas aeruginosa colonization in cystic fibrosis patients.* Hum Immunol. **73**(11): p. 1175-83.
350. Chalmers, J.D., et al., *Impact of mannose-binding lectin insufficiency on the course of cystic fibrosis: A review and meta-analysis.* Glycobiology. **21**(3): p. 271-82.

351. Wright, A.K., et al., *Pivotal Advance: Expansion of small sputum macrophages in CF: failure to express MARCO and mannose receptors.* J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 479-89.
352. Muller, B., et al., *Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients.* Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1404-7.
353. Huttunen, R., et al., *High plasma level of long pentraxin 3 (PTX3) is associated with fatal disease in bacteremic patients: a prospective cohort study.* PLoS One. **6**(3): p. e17653.
354. Brusselle, G.G., G.F. Joos, and K.R. Bracke, *New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease.* Lancet. **378**(9795): p. 1015-26.
355. Blasi, F., et al., *Chlamydia pneumoniae and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment.* Thorax, 2002. **57**(8): p. 672-6.
356. Morris, A., et al., *Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and Pneumocystis colonization.* Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(4): p. 408-13.
357. Kousha, M., R. Tadi, and A.O. Soubani, *Pulmonary aspergillosis: a clinical review.* Eur Respir Rev. **20**(121): p. 156-74.
358. Van Pottelberge, G.R., et al., *COPD is associated with reduced pulmonary interstitial expression of pentraxin-3.* Eur Respir J. **39**(4): p. 830-8.
359. Pizzichini, M.M., et al., *Pentraxin 3 (PTX3): A new marker to study airway inflammation?.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**: p. A2532.
360. Taggart, C., et al., *Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(1): p. L33-41.
361. Hirche, T.O., et al., *Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain.* J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27688-98.
362. Monod, M., et al., *Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of Aspergillus fumigatus.* Infect Immun, 1993. **61**(10): p. 4099-104.
363. Reichard, U., H. Eiffert, and R. Ruchel, *Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from Aspergillus fumigatus.* J Med Vet Mycol, 1995. **33**(4): p. 279.
364. Behnsen, J., et al., *Secreted Aspergillus fumigatus protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5.* Infect Immun. **78**(8): p. 3585-94.
365. Abad, A., et al., *What makes Aspergillus fumigatus a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis.* Rev Iberoam Micol. **27**(4): p. 155-82.
366. Larcher, G., et al., *A 33 kDa serine proteinase from Scedosporium apiospermum.* Biochem J, 1996. **315 (Pt 1)**: p. 119-26.
367. Henke, M.O., et al., *Serine proteases degrade airway mucins in cystic fibrosis.* Infect Immun. **79**(8): p. 3438-44.
368. Malloy, J.L., et al., *Pseudomonas aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(2): p. L409-18.
369. Hong, Y.Q. and B. Ghebrehiwet, *Effect of Pseudomonas aeruginosa elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3.* Clin Immunol Immunopathol, 1992. **62**(2): p. 133-8.
370. Gould, J.M. and J.N. Weiser, *Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract.* Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1747-54.
371. Lu, Y.T., et al., *Proteomic profiles of bronchoalveolar lavage fluid from patients with ventilator-associated pneumonia by gel-assisted digestion and 2-D-LC/MS/MS.* Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(9): p. 1208-22.
372. Kakuta, Y., K. Aoshiba, and A. Nagai, *C-reactive protein products generated by neutrophil elastase promote neutrophil apoptosis.* Arch Med Res, 2006. **37**(4): p. 456-60.
373. Deban, L., et al., *Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3.* Nat Immunol. **11**(4): p. 328-34.
374. Paroni, M., et al., *Response of CFTR-Deficient Mice to Long-Term chronic Pseudomonas aeruginosa Infection and PTX3 Therapy.* J Infect Dis.

375. Stoltz, D.A., et al., *Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth.* Sci Transl Med. **2**(29): p. 29ra31.
376. Brea, D., et al., *The pig as a model for investigating the role of neutrophil serine proteases in human inflammatory lung diseases.* Biochem J. **447**(3): p. 363-70.
377. Cabiati, M., et al., *Exploring PTX3 expression in Sus scrofa cardiac tissue using RNA sequencing.* Regul Pept. **174**(1-3): p. 1-5.
378. Levy, O., et al., *Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848.* J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4627-34.
379. Yan, S.R., et al., *Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide.* Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1223-9.
380. Kjeldsen, L., et al., *Granules and secretory vesicles in human neonatal neutrophils.* Pediatr Res, 1996. **40**(1): p. 120-9.
381. Levy, O., et al., *Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein.* Pediatrics, 1999. **104**(6): p. 1327-33.
382. Wynn, J.L. and O. Levy, *Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis.* Clin Perinatol. **37**(2): p. 307-37.
383. Labbok, M.H., D. Clark, and A.S. Goldman, *Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 565-72.
384. Nagata, S., R. Hanayama, and K. Kawane, *Autoimmunity and the clearance of dead cells.* Cell. **140**(5): p. 619-30.
385. Rovere, P., et al., *The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells.* Blood, 2000. **96**(13): p. 4300-6.

Annexe 1

PTX3 contenue dans le lait maternel diffuse rapidement dans les tissus du nouveau-né

« Breast milk contains the prototypic long pentraxin PTX3 that may rapidly spread in neonate tissues »

Sébastien Jaillon, Yveline Hamon, Pascale Jeannin, Céline Beauvillain, Viorica Cotici, Barbara Bottazzi, Manuela Nebuloni, Cecilia Garlanda, Isabelle Frémaux, Jean-François Gauchat, Philippe Descamps, Alberto Mantovani, Yves Delneste

Soumis à la revue *The Journal of Immunology*, en révision

Introduction

Les nouveau-nés ont un système immunitaire immature qui les rend plus sensibles aux infections microbiennes que les adultes. Leurs réponses immunitaires sont caractérisées par une production prédominante de cytokines Th2 et Th17 en réponse à des motifs microbiens et un défaut de production de cytokines Th1. Les cellules de nouveau-nés expriment plus faiblement certains récepteurs de l'immunité innée (e.g. CD14) et des molécules de signalisation (e.g. MyD88) que les cellules adultes, conduisant à une altération de l'activation cellulaire en réponse aux agonistes des TLRs dépendante de la voie de signalisation MyD88 [378, 379]. Les neutrophiles de nouveau-nés présentent également des insuffisances qualitatives et quantitatives (e.g. défaut de chimiotaxie et stock limité de certaines protéines antimicrobiennes) [380-382], comparativement aux cellules adultes.

L'allaitement apparaît être le moyen le plus efficace pour compenser cette immaturité du système immunitaire chez le nouveau-né. En effet, le lait maternel contient différentes cytokines (e.g. IL-6, IL-10, TGFβ), des anticorps, des PRRs solubles (e.g. sCD14, sTLR2) et des leucocytes [383]. La perméabilité du tractus gastro-intestinal du nouveau-né permet le passage des macromolécules et des cellules dans la circulation sanguine, permettant de retrouver les protéines et les cellules du lait dans les organes du nouveau-né [383].

La reconnaissance des micro-organismes par les cellules de l'immunité innée se fait via une famille de récepteurs, appelée « Pattern recognition receptors » ou PRRs, qui reconnaissent des motifs moléculaires très conservés et exprimés exclusivement par les micro-organismes (« Pathogen-associated molecular pattern » ou PAMPs). Les PRRs sont soit associés aux cellules, soit solubles. Selon leur fonction, les PRRs peuvent être classés en trois familles : (i) les récepteurs d'endocytose (e.g. les Scavenger receptors et les lectines de type C) impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation des micro-organismes ; (ii) les récepteurs de signalisation (e.g. Toll-like receptors) impliqués dans l'activation cellulaire ; et (iii) les récepteurs solubles (e.g. collectines, ficolines et pentraxines) impliqués dans l'opsonisation des micro-organismes, facilitant ainsi leur élimination par les phagocytes [1].

La famille des pentraxines comprend les pentraxines courtes, telles que CRP et SAP, et les pentraxines longues, représentées par PTX3. PTX3 possède des activités pléïotropiques au niveau de l'immunité innée et de l'inflammation [147]. PTX3 est exprimée par divers types cellulaires (à l'exception des hépatocytes), en réponse à des cytokines pro-inflammatoires ou

des composants microbiens/agonistes des molécules TLR [166-168]. PTX3 est également stockée dans les granules spécifiques des neutrophiles [83].

Le rôle physiologique de PTX3 a été clairement illustré dans des souris déficientes ($PTX3^{-/-}$) [177]. Ces souris succombent rapidement à une infection par *Aspergillus fumigatus* alors que les souris sauvages ne sont pas sensibles à ce pathogène. La sensibilité des souris $PTX3^{-/-}$ est associée à un défaut d'initiation d'une réponse protectrice de type Th1 [177]. Les souris $PTX3^{-/-}$ sont protégées d'une infection par *Aspergillus fumigatus* par injection de PTX3 exogène [177].

Au vu du rôle central de PTX3 dans la protection contre certains micro-organismes et la sensibilité accrue des nouveau-nés à des infections microbiennes, le but de cette étude a été d'analyser le statut de PTX3 chez les nouveau-nés et d'évaluer si le lait maternel peut compenser un éventuel déficit en PTX3.

Présentation des résultats

Nous avons montré que le lait maternel contient des concentrations élevées de PTX3, comparativement aux taux sériques observés chez les sujets sains et les mères (avant et après accouchement). Comme précédemment observé pour sCD14, la concentration de PTX3 dans le lait maternel diminue avec le temps, après l'accouchement. Puisque la forte concentration de PTX3 dans le lait maternel ne résulte pas d'une augmentation sérique, nous avons émis l'hypothèse d'une production locale de PTX3 dans la glande mammaire. Nous avons montré que (i) les cellules épithéliales mammaires et les cellules CD11b+ contenues dans le lait produisent de façon constitutive PTX3, et (ii) que l'expression de PTX3 par les cellules épithéliales mammaires est régulée par des cytokines pro-inflammatoires.

En plus de contenir PTX3, le lait maternel potentialise également la sécrétion de PTX3 par les cellules dendritiques stimulées par du LPS. Cet effet est inhibé après déplétion du sCD14 dans le lait et restaurée par l'addition de sCD14 exogène. Finalement, nous avons évalué si PTX3 contenue dans le lait maternel pouvait diffuser in vivo dans les tissus du nouveau-né. Dans une première série d'expériences, nous avons montré que la molécule PTX3 recombinante biotinylée, administrée par voie orale à des souriceaux, est retrouvée dès 15 minutes après gavage, au niveau des poumons, du foie, des reins et à un niveau plus faible, dans le cœur. Dans une deuxième série d'expériences, nous avons évalué si PTX3 contenue dans le lait maternel et ingérée pendant la lactation se retrouvait chez les nouveau-nés. Pour cela, des

souris nouveau-nés déficients en PTX3 ($PTX3^{-/-}$) ont reçu du lait maternel de souris hétérozygotes $PTX3^{+/-}$. Les résultats montrent que la molécule PTX3 est retrouvée dans les sérums de nouveau-nés (1 nouveau-né sur 9, 4 jours après la naissance et 8 nouveau-nés sur 14, 8 jours après la naissance).

En résumé, ces résultats montrent que PTX3, contenue dans le lait maternel, diffuse rapidement in vivo dans les tissus du nouveau-né, démontrant un transfert maternel de PTX3 aux souris nouveau-nés.

Conclusion

Cette étude montre que l'allaitement constitue une importante source de PTX3 pendant les premiers jours de vie et que PTX3 fournie par l'allaitement, qu'elle soit sous forme soluble ou associée aux leucocytes maternels, peut participer à la protection des nouveau-nés contre les infections microbiennes. Ces données renforcent également l'impact bénéfique de l'allaitement sur la santé du nouveau-né.

Breast milk contains the prototypic long pentraxin PTX3 that may rapidly spread in neonate tissues

Short title: **PTX3 in maternal milk**

Sébastien Jaillon[1,2,3], Yveline Hamon[1,2,4], Pascale Jeannin[1,2,4,5], Céline Beauvillain[1,2,4,5], Viorica Cotici[6], Barbara Bottazzi[3], Manuela Nebuloni[6], Cecilia Garlanda[3], Isabelle Frémaux[1,2,4], Jean-François Gauchat[7] , Philippe Descamps[8], Alberto Mantovani[3,9], Yves Delneste[1,2,4,5]

[1] LUNAM Université, Université d'Angers, Angers, France

[2] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Angers, France

[3] Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milan, Italy

[4] Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6299, Angers, France

[5] Université d'Angers, CHU d'Angers, Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, Angers, France

[6] Pathology Unit, L. Sacco Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milan, Milan, Italy

[7] Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Canada

[8] Université d'Angers, CHU d'Angers, Département de Gynécologie, Angers, France

[9] Department of Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy

Address orrespondence and reprint requests to Yves Delneste, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, UMR Inserm 892 - CNRS 6299, CHU Angers, IBS/IRIS, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. E-mail address: yves.delneste@univ-angers.fr

Abbreviations: APC, antigen presenting cells; CLR, C-type lectin receptors; CRP, C-reactive protein; DC, dendritic cells; HMC, human milk cells; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PRR, pattern recognition receptor; PTX, pentraxin; SAP, serum amyloid P; SR, scavenger receptors;TLR, toll-like receptor

Key words: Innate immunity, Newborn, Milk, PTX3

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Abstract

Newborns and infants present a higher susceptibility to infection than adults, a vulnerability associated with deficiencies in both the innate and adaptive immune systems. Innate immune receptors are sensors involved in the recognition and elimination of microbes that also play a pivotal role at the interface between innate and adaptive immunity. Pentraxin 3 (PTX3), the prototypic long pentraxin, is a soluble pattern recognition receptor involved in the initiation of protective responses against selected pathogens. As neonates are generally resistant to PTX3-sensitive pathogens, we suspected that PTX3 may be provided by a maternal source during the early life time. We observed that human colostrum contains high levels of multimeric PTX3 and, that mammary epithelial cells and $CD11b^{+}$ milk cells constitutively produce PTX3. Interestingly, PTX3 given orally to mice pups is rapidly distributed in different organs in a multimeric form. Finally, PTX3 ingested during lactation may be also detected in neonates. In conclusion, this study shows that breastfeeding constitutes an important source of PTX3 during the early life times and suggests that maternal milk may actively participate to the protection of neonates against microbial infections. This data also reinforces the beneficial impact of breastfeeding on the newborn health.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Introduction

Newborns have an immature immune system, rendering them more susceptible to microbial infections than adults. Intrinsic and extrinsic cell factors have been reported involved in both innate and adaptive immunity. Neonatal immune cells may exhibit functional defects compared to adult cells (1). They express lower levels of some innate sensors (e.g. CD14) and signalling molecules (e.g. MyD88) than adult cells, resulting in altered cell activation in response to MyD88-dependent Toll-like receptors (TLR) agonists (2, 3). Neutrophils from neonates have both quantitative and qualitative insufficiencies, characterized by a defective chemotaxis (4), and a limited stock of some antimicrobial proteins (e.g. lactoferrin and bactericidal/permeability-increasing protein) (5, 6). The formation of neutrophil extracellular traps (NETs), a major component of their antimicrobial arsenal, is also delayed (7, 8).

In response to microbial moieties, neonatal myeloid cells have an increased production of Th2- and Th17-biased cytokines, and a depressed production of Th1 cytokines. Dendritic cells (DC), the most potent antigen-presenting cells (APC) involved in the initiation and polarization of the adaptive immune responses, have an impaired production of IL-12 and IFNα in response to inflammatory signals (9, 10). Moreover, myeloid mononuclear cells, precursors of conventional DC, have a cytokine profile biased to Th2- and Th17-promoting phenotypes (10). However, some studies have reported that neonatal myeloid cells are similar to adult cells in their capacity to produce cytokines (11) and that the deficiency in producing pro-inflammatory cytokines in neonates is related to immunomodulatory soluble mediators. As an example, a constitutive high expression of adenosine, an endogenous immunomodulatory metabolite, in neonates, inhibits the TLR-induced TNFα production (1, 12). To date, the nature of the soluble immunomodulatory molecules responsible for the impaired Th1 responses in neonates remains largely undetermined (13).

To compensate the immature immune system in neonates, breastfeeding is considered as the most effective protective means to limit children mortality, by providing an optimal immune protection to the neonates (14-16). In addition to cytokines (e.g. IL-6, IL-10, TGFβ) and antibodies, breast milk contains biologically active and protective PRR, such as soluble CD14 (sCD14) and sTLR2 (15, 17-23). Lactadherin and lactoferrin are also involved in the protection of neonates during the early months of life (15, 24-26).

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Innate immune cells sense non self through germline-encoded receptors, called pattern recognition receptor (PRR), which are specialized in the recognition of highly conserved motifs expressed by microbes and called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (27). Based on their localisation, PRRs can be classified into three groups: (i) endocytic PRRs, such as scavenger receptors (SR) and C-type lectin receptors (CLR), involved in the recognition and internalization of microbes; (ii) signaling PRRs, involved in cell activation in response to microbes and, (iii) soluble PRRs, including soluble CLR (collectins, ficolins) and pentraxins (PTXs), that bind microbes and favor their clearance by phagocytic cells (28).

Pentraxins are a superfamily of proteins that includes the two short pentraxins serum amyloid P component (SAP) and C-reactive protein (CRP) and the prototypic long pentraxin PTX3 (27). Several studies have underlined the pleiotropic activities of PTX3 in innate immunity and inflammation (recently reviewed in (29)). PTX3 is produced by numerous cell types, including myeloid cells, endothelial cells and epithelial cells, in response to proinflammatory cytokines, microbes and microbial moieties (27). PTX3 is also stored in specific granules of neutrophils which serve as a reservoir of preformed PTX3 suitable for a rapid release (30). The pivotal role of PTX3 in innate immunity has been evidenced in *Ptx3*$^{-/-}$ mice which are susceptible to selected fungal, bacterial and viral infections (31-33). PTX3 opsonises specific pathogens (e.g. *A. fumigatus*, *P. aeruginosa*) and promotes their phagocytosis and clearance by phagocytes (30-32). The susceptibility of *Ptx3*$^{-/-}$ mice to *A. fumigatus* results from their inability to mount a protective Th1 response and a deficient activation of the phagocytic cup (31, 32). PTX3 has also been involved in complement activation (34) and regulation of inflammatory response (35).

Given the central role played by PTX3 in the protection against selected microbes and the high susceptibility of newborns to microbial infections, the aim of this study was to evaluate the status of PTX3 in neonates and whether maternal milk may compensate for a potential defect.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Materials and Methods

Blood collection

Blood from healthy adults (Blood collection center, Angers, France) was obtained with written informed consent in accordance with the Angers University Hospital ethics committee. Cord blood was obtained after written informed consent of the mother, in accordance with the Angers University Hospital ethics committee.

Breast milk collection and human milk cell isolation

Human breast milk was obtained after written informed consent. As levels of circulating PTX3 are increased during preeclampsia or preterm delivery (36, 37), only healthy pregnant women with an uncomplicated term vaginal delivery were selected for this study. After collection, milk samples were immediately placed on ice and centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4°C. Pelleted human milk cells (HMC) were washed in PBS (Lonza, Verviers, Belgium) and resuspended in culture medium (see below). Cell-free milk was subjected to a second centrifugation at 15000 rpm for 30 min at 4°C to remove debris, and stored at -80°C. $CD11b^+$ leukocytes were isolated from human milk cells by positive selection using PE-labeled anti-CD11b mAb (BD Biosciences, San Jose, CA) followed by incubation with anti-PE Ab-coated magnetic beads (Miltenyi biotech, Bergisch Gladbach, Germany); non retained cells were considered as epithelial cells and their purity, assessed by FACS analysis using an anti-EpCAM mAb (Miltenyi biotech), was >97%.

Mice milk was collected from anesthetized lactating C57BL/6 mice (Charles River, L'Arbresle, France) at day 5 post-delivery.

Monocyte isolation and dendritic cell generation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from adults were separated by Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) density gradient centrifugation. Monocytes were isolated from PBMC by positive selection using anti-CD14 mAb-coated magnetic beads (Miltenyi Biotech); purity, assessed by FACS analysis using an anti-CD13 mAb (BD Biosciences), was >98%. Purified $CD14^+$ monocytes were differentiated into DC by 5 days culture in complete medium (CM) consisting in RPMI 1640 medium supplemented with 10%

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) at $5x10^6$ cells/5 ml/well in 6-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) with 20 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml GM-CSF (both from R&D Systems, Abingdon, UK).

Cell activation

Dendritic cells from adults and monocytes from neonates ($0.5x10^6$ cells/ml) were cultured in CM and stimulated with LPS (from *E. coli* serotype O111:B4; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at the indicated concentrations, without or with human milk (0.125 or 2 % final concentration) or 50 ng/ml recombinant sCD14 (R&D Systems). Dendritic cells were also stimulated with Pam3CSK4, poly[I:C] (both from Invivogen, San Diego, CA) or TNFα plus IL-1β (R&D Systems), at the indicated concentrations. In some experiments, cells were cultured with sCD14-depleted milk. Briefly, milk was incubated with the anti-human CD14 mAb MY4 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) for 16 hours at 4°C. Control consisted in incubated milk with an isotype control mAb. Milks were then subjected to 2 hours incubation at room temperature with protein A-coated microbeads (GE Healthcare, Orsay, France) before centrifugation; sCD14-depleted milks were stored at -80°C until use.
The human mammary epithelial cell lines (MDA-MD-435, MCF-7, MDA-MD-231, MDA-MD-453, MDA-MD-468) were cultured in CM. The cell line MCF-10A was cultured in DMEM/F12 medium (Lonza) supplemented with 5% horse serum (Invitrogen), 20 ng/ml EGF, 0.5 µg/ml hydrocortisone, 10 µg/ml insulin (all from Sigma-Aldrich), and antibiotics. In some experiments, MCF10A cells were activated for 24 hours with TNFα plus IL-1β, at the indicated concentrations.

Quantification of PTX3 by ELISA

PTX3 was quantified by ELISA as previously reported (38). Briefly, the anti-PTX3 mAb (MNB4 for human or 2C3 for murine PTX3) was coated in ELISA plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in 10 mM $NaHCO_3/NaH_2CO_3$ carbonate buffer, pH=9.6, for 16 h at 4°C. After washings with PBS containing 0.05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich) (PBS/Tween), wells were saturated with PBS/BSA 1% for 2 h at 37°C. Samples were incubated for 2.5 h at 37°C (or 16 h at 4°C for human milk) before washings with PBS/Tween. Plates were then incubated for 1.5 h at 37°C with affinity-purified polyclonal rabbit anti-PTX3 Ab (100 ng/ml, 100 µl/well) for human PTX3 or with biotin-labeled anti-PTX3 mAb (clone 6B11) (100 ng/ml, 100

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

µl/well) for murine PTX3. After washings, plates were incubated with peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG Ab (1 µg/ml, 100 µl/well; Biosource, Camarillo, CA) or peroxidase-labeled streptavidin (Amersham Biosciences) for 1 h at 37°C. Bound Abs were revealed using the TMB substrate (Sigma-Aldrich).

Analysis of PTX3 expression by Western Blotting

Proteins were electrophoretically separated on a 10% SDS-PAGE in reducing conditions and then transferred to an Immobilon® membrane (Millipore, Bedford, MA). After saturation, membranes were incubated for 16 h at 4°C with 1 µg/ml affinity-purified rabbit polyclonal anti-PTX3 Ab. When PTX3 expression was evaluated in cell extracts, protein loading was verified by incubating the membranes with a rabbit anti-actin polyclonal Ab (Sigma-Aldrich). After washing, membranes were incubated with 1 µg/ml peroxydase-labeled anti-rabbit IgG Ab (Biosource). Bound Abs were detected using ECL, according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

Analysis of PTX3 mRNA expression

PTX3 mRNA expression in human tissues and mammary epithelial cell lines was determined by RT-PCR. Briefly, total RNA was extracted using Trizol reagent (Life technologies, Saint Aubin, France) following the manufacturer's recommendations. Single strand cDNA was synthesized using 1 µg of total RNA by reverse transcription using an oligo-dT primer and reverse transcriptase (Amersham Biosciences). Human tissue cDNA and human mammary gland mRNA were purchased from Clontech (Mountain View, CA); mammary gland mRNA was reverse transcribed as mentioned above. PCR amplification was performed with an amount of cDNA corresponding to 25 ng of starting total RNA using specific oligonucleotides. RNA integrity was assessed by GAPDH cDNA amplification. The PCR products were analyzed on a 1% agarose gel by electrophoresis and visualized with ethidium bromide.

Quantification of TNFα by ELISA

Human TNFα was quantified by ELISA using a commercial kit (R&D Systems).

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

In vivo experiments

C57BL/6 neonate (5 days old) or adult mice (8-12 weeks old) were injected intraperitoneally with 4 mg/kg LPS. Sera were collected 5 hours later and PTX3 was quantified by ELISA. Recombinant murine PTX3 was biotinylated, according to the manufacturer's instruction (Pierce, Rockford, IL). Neonate mice were given orally 10 µg biotin-labeled PTX3. Organs were collected 15 and 45 min after gavage and were homogeneized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.25% SDS, 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (Complete®; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After sonication and 1 h incubation at 4°C, lysates were centrifuged at 14000 rpm for 15 min at 4°C to remove debris. Proteins (60 µg/organs) were electrophoretically separated on a 10% SDS-PAGE in reducing conditions and then transferred to an Immobilon® membrane. After saturation, membranes were incubated for 16 h at 4°C with streptavidin-poly-HRP (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands). After washings, bound streptavidin-poly-HRP was detected using ECL (Amersham Biosciences).

Immunohistochemistry analysis

Frozen sections of lung tissue were cut and mounted on Super-frost slides. After fixation with acetone/chloroform for 3 min, slides were washed in PBS and incubated for 2 hours with affinity-purified polyclonal rabbit anti-PTX3 Ab. Bound antibodies were revealed using non-biotin HRP rabbit EnVision Detection System (Dako, Glostrup, Denmark) and the chromogen 3,3' diaminobenzidine.

Statistical analysis

Data are shown as means ± SD or means ± SEM and comparisons between groups were carried out by the Student's *t* test; P values less than 0.05 were considered as statistically significant.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Results

Neonates have a defective expression of PTX3

PTX3 was quantified in the sera of adults and neonates. Results showed that the levels of circulating PTX3 were lower in cord blood (0.45 ± 0.05 ng/ml; mean ± SEM, n=11) compared to adults (1.143 ± 0.18 ng/ml; n=27) (Fig. 1A). In an effort to assess *in vivo* the expression of PTX3 by neonates, circulating PTX3 was quantified by ELISA in the sera of adults and 5 days old mice collected 5 hours after intraperitoneal injection of LPS. Levels of circulating PTX3 were lower in newborn mice (175.86 ± 29.94 ng/ml ; mean ± SEM, n=4) compared to adult mice (378.95 ± 15.64 ng/ml) (Fig. 1B). These data demonstrate that neonates have a reduced capacity to secrete PTX3 in response to LPS.

PTX3 is present in human milk

Breast milk contains immune mediators that may compensate for a deficient production in neonates (15). We thus hypothesized that breast milk may contain PTX3. Human colostrum contains high levels of PTX3 at day 1 post-delivery (D1) (47.62 ± 4.29 ng/ml; mean ± SEM, n=10) and the concentrations remained elevated at D2 (35.24 ± 5.87 ng/ml), D3 (10.41 ± 1.70 ng/ml) and D4 (10.01 ± 2.48 ng/ml) (Fig. 2A) compared to the mean concentrations in the sera of healthy subjects (< 2 ng/ml) (Fig 2B) (39). We next verified that PTX3 present in human colostrum did not result from a systemic increase of circulating PTX3 during pregnancy and/or labour. PTX3 was quantified in the serum of pregnant women during labour (D-1) and in the sera and milk of the same mothers collected at D2. Pregnant women had a low increase of circulating PTX3 at the time of delivery, compared to non-pregnant healthy women (1.54 ± 0.14 and 0.83 ± 0.17 ng/ml, respectively; mean ± SEM, n=4) (Fig. 2B), as previously reported (36, 40). The levels of circulating PTX3 at D2 were similar to the ones observed in non pregnant women (0.96 ± 0.33 and 0.83 ± 0.42 ng/ml, respectively) (Fig. 2C), while the concentrations of PTX3 remained elevated in the colostrum collected at the time of blood sampling (30.94 ± 2.96 ng/ml) (Fig. 2B).

Western Blotting analysis of colostrums collected at D1, D2 and D3 revealed major immunoreactive bands with apparent molecular weights of ~80 and ~45 kDa, a profile similar to the one obtained with recombinant human PTX3 (Fig. 2C) and corresponding to multimeric and monomeric forms of PTX3, respectively (41). In contrast, no PTX3 was evidenced in

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

formula milk (Fig. 2C). These results demonstrate that human colostrum contains high levels of PTX3 that does not result from elevated levels of circulating PTX3.

Identification of PTX3-producing cells

The high concentrations of PTX3 in colostrum compared with the ones detected in the serum suggested a local production of PTX3. We first evaluated whether PTX3 is produced by mammary tissue and mammary epithelial cells. As previously reported (42-44), the PTX3 transcript is constitutively expressed in lung, ovary and skeletal muscle (Fig. 3A, left panel). In an unexpected way, mammary glands also constitutively express PTX3 mRNA (Fig. 3A, left panel). We next analyzed PTX3 mRNA expression in human mammary epithelial cell lines. A constitutive expression of the transcript encoding PTX3 was evidenced in the MDA-MD-231 and MDA-MD-453 cell lines and, interestingly, in the non-tumoral cell line MCF-10A (Fig. 3A, right panel). In contrast, the tumoral cell lines MDA-MD-435, MDA-MD-468 and MCF-7 expressed low or no PTX3 mRNA (Fig. 3A, right panel). As a positive control, a strong expression of PTX3 mRNA was evidenced in LPS-stimulated DC (Fig. 3A, right panel).

The production of PTX3 was next evaluated by ELISA in the supernatants of these cell lines. In agreement with the expression of the transcript encoding PTX3, the MCF-10A and MDA-MD-231 cell lines constitutively secrete PTX3 which accumulates in the culture supernatants (Fig. 3B) whereas, in contrast, no PTX3 was detected in the supernatants of MDA-MD-435 (Fig. 3B, right panel) and MCF-7 cells (data not shown). Moreover, the production of PTX3 by the MCF-10A cells was increased, in a dose-dependent manner, upon stimulation with TNFα and IL-1β (Fig. 3C), two PTX3-inducing cytokines present in the colostrum (15).

Human milk contains cells (referred to as HMC), mainly epithelial cells and leukocytes. Western Blotting analysis showed a constitutive expression of PTX3 in HMC (Fig. 3D, left panel) with an electrophoretic profile similar to the one observed in human neutrophils (30). In order to identify which milk cell type produces PTX3, HMC were separated into $CD11b^+$ $EpCAM^-$ leukocytes and $CD11b^-$ $EpCAM^+$ epithelial cells. Results showed that $CD11b^+$ $EpCAM^-$ cells, containing mainly neutrophils ((15, 45) and data not shown), expressed high levels of PTX3 compared to $CD11b^-$ $EpCAM^+$ epithelial cells (Fig. 3E).

Collectively, these data show that (i) mammary epithelial cells and $CD11b^+$ HMC constitutively produce PTX3 and (ii) that the expression of PTX3 by mammary epithelial cells can be regulated by pro-inflammatory cytokines.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

PTX3 expression is potentiated by human milk

Previous studies have reported that molecules present in human milk may exhibit immunoregulatory properties (20, 21, 46). We thus evaluated whether human colostrum and maternal milk may modulate the LPS-induced expression of PTX3 by myeloid cells. Human colostrum potentiated the production of PTX3 by LPS-stimulated DC while, in contrast, colostrum alone did not induce significant levels of PTX3 by DC (Fig. 4A). The potentiating activity was observed with colostrum collected at D1 and D4 but also with maternal milk collected at D30 (Fig. 4B), underlining a long-lasting potentiating effect of milk on PTX3 production. Interestingly, human colostrum also increased the production of PTX3 by newborn monocytes stimulated with LPS (Fig. 4C).

The potentiating effect of D1 colostrum on the production of PTX3 was not observed in response to Pam3CSK4, poly[I:C] or TNFα and IL-1β (Fig. 4D), suggesting that milk contains soluble molecule(s) that selectively modulate(s) the TLR4-mediated activation of myeloid cells. A previous study reported that human milk contains sCD14 that potentiates the LPS-induced cell activation (20). Accordingly, the increase of LPS-induced PTX3 secretion induced by colostrum was abrogated after sCD14 depletion and restored by addition of exogenous sCD14 (Fig. 4E).

Collectively, these data demonstrate that human milk potentiates the LPS-induced production of PTX3 via sCD14.

PTX3 contained in maternal milk diffuses in neonate tissues

The neonatal gastrointestinal system is permeable for biomolecules present in milk which may rapidly accumulate in the neonate tissues (22, 47, 48). In order to evaluate whether PTX3 contained in milk may diffuse in vivo in neonate tissues, we first analyzed whether orally administered PTX3 may be detected in the organs of newborns. Biotin-labeled recombinant PTX3 (biot-PTX3) was detected in the lung, liver, kidney and, at a lower level, heart, as soon as 15 min after oral administration (Fig. 5A). An accumulation of PTX3 was observed 45 min after gavage. Interestingly, high molecular weights biot-PTX3 were detected, suggesting that the polymeric structure of PTX3 (41) is preserved (Fig. 5A). Low molecular weight forms of biot-PTX3 (<47 kDa) were observed in liver and kidney, probably reflecting an elimination of the molecule (Fig. 5B), as reported for TGFβ (22).

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

We next evaluated whether Ptx3 ingested during lactation may be also detected in neonates. Western-blotting analysis showed that Ptx3 is expressed in murine colostrum and exhibits a similar electrophoretic profile than PTX3 found in human colostrum (Fig. 5B). Interestingly, in *Ptx3*$^{-/-}$ neonate mice breastfed by an heterozygote *Ptx3*$^{+/-}$ mother, circulating PTX3 was detected in the sera of 1/9 neonates at day 4 and in 8/14 neonates at day 8 after birth (Fig 5C). Moreover, immunohistochemistry revealed interstitial PTX3 staining in the lung interalveolar septa of *Ptx3*$^{-/-}$ neonate mice (8-days-old) born and breastfed by a *Ptx3*$^{+/-}$ female mice (Fig. 5D). In contrast, no PTX3 was detected in serum and lung sections of *Ptx3*$^{-/-}$ neonate mice breastfed by a PTX3$^{-/-}$ female mice (Fig. 5C and 5D). As a positive control, high concentrations and staining of Ptx3 were found in the sera and lung sections, respectively, of *Ptx3*$^{+/+}$ and *Ptx3*$^{+/-}$ neonates born and breastfed by *Ptx3*$^{+/-}$ female mice (Fig. 5C and 5D). Collectively, these data show that PTX3 present in maternal milk rapidly diffuses in vivo in neonate tissues, demonstrating a maternal transfer for PTX3 in neonate mice.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Discussion

In this study, we report the constitutive expression of PTX3 in human and murine colostrum, either soluble or cell-associated that may spread in neonate tissues.

In the early months of life, breastfeeding represents an important source of protective immune molecules and is believed to be the main preventive means to reduce the death rate of children under five (15). Breast milk contains immunomodulatory mediators, such as cytokines (e.g. IL-10, TGFβ, IL-1β), antibodies and, soluble PRR (e.g. sCD14, sTLR2), that can compensate and/or instruct the immature immune system of neonates (15, 20, 21, 49). Our results show that colostrum contains high levels of soluble PTX3 compared to the ones found in the sera of healthy adults and mothers (before or after delivery). As reported for sCD14, the concentration of PTX3 in colostrum decreases, in a time-dependent manner, after delivery (20).

Except a constitutive expression in neutrophils (30), PTX3 is induced in response to proinflammatory signals in numerous cell types, including myeloid cells, fibroblasts and endothelial cells (27). In this study, we extend this observation to mammary epithelial cells. This production is potentiated by TNFα, which plays an important role in the mammary gland development and in the regulation of milk protein expression (50). As adipocytes also produce PTX3 (51), we cannot exclude that soluble PTX3 found in colostrum may also derive from adipocytes surrounding the mammary ducts and alveoli.

In addition to epithelial cells, milk also contains leukocytes, notably neutrophils (40-65%), macrophages (35-55%) and lymphocytes (5-10%). These leukocytes colonize the organs of the pups and participate to the immune protection of neonates (15, 45, 52, 53). Neutrophils and mononuclear myeloid cells are a major source of PTX3 in response to proinflammatory signals (29). In agreement with these data, our results showed that leukocytes are the main PTX3-producing cells among HMC and that HMC-associated PTX3 exhibits an electrophoresis migration profile similar to the one observed in neutrophils (30). These results suggest that neutrophils may represent the main cellular source of cell-associated PTX3 in HMC. The absence or low expression of PTX3 by $CD11b^{-}$ $EpCAM^{+}$ epithelial cells present in milk, compared to mammary epithelial cell lines, may be related to the fact that these cells are dying.

The gastrointestinal system of neonates is permeable for macromolecules and milk cells. Consequently, ingested molecules and cells are rapidly found in plasma and organs after feeding (22, 45, 47, 48). Orally administered recombinant PTX3 rapidly accumulated in

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

different organs of neonates. Importantly, Western-Blotting analysis revealed that exogenous PTX3, accumulated in tissues conserved a multimeric structure, which can required for its biological activity (41, 54). Circulating Ptx3 was detected in the serum of some *Ptx3*$^{-/-}$ neonates born from *Ptx3*$^{+/-}$ parents at day 4 and day 8 after birth. Moreover, PTX3 is observed in the interalveolar septum of lung sections of *Ptx3*$^{-/-}$ neonates from *Ptx3*$^{+/-}$ female. These data demonstrate that, following breastfeeding, PTX3 accumulates in neonates and diffuses into their tissues. Even thought we cannot exclude that a part of PTX3 observed in the neonate tissues comes from the gestational period, as reported for immunoglobulins, results showing that ingested PTX3 may accumulate in different organs are in favor of a transfer through the gastrointestinal tract (25).

Milk cells can also migrate through the gastrointestinal barrier of neonates and accumulate in different organs (45), as reported in mice and sheep (15, 45, 55). This phenomenon is suspected to occur also in human (15, 56, 57). Milk cells, and especially neutrophils, thus represent an alternate source of PTX3 for neonates.

In addition to containing PTX3, human colostrum (collected at day 1 and day 5 post-partum) but also maternal milk (collected at day 30 post-partum) increased the production of PTX3 by immune cells in response to LPS, a property related to the presence of sCD14 in milk and in line with the high concentration of sCD14 still observed in maternal milk after a month post-partum (more than 10 µg/ml) (20). A previous study reported that milk prevents the activation induced by Pam3CSK4 and poly[I:C] (46). In our experimental conditions, the expression of PTX3 induced by these TLR agonists was not or poorly modulated by milk. These differences may result from the use of different cell isolation protocols and/or origin of the TLR agonists.

The susceptibility of neonates to infections, has been related to the functional immaturity of the neonate immune cells (1, 15). *In vivo* studies have underlined the pivotal role played by PTX3 in the protection against selected bacteria, fungi and viruses (31-33). Neonates exhibit an immune response biased toward a Th2- and Th17-promoting phenotype (10, 58). Interestingly, PTX3 has been shown to participate to the polarisation of adaptive immune responses. Indeed, the susceptibility of *Ptx3*$^{-/-}$ mice to *A. fumigatus* infection results, at least in part, from a defect to mount a protective Th1 immune response (31). PTX3 decreases the production of IL-23 and restores a Th1 response in a murine model of chronic granulomatous disease (59). Thus, milk-associated PTX3 could participate to the fine tuning of neonate adaptive immune responses, by favouring the initiation of protective immune responses. In conclusion, this study shows that breastfeeding constitutes an important source of PTX3 during the early life times and that soluble PTX3 and HMC-derived PTX3, provided by

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

breastfeeding, may actively participate to the protection of neonates against microbial infections. This data also reinforces the beneficial impact of breastfeeding on the newborn health.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Acknowledgments.

We sincerely acknowledge mothers for their acceptance to participate in this study and the nurses (Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Angers, F-Angers) for breast milk and blood collection.

This study is supported by institutional grants from Inserm and the University of Angers and by a grant from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR; project Pentraximmune). SJ and YH received a fellowship from the Conseil Général du Maine et Loire.

Disclosures.

The authors have no financial conflicts of interest.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

References

1. Levy, O. 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 7: 379-390.
2. Yan, S. R., G. Qing, D. M. Byers, A. W. Stadnyk, W. Al-Hertani, and R. Bortolussi. 2004. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infection and immunity* 72: 1223-1229.
3. Levy, O., K. A. Zarember, R. M. Roy, C. Cywes, P. J. Godowski, and M. R. Wessels. 2004. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol* 173: 4627-4634.
4. Wynn, J. L., and O. Levy. 2010. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clinics in perinatology* 37: 307-337.
5. Levy, O., S. Martin, E. Eichenwald, T. Ganz, E. Valore, S. F. Carroll, K. Lee, D. Goldmann, and G. M. Thorne. 1999. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics* 104: 1327-1333.
6. Kjeldsen, L., H. Sengelov, K. Lollike, and N. Borregaard. 1996. Granules and secretory vesicles in human neonatal neutrophils. *Pediatric research* 40: 120-129.
7. Yost, C. C., M. J. Cody, E. S. Harris, N. L. Thornton, A. M. McInturff, M. L. Martinez, N. B. Chandler, C. K. Rodesch, K. H. Albertine, C. A. Petti, A. S. Weyrich, and G. A. Zimmerman. 2009. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood* 113: 6419-6427.
8. Marcos, V., C. Nussbaum, L. Vitkov, A. Hector, E. M. Wiedenbauer, D. Roos, T. Kuijpers, W. D. Krautgartner, O. Genzel-Boroviczeny, M. Sperandio, and D. Hartl. 2009. Delayed but functional neutrophil extracellular trap formation in neonates. *Blood* 114: 4908-4911; author reply 4911-4902.
9. Goriely, S., C. Van Lint, R. Dadkhah, M. Libin, D. De Wit, D. Demonte, F. Willems, and M. Goldman. 2004. A defect in nucleosome remodeling prevents IL-12(p35) gene transcription in neonatal dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 199: 1011-1016.
10. Kollmann, T. R., J. Crabtree, A. Rein-Weston, D. Blimkie, F. Thommai, X. Y. Wang, P. M. Lavoie, J. Furlong, E. S. Fortuno, 3rd, A. M. Hajjar, N. R. Hawkins, S. G. Self, and C. B. Wilson. 2009. Neonatal innate TLR-mediated responses are distinct from those of adults. *J Immunol* 183: 7150-7160.
11. Sohlberg, E., S. Saghafian-Hedengren, K. Bremme, and E. Sverremark-Ekstrom. 2011. Cord blood monocyte subsets are similar to adult and show potent peptidoglycan-stimulated cytokine responses. *Immunology* 133: 41-50.
12. Levy, O., M. Coughlin, B. N. Cronstein, R. M. Roy, A. Desai, and M. R. Wessels. 2006. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. *J Immunol* 177: 1956-1966.
13. Belderbos, M. E., O. Levy, F. Stalpers, J. L. Kimpen, L. Meyaard, and L. Bont. 2012. Neonatal plasma polarizes TLR4-mediated cytokine responses towards low IL-12p70 and high IL-10 production via distinct factors. *PLoS One* 7: e33419.
14. Jones, G., R. W. Steketee, R. E. Black, Z. A. Bhutta, and S. S. Morris. 2003. How many child deaths can we prevent this year? *Lancet* 362: 65-71.

For Peer Review Only. Do not copy or distribute.

15. Labbok, M. H., D. Clark, and A. S. Goldman. 2004. Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. *Nat Rev Immunol* 4: 565-572.
16. Lawrence, R. M., and C. A. Pane. 2007. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 37: 7-36.
17. Garofalo, R., S. Chheda, F. Mei, K. H. Palkowetz, H. E. Rudloff, F. C. Schmalstieg, D. K. Rassin, and A. S. Goldman. 1995. Interleukin-10 in human milk. *Pediatric research* 37: 444-449.
18. Garofalo, R. P., and A. S. Goldman. 1999. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. *Clinics in perinatology* 26: 361-377.
19. Hawkes, J. S., D. L. Bryan, M. J. James, and R. A. Gibson. 1999. Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. *Pediatric research* 46: 194-199.
20. Labeta, M. O., K. Vidal, J. E. Nores, M. Arias, N. Vita, B. P. Morgan, J. C. Guillemot, D. Loyaux, P. Ferrara, D. Schmid, M. Affolter, L. K. Borysiewicz, A. Donnet-Hughes, and E. J. Schiffrin. 2000. Innate recognition of bacteria in human milk is mediated by a milk-derived highly expressed pattern recognition receptor, soluble CD14. *The Journal of experimental medicine* 191: 1807-1812.
21. LeBouder, E., J. E. Rey-Nores, N. K. Rushmere, M. Grigorov, S. D. Lawn, M. Affolter, G. E. Griffin, P. Ferrara, E. J. Schiffrin, B. P. Morgan, and M. O. Labeta. 2003. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 171: 6680-6689.
22. Letterio, J. J., A. G. Geiser, A. B. Kulkarni, N. S. Roche, M. B. Sporn, and A. B. Roberts. 1994. Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science (New York, N.Y* 264: 1936-1938.
23. Saito, S., M. Yoshida, M. Ichijo, S. Ishizaka, and T. Tsujii. 1993. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human milk. *Clin Exp Immunol* 94: 220-224.
24. Firth, M. A., P. E. Shewen, and D. C. Hodgins. 2005. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Anim Health Res Rev* 6: 143-158.
25. Zinkernagel, R. M. 2001. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *The New England journal of medicine* 345: 1331-1335.
26. Zinkernagel, R. M. 2003. On natural and artificial vaccinations. *Annual review of immunology* 21: 515-546.
27. Bottazzi, B., A. Doni, C. Garlanda, and A. Mantovani. 2010. An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm. *Annual review of immunology*.
28. Jeannin, P., S. Jaillon, and Y. Delneste. 2008. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current opinion in immunology* 20: 530-537.
29. Moalli, F., S. Jaillon, A. Inforzato, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Mantovani, and C. Garlanda. 2011. Pathogen Recognition by the Long Pentraxin PTX3. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011: 830421.
30. Jaillon, S., G. Peri, Y. Delneste, I. Fremaux, A. Doni, F. Moalli, C. Garlanda, L. Romani, H. Gascan, S. Bellocchio, S. Bozza, M. A. Cassatella, P. Jeannin, and A. Mantovani. 2007. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *The Journal of experimental medicine* 204: 793-804.
31. Garlanda, C., E. Hirsch, S. Bozza, A. Salustri, M. De Acetis, R. Nota, A. Maccagno, F. Riva, B. Bottazzi, G. Peri, A. Doni, L. Vago, M. Botto, R. De Santis, P. Carminati, G. Siracusa, F. Altruda, A. Vecchi, L. Romani, and A. Mantovani. 2002. Non-

For Peer Review Only - Not for distribution - Please do not reuse.

redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 420: 182-186.

32. Moalli, F., A. Doni, L. Deban, T. Zelante, S. Zagarella, B. Bottazzi, L. Romani, A. Mantovani, and C. Garlanda. 2010. Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against Aspergillus fumigatus. *Blood* 116: 5170-5180.
33. Reading, P. C., S. Bozza, B. Gilbertson, M. Tate, S. Moretti, E. R. Job, E. C. Crouch, A. G. Brooks, L. E. Brown, B. Bottazzi, L. Romani, and A. Mantovani. 2008. Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. *J Immunol* 180: 3391-3398.
34. Cotena, A., V. Maina, M. Sironi, B. Bottazzi, P. Jeannin, A. Vecchi, N. Corvaia, M. R. Daha, A. Mantovani, and C. Garlanda. 2007. Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3. *J Immunol* 179: 6311-6317.
35. Deban, L., R. C. Russo, M. Sironi, F. Moalli, M. Scanziani, V. Zambelli, I. Cuccovillo, A. Bastone, M. Gobbi, S. Valentino, A. Doni, C. Garlanda, S. Danese, G. Salvatori, M. Sassano, V. Evangelista, B. Rossi, E. Zenaro, G. Constantin, C. Laudanna, B. Bottazzi, and A. Mantovani. 2010. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. *Nat Immunol* 11: 328-334.
36. Assi, F., R. Fruscio, C. Bonardi, A. Ghidini, P. Allavena, A. Mantovani, and A. Locatelli. 2007. Pentraxin 3 in plasma and vaginal fluid in women with preterm delivery. *Bjog* 114: 143-147.
37. Cetin, I., V. Cozzi, F. Pasqualini, M. Nebuloni, C. Garlanda, L. Vago, G. Pardi, and A. Mantovani. 2006. Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *American journal of obstetrics and gynecology* 194: 1347-1353.
38. Peri, G., M. Introna, D. Corradi, G. Iacuitti, S. Signorini, F. Avanzini, F. Pizzetti, A. P. Maggioni, T. Moccetti, M. Metra, L. D. Cas, P. Ghezzi, J. D. Sipe, G. Re, G. Olivetti, A. Mantovani, and R. Latini. 2000. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* 102: 636-641.
39. Muller, B., G. Peri, A. Doni, V. Torri, R. Landmann, B. Bottazzi, and A. Mantovani. 2001. Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Critical care medicine* 29: 1404-1407.
40. Larsson, A., M. Palm, J. Helmersson, and O. Axelsson. 2010. Pentraxin 3 Values During Normal Pregnancy. *Inflammation*.
41. Inforzato, A., V. Rivieccio, A. P. Morreale, A. Bastone, A. Salustri, L. Scarchilli, A. Verdoliva, S. Vincenti, G. Gallo, C. Chiapparino, L. Pacello, E. Nucera, O. Serlupi-Crescenzi, A. J. Day, B. Bottazzi, A. Mantovani, R. De Santis, and G. Salvatori. 2008. Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization. *The Journal of biological chemistry* 283: 10147-10161.
42. Han, B., M. Mura, C. F. Andrade, D. Okutani, M. Lodyga, C. C. dos Santos, S. Keshavjee, M. Matthay, and M. Liu. 2005. TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J Immunol* 175: 8303-8311.
43. Salustri, A., C. Garlanda, E. Hirsch, M. De Acetis, A. Maccagno, B. Bottazzi, A. Doni, A. Bastone, G. Mantovani, P. Beck Peccoz, G. Salvatori, D. J. Mahoney, A. J. Day, G. Siracusa, L. Romani, and A. Mantovani. 2004. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development (Cambridge, England)* 131: 1577-1586.

For Peer Review Only. Not for distribution. Please do not forward.

44. Introna, M., V. V. Alles, M. Castellano, G. Picardi, L. De Gioia, B. Bottazzai, G. Peri, F. Breviario, M. Salmona, L. De Gregorio, T. A. Dragani, N. Srinivasan, T. L. Blundell, T. A. Hamilton, and A. Mantovani. 1996. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood* 87: 1862-1872.
45. Zhou, L., Y. Yoshimura, Y. Huang, R. Suzuki, M. Yokoyama, M. Okabe, and M. Shimamura. 2000. Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology* 101: 570-580.
46. LeBouder, E., J. E. Rey-Nores, A. C. Raby, M. Affolter, K. Vidal, C. A. Thornton, and M. O. Labeta. 2006. Modulation of neonatal microbial recognition: TLR-mediated innate immune responses are specifically and differentially modulated by human milk. *J Immunol* 176: 3742-3752.
47. Muller, G., I. Bernsau, W. Muller, E. Weissbarth-Riedel, J. Natzschka, and C. H. Rieger. 1986. Cow milk protein antigens and antibodies in serum of premature infants during the first 10 days of life. *The Journal of pediatrics* 109: 869-873.
48. Axelsson, I., I. Jakobsson, T. Lindberg, S. Polberger, B. Benediktsson, and N. Raiha. 1989. Macromolecular absorption in preterm and term infants. *Acta paediatrica Scandinavica* 78: 532-537.
49. Mosconi, E., A. Rekima, B. Seitz-Polski, A. Kanda, S. Fleury, E. Tissandie, R. Monteiro, D. D. Dombrowicz, V. Julia, N. Glaichenhaus, and V. Verhasselt. 2010. Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal immunology* 3: 461-474.
50. Shea-Eaton, W. K., P. P. Lee, and M. M. Ip. 2001. Regulation of milk protein gene expression in normal mammary epithelial cells by tumor necrosis factor. *Endocrinology* 142: 2558-2568.
51. Abderrahim-Ferkoune, A., O. Bezy, C. Chiellini, M. Maffei, P. Grimaldi, F. Bonino, N. Moustaid-Moussa, F. Pasqualini, A. Mantovani, G. Ailhaud, and E. Z. Amri. 2003. Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells. *Journal of lipid research* 44: 994-1000.
52. Sone, S., H. Tsutsumi, R. Takeuchi, K. Matsuda, S. Imai, P. L. Ogra, and S. Chiba. 1997. Enhanced cytokine production by milk macrophages following infection with respiratory syncytial virus. *J Leukoc Biol* 61: 630-636.
53. Hawkes, J. S., D. L. Bryan, and R. A. Gibson. 2002. Cytokine production by human milk cells and peripheral blood mononuclear cells from the same mothers. *J Clin Immunol* 22: 338-344.
54. Bottazzi, B., V. Vouret-Craviari, A. Bastone, L. De Gioia, C. Matteucci, G. Peri, F. Spreafico, M. Pausa, C. D'Ettorre, E. Gianazza, A. Tagliabue, M. Salmona, F. Tedesco, M. Introna, and A. Mantovani. 1997. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *The Journal of biological chemistry* 272: 32817-32823.
55. Ma, L. J., B. Walter, A. Deguzman, H. K. Muller, and A. M. Walker. 2008. Trans-epithelial immune cell transfer during suckling modulates delayed-type hypersensitivity in recipients as a function of gender. *PLoS One* 3: e3562.
56. Pabst, H. F., J. Godel, M. Grace, H. Cho, and D. W. Spady. 1989. Effect of breast-feeding on immune response to BCG vaccination. *Lancet* 1: 295-297.
57. Schlesinger, J. J., and H. D. Covelli. 1977. Evidence for transmission of lymphocyte responses to tuberculin by breast-feeding. *Lancet* 2: 529-532.

For Peer Review Only - Not to be distributed or Destroyed after use.

58. Adkins, B., C. Leclerc, and S. Marshall-Clarke. 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol* 4: 553-564.
59. D'Angelo, C., A. De Luca, T. Zelante, P. Bonifazi, S. Moretti, G. Giovannini, R. G. Iannitti, S. Zagarella, S. Bozza, S. Campo, G. Salvatori, and L. Romani. 2009. Exogenous pentraxin 3 restores antifungal resistance and restrains inflammation in murine chronic granulomatous disease. *J Immunol* 183: 4609-4618.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure legends

Figure 1. Analysis of PTX3 expression in neonates. **A**. Levels of circulating PTX3 were quantified by ELISA in the sera of cord blood (n=11) and healthy adults (n=27). **B**. Neonate (5 days old C57BL/6 mice) or adult mice (8 weeks old C57BL/6 mice) were injected i.p. with 4 mg/kg LPS and the levels of circulating PTX3 were determined 5 hours later by ELISA. **A&B.** Results are expressed in ng/ml (mean ± SEM). *P≤0.05; ***P≤0.001; two-tailed Student's *t* test.

Figure 2. Analysis of PTX3 expression in human milk. A. The levels of PTX3 in human colostrum were determined by ELISA in day 1 (D1) to day 4 (D4) post-partum. **B**. The levels of PTX3 in the sera of pregnant healthy women (12 hours before delivery) (D-1) (○), in the sera collected at day 2 after delivery (D2) (●), in the cell-free milk of the same mothers at D2 (□) and, in the sera of healthy subjects (▲), were determined by ELISA. **A&B**. Results are expressed in ng/ml (mean ± SEM). ***P≤0.001; two-tailed Student's *t* test. **C**. Western Blotting analysis of PTX3 in milk formula and in human colostrums collected at day 1 (D1), D2 and D3 postpartum. Recombinant human PTX3 (10 ng/lane) was used as a positive control.

Figure 3. Identification of the PTX3-producing cells. A. Analysis of PTX3 mRNA expression by RT-PCR in human tissues (left panel) and in non stimulated human mammary epithelial cell lines (right panel). **B**. The spontaneous production of PTX3 by human mammary epithelial cell lines (MCF-10A, MDA-MD-231 and MDA-MD-435) was determined by ELISA in the supernatants collected at the indicated times. **C**. PTX3 secretion was quantified by ELISA in the supernatants of MCF-10A cells stimulated for 24 hours with the indicated concentrations of TNFα and IL-1β. **B** & **C**. Results are expressed in ng/ml (mean ± SD, n=6); * P<0.05; two-tailed Student's *t* test. **D**. Western Blotting analysis of PTX3 expression by total HMC isolated from 2 donors. Neutrophil lysate from an healthy adult was used as a positive control. **E**. Western-blotting analysis of PTX3 expression in cell lysates from total HMC (lane 1) and from $CD11b^-$ $EpCAM^+$ (lane 2) and $CD11b^+$ $EpCAM^-$ (lane 3) cells. Results are representative of one of 3 independent experiments.

Figure 4. Regulation of PTX3 expression by human breast milk. **A** & **B**. PTX3 was quantified by ELISA in the supernatants of dendritic cells stimulated 16 hours with 2.5 ng/ml

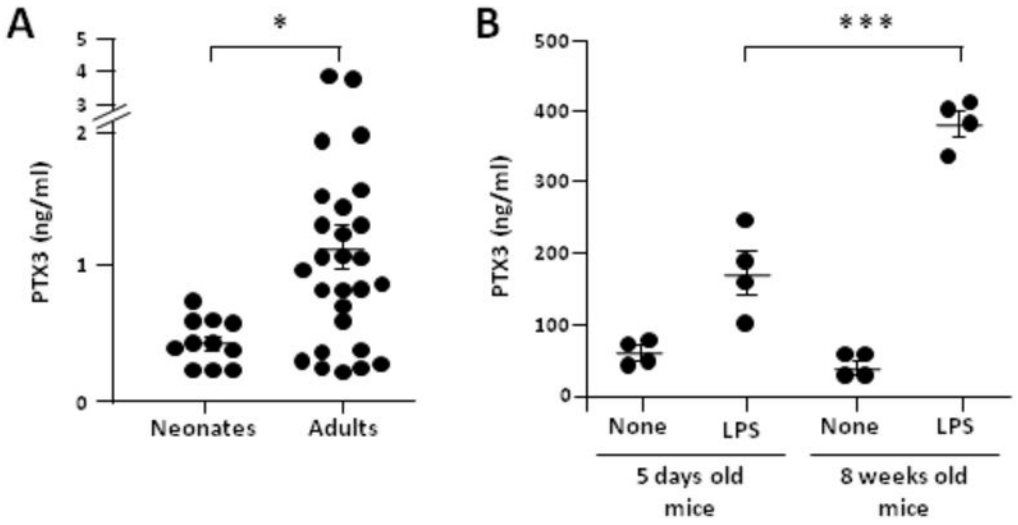
For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

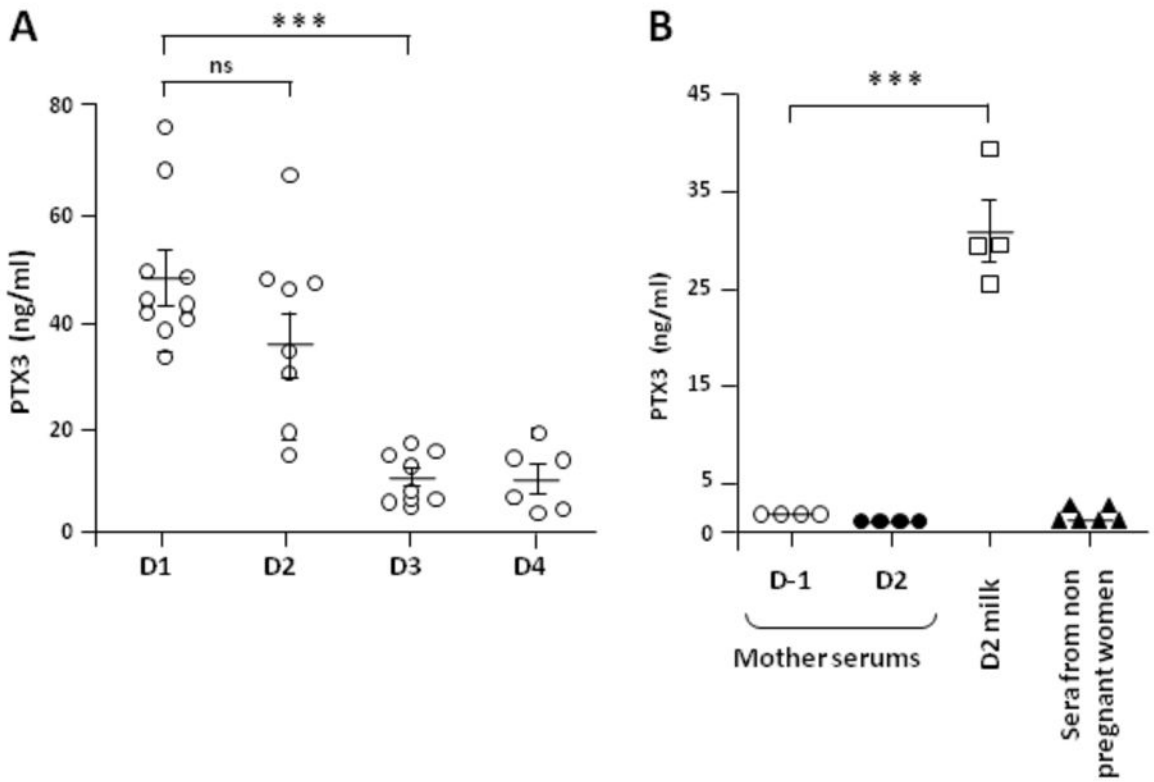
LPS, supplemented or not with 0.125% human colostrum collected at D1 (**A,B**), D4 (**B**) or milk collected at D30 (**B**). Results were expressed in ng/ml (mean ± SD, n=6); * P<0.05. two-tailed Student's *t* test. **C**. Western Blotting analysis of PTX3 secretion by human neonate monocytes stimulated for 16 h with 5 ng/ml LPS supplemented or not with 2% D1 colostrum. Results are representative of one of three experiments. **D**. PTX3 was quantified by ELISA in the supernatants of dendritic cells stimulated for 16 h with LPS, Pam3CSK4, Poly[I:C] or TNFα plus IL-1β (used at the indicated contentrations), with or without 0.125% D1 colostrum. **E**. Analysis of PTX3 secretion in the supernatants of dendritic cells stimulated for 16 h with 2.5 ng/ml LPS supplemented or not with 0.125% D1 colostrum, previously depleted or not in sCD14. **D&E**. Results were expressed in ng/ml (mean ± SD, n=6); * P<0.05. two-tailed Student's *t* test.

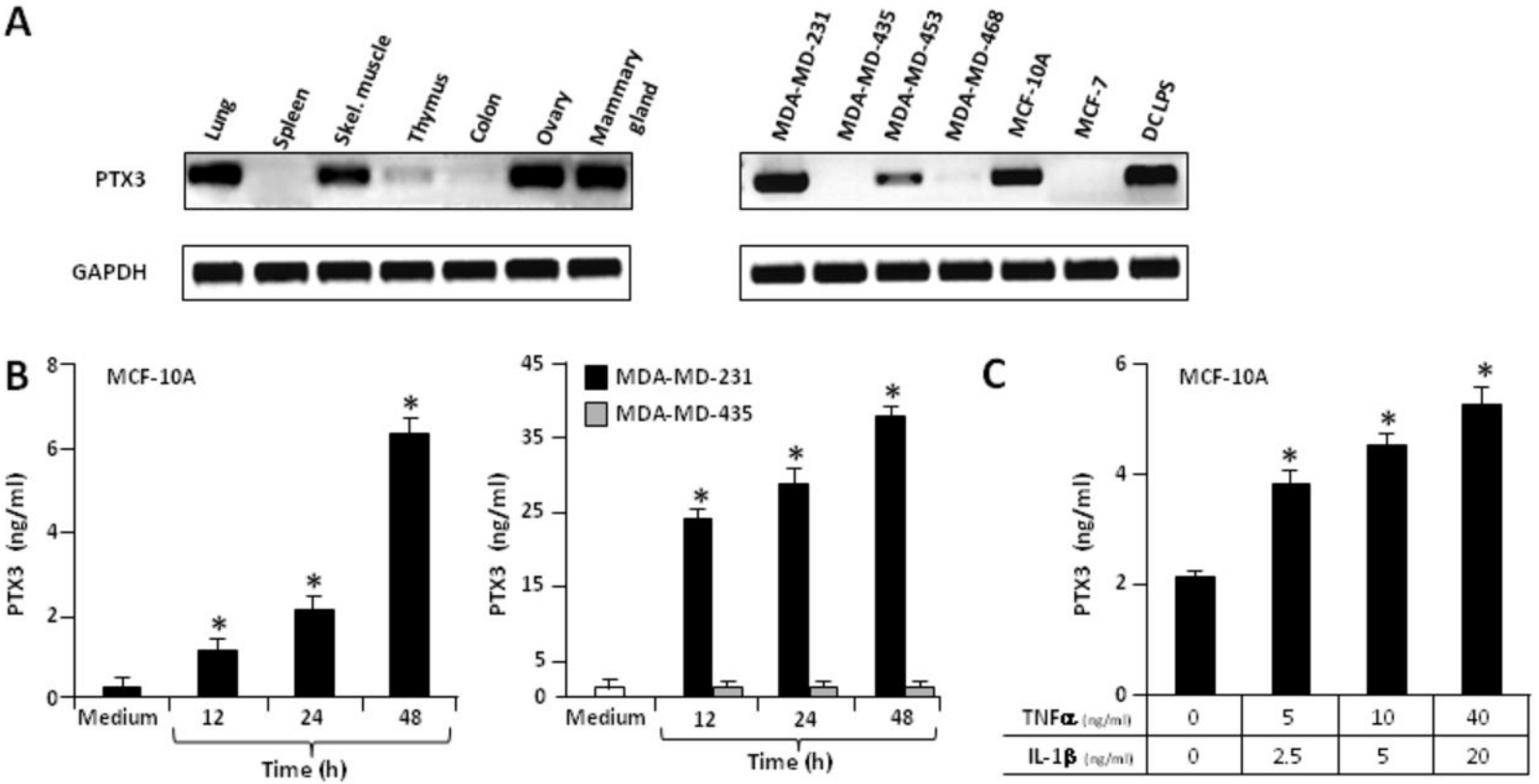
Figure 5. Analysis of tissue distribution of orally administered PTX3 in neonate mice. **A**. Western Blotting analysis of biotin-labeled PTX3 in different organs collected 15 min and 45 min after gavage of 5 days-old C57BL/6 mice with 5 µg biotin-labeled PTX3. Results are representative of one of 4 experiments. **B**. Western Blotting analysis of PTX3 expression in murine and human colostrums. Colostrum (1 µl/lane) was collected at day 1 post-partum **C.** Quantification of Ptx3 in the sera of $Ptx3^{-/-}$, $Ptx3^{+/-}$ and $Ptx3^{+/+}$ neonate mice born and breastfed by $Ptx3^{+/-}$ or $Ptx3^{-/-}$ female mice. Sera were collected at days 1, 4 or 8 post partum. Ptx3 was also quantified in the sera of adult $Ptx3^{-/-}$ and $Ptx3^{+/+}$ mice. Results are expressed in ng/ml (mean ± SEM). **D.** Immunostaining analysis for Ptx3 in lung sections of $Ptx3^{-/-}$, $Ptx3^{+/-}$ and $Ptx3^{+/+}$ neonate mice (8 days-old) born and breastfed by $Ptx3^{-/-}$ or $Ptx3^{+/-}$ female mice.

For Peer Review. Do not distribute. Destroy after use.

Figure 1
Jaillon S *et al*




A
***
ns
PTX3 (ng/ml)
80
60
40
20
0
D1
D2
D3
D4
B
***
PTX3 (ng/ml)
45
35
25
15
5
0
D-1
D2
Mother serums
D2 milk
Sera from non pregnant women
C
MW (kDa)
Colostrum
D1
D2
D3
Form. milk
Rec PTX3
220
120
80
50
40


A
Lung
Spleen
Skel. muscle
Thymus
Colon
Ovary
Mammary gland
MDA-MD-231
MDA-MD-435
MDA-MD-453
MDA-MD-468
MCF-10A
MCF-7
DC LPS
PTX3
GAPDH
B
MCF-10A
PTX3 (ng/ml)
Medium
12
24
48
Time (h)
MDA-MD-231
MDA-MD-435
C
MCF-10A
TNFα (ng/ml) 0 5 10 40
IL-1β (ng/ml) 0 2.5 5 20
D
Total HMC
MW (kDa)
Donor 1
Donor 2
Neutrophils
120
80
50
40
E
1 2 3
PTX3
Actin
1: Total HMC
2: CD11b- EpCAM+ cells
3: CD11b+ EpCAM- cells

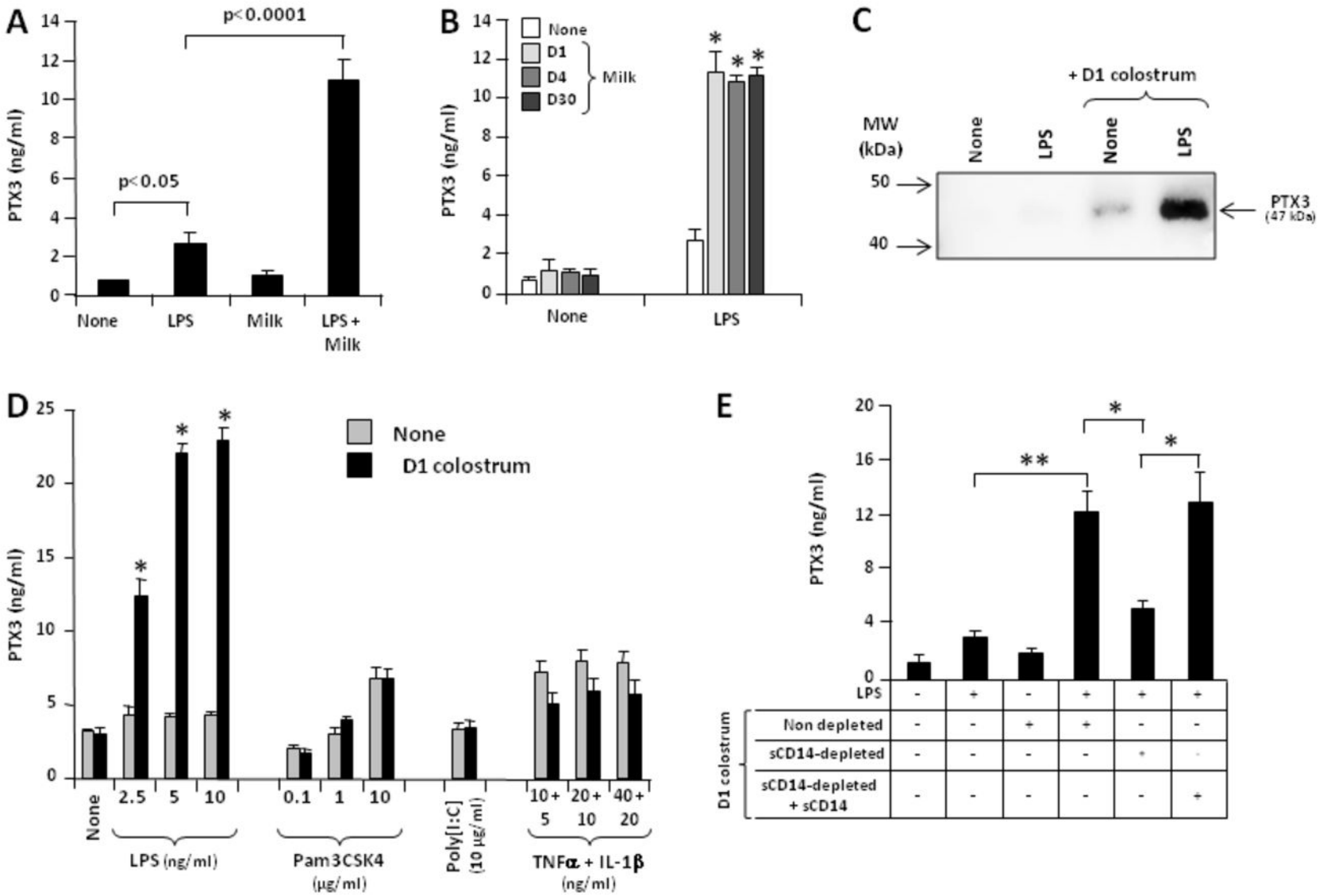
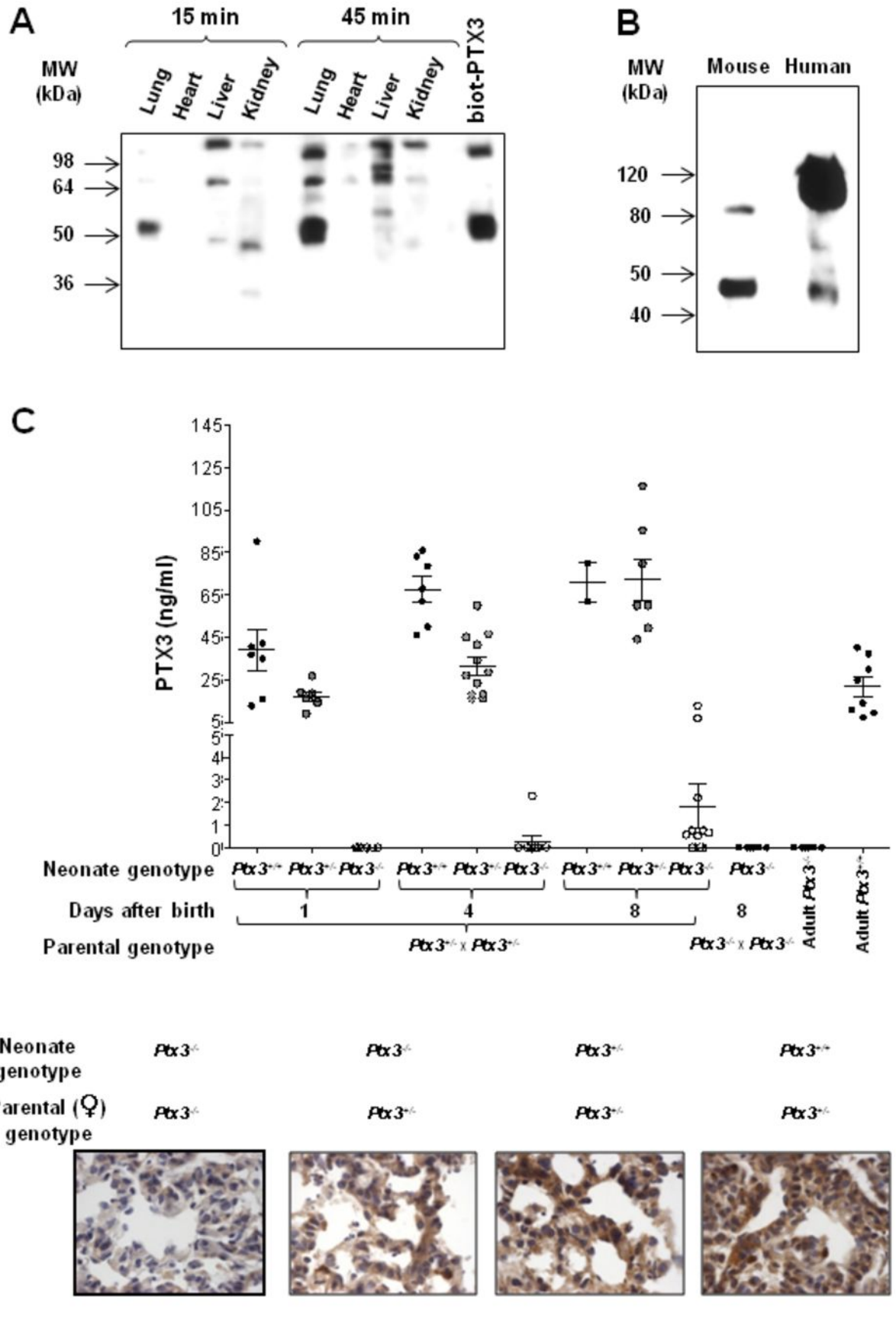

A
PTX3 (ng/ml)
p<0.0001
p<0.05
None
LPS
Milk
LPS + Milk
B
PTX3 (ng/ml)
None
D1
D4
D30
Milk
None
LPS
C
+ D1 colostrum
MW (kDa)
None
LPS
None
LPS
50
40
PTX3 (47 kDa)
D
PTX3 (ng/ml)
None
D1 colostrum
None
2.5
5
10
0.1
1
10
Poly[I:C] (10 µg/ml)
10 + 5
20 + 10
40 + 20
LPS (ng/ml)
Pam3CSK4 (µg/ml)
TNFα + IL-1β (ng/ml)
E
PTX3 (ng/ml)
LPS
D1 colostrum
Non depleted
sCD14-depleted
sCD14-depleted + sCD14

Figure 5
Jaillon S *et al*



Annexe 2

PTX3 est relocalisée à la membrane des neutrophiles en apoptose tardive et est impliquée dans leur capture par les macrophages

« Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages »

Sébastien Jaillon, Pascale Jeannin, Yveline Hamon, Isabelle Frémaux, Andrea Doni, Barbara Bottazzi, Simon Blanchard, Jean-François Subra, Allain Chevailler, Alberto Mantovani, Yves Delneste

Cell Death and Differentiation (2009) 16, 465–474

Introduction

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle essentiel dans l'embryogénèse, l'homéostasie cellulaire et tissulaire et la résolution de l'inflammation. Les cellules apoptotiques doivent être rapidement éliminées par des phagocytes professionnels (macrophages et cellules dendritiques) et par des phagocytes non-professionnels (e.g. fibroblastes) pour éviter la libération de molécules intracellulaires qui pourraient entraîner des dommages tissulaires, une inflammation chronique ou l'apparition de maladies auto-immunes [384]. La phagocytose des cellules apoptotiques fait intervenir trois acteurs moléculaires : (i) les signaux exprimés à la surface des cellules apoptotiques (appelés signaux « eat-me »), tels que la phosphatidylsérine (PS), ou des molécules membranaires altérées lors du processus d'apoptose (oxydation, modification des chaînes sucrées,…), (ii) les récepteurs d'endocytose, tels que les Scavenger receptors (e.g. LOX-1, SR-AI, stabilin-2), Tim-1 et Tim-4, et (iii) les récepteurs solubles, tels que C1q, « mannose binding lectin » ou MBL, ficollines 2 et 3, « milk fat globule epidermal growth factor 8 » ou MFG-E8 et les pentraxines CRP et SAP, qui servent de ponts moléculaires entre les cellules apoptotiques et les phagocytes (« bridging molecules »).

La famille des pentraxines comprend les pentraxines courtes, CRP et SAP, et la pentraxine longue PTX3. A l'inverse des pentraxines courtes qui sont produites par les hépatocytes, PTX3 est principalement produite par les cellules myéloïdes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales, en réponse à des médiateurs pro-inflammatoires (agonistes des TLRs et cytokines pro-inflammatoires) [147]. PTX3 fixe des molécules du soi (e.g. C1q), du non-soi (e.g. micro-organismes) et du soi-modifié (e.g. cellules en apoptose tardive). Bien que PTX3 favorise la reconnaissance des micro-organismes [177], elle inhibe la capture des cellules apoptotiques par les phagocytes [199, 200, 385].

Nous avons précédemment montré que PTX3 est stockée dans les granules de neutrophiles [83], cellules qui ont une durée de vie courte et qui meurent spontanément par apoptose.

L'objectif de cette étude a donc été de déterminer si PTX3 endogène participe à l'élimination des neutrophiles apoptotiques par les phagocytes.

Présentation des résultats

Nous avons tout d'abord mis en évidence la présence de PTX3 à la surface des neutrophiles en apoptose tardive. Cette expression en surface ne résulte pas d'une fixation de

PTX3 soluble libérée par les cellules mortes mais d'une relocalisation de PTX3 intracellulaire à la surface de la cellule. De plus, la cinétique d'expression de PTX3 à la surface des neutrophiles en culture est dépendante du temps et parallèle à l'apparition des neutrophiles en apoptose tardive.

La protéinase 3 (PR3) est une molécule contenue dans les granules primaires, secondaires et tertiaires du neutrophile et qui se relocalise de manière précoce à la surface du neutrophile lors de l'apoptose. Nos résultats confirment l'expression de PR3 à la surface des neutrophiles en apoptose précoce avec une augmentation d'expression sur les cellules en apoptose tardive. De plus, PTX3 et PR3 colocalisent à la surface des neutrophiles en apoptose tardive ce qui suggère une translocation séquentielle de PR3 contenue dans les granules primaires, suivi de la translocation de PR3 et PTX3 contenues dans les granules secondaires.

L'apoptose induit des changements morphologiques de la cellule, notamment le bourgeonnement membranaire ou « blebbing ». La formation de ces bourgeons membranaires est dépendante de l'activité de la caspase 3 qui active la kinase « Rho-associated kinase-I » (ROCK-I). L'utilisation d'un inhibiteur de ROCK-I réduit l'expression membranaire de PTX3 sur les neutrophiles en apoptose tardive, suggérant que la relocalisation de PTX3 dans les bourgeons est un processus actif, dépendant des caspases et de la kinase ROCK-I.

Enfin, nous avons montré que PTX3 à la membrane des neutrophiles en apoptose tardive favorise leur capture par les macrophages.

Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la fonction de « eat me » molécule que joue PTX3 lorsqu'elle se localise à la membrane des neutrophiles en apoptose tardive et qu'elle s'accumule au niveau des bourgeons pour faciliter leur élimination par les macrophages.

Cell Death and Differentiation (2009) 16, 465–474
© 2009 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1350-9047/09 $32.00
www.nature.com/cdd

Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages

S Jaillon[1,2,7], P Jeannin[1,2,3], Y Hamon[1,2], I Frémaux[1,2], A Doni[4], B Bottazzi[4], S Blanchard[1,2,3], J-F Subra[5,6], A Chevailler[3,6], A Mantovani[4] and Y Delneste*[,1,2,3]

Neutrophils are short-lived innate immune cells that rapidly die by apoptosis. A rapid and efficient clearance of apoptotic cells is crucial to avoid autoimmunity. This process involves cell alterations, endocytic receptors expressed by phagocytic cells and soluble bridging molecules (opsonins) that facilitate internalization of apoptotic cells by phagocytes. Neutrophils constitutively express the prototypic long pentraxin PTX3 that binds to apoptotic cells and modulates their clearance. We thus evaluated whether endogenous PTX3 may interfere with the capture of apoptotic neutrophils. We observed that PTX3 accumulates in blebs at the surface of late apoptotic neutrophils, resulting from its active translocation from granules to the membrane. A neutralizing anti-PTX3 monoclonal Ab (mAb) inhibits the capture of late apoptotic neutrophils by macrophages. This study shows that intracellular PTX3 translocates at the surface of late apoptotic neutrophils and acts as an 'eat-me' molecule for their recognition and capture by macrophages.
Cell Death and Differentiation (2009) **16,** 465–474; doi:10.1038/cdd.2008.173; published online 12 December 2008

Apoptosis is a physiological cell death process involved in embryogenesis, tissue turnover and resorption of inflammation. Apoptotic cells are rapidly and efficiently cleared by professional and non-professional phagocytic cells. They do not release proinflammatory intracellular components, such as high-mobility group box-1,[1] thereby avoiding phagocyte activation. Apoptotic cells trigger an anti-inflammatory program and render phagocytic cells unresponsive to a subsequent activation by a toll-like receptor (TLR) agonist.[2,3] Accordingly, the presentation of particulate exogenous antigens by antigen-presenting cells (APCs) requires the presence of a TLR agonist within the phagocytosed cargo.[4] Finally, the capture of apoptotic cells *in vivo* protects against a subsequent lipopolysaccharide-induced septic shock.[5] The immunosuppressive response induced by apoptotic cells may ultimately avoid the initiation of an inappropriate autoimmune response.[3,6] A defect in apoptotic cell clearance has been associated with some autoimmune diseases, as reported in systemic lupus erythematosus.[7] Mice deficient in receptors involved in apoptotic cell recognition (such as C1q- or MER-deficient mice) have a profound defect in apoptotic cell clearance and develop systemic autoimmunity.[8,9] Lastly, it is assumed that a delayed elimination of apoptotic cells may also result in the appearance of necrotic cells that may favor the initiation of autoimmune responses.

In addition to morphological modifications (e.g. cell shrinkage and nucleus condensation), apoptotic cells exhibit cell surface phenotypical alterations such as externalization of phosphatidyl serine (PS), membrane relocalization of intracellular components (e.g. endoplasmic reticulum proteins and nucleosomes) and modulation of membrane markers.[10–12] Such modifications of cell surface molecules are a prerequisite for apoptotic cell clearance by phagocytes.[12] Recognition and engulfment of apoptotic cells involve endocytic receptors expressed by phagocytes, such as the recently identified PS receptor T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule (TIM)-1 and TIM-4, the CD36/$\alpha v\beta 3$ complex, MER or members of the scavenger receptor family (such as lectin-like oxidized low-density-lipoprotein (ox-LDL) receptor-1, SR-A1 and stabilin-2).[6,13–15] Apoptotic cells are also opsonized by soluble bridging molecules (also called opsonins) that favor their recognition by phagocytes. Among these soluble molecules, Gas-6, milk fat globule factor-E8, thrombospondin (TSP), the complement components iC3b and C1q, mannose-binding lectin and the pentraxins serum amyloid P (SAP) and C-reactive protein (CRP) favor apoptotic cell clearance.[6]

The pentraxin family contains mainly the two short pentraxins, SAP and CRP (also referred to as acute-phase proteins), and the prototypic long pentraxin PTX3.[16,17] In contrast to the short pentraxins that are produced in the liver,

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U564, Angers, France; [2]University of Angers, UMR-S 564, Angers, France; [3]Immunology and Allergology Laboratory, University Hospital of Angers, Angers, France; [4]Immunology and Inflammation Research Laboratory, Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (Milan), Italy; [5]Service de Néphrologie, University Hospital of Angers, Angers, France and [6]UPRES EA3863, University of Angers, Angers, France
*Corresponding author: Y Delneste, Inserm Unit 564, University Hospital of Angers, Bâtiment Montéclair, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France.
Tel: +33 (0) 241 354 727; Fax: +33 (0) 241 731 630; E-mail: yves.delneste@univ-angers.fr
[7]Present address: Research Laboratory in Immunology and Inflammation, Istituto Clinico Humanitas, Via Manzoni 113, 20089 Rozzano (Milan), Italy
Keywords: neutrophil; apoptosis; PTX3; macrophage; engulfment
Abbreviations: APCs, antigen-presenting cells; CRP, C-reactive protein; DMSO, dimethyl sulfoxide; FACS, fluorescence-activated cell sorting; MPO, myeloperoxidase; PI, propidium iodide; PR3, proteinase 3; PS, phosphatidyl serine; PTX, pentraxin; ROCK-I, Rho-associated kinase-I; SAP, serum amyloid P; TIM, T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule; TLR, toll-like receptor; TSP, thrombospondin
Received 05.5.08; revised 08.10.08; accepted 27.10.08; Edited by M Piacentini; published online 12.12.08

PTX3 is produced mainly by myeloid cells, endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts in response to proinflammatory mediators (TLR agonists and TNFα).[16,18] PTX3 binds self (C1q),[19] non self (microbes)[18] and modified self (late apoptotic cells).[20] Although PTX3 favors the capture of microorganisms,[18] it inhibits the engulfment of apoptotic cells by phagocytes.[20–22]

Recently, we have reported that PTX3 is constitutively expressed by human neutrophils,[23] which are short-lived cells that spontaneously die by apoptosis. The aim of this study was thus to evaluate whether endogenous PTX3 may interfere with the clearance of apoptotic neutrophils. Results showed that endogenous PTX3 translocates at the surface of late apoptotic neutrophils and is involved in their uptake by macrophages.

Results

Detection of PTX3 at the surface of apoptotic neutrophils. In the first set of experiments, we evaluated the expression of PTX3 on apoptotic neutrophils. Membrane PTX3 was evaluated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) on freshly isolated living cells, spontaneously dying neutrophils (48 h culture) and necrotic neutrophils (heated cells) using the anti-PTX3 monoclonal Ab (mAb) 16B5. Membrane PTX3 was detected at the surface of a fraction of apoptotic neutrophils (AnnexinV$^+$) but not on live neutrophils (AnnexinV$^-$PI$^-$) (Figure 1a). No or low membrane PTX3 was detected on necrotic neutrophils (AnnexinV$^+$PI^{++}) (Figure 1a). No binding of the isotype control mAb was observed on the different cell populations analyzed (Figure 1a). A three-color analysis evidenced membrane PTX3 on late (AnnexinV$^+$PI$^+$) but not on early apoptotic neutrophils (AnnexinV$^+$PI$^-$) (Figure 1b). Similar results were obtained using a polyclonal anti-PTX3 Ab (data not shown).

Importantly, membrane PTX3 expression was never observed at the surface of live neutrophils stimulated with microbes or TLR agonists (data not shown), suggesting that membrane PTX3 translocation occurs selectively during the apoptotic process.

Cell surface molecules can be modified during the apoptotic process (i.e. oxidation and changes in sugar chains). We thus evaluated whether apoptosis may affect PTX3 and/or generate a neo-epitope recognized by the 16B5 mAb. Two-dimensional (2D) electrophoresis followed by western blotting revealed that only one protein is recognized by the 16B5 mAb in late apoptotic (Figure 1c, middle panel) and freshly isolated neutrophils (Figure 1c, left panel) that exhibits the same biochemical characteristics than recombinant PTX3 (Figure 1c, right panel). These data show that the biochemical characteristics of PTX3 are not modified in late apoptotic neutrophils and that 16B5 did not recognize a new epitope generated during the apoptotic process.

Membrane PTX3 was preferentially expressed at the surface of apoptotic rather than necrotic cells (Figure 1a). It was thus important to exclude that the absence or low expression of membrane PTX3 at the surface of necrotic neutrophils did not result from a destruction of the 16B5 epitope during the necrotic process. Western blotting showed that PTX3 immunoreactivity was equivalent in freshly isolated, 48 h-cultured and necrotic neutrophils (Supplementary Figure 1). Moreover, the ability of 16B5 to recognize membrane PTX3 expressed at the surface of apoptotic cells was not affected by heating (Supplementary Figure 1), showing that the lower frequency of membrane PTX3$^+$ necrotic cells compared with apoptotic cells did not result from an alteration of PTX3 immunoreactivity during the necrotic process.

Collectively, these results show that, among dying cells, PTX3 is selectively detected at the surface of late apoptotic neutrophils.

Membrane PTX3 does not result from a binding of soluble PTX3 released by dying neutrophils to the membrane of apoptotic cells. PTX3 is rapidly released from neutrophils on stimulation with microorganisms or TLR agonists,[23] and recombinant PTX3 binds to late apoptotic cells.[20–22] The detection of membrane PTX3 on late apoptotic cells may result from (i) a passive entry of the anti-PTX3 mAb, (ii) a binding of soluble PTX3 released by dying cells or (iii) a membrane translocation of endogenous PTX3. To evaluate the first hypothesis, the following experiments were performed. PTX3 expressed at the membrane of apoptotic neutrophils was detected by the C-terminal-specific mAb 16B5 but not by the N-terminal-specific mAb MNB4 (Figure 2a, upper panels), even when used at a high concentration (up to 50 μg/ml) (data not shown). In contrast, the two anti-PTX3 mAbs detected intracellular PTX3 in permeabilized late apoptotic neutrophils (Figure 2a, lower panels), showing that the detection of PTX3 did not result from a passive entry of the 16B5 mAb into apoptotic cells.

Rovere *et al*. reported that as low as 100 ng/ml of exogenous PTX3 binds to late apoptotic neutrophils.[20] We thus quantified the levels of PTX3 spontaneously released by neutrophils cultured for 2–72 h. Low levels of PTX3 were detected in the 2–24 h supernatants (0.96 ± 0.32 ng/ml at 24 h; mean $\pm$ S.D., $n = 6$); the highest concentrations of PTX3 were detected in the supernatants collected at 72 h (1.6 ± 0.55 ng/ml) (Figure 2b). These levels of PTX3 remained significantly lower to those detected in the supernatants of neutrophils stimulated for 24 h with *Staphylococcus aureus* (4.1 ± 0.7 ng/ml; $P < 0.01$) (Figure 2b). Moreover, western blotting analysis showed that the levels of cell-associated PTX3 were not modified after 24, 48 or 72 h of culture (Figure 2c). These results showed that the levels of PTX3 spontaneously released by cultured neutrophils are significantly lower to those required to detect exogenous PTX3 added to late apoptotic neutrophils.[20] Incubation of late apoptotic neutrophils with ice-cold acetate buffer (pH = 4.4), used to remove cell-surface-bound molecules,[24] did not affect the binding of the 16B5 mAb (data not shown). Finally, the two anti-PTX3 mAbs, 16B5 and MNB4, but not the control mAbs (Figure 2d, middle panel), detected the binding of exogenous PTX3 added to late apoptotic neutrophils (Figure 2d, right panel) when only the 16B5 mAb detected translocated PTX3 (Figure 2d, left panel).

Collectively, these data show that the expression of PTX3 at the surface of late apoptotic neutrophils is consecutive to the relocalization of intracellular PTX3 and exclude a binding of

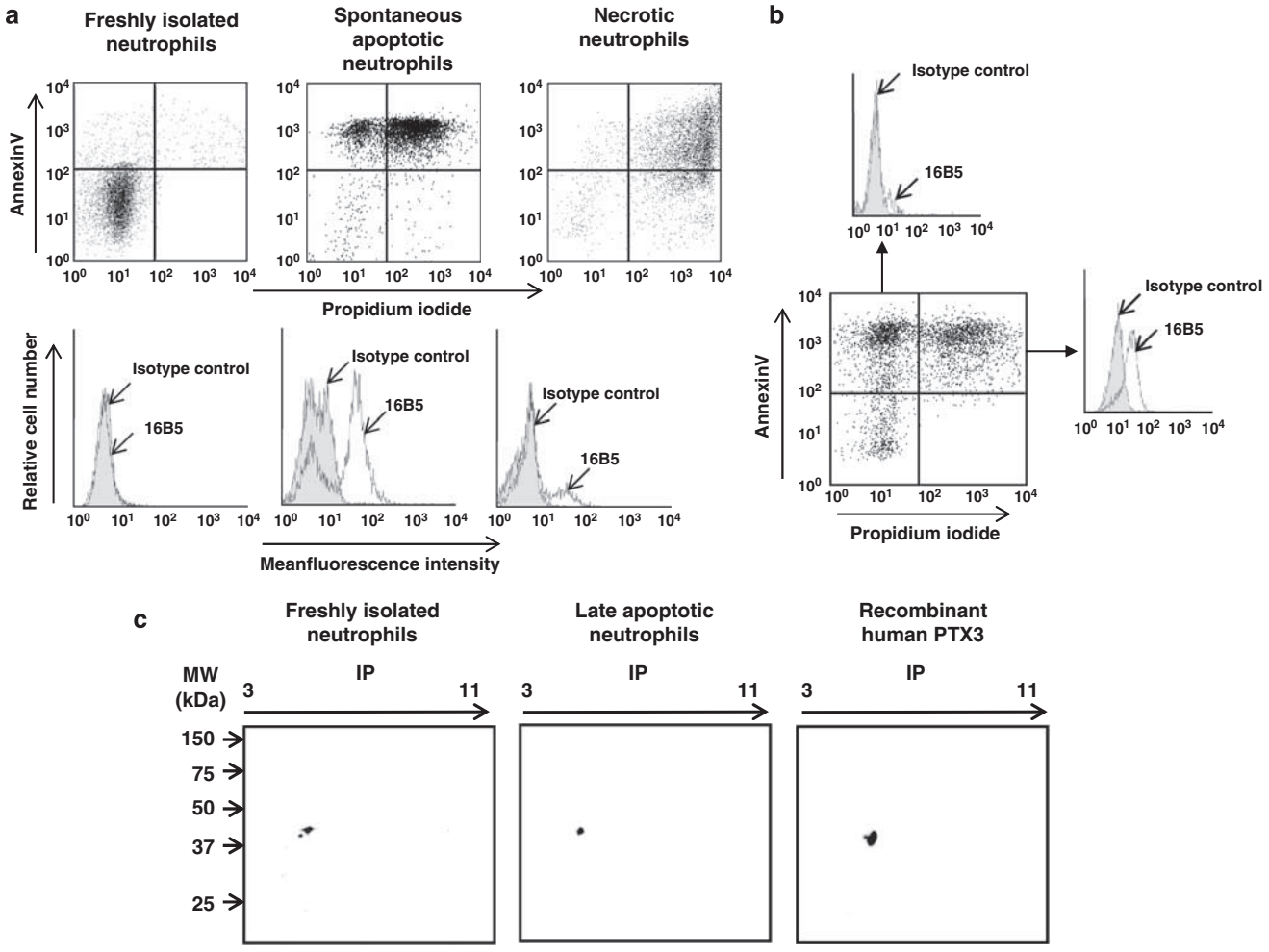


Figure 1 PTX3 is detected at the surface of late apoptotic human neutrophils. (**a**) Human neutrophils, freshly isolated (left panels), cultured for 48 h in RPMI-1640 medium containing 1% FCS (spontaneous apoptosis) (middle panels) or incubated at 56 °C for 30 min (necrosis) (right panels), were analyzed for PTX3 expression. Cell death was analyzed by propidium iodide and APC-labeled AnnexinV staining (upper panels). Membrane PTX3 expression was analyzed using the anti-PTX3 mAb 16B5 revealed with FITC-labeled anti-rat IgG Ab (lower panels). Results are representative of one out of 10 experiments. (**b**) Membrane PTX3 expression on apoptotic cells was analyzed by triple-color analysis. Neutrophils, cultured for 48 h in RPMI-1640 medium containing 1% FCS, were incubated with the anti-PTX3 mAb 16B5 revealed with FITC-labeled anti-rat IgG polyclonal Ab, APC-labeled AnnexinV and propidium iodide before analysis using an FACSAria cytofluorometer. Results are representative of one out of four experiments. (**c**) PTX3 expression in freshly isolated (left panel) or late apoptotic neutrophil lysates (middle panel) was analyzed by western blotting after two-dimensional electrophoresis. Recombinant human PTX3 (100 ng loaded; right panel) was used as a control

soluble PTX3 released during the apoptotic process. Moreover, the detection of translocated PTX3 by 16B5, but not by MNB4, mAb suggests that the pentraxin domain of PTX3 is exposed at the surface of late apoptotic neutrophils.

Kinetics of membrane PTX3 translocation on dying neutrophils. Kinetics of membrane PTX3 expression was analyzed on neutrophils from 12 different donors. The expression of PTX3 increased in a time-dependent manner at the surface of dying neutrophils and paralleled the appearance of AnnexinV$^+$PI$^+$ neutrophils ($P<0.05$); membrane PTX3 expression was detectable at 24 h and maximal at 72 h (Figure 3). The kinetics of PTX3 translocation varied from donor to donor (data not shown) and was significant at 48 and 72 h ($P<0.008$, Spearman's test). Interestingly, the frequency of apoptotic neutrophils expressing membrane PTX3 increased from 24 to 72 h, but the MFI values, reflecting the levels of PTX3 at the surface of dying neutrophils, remained equivalent, whatever the time point analyzed, suggesting that the translocation of PTX3 is an 'all-or-nothing' phenomenon.

PTX3 colocalizes with PR3 on apoptotic blebs. Proteinase 3 (PR3), which is mainly stored not only in primary granules but also in secondary and tertiary granules,[25,26] translocates early at the surface of neutrophils during the apoptotic process.[27,28] In contrast, PTX3 is localized mainly in the specific granules (lactoferrin$^+$) and is detected only at the surface of late apoptotic neutrophils (Figure 1b). We thus compared membrane PTX3 and PR3 expression on apoptotic neutrophils. Results confirmed that PR3 is expressed at the surface of early (AnnexinV$^+$PI$^-$) and late (AnnexinV$^+$PI$^+$) apoptotic neutrophils (Figure 4a, upper panels) and that the

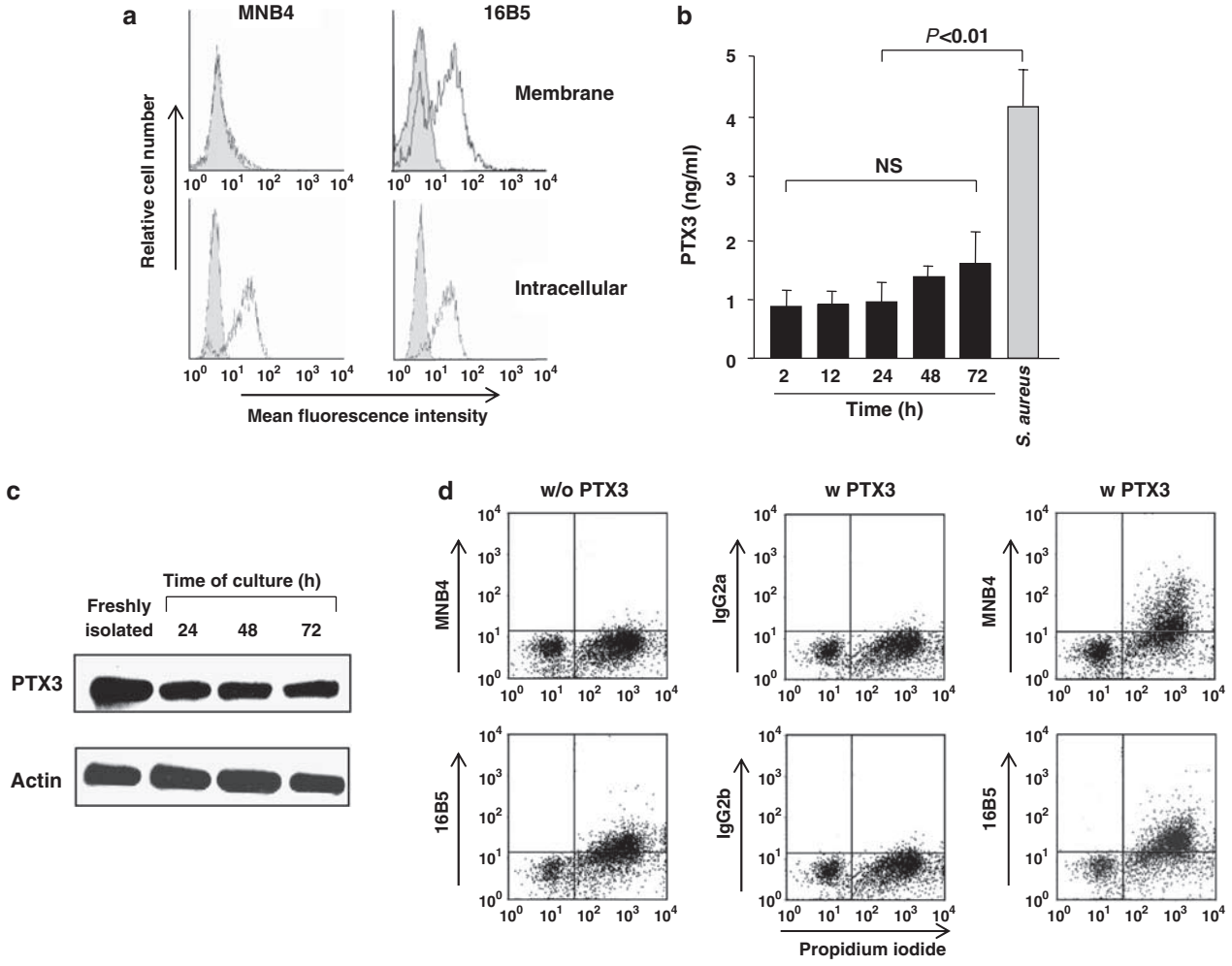


Figure 2 Membrane PTX3 does not result from a binding of soluble PTX3 to apoptotic neutrophils. (**a**) PTX3 expression in apoptotic neutrophils was analyzed in non-permeabilized (upper panels) or in permeabilized cells (lower panels) using the anti-PTX3 mAbs MNB4 and 16B5. Bound Abs were revealed using FITC-labeled goat anti-rat Abs. (**b**) The release of PTX3 in the supernatants of apoptotic neutrophils cultured for 2–72 h was determined by ELISA. As a control, PTX3 is induced on stimulation of neutrophils for 24 h with *S. aureus*. Results were expressed in ng/ml (mean ± S.D., $n = 5$). (**c**) PTX3 expression was analyzed by western blotting in freshly isolated neutrophils or neutrophils cultured for 24–72 h in RPMI-1640 medium containing 1% FCS (upper panel). Control of total protein loading was assessed by analyzing actin immunoreactivity (lower panel). (**d**) Exogenous PTX3 (100 ng/ml) was added or not to 48-h-cultured neutrophils. The binding of PTX3 at the cell surface or membrane-translocated PTX3 was analyzed by FACS using the anti-PTX3 mAbs MNB4 and 16B5. Binding of isotype control mAbs on neutrophils incubated with exogenous PTX3 is also shown. Results are representative of one out of four experiments

levels of membrane PR3 increased during the apoptotic process. Membrane PTX3 expression on the same apoptotic cells is shown (Figure 4a, lower panels). Double-color FACS analysis confirmed the expression of both PTX3 and PR3 at the membrane of 48-h-cultured neutrophils and evidenced the absence of $PTX3^+$ $PR3^-$ apoptotic neutrophils (Figure 4b). Finally, fluorescence microscopy revealed that PTX3 and PR3 are colocalized at the surface of apoptotic neutrophils (Figure 4c). These data suggest a sequential translocation of $PR3^+$ primary granules occurring early during apoptosis, followed by the translocation of $PTX3^+PR3^+$ secondary granules at later stages.

Apoptosis induces morphological modifications such as membrane blebbing. Blebbing is an active process dependent on caspases that, among other substrates, activate the kinase Rho-associated kinase-I (ROCK-I), which promotes contractile forces leading to the formation of blebs.[29] The pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk and the ROCK-I inhibitor Y-27632 inhibited, in a dose-dependent manner, the frequency of $AnnexinV^+PI^+$ apoptotic neutrophils expressing membrane PTX3. Interestingly, Y-27632 also reduced the levels of membrane PTX3 at the surface of late apoptotic cells (Figure 4d). Z-VAD-fmk or Y-27632 did not modulate the secretion of PTX3 (data not shown), showing that the decrease of membrane PTX3 expression did not result from a loss of cell-associated PTX3. These data showed that the relocalization of PTX3 on blebs is an active process depending at least on the kinase ROCK-I.

Membrane PTX3 is involved in the engulfment of late apoptotic neutrophils by macrophages. We analyzed whether translocated PTX3 is involved in the capture of late apoptotic neutrophils by macrophages. *In vitro*

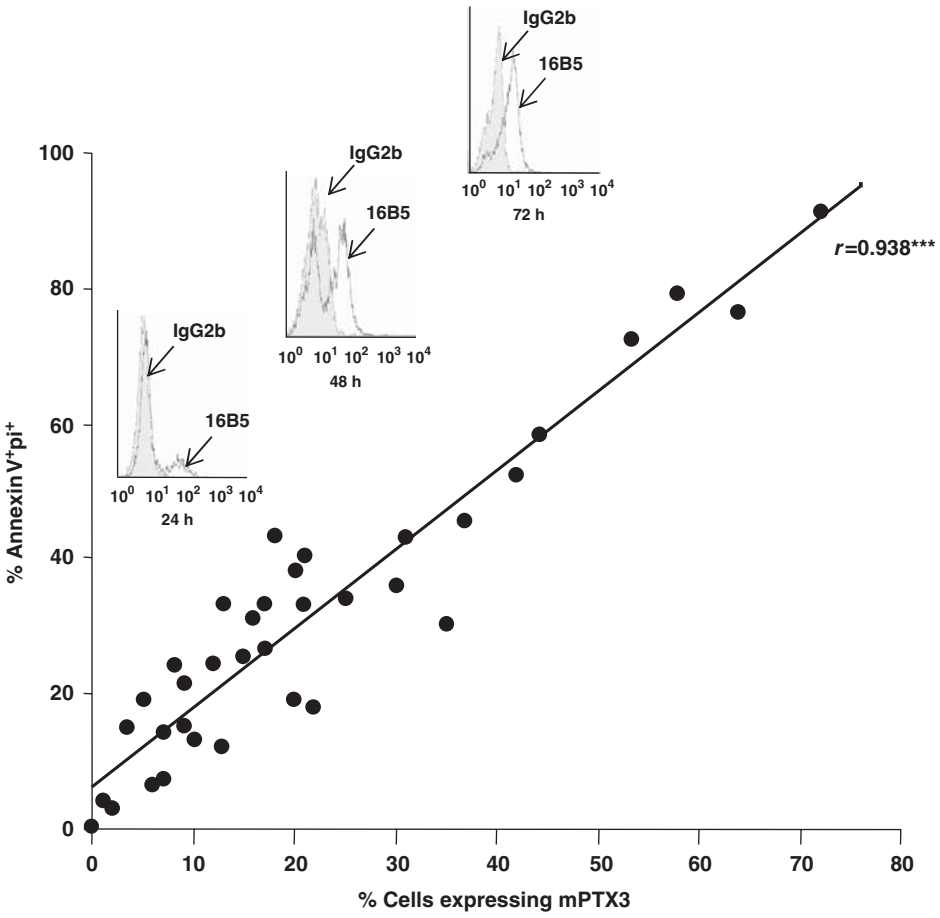


Figure 3 Kinetics of membrane PTX3 expression on dying neutrophils. Membrane PTX3 expression was analyzed by FACS on neutrophils isolated from 12 healthy subjects incubated for 24–72 h in RPMI-1640 containing 1% heat-inactivated FCS. Results are expressed as the percentage of AnnexinV$^+$PI$^+$ cells expressing membrane PTX3 at the different time points analyzed. Histograms corresponding to membrane PTX3 expression analyzed at different time points for one donor are also presented

engulfment was evaluated by FACS following protocols described earlier.[30–32] In preliminary experiments, we validated that this protocol may discriminate binding from internalization. As expected, apoptotic neutrophils, but not living neutrophils, were efficiently endocytosed by macrophages (Figure 5a). Confocal microscopy confirmed that PKH67-labeled apoptotic neutrophils were indeed internalized by macrophages (Figure 5b). The phagocytosis of late apoptotic neutrophils (Figure 5c) and of 24-h-cultured neutrophils (Figure 5c and data not shown) was prevented by the F-actin-depolymerizing agent cytochalasin D (92 ± 4% inhibition; mean $\pm$ S.D., $n = 4$), inhibitors of the phosphoinositide metabolism, wortmannin and U73122 (51 ± 6 and 83 ± 8% inhibition, respectively) and by incubating cells at 4 °C (Figure 5c); no inhibition was observed with the diluent dimethyl sulfoxide (Figure 5c). Collectively, these results confirm that FACS analysis allows discriminating internalization from binding.

We next evaluated the role of membrane PTX3 in the engulfment of late apoptotic neutrophils. Seventy-two-hour-cultured neutrophils (membrane PTX3$^+$) were incubated with anti-PTX3 or isotype control mAbs before incubation with human macrophages. The anti-PTX3 mAb 16B5 significantly inhibited the phagocytosis of late apoptotic neutrophils (58 ± 6% inhibition; mean $\pm$ S.E.M., $n = 5$) compared with the control mAb (14 ± 6% inhibition, $P < 0.0085$) (Figure 5d and e) but not the 24-h-cultured neutrophils. In contrast, MNB4 did not affect the phagocytosis of 24-h- (data not shown) and 72-h-cultured neutrophils (Figure 5e). Even though we were unable to determine which apoptotic cell type is engulfed (AnnexinV$^+$PI$^+$ or AnnexinV$^+$PI$^-$), the phagocytosis assays were carried out with apoptotic neutrophil populations containing more than 95% of AnnexinV$^+$PI$^+$. These data show that PTX3 translocated at the surface of late apoptotic neutrophils is a major 'eat-me' molecule involved in their clearance by macrophages.

Discussion

We report that endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic neutrophils, accumulates in blebs and acts as an 'eat-me' molecule for their clearance by phagocytes.

PTX3 is involved in innate immunity, inflammation and female fertility.[16] PTX3 binds to non-self (e.g. *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*), modified-self (apoptotic cells) and self components (such as C1q, the matrix component TNFα-induced protein 6 and

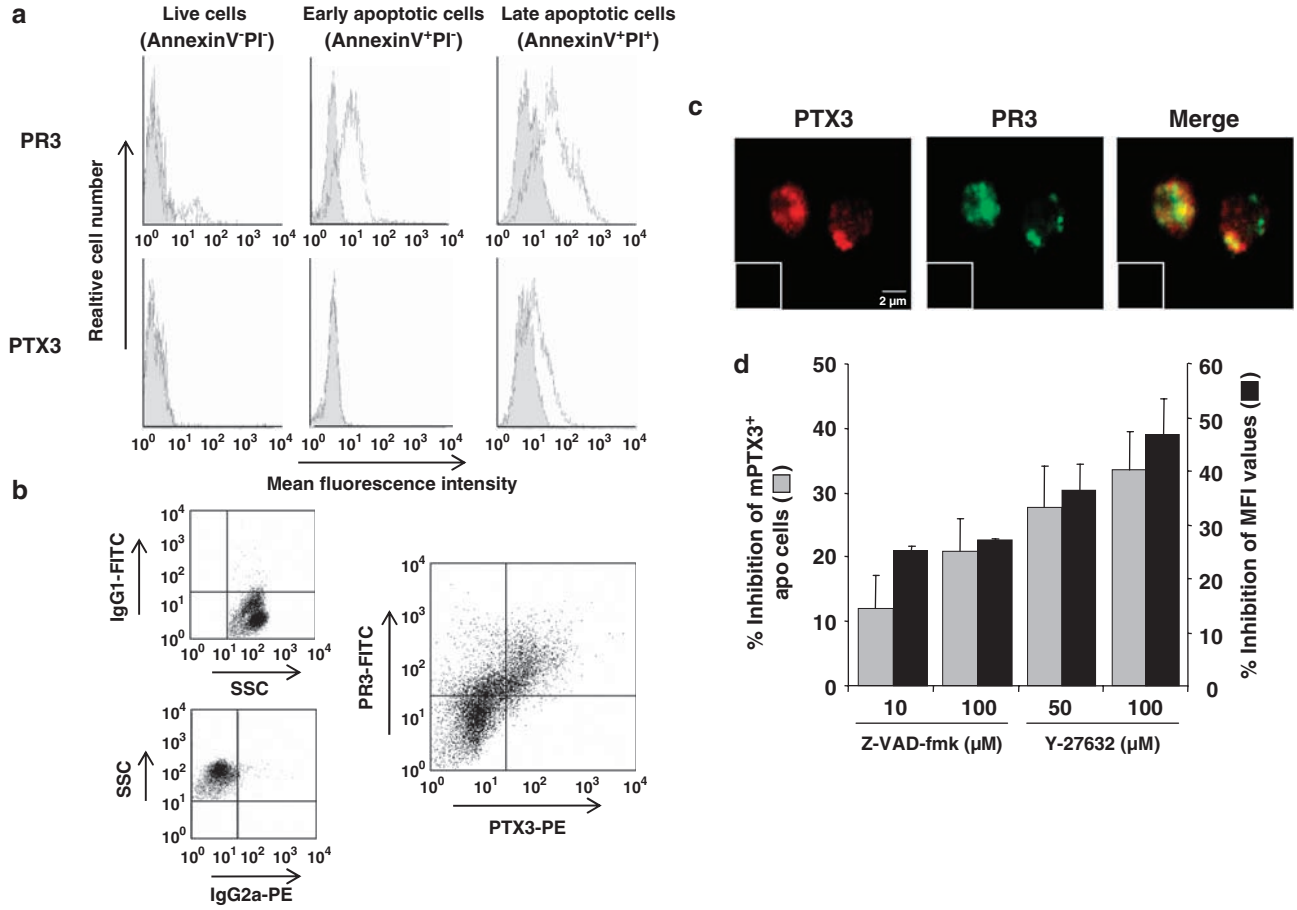


Figure 4 Membrane expression of PTX3 and PR3 at the surface of apoptotic neutrophils. (**a**) Membrane PR3 and PTX3 expression was analyzed by FACS on freshly isolated (AnnexinV$^-$PI$^-$), early apoptotic (AnnexinV$^+$PI$^-$) and late apoptotic (AnnexinV$^+$PI$^+$) neutrophils. Left histograms show fluorescence obtained with the isotype control mAb. (**b**) Membrane PTX3 and PR3 expression was evaluated by double-color FACS analysis on 48-h-cultured neutrophils using anti-PR3 mAb revealed by FITC-labeled anti-mouse IgG Ab and anti-PTX3 mAb 16B5 revealed by PE-labeled anti-rat IgG Ab. Results are representative of one out of five experiments. (**c**) Microscopy analysis of PR3 and PTX3 expression in late apoptotic neutrophils. Late apoptotic neutrophils (AnnexinV$^+$PI$^+$) were labeled with anti-PR3 mAb revealed by Alexa^{488}-labeled anti-mouse IgG Ab and anti-PTX3 mAb 16B5 revealed by PE-labeled anti-rat IgG Ab. Fluorescence was analyzed using a Leica microscope. Inserts correspond to fluorescence obtained with isotype control mAbs. (**d**) Membrane PTX3 is localized on apoptotic blebs. Neutrophils were cultured for 72 h without or with Z-VAD-fmk or the ROCK-I inhibitor Y-27632 at the indicated concentrations before analysis of membrane PTX3 expression on late apoptotic neutrophils. Results are expressed as the percentage of inhibition of the frequency of late apoptotic cells expressing membrane PTX3 (left *y* axis) and as a percentage of inhibition of the level of PTX3 expression by late apoptotic cells (right *y* axis)

FGF2).[16,19,33,34] PTX3 is produced by several cell types in response to TLR agonists or proinflammatory cytokines.[16] We recently reported that human neutrophils constitutively express PTX3.[23] PTX3 is mainly localized in lactoferrin$^+$-specific granules and is rapidly released on stimulation. It was thus important to exclude that the detection of PTX3 at the surface of apoptotic neutrophils did not result from the binding of soluble PTX3 released by the dying cells. Several lines of evidence show a membrane translocation of endogenous PTX3 during apoptosis: (i) whatever be the time point analyzed, the levels of PTX3 detected in the supernatants of dying neutrophils are lower to those required for the detection of exogenous PTX3 added to apoptotic cells,[20] (ii) the treatment of apoptotic neutrophils with a low-pH buffer did not affect the binding of anti-PTX3 mAb and (iii) the two anti-PTX3 mAbs, 16B5 and MNB4, detected PTX3 added to late apoptotic cells, whereas, in contrast, only the 16B5 mAb recognized endogenous PTX3 at the surface of late apoptotic neutrophils. Moreover, the detection of PTX3 did not result from a passive entry of mAb within late apoptotic cells, as intracellular PTX3 was detected by MNB4 only after membrane permeabilization.

Results showed that MNB4 has a different profile of binding from 16B5 when exogenous PTX3 is added. Recognition of dying cells by phagocytes is dependent on the expression of molecules, allowing them to be discriminated from viable cells. These molecules can result from biochemical modifications (oxidation, changes in the sugar chains of glycoproteins and glycolipids), neo-expression (such as TSP-1)[35] or membrane relocalization of intracellular molecules (e.g., PS externalization).[10,12] The profile of MNB4 binding in the presence of exogenous PTX3 may result from the interaction of the C-terminal domain containing the pentraxin motif to neo-expressed motifs at the surface of apoptotic cells, leaving the N-terminal domain accessible to the MNB4 mAb. Binding heterogeneity may also be related to the fact that apoptosis is

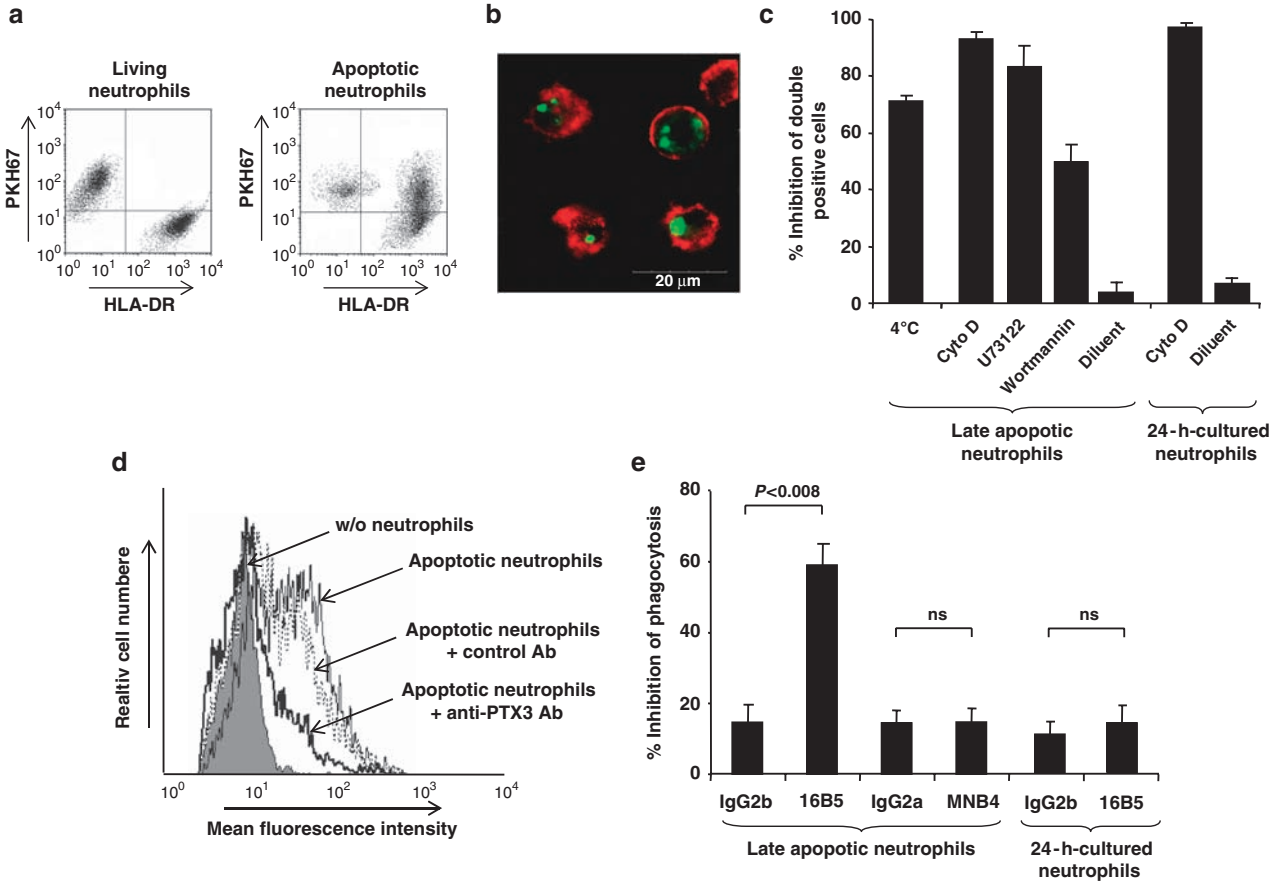


Figure 5 Membrane PTX3 expressed by late apoptotic neutrophils is involved in their phagocytosis by macrophages. (**a**) PKH67-labeled living and late apoptotic neutrophils were incubated with macrophages for 30 min at 37 °C. After washings, macrophages were incubated with anti-HLA-DR mAb revealed by PE-labeled anti-mouse IgG Ab. Fluorescence was analyzed by FACS. Representative results of one out of four experiments are presented. (**b**) Analysis of apoptotic neutrophil engulfment by confocal microscopy. After incubation with PKH67-labeled late apoptotic neutrophils, macrophages were washed and incubated with anti-HLA-DR mAb revealed by PE-labeled anti-mouse IgG Ab. After staining, the cells were fixed and visualized by confocal fluorescence microscopy. Bars, 20 μm. (**c**) PKH67-labeled 24-h-cultured and late apoptotic neutrophils were incubated for 30 min at 37 °C with macrophages treated or not with cytochalasin D, wortmannin, U73122 or the diluent DMSO. After washings, macrophages were incubated with anti-HLA-DR mAb revealed by PE-labeled anti-mouse IgG Ab. In some experiments, the incubation was carried out at 4 °C. Results are expressed as the percentage of inhibition of apoptotic cell engulfment (mean ± S.E.M., $n = 5$). (**d**) PKH67-labeled late apoptotic neutrophils were either untreated or treated with the anti-PTX3 mAb 16B5 or isotype control mAbs before incubation with macrophages for 30 min. After washings, macrophages were labeled with anti-HLA-DR mAb detected by PE-labeled anti-mouse IgG Ab. Histograms correspond to the green fluorescence of HLA-DR$^+$ cells. Representative results of one out of five experiments are presented. (**e**) Inhibition of apoptotic neutrophil engulfment by anti-PTX3 mAbs. PKH67-labeled late apoptotic or 24-h-cultured neutrophils were incubated or not with the MNB4 and 16B5 mAbs and the corresponding isotype control mAbs. Results are expressed as the percentage of inhibition of neutrophil phagocytosis (mean ± S.E.M., $n = 5$); NS means not significant

an active process and that, at the time of analysis, the expression of the PTX3-binding motif(s) is diverse among late apoptotic neutrophils. We cannot also formally exclude that the MNB4 epitope is masked at the surface of apoptotic cells as a result of its relocalization.

Dying cells express molecules, allowing them to be discriminated from viable cells. These molecules can result from biochemical modifications, neo-expression or membrane relocalization of intracellular molecules. Externalized molecules may derive from the nucleus (e.g., nucleosomes and DNA), the endoplasmic reticulum,[10,11] the cytoplasm (such as vimentin and laminin B1)[36] or the membrane (PS). Unprimed apoptotic neutrophils also express molecules that are contained within granules in living cells, such as PR3 and myeloperoxidase (MPO), showing a translocation of cytoplasmic granules to the cell surface during the apoptotic process.[27,28] In agreement with these results, granules are aligned just beneath an intact membrane in apoptotic neutrophils.[27]

Neutrophil granules are sequentially generated during granulopoiesis. They are classified on the basis of their protein contents: azurophil or primary granules (characterized by MPO), specific or secondary granules (lactoferrin$^+$), and gelatinase or tertiary granules (gelatinase$^+$). The expression of MPO and lactoferrin at the surface of apoptotic neutrophils suggests that at least primary and secondary granules fuse with the membrane during the apoptotic process.[28] Moreover, PR3, but not PTX3, is expressed at the membrane of early apoptotic neutrophils and both PR3 and PTX3 are expressed at the surface of late apoptotic cells, showing that a sequential fusion of granules with the membrane occurs during the transition from the early to the late phases of the apoptotic process. The mechanism(s) responsible for the sequential fusion of granules with the cell membrane remain(s) unknown.

Molecules contained in the granules are released in a coordinated manner in the context of microbial infection or inflammation. In contrast, during spontaneous apoptosis, intracellular components are, at least theoretically, not released. In agreement with this hypothesis, we did not detect PTX3 in the supernatants of apoptotic neutrophils. The mechanism(s) responsible for the outcome of granule components (release *versus* membrane translocation) remain(s) undetermined. On the basis of the literature, we can hypothesize that exogenous signals drive a secretion program, whereas, in contrast, endogenous signals lead to the fusion of intracellular granules with the cell membrane. The balance between these two programs must be tightly regulated to avoid the release of potentially deleterious intracellular components during the apoptotic process.

Nucleus condensation, cell shrinkage and membrane blebbing are the main morphological features of apoptotic cells. Membrane blebbing is an active process involving caspases and ROCK-I.[29] Membrane translocation of endogenous PTX3 appears to be dependent on the activity of these enzymes, showing that they accumulate in blebs, as reported for other translocated molecules.[10] The fact that most of the externalized molecules are concentrated in blebs confirms that this structure plays an important role at the interface between apoptotic cells and phagocytes.

Finally, we analyzed the potential role of membrane PTX3 in the engulfment of late apoptotic neutrophils. Phagocytosis was evaluated by FACS, as reported earlier;[20,31,32] the use of phagocytosis inhibitors and confocal microscopy confirmed that FACS is a reliable technique to discriminate binding from internalization. The anti-PTX3 mAb 16B5 prevented the capture of late, but not early, apoptotic neutrophils by phagocytes. Interestingly, 16B5 binds to the C-terminal domain of PTX3 that contains the pentraxin domain, suggesting that this domain of PTX3 is exposed at the outer side of the late apoptotic neutrophils and is involved in the interaction of membrane PTX3 with its ligand(s) and/or receptor(s).[16] Membrane PTX3 may thus act as a late 'eat-me' molecule involved in the recognition and engulfment of apoptotic neutrophils by phagocytes. The mechanism involved in the recognition and capture of late apoptotic neutrophils by macrophages remains unclear. Whether membrane PTX3 interacts with unidentified soluble bridging molecule(s) or directly with a putative PTX3-binding structure expressed by macrophages remains unclear. Experiments are in progress to elucidate the mechanism of PTX3-mediated endocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages.

Earlier studies have reported the involvement of pentraxins in the capture of apoptotic cells.[30,37] SAP binds to apoptotic cells and acts as a bridging molecule, favoring the capture of apoptotic cells by phagocytes.[37] However, in contrast to SAP and most of the bridging molecules, soluble PTX3 was reported to inhibit the phagocytosis of late apoptotic cells.[20–22] In this study, by using PTX3 concentrations similar to those released by activated neutrophils (ranging from 1 to 20 ng/ml), we failed to inhibit the clearance of apoptotic neutrophils by exogenous PTX3 (data not shown). We can hypothesize that soluble PTX3, produced in an inflammatory context, may interfere with the capture of late apoptotic neutrophils and thus prevent the initiation of an autoimmune response against neutrophil components. The inhibitory role of soluble PTX3 in apoptotic cell engulfment may result from (i) an interaction with 'eat-me' molecules, including membrane PTX3, exposed by late apoptotic cells, (ii) a binding to PTX3-binding sites on phagocytes and/or (iii) a binding of soluble PTX3 to a soluble bridging molecule such as C1q.[21] The molecular mechanism responsible for the opposite activity of soluble *versus* membrane PTX3 in the capture of apoptotic neutrophils remains undetermined.

In conclusion, this study shows that neutrophils contain a stock of preformed PTX3 that may act as an 'eat-me' molecule to mediate their capture by professional phagocytes when neutrophils enter the apoptotic process. Whether membrane PTX3 is involved in the capacity of late apoptotic neutrophils to generate an inflammatory signal in immune phagocytes and prevents the initiation of a harmful immune response against neutrophil components remains to be elucidated.

Materials and Methods

Isolation and generation of human leukocytes. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) density-gradient centrifugation. Monocytes were purified from PBMC by positive selection using anti-CD14 mAb-coated magnetic beads (MACS technology; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany); purity, assessed by FACS analysis using an anti-CD13 mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), was $>98\%$. Purified $CD14^+$ monocytes were differentiated into macrophages by 5-day culture with 20 ng/ml of M-CSF (R&D Systems, Abingdon, UK) in complete medium (CM) consisting of RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin, 10 mM Hepes and 0.1 mM non-essential amino acids (all from Lonza, Verviers, Belgium) at 5×10^6 cells/5 ml/well in six-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA). $CD14^+CD86^-$ macrophages were used in this study. After Ficoll-Paque centrifugation, neutrophils were isolated from erythrocytes by 3% dextran (Amersham Biosciences) density-gradient sedimentation. Contaminating red blood cells were lysed by hypo-osmotic shock. Purity was determined by FACS analysis on forward scatter/side scatter parameters; purity was routinely $>96\%$. Spontaneous activation of neutrophils was analyzed by evaluating CD11b and L-selectin expression by FACS analysis before and after isolation; only L-$selectin^+CD11b^{low}$ (non-activated) neutrophils were used in this study (data not shown).

Neutrophil activation and induction of cell death. Spontaneous apoptosis of neutrophils was obtained by incubating cells (1×10^6 cells/ml) in RPMI-1640 medium containing 1% heat-inactivated FCS for 24–72 h. Necrosis of neutrophils was induced by incubating cells at 56 °C for 30 min.[38] In some experiments, freshly isolated neutrophils were resuspended in RPMI-1640 medium containing 2% heat-inactivated FCS and activated for 24 h with 10 μg/ml *S. aureus* (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). In others, neutrophils were incubated for 72 h with the ROCK-I inhibitor Y-27632 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or the caspase inhibitor Z-VAD-fmk (R&D Systems) at the indicated concentrations.

FACS analysis. Membrane PTX3 expression was analyzed by FACS using rat anti-PTX3 mAbs that recognize the C-terminal (clones 16B5, also known as MNB1) or the N-terminal domain of PTX3 (clone MNB4). Cells were first incubated with 200 μg/ml human IgG in PBS/BSA 1% containing 0.01% NaN_3. Bound Abs were revealed by FITC-labeled anti-rat IgG (BD Pharmingen). Membrane PR3 expression was evaluated using anti-PR3 mAb (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands). Isotype control Abs were from BD Pharmingen. Intracellular staining of PTX3 was carried out as described earlier.[23] Fluorescence was analyzed using an FACSAria cytofluorometer (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). Apoptosis and necrosis were evaluated by AnnexinV *versus* propidium iodide (PI) labeling. Briefly, cells were incubated with APC-labeled AnnexinV (Molecular Probes) for 15 min at room temperature, according to the manufacturer's instructions. PI was added to the samples before analysis of the fluorescence. Viable cells, early apoptotic, late apoptotic and primary necrotic cells are characterized as $AnnexinV^-PI^-$, $AnnexinV^+PI^-$, $AnnexinV^+PI^+$ and

AnnexinV^{+}PI^{++}, respectively.[22,38] Binding of PTX3 on apoptotic cells was also analyzed by FACS. Apoptotic neutrophils were incubated with recombinant human PTX3 in PBS/BSA 1% for 15 min at room temperature. After washing, apoptotic cells were incubated with the anti-PTX3 mAbs 16B5 and MNB4 and revealed as described above.

Quantification of soluble PTX3 by ELISA. Soluble PTX3 was quantified by ELISA as described earlier.[39] Briefly, the anti-PTX3 mAb MNB4 was coated in ELISA plate (Immunolon™; Nunc, Roskilde, Denmark) in 10 mM carbonate buffer, pH = 9.6, for 16 h at 4 °C. After washing with PBS, wells were saturated with 1% BSA in PBS (PBS/BSA buffer) for 2 h at 37 °C. Cell culture supernatants (100 μl/well) or recombinant PTX3 were incubated for 2.5 h at 37 °C before washing using PBS containing 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich). Plates were then incubated with polyclonal anti-PTX3 Ab (100 ng/ml, 100 μl/well) for 1.5 h at 37 °C. After washing, the plates were incubated with peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG Ab (1 μg/ml, 100 μl/well) for 1 h at 37 °C. After final washings, bound Abs were revealed using the TMB substrate, and absorbance was read at $\lambda = 450$ nm. Results are expressed in ng/ml.

Analysis of PTX3 expression by western blotting. PTX3 expression in cell lysates was analyzed by western blotting. Briefly, proteins (60 μg of total proteins/lane) were electrophoretically separated on a 10% polyacrylamide gel in reducing conditions and then transferred to an Immobilon membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). After saturation, membranes were incubated for 16 h at 4 °C with 3 μg/ml polyclonal anti-PTX3 Ab. Protein loading was verified by incubating the membranes with an antiactin Ab (Sigma-Aldrich). After washing, membrane was incubated with 1 μg/ml peroxidase-labeled anti-rabbit IgG Abs (Biosource, Camarillo, CA, USA); bound Abs were detected using the ECL system, according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences).

Two-dimensional electrophoresis. Cells were lysed in a buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea and 4% (w : v) CHAPS at 4 °C for 30 min. The lysis was achieved by ultrasonication on ice and the lysates were clarified by centrifugation for 10 min at 14 000 × *g*, 4 °C. Proteins were precipitated by using the 2D Clean Up Kit (GE Healthcare, Orsay, France) and dissolved in the sample buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w : v) CHAPS, 2% immobilized pH gradient (IPG) buffer (non-linear (NL) pH 3–11) and 10 mM DTT; the protein concentration was determined with the Plus One 2D Quant Kit (GE Healthcare). The first-dimensional electrophoresis was carried out on an Ettan™ IPGphor 3 system (GE Healthcare). Proteins (150 μg) were cup-loaded onto 18 cm, pH 3–11, NL Immobiline™ DryStrips rehydrated earlier with Destreak Solution in an IPGphor strip holder (all from GE Healthcare). The IEF was processed at 20 °C using the following parameters: 300 V, 600 Vh (linear), 1000 V, 625 Vh (gradient), 4000 V, 2500 Vh (gradient), 8000 V, 6000 Vh (gradient) and 8000 V, 12 000 Vh (linear). Before second-dimension electrophoresis, the strips were equilibrated for 2 × 15 min in the SDS equilibration buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% (v : v) glycerol and 2% (w : v) SDS. The first step was performed in the above-mentioned equilibration buffer with 1% (w : v) DTT followed by a second step with 2.5% (w : v) iodoacetamide. The second-dimension electrophoresis was carried out using an Ettan DALTsix electrophoresis unit (GE Healthcare). The strips were embedded on top of (255 mm × 200 mm × 1 mm, 12.5%) gels with 0.5% agarose in SDS electrophoresis buffer containing bromophenol blue. The SDS-PAGE was processed at 14 °C at 5 W/gel for 30 min and then at 17 W/gel until the dye front reached the bottom of the gels. Proteins were electrotransferred on an Immobilon membrane that was processed as detailed above.

Fluorescence microscopy analysis. After incubation with 100 μg/ml human IgG (Sigma-Aldrich) for 1 h at 4 °C, neutrophils were incubated with 2.5 μg/ml anti-PTX3 mAb (16B5), anti-PR3 mAb or with isotype-matched control mAb for 30 min at 4 °C. After washing, the cells were incubated with 5 μg/ml PE-labeled anti-rat IgG or Alexa^{488}-labeled anti-mouse IgG mAbs (BD Pharmingen) for 30 min at 4 °C. Neutrophils were then layered on a poly-L-lysine-coated microscope slide (O Kindler, Freiburg, Germany) using a Cytospin 3 centrifuge (Shandon, Pittsburgh, PA, USA). Slides were then mounted in fluorescence mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark). Fluorescence was analyzed using a fluorescence microscope and the image digitalized with the IM500 image manager system (Leica, Wetzlar, Germany).

Engulfment of apoptotic neutrophils by macrophages. *In vitro* analysis of apoptotic-cell engulfment was performed by FACS as described earlier.[30–32] Briefly, freshly isolated neutrophils were labeled with the cell dye PKH67 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Living, 24-h-cultured or late apoptotic PKH67-labeled neutrophils were incubated for 30 min at 37 or 4 °C with adherent macrophages (at a 10 : 1 ratio) in RPMI-1640 medium containing 30% heat-inactivated human serum (Sigma-Aldrich). Non-internalized apoptotic cells were removed by washing with cold PBS. Macrophages were then detached by scraping before incubation with 5 μg/ml anti-HLA-DR mAb (Coulter Immunotech, Marseille, France); bound Abs were detected using PE-labeled anti-mouse IgG Abs (BD Pharmingen). In some experiments, neutrophils were incubated with 50 μg/ml anti-PTX3 mAb 16B5 or MNB4 or with isotype control mAbs before addition to macrophages. In others, macrophages were treated for 1 h with 25 μg/ml cytochalasin D, 500 μM wortmannin or 20 μM U73122 (all from Sigma-Aldrich)[40] before incubation with 24-h-cultured or late apoptotic neutrophils. Fluorescence was analyzed using an FACSCalibur cytometer (BD Biosciences). The percentage of inhibition of phagocytosis was determined as follows: $(A-B/A) \times 100$ where *A* and *B* are the percentages of phagocytosis (double-labeled macrophages) in the absence or presence of antibodies or drugs, respectively.

Confocal microscopy. Phagocytosis was carried out as described above. After detachment, cells were layered on a poly-L-lysine-coated microscope slide using a Cytospin 3 centrifuge. Sections were mounted with FluorSave™ Reagent (Calbiochem, Darmstadt, Germany) and analyzed with a laser-scanning confocal microscope (FluoView FV1000; Olympus): images (1024 × 1024 pixels) were acquired with an oil immersion objective (60 × 1.4 NA PLAN Apochromat; Olympus).

Statistical analysis. Data are shown as means ± S.D. or means ± S.E.M., and comparisons between groups were carried out by Spearman's and Wilcoxon's tests. A *P*-value less than 0.05 was considered as statistically significant.

Acknowledgements. S Jaillon is supported by a grant from the Conseil Général du Maine et Loire. We sincerely acknowledge Dr. Catherine Guette and Emilie Ernoult (Inserm U892, Centre de lutte contre le Cancer Paul Papin, Angers, France) for their help in the two-dimensional electrophoresis experiments. This study is supported by the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Avenir Program) and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR MIME – Project Pentraximmune). AM is supported by the CARIPLO foundation (project Nobel), Telethon and the Italian Ministry of Health.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

1. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; **418**: 191–195.
2. Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 243–250.
3. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev* 2008; **8**: 279–289.
4. Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006; **440**: 808–812.
5. Ren Y, Xie Y, Jiang G, Fan J, Yeung J, Li W *et al.* Apoptotic cells protect mice against lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* 2008; **180**: 4978–4985.
6. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev* 2002; **2**: 965–975.
7. Gaipl US, Voll RE, Sheriff A, Franz S, Kalden JR, Herrmann M. Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2005; **4**: 189–194.
8. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F *et al.* Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat Genet* 1998; **19**: 56–59.
9. Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA *et al.* Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med* 2002; **196**: 135–140.
10. Franz S, Herrmann K, Fuhrnrohr B, Sheriff A, Frey B, Gaipl US *et al.* After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 733–742.
11. Radic M, Marion T, Monestier M. Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J Immunol* 2004; **172**: 6692–6700.

12. Zhou Z. New phosphatidylserine receptors: clearance of apoptotic cells and more. *Dev Cell* 2007; **13**: 759–760.
13. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000; **405**: 85–90.
14. Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* 2008; **20**: 530–537.
15. Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 2007; **450**: 435–439.
16. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 337–366.
17. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* 2007; **Sep**: 9.
18. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R *et al.* Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 2002; **420**: 182–186.
19. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G *et al.* Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1997; **272**: 32817–32823.
20. Rovere P, Peri G, Fazzini F, Bottazzi B, Doni A, Bondanza A *et al.* The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood* 2000; **96**: 4300–4306.
21. Baruah P, Dumitriu IE, Peri G, Russo V, Mantovani A, Manfredi AA *et al.* The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2006; **80**: 87–95.
22. van Rossum AP, Fazzini F, Limburg PC, Manfredi AA, Rovere-Querini P, Mantovani A *et al.* The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 2667–2674.
23. Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Fremaux I, Doni A, Moalli F *et al.* The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med* 2007; **204**: 793–804.
24. Kumagai K, Abo T, Sekizawa T, Sasaki M. Studies of surface immunoglobulins on human B lymphocytes. I. Dissociation of cell-bound immunoglobulins with acid pH or at 37 degrees C. *J Immunol* 1975; **115**: 982–987.
25. Lominadze G, Powell DW, Luerman GC, Link AJ, Ward RA, McLeish KR. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics* 2005; **4**: 1503–1521.
26. Witko-Sarsat V, Cramer EM, Hieblot C, Guichard J, Nusbaum P, Lopez S *et al.* Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood* 1999; **94**: 2487–2496.
27. Gilligan HM, Bredy B, Brady HR, Hebert MJ, Slayter HS, Xu Y *et al.* Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming. *J Exp Med* 1996; **184**: 2231–2241.
28. Yang JJ, Tuttle RH, Hogan SL, Taylor JG, Phillips BD, Falk RJ *et al.* Target antigens for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) are on the surface of primed and apoptotic but not unstimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol* 2000; **121**: 165–172.
29. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 339–345.
30. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2000; **192**: 1353–1364.
31. Hess KL, Babcock GF, Askew DS, Cook-Mills JM. A novel flow cytometric method for quantifying phagocytosis of apoptotic cells. *Cytometry* 1997; **27**: 145–152.
32. Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Eggleton P, Garred P. The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 1598–1607.
33. Camozzi M, Rusnati M, Bugatti A, Bottazzi B, Mantovani A, Bastone A *et al.* Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. *J Biol Chem* 2006; **281**: 22605–22613.
34. Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, De Acetis M, Maccagno A, Bottazzi B *et al.* PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in *in vivo* fertilization. *Development (Cambridge, England)* 2004; **131**: 1577–1586.
35. Krispin A, Bledi Y, Atallah M, Trahtemberg U, Verbovetski I, Nahari E *et al.* Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states. *Blood* 2006; **108**: 3580–3589.
36. Moisan E, Girard D. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 489–498.
37. Bijl M, Horst G, Bijzet J, Bootsma H, Limburg PC, Kallenberg CG. Serum amyloid P component binds to late apoptotic cells and mediates their uptake by monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum* 2003; **48**: 248–254.
38. Gaipl US, Kuenkele S, Voll RE, Beyer TD, Kolowos W, Heyder P *et al.* Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 327–334.
39. Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F *et al.* PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* 2000; **102**: 636–641.
40. Ivanov AI. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 2008; **440**: 15–33.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (http://www.nature.com/cdd)

Thèse de Doctorat

Yveline HAMON

Mise en évidence d'une altération fonctionnelle du récepteur soluble de l'immunité innée PTX3 dans la mucoviscidose

Résumé

La pentraxine longue PTX3, récepteur soluble de l'immunité innée, joue un rôle important dans la protection contre certains pathogènes, en favorisant leur élimination et l'initiation de réponses immunitaires protectrices. PTX3 a notamment un rôle protecteur lors d'infections par *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa*. La mucoviscidose, maladie héréditaire grave à transmission autosomique récessive, est caractérisée par des infections pulmonaires récurrentes, notamment par ces deux pathogènes. Nous avons donc émis l'hypothèse que le statut de PTX3 pourrait être altéré chez ces patients. L'expression et l'intégrité de PTX3 ont été analysées dans les expectorations de 51 patients atteints de mucoviscidose et de 7 patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Les résultats montrent que la concentration de PTX3 est augmentée dans les sérums de patients atteints de mucoviscidose. Au contraire, la concentration de PTX3 dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose est considérablement plus faible que celle des patients atteints de BPCO. Cette faible concentration de PTX3 résulte d'un clivage protéolytique par l'élastase du neutrophile et par les protéases sécrétées par *Aspergillus fumigatus*. De manière intéressante, le domaine N-terminal de PTX3, impliqué dans la protection contre *Aspergillus fumigatus*, est préférentiellement dégradé par ces protéases. Cette dégradation est spécifique de la pentraxine longue PTX3 car les pentraxines courtes, CRP et SAP, ne sont pas dégradées.

Ces résultats indiquent que la protéolyse sélective de PTX3 au niveau des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose peut expliquer, en partie, les infections pulmonaires récurrentes par certains pathogènes.

Mots clés

Immunité innée, Pentraxine 3, Mucoviscidose, Protéases, Pathogènes

Abstract

The prototypic long pentraxin PTX3, a soluble pattern recognition receptor, plays an important role in innate defense against selected pathogens, by favoring their elimination and the initiation of protective responses. PTX3 has notably beneficial effects in mice infected with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Cystic fibrosis (CF), a severe inherited autosomal recessive disease, is characterized by recurrent lung infections, especially by these two pathogens. We thus hypothesized that the status of PTX3 may be altered in CF patients. The levels and integrity of PTX3 were analyzed in the sputum samples from 51 CF patients and 7 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The levels of PTX3 were increased in serums from CF and COPD patients, compared to healthy subjects, reflecting their infectious status. Surprisingly, the levels of PTX3 in sputum samples were dramatically lower in CF patients than in COPD patients. The low concentrations of PTX3 resulted from a proteolysis cleavage by elastase and *Aspergillus fumigatus* proteases. Interestingly, the N-terminal domain of PTX3, involved in the protection against *Aspergillus fumigatus*, is preferentially degraded by these proteases.

These results indicate that the selective proteolysis of PTX3 in the CF lung may explain, at least in part, the recurrent lung infections by PTX3-sensitive pathogens in CF patients.

Key Words

Innate immunity, Pentraxin 3, Cystic fibrosis, Proteases, Pathogens