



Rôle des récepteurs monocytaires aux chimiokines dans la physiopathologie du sepsis

Benjamin Chousterman

► To cite this version:

Benjamin Chousterman. Rôle des récepteurs monocytaires aux chimiokines dans la physiopathologie du sepsis. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066360 . tel-01346983v2

HAL Id: tel-01346983

<https://theses.hal.science/tel-01346983v2>

Submitted on 22 Jul 2016

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 DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE COMPLEXITÉ DU VIVANT (ED515)

SPÉCIALITÉ : IMMUNOLOGIE

Présentée par :

M. Benjamin Glenn CHOUSTERMAN

Pour obtenir le grade de :

Docteur de l'université Paris VI

Sujet de thèse :

Rôle des récepteurs monocytaires aux chimiokines dans la physiopathologie du sepsis

Soutenue publiquement

Le 30 Septembre 2015

Devant le jury composé de :

M. le Pr Karim Asehnoune - Rapporteur
M. le Dr Christophe Combadière – Directeur de Thèse
M. le Dr Alain Hazi  t - Rapporteur
M. le Dr Philippe Lesnik - Président
M. le Pr Didier Payen - Examineur

Résumé (Français)

Le sepsis est la réaction inflammatoire généralisée secondaire à une infection. C'est une pathologie fréquente et grave qui fait intervenir plusieurs composantes du système immunitaire. L'activation de l'immunité innée au cours du sepsis se fait notamment par l'activation et le recrutement des monocytes, des cellules mononuclées circulantes faisant partie de la famille des phagocytes et qui modulent le phénomène inflammatoire. La mobilisation des monocytes fait intervenir les cytokines chimiotactiques (chimiokines) et leurs récepteurs. La contribution des monocytes et des récepteurs aux chimiokines qu'ils expriment au cours du sepsis est encore imparfaitement connue.

Nous nous sommes spécifiquement intéressé dans ce travail au rôle de l'expression monocyttaire des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 au cours du sepsis. Pour ce faire, nous avons utilisé des modèles murins de sepsis et analysé le rôle d'un polymorphisme génétique de CX3CR1 dans une cohorte de malades atteints de sepsis.

Nous avons montré qu'au cours du sepsis, la mobilité des monocytes était altérée sous la forme d'une augmentation de l'adhérence aux parois vasculaire contrôlée en partie par le récepteur CX3CR1. Au moyen de souris invalidées pour CCR2 ou CX3CR1, de l'utilisation d'un antagoniste de CX3CR1 et de transferts adoptifs, nous avons montré que les monocytes inflammatoires jouaient un rôle essentiel dans la régulation du phénomène inflammatoire au cours du sepsis en protégeant le rein des lésions septiques. Cette protection est médiée par l'expression de CX3CR1. L'allèle I249 du gène *Cx3cr1*, à l'origine d'une augmentation des propriétés adhésives du couple CX3CR1/CX3CL1, est un facteur protecteur dans la survenue d'insuffisance rénale aiguë chez le malade atteint de sepsis.

Collectivement, ces travaux confirment un rôle régulateur des monocytes inflammatoires au cours du sepsis et identifient de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques dans la prévention et le traitement de l'insuffisance rénale aiguë au cours du sepsis.

Mot-clés : Inflammation, sepsis, monocytes, CX3CR1, CCR2, Insuffisance rénale.

Résumé (Anglais) / Summary

Sepsis is the generalized inflammatory response secondary to an infection. This is a common and serious condition that involves several components of the immune system. The action of innate immunity in sepsis is mediated by the activation and recruitment of monocytes, which are mononuclear circulating cells of the phagocytes family, and which modulate the inflammatory process. The mobilization of monocytes involves chemotactic cytokines (chemokines) and their receptors. The contribution of monocytes and the chemokine receptors they express in sepsis is still imperfectly known.

This work was specifically focused on the role of monocyte expression of chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 in sepsis. To this end, we used mouse models of sepsis and analyzed the role of a common genetic polymorphism of CX3CR1 in a cohort of patients with sepsis.

We have shown that in sepsis, monocytes' motility was modified with an increase of their adhesion to vascular walls that was controlled in part by CX3CR1. Using mice invalidated for CCR2 or CX3CR1, an antagonist of CX3CR1 and adoptive transfers, we have shown that inflammatory monocytes play a key role in the regulation of the inflammatory phenomenon in sepsis and that they protected the kidney from septic lesions via a CX3CR1 mediated adhesion mechanism. The I249 allele of CX3CR1, conferring increased adhesive properties to monocytes, is a protective factor in the occurrence of acute kidney injury in septic patients.

Collectively, these data confirm a regulatory role for inflammatory monocytes during sepsis and identify potential new therapeutic targets for the prevention and treatment of sepsis-associated acute kidney injury.

Keywords: Inflammation, sepsis, monocytes, CCR2, CX3CR1.

Table des matières

	Page
Résumé (Français)	3
Résumé (Anglais)	4
Remerciements	8
Introduction	9
Chapitre 1 : Le sepsis	12
I. Introduction	13
II. Épidémiologie	14
i. incidence	14
ii. étiologie	19
iii. Mortalité liée au sepsis	21
III. Physiopathologie	24
i. La phase aiguë du sepsis – le rôle de l'immunité innée	25
a. les Pattern recognitions receptors (PRRs)	26
b. les TLRs et leur empereur : le TLR4	28
c. les NLRs	34
d. Les CLRs	35
e. les RLRs	36
II. Les médiateurs inflammatoires	36
III. Activation de la coagulation	42
IV. Anti-inflammation et immunosuppression	45
i. médiateurs anti-inflammatoires	46
ii. Immunosuppression au cours du sepsis	49
V. Sepsis, l'échec des essais thérapeutiques	57
VI. Limite des modèles murins	62
Chapitre 2 : les monocytes	66
I. Introduction	67
II. La synthèse des monocytes	68
III. Monocytes et sous-populations monocytaires	70
i. les monocytes humains	70
ii. les monocytes murins	73
IV. Macrophages et cellules dendritiques	76
V. Hématopoïèse extra-médullaire	80
VI. Les monocytes dans les pathologies inflammatoires	81
VII. Conclusion	85
Chapitre 3 : les chimiokines monocytaires	86
I. Généralités	87
i. les CC CKs	87
ii. les CXC CKs	88
iii. la CX3C CK	88
iv. les XC CKs	89
II. Les récepteurs aux chimiokines	89
III. Transduction du signal	92
IV. Le rôle des CK à l'état stable et en pathologie	95
V. Axe CCL2/CCR2	99

VI. Axe CX3CL1/CX3CR1	103
VII. Développement d'antagonistes des récepteurs aux chimiokines	108
VIII. Conclusion	111
Chapitre 4 : Objectifs du travail	113
Article	117
Résultats complémentaires	152
Conclusions et perspectives	155
Annexes	161
Références	224

Abréviations

ADCC : Antibody dependent cell mediated cytotoxicity	MDSC : Myeloid derived suppressor cell
AP-1 : activator protein 1	MHC : Major histocompatibility complex
AVC : Accident vasculaire cérébral	MIF : Macrophage inhibition factor
BGN : Bactérie Gram négatif	MyD88 : Myeloid differentiation protein 88
BGP : Bactérie Gram positif	MPO : Myeloperoxydase
CARS : Compensatory anti-inflammatory response syndrome	NFkB : Nuclear factor kB
CD : Cluster of differentiation	NK : Natural killer
CK : chimiokine	NLR : NOD-like receptor
CLR : C-type lectin receptor	NO : Nitric oxide
DAMP : damage associated molecular pattern	PAI : plasminogen-activation inhibitor
DC : dendritic cell	PAMP : pathogen associated molecular pattern
G(M)-CSF : Granulocyte (macrophage) – colony stimulation factor	PGE2 : Prostaglandine E2
HLA : Human leukocyte antigen	PRR : Pattern recognition receptor
HMGB1 : High mobility group box protein 1	RCK : récepteur aux chimiokines
HSPC : Hematopoietic stem and progenitor cell	RLR : RIG-like receptor
IDM : Infarctus du myocarde	ROS : Reactive oxygen species
IFN : Interferon	SIRS : Systemic Inflammation response syndrome
Il-X : Interleukine-X	TipDC : TNF and Inducible nitric oxide synthase producing DC
IRA : Innate response activation	TLR : Toll-like receptor
IRF : Interferon regulatory factor	TNF : Tumor necrosis factor
LPS : lipopolysaccharide	VSMC : Vascular smooth muscle cel
MCP-1 : Monocyte chemotactic protein 1	

Remerciements

Pour la réalisation de cette thèse je tiens à remercier,

Les membres du jury :

- Le Dr Christophe Combadière, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir accueilli dans ton équipe et fait confiance.
- Le Pr Asehnoune, rapporteur, merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail.
- Le Dr Haziot, rapporteur, merci de votre aide et d'avoir accepté d'évaluer ce travail
- Le Dr Lesnik, rapporteur, merci d'avoir accepté de présider ce jury et de m'avoir soutenu quand il le fallait.
- Le Pr Payen, qui m'a donné goût à la recherche scientifique au service de la médecine et qui me soutient dans ma carrière.

Alexandre Boissonnas et Lucie Poupel. Lucie, tu as été mon maître Jedi lors de mon arrivée au laboratoire et une fantastique alliée. Alex, c'est une chance que nos routes se soient croisées, merci pour tes conseils et nos franches rigolades.

Les membres de l'ex-U945 devenue aujourd'hui l'U1135 – Cimi-Paris. Ludovic, Patricia, Philippe, Virginie, Camille, Constance, Fabrice, Élodie, Julie, Mariano, Audrey, Pilou, Pauline, Matthieu, Charlotte et des équipes voisines Béhazine, Charles, Angèle et pardon pour ceux que j'ai oublié. Merci pour votre accueil ! Vous avez fait de mon séjour au laboratoire une expérience inoubliable.

L'équipe du Dr Swirski au Center for Systems Biology qui m'a formidablement accueilli et avec laquelle j'ai pu travailler sur d'incroyables projets,

Mes amis et ma famille, pour leur soutien sans faille et leurs encouragements,

Julia et Zacharie, au moment où j'écris ces lignes vous êtes en train de somnoler près de moi, il fait bon, je ne souhaiterais être nulle part ailleurs.

INTRODUCTION

Introduction

Le sepsis est une affection courante et grave mettant en œuvre le système immunitaire. Il résulte d'une inflammation généralisée secondaire à une infection. Sa physiopathologie implique un nombre important de médiateurs moléculaires et cellulaires et est toujours en cours d'exploration. Il apparaît que le sepsis évolue en différentes phases qui se chevauchent et mènent à la fois à une hyper-inflammation et à la constitution secondaire d'une immunodépression. Le recrutement leucocytaire à des temps précis est un élément central de la réponse de l'hôte face au pathogène et fait intervenir plusieurs cytokines chimiotactiques (chimiokines). Le rôle des chimiokines au cours des pathologies inflammatoires est exploré depuis deux décennies, ces recherches ont permis de comprendre des mécanismes physiopathologiques majeurs mis en œuvre au cours de diverses affections. Les avancées techniques et conceptuelles ont permis de mieux caractériser les multiples interactions intervenant à l'état stable et en pathologie. Ainsi, le réseau complexe des chimiokines et de leurs récepteurs témoigne d'une fine régulation des flux cellulaires dans les différents compartiments de l'organisme. Le sepsis est l'exemple prototypique d'une agression localisée qui va déclencher une réaction inflammatoire généralisée et qui fait donc intervenir ce réseau. Bien que le sepsis soit une maladie inflammatoire, aucune thérapeutique spécifique de l'inflammation n'a prouvé son efficacité au cours du sepsis. Le traitement actuel du sepsis, en plus du traitement de l'infection, n'est que symptomatique.

Au cours de ce travail, nous allons tenter de caractériser le rôle des monocytes et des récepteurs de chimiokines monocytaires CX3CR1 et CCR2 au cours du sepsis.

Chapitre 1: Le sepsis

I. Introduction

Sepsis vient du grec « σήψις » qui signifie « putréfaction ». Depuis la nuit des temps, il a été constaté que les pathologies infectieuses (non identifiées comme telles alors mais présentes sous la forme de gangrènes, abcès, sécrétion de pus, fièvres, ..) étaient initialement des affections locales qui dans certains cas allaient évoluer vers une réaction généralisée de l'organisme qui conduisait elle-même au décès. Malgré ces constatations millénaires, la compréhension de ce syndrome est récente. Les définitions modernes du sepsis ne datent que d'une trentaine d'années et sont encore en cours d'évolution. Ce sont les avancées de la microbiologie et de l'immunologie qui ont permis de comprendre qu'il existait des points communs entre les différentes infections dans les phénomènes de propagation de l'inflammation. Avoir identifié le sepsis comme entité clinique, à l'instar du cancer, a permis de mieux cerner l'incidence, les mécanismes et les complications de cette pathologie. Aujourd'hui, la prise en charge du sepsis représente un enjeu majeur de santé publique. Tandis que les pathologies représentant les principales causes de mortalité (cancer, maladie cardiovasculaire) se sont vues mieux diagnostiquées, prévenues et traitées, entraînant une baisse des taux de mortalité qui y sont associés, on constate que l'incidence du sepsis est en constante augmentation avec un coût majeur pour la société. Le sepsis n'est plus uniquement une pathologie de l'« urgence immédiate », il nécessite de longues semaines de traitement en réanimation puis à l'hôpital et le post-sepsis est également une source importante de morbi-mortalité. La prise en charge globale du sepsis pose donc

d'énormes défis médicaux et organisationnels et nécessite une compréhension fine de son épidémiologie et de sa physiopathologie afin d'élaborer des stratégies de prise en charge adaptées et développer enfin des traitements spécifiques et efficaces.

II. Épidémiologie

i. incidence

L'analyse épidémiologique du sepsis est ardue. Contrairement aux infarctus du myocarde (IDM), accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou les différents cancers, dont les relevés sont (quasi)-exhaustifs, le sepsis peut être présent chez un patient sans apparaître en tant que tel dans son dossier.

La définition couramment admise du sepsis est celle d'un syndrome inflammatoire généralisé secondaire à une infection (1). Pour poser le diagnostic de sepsis, il est donc nécessaire d'avoir une inflammation, qui est définie cliniquement comme la présence d'un Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (en anglais, Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)), associé à une infection (réelle ou supposée) (Tableau 1). Le sepsis est également décomposé en 3 catégories selon le degré de gravité du patient : sepsis simple, sepsis sévère et choc septique. Cette définition « classique » du sepsis est pratique pour classer a posteriori des patients en sepsis mais a finalement peu d'intérêt clinique d'autant plus que les critères de SIRS sont fréquents chez les malades de réanimation y compris ceux n'ayant pas de sepsis. Une étude

récente(2) a montré que près de 12% des patients qui ont été diagnostiqué en sepsis sévère ne présentaient pas les 2 critères de SIRS selon la définition de Bone et seraient donc exclus des études s'intéressant au sepsis sévère.

La définition du sepsis a donc été plusieurs fois reconstruite (3, 4) (5), les définitions les plus récentes sont celles, plus larges et moins limitantes, de la surviving sepsis campaign (3) et plus récemment celle proposée par Vincent et coll. (4) qui propose pragmatiquement de définir le sepsis comme étant une infection grave associée à une défaillance d'organe. Cette définition guidée par l'examen clinique et pratique à utiliser tend à s'imposer. Contrairement aux IDM dont le diagnostic peut reposer sur le dosage d'un marqueur spécifique sanguin (la troponine) ou les pneumonies pour lesquelles la radiographie thoracique est un élément clé du diagnostic, aucun biomarqueur ou examen d'imagerie n'a encore prouvé son intérêt, avec une sensibilité et une spécificité satisfaisante, pour le sepsis, et ce malgré une intense activité de recherche à ce sujet. Certains travaux prometteurs retrouvent une signature transcriptomique spécifique du sepsis qui pourrait avoir une utilité clinique mais cette méthode nécessite d'être validée et pose des problèmes pratiques en terme de durée de réalisation de la mesure notamment (6).

Cette difficulté à définir le sepsis témoigne des potentiels biais des études épidémiologiques dans ce domaine. Le sepsis étant la conséquence d'une infection, il est par conséquent transversal et pose un problème d'« étiquetage ». Ainsi, des infections d'organes telles que les pneumonies ou les pyélonéphrites, peuvent être traitées aux urgences, en salle d'hospitalisation de différentes spécialités selon le lieu où est le patient quand la maladie se manifeste, et se

compliquer d'un sepsis. Les études rétrospectives qui cherchent des codes d'identification de pathologie peuvent retrouver l'infection initiale mais pas le sepsis. Le biais est aussi chronologique car la sensibilisation des praticiens à la problématique du sepsis fait augmenter le codage de la pathologie. De la même façon, un sepsis ou un sepsis sévère peuvent ne pas être traités en réanimation (plus rarement pour le sepsis sévère) alors qu'un choc septique sera quasi-constamment hospitalisé en réanimation. Ainsi, une étude s'intéressant à la réanimation du sepsis risque de passer à côté de nombreux cas, en particulier les moins graves, et donc fausser les conclusions. Par ailleurs, le sepsis est une pathologie dont l'évolution peut être rapide. Un sous-recensement lié à des décès à domicile ou extra-hospitaliers peut également influencer sur l'évaluation de l'incidence du sepsis. On ne comptabilise in fine que les sepsis traités.

Term	Criteria
SIRS*	2 out of the 4 following criteria:
	Temperature >38 °C or <36 °C
	Heart rate >90/min
	Hyperventilation evidenced by respiratory rate >20/min or arterial CO ₂ lower than 32 mmHg
	White blood cell count >12 000 cells/μL or lower than 4000 cells/μL
Sepsis	SIRS criteria with presumed or proven infection
Severe sepsis	Sepsis with organ dysfunction
Septic shock	Sepsis with hypotension despite adequate fluid resuscitation

Note: *SIRS, systemic inflammatory response syndrome.

Table 1. Critères de SIRS, Sepsis, sepsis sévère et choc septique. D'après Bone et coll. (1)

Term	Criteria
Sepsis	Documented (or suspected) infection with any one of the following clinical or laboratory criteria
General parameters	Fever, hypothermia, tachycardia, tachypnea, altered mental status, arterial hypotension, decreased urine output, significant peripheral edema, or positive fluid balance
Inflammatory parameters	Leukocytosis, leukopenia, hyperglycemia, increased C-reactive protein, procalcitonin, or creatinine, coagulation abnormalities, increased cardiac output, reduced mixed venous oxygen saturation
Hemodynamic parameters	Hypotension, elevated mixed venous oxygen saturation, elevated cardiac index
Organ dysfunction parameters	Arterial hypoxemia, acute oliguria, increase in creatinine level, elevated international normalized ratio or activated partial thromboplastin time, ileus, thrombocytopenia, hyperbilirubinemia
Tissue perfusion parameters	Hyperlactatemia, decreased capillary refill, or mottling

Table 2. Critères de sepsis selon la Surviving sepsis campaign (Levy et coll. (3)).

L'incidence du sepsis est, d'après les éléments cités ci-dessus, difficile à évaluer précisément. La difficulté est moindre pour le sepsis sévère ou le choc septique. Les meilleures évaluations proviennent de pays ayant de très larges bases de données et registres de malades tels que les USA. Angus et coll. (7) ont analysé les données issues de réanimations américaines de 1995 et ont décrit une incidence du sepsis aux alentours de 300 cas pour 100 000 habitants ce qui représentait près de 750 000 cas de sepsis par an aux USA. Martin et coll. (8) ont évalué à partir d'un registre de plus de 750 millions d'hospitalisations sur une période de 22 ans que l'incidence du sepsis a plus que doublé entre les années 1980 et 2000 (Figure 1) et atteint là encore près de 300 cas pour 100 000 habitants. Des estimations plus récentes retrouvent même une incidence de 377 pour 100 000, ce qui est supérieur aux incidences cumulées des maladies cardiovasculaires et des principaux cancers (344 pour 100 000) ; ces chiffres sont en accord avec d'autres études récentes en Europe (9) et aux USA (10, 11).

On estime que l'incidence annuelle du sepsis dans le monde se situe entre 15 et 30 millions de cas (12). Cette élévation du nombre de cas peut s'expliquer par un vieillissement de la population, une augmentation des malades à risque d'infection (en particuliers immunodéprimés), une diffusion plus importante d'informations sur le sepsis mais également par des modifications « techniques », par exemple la mise en place d'un nouveau code spécifique du sepsis aux USA (13). Les études de prévalence qui s'intéressent aux patients hospitalisés, en réanimation par exemple, atteints de sepsis se heurtent aux différentes pratiques cliniques telles que des différences dans les critères d'admission en réanimation ou encore le nombre de lits de réanimation disponibles par habitant qui peuvent fausser l'extrapolation des données à l'ensemble de la population.

Plusieurs facteurs de risque de sepsis ont été retrouvés. L'avancée en âge constitue un facteur de risque majeur avec une augmentation continue de la fréquence du sepsis qui s'accélère au fur et à mesure (8). Il est toutefois difficile de déterminer la part liée aux effets de l'âge sur le système immunitaire et le fait d'avoir des pathologies anciennement mortelles devenues en quelque sorte « chroniques » comme le VIH ou le cancer ou la part jouée par les maladies inflammatoires traitées au long cours dans la constitution de la susceptibilité au sepsis des personnes âgées.

Des facteurs de risques constitutifs ont été également retrouvés. Le sexe joue un rôle majeur (7, 8), notamment via l'action des hormones comme la testostérone ou les oestrogènes sur le fonctionnement du système

immunitaire (14, 15); le sexe féminin semblent associé à une moindre morbi-mortalité pour une même infection que le sexe masculin (7, 8). Des polymorphismes d'éléments clés du système immunitaire comme ceux des Toll-like récepteurs et des protéines associées (TLR, cf physiopathologie) (16-20), des cytokines pro- ou anti-inflammatoires (TNFalpha, IL-6, IL-1bêta, IL-10, etc.) ((21-23) ou de facteurs de la coagulation (Facteur V leyden, PAI-1, ...) (24, 25) ont montré qu'ils pouvaient influencer le risque de développer des sepsis et/ou modifier le pronostic.

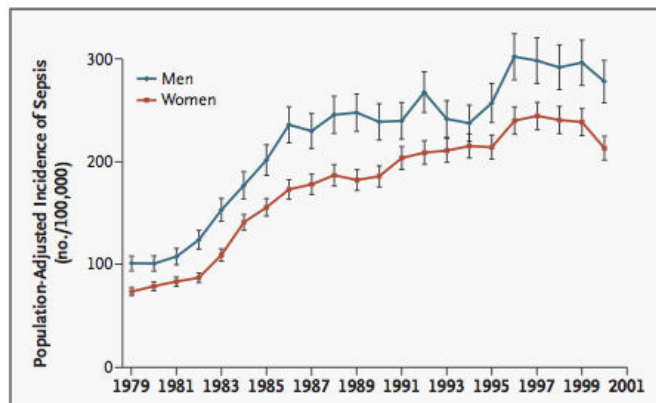


Figure 1. Incidence annuelle ajustée sur la population du sepsis selon le sexe entre 1979 et 2000. D'après Martin et coll. (8)

ii. Étiologie

Les causes de sepsis évoluent avec le temps et le panorama global des patients. La multiplication des procédures invasives (chirurgicales ou en radiologie interventionnelle), l'augmentation du nombre de patients sous chimiothérapie ou immunosuppresseurs, le vieillissement de la population et l'inquiétante

augmentation des infections nosocomiales ont profondément fait évoluer les sources de sepsis et les micro-organismes impliqués. La fréquence des infections à Bactéries Gram-positif (BGP, e.g. Streptocoques, Staphylocoques) a nettement augmenté jusqu'à représenter près de 40% des sources de sepsis, de même les infections à champignons (*Candida Albicans* notamment) ou germes opportunistes sont également en augmentation (table 4).

Les principales infections à l'origine de sepsis sévère sont les pneumonies, les infections du tractus urogénital ou les infections abdominales (table 3) (26). Il est intéressant de constater que dans près de 15-20% des cas la source du sepsis n'est pas clairement identifiée. Les infections nosocomiales représentent entre 20 et 30% des infections à l'origine de sepsis (27, 28).

Site of infection	Frequency (%)		Mortality (%)	
	Male	Female	Male	Female
Respiratory	41.8	35.8	22.0	22.0
Bacteremia, site unspecified	21.0	20.0	33.5	34.9
Genitourinary	10.3	18.0	8.6	7.8
Abdominal	8.6	8.1	9.8	10.6
Device-related	1.2	1.0	9.5	9.5
Wound/soft tissue	9.0	7.5	9.4	11.7
Central nervous system	0.7	0.5	17.3	17.5
Endocarditis	0.9	0.5	23.8	28.1
Other/unspecified	6.7	8.6	7.6	6.5

Table 3. Sites d'infections responsables de sepsis et taux de mortalité. D'après Mayr et coll. (26)

	Frequency (%)	OR (95% CI)
Gram-positive	46.8	
<i>Staphylococcus aureus</i>	20.5	0.8 (0.6–1.1)
MRSA	10.2	1.3 (0.9–1.8)
<i>Enterococcus</i>	10.9	1.6 (1.1–2.3)
<i>S. epidermidis</i>	10.8	0.9 (0.7–1.1)
<i>S. pneumoniae</i>	4.1	0.8 (0.5–1.4)
Other	6.4	0.9 (0.7–1.2)
Gram-negative	62.2	
<i>Pseudomonas</i> species	19.9	1.4 (1.2–1.6)
<i>Escherichia coli</i>	16.0	0.9 (0.7–1.1)
<i>Klebsiella</i> species	12.7	1.0 (0.8–1.2)
<i>Acinetobacter</i> species	8.8	1.5 (1.2–2.0)
<i>Enterobacter</i>	7.0	1.2 (0.9–1.6)
Other	17.0	0.9 (0.7–1.3)
Anaerobes	4.5	0.9 (0.7–1.3)
Other bacteria	1.5	1.1 (0.6–2.0)
Fungi		
<i>Candida</i>	17.0	1.1 (0.9–1.3)
<i>Aspergillus</i>	1.4	1.7 (1.0–3.1)
Other	1.0	1.9 (1.0–3.8)
Parasites	0.7	1.3 (0.5–3.3)
Other organisms	3.9	0.9 (0.6–1.3)

OR, odds ratio; CI, confidence interval; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*

Table 4. Principaux germes retrouvés lors des épisodes de sepsis sévère. D'après Mayr et coll. (26)

iii. Mortalité liée au sepsis

Les limites des calculs de la mortalité liée au sepsis sont les mêmes que celles retrouvées pour le calcul d'incidence. Ainsi, le nombre de sepsis augmente mais proportionnellement plus de sepsis moins « graves » sont retrouvés. La mortalité liée au sepsis est estimée aux alentours de 25 % (7, 29), elle augmente en fonction du degré de gravité et peut atteindre 40 à 50% pour le choc septique (30). D'une façon générale, les données pour les sepsis sévères et le choc septique sont plus robustes que pour le sepsis dans son ensemble. La mortalité

liée au sepsis sévère tend à diminuer d'environ 2 à 5% par an mais l'augmentation du nombre de cas entraîne une augmentation continue de la mortalité liée au sepsis. Dans l'étude de Angus et al. (7), avec près de 750 000 cas par an, le sepsis était à l'origine de près de 250 000 décès (un tiers). L'étude de Martin et coll. (8) montre la mortalité associée au sepsis aux USA est passée de 27,8 % à 17,9% entre 1979 et 2003. Kumar et coll. (10), aux USA également, montrent qu'entre 2000 et 2007, la mortalité attribuée au sepsis sévère est passée de 39 à 27%. En Océanie, entre 2000 et 2012, la mortalité du sepsis sévère est passée de 35 à 18,4% (29). De façon concordante, une étude d'Esteban et coll. (9) en Europe montre que la mortalité attribuée au sepsis est de 12,8%, 20,7% pour le sepsis sévère et 45,7% pour le choc septique. Ces données rejoignent celles d'Annane et coll. (31) qui montrent une augmentation de l'incidence de cas de patients en choc septique admis en réanimation et une évolution de la mortalité de 62,1 à 55,9% entre 1993 et 2000 ou de Brun-buisson et coll. (32) qui retrouvent une mortalité liée au sepsis de 35% à 30 jours et allant jusqu'à 41,9 à 60 jours en 2004 en France.

Malgré une nette amélioration du pronostic, le sepsis devient une source de mortalité de plus en plus conséquente et tend à devenir une des principales causes de mortalité dans le monde.

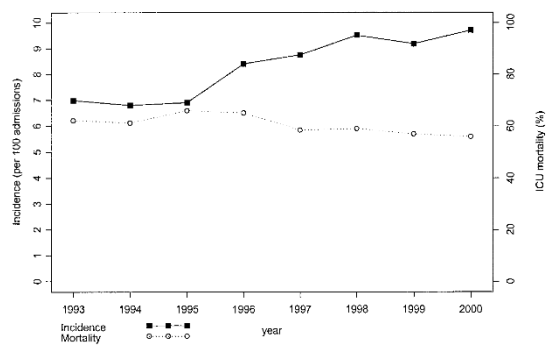


Figure 2. Incidence et mortalité du choc septique. D'après Annane et coll. (31)

III. Physiopathologie

C'est à Ignace Semmelweis et Louis Pasteur que nous devons la connaissance de l'infectiologie et des micro-organismes. Il aura toutefois fallu attendre près de 100 ans après ces découvertes pour comprendre que le sepsis n'était pas (uniquement) le fait du germe mais principalement celui de la réponse immunitaire de l'hôte. La recherche sur le sepsis est en pleine extension. L'analyse sur Pubmed du nombre de publications s'intéressant au sepsis passe de près de 6500 références entre 1975 et 1985 à près de 20 000 entre 1996 et 2006. Le système immunitaire est essentiel au maintien de l'homéostasie et à la réponse de l'hôte face aux agressions. Dans le cas d'une infection, le système immunitaire va être activé dans le but de limiter l'extension de l'infection et détruire les micro-organismes responsables. Cette réaction inflammatoire, initialement locale, va rapidement se propager et conduire à une cascade d'activation immunitaire auto-entretenue qui va conduire au sepsis. L'activité du système immunitaire est donc finement contrôlée : pas assez efficace et c'est le terrassement de l'hôte par la bactérie, trop actif et c'est un sepsis devenu incontrôlable. L'activation du système immunitaire au cours du sepsis passe par la mise en route des mécanismes de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Le rôle de l'immunité innée est prépondérant à la phase aiguë du sepsis alors que le rôle de l'immunité adaptative est plus criant lors de la phase tardive. Dans ce chapitre, nous discuterons des principaux mécanismes physiopathologiques qui vont survenir au cours du sepsis, en particulier à la phase aiguë (« inflammatoire »), puis nous aborderons les processus qui mènent à la phase secondaire (« immunosuppression »).

i. La phase aigue du sepsis – le rôle de l'immunité innée

L'immunité dite « innée » regroupe l'ensemble des mécanismes de réaction, humoraux et cellulaires, activés de façon automatique et sans apprentissage lors des agressions et qui vont générer de l'inflammation. Récemment, plusieurs travaux ont montré que cette réponse immunitaire innée pouvait évoluer au cours du temps et des expositions aux antigènes qui l'activent. Une mémoire immunitaire, la « trained innate immunity » permet une réponse plus réponse plus intensive et mieux contrôlée et est sous la dépendance de mécanismes de régulation épigénétiques (33, 34).

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme face aux infections. Ce mécanisme de défense, précieusement conservé et développé au cours de l'évolution, ne nécessite pas de contact préalable avec les pathogènes. L'organisme sait réagir face aux germes de façon constitutive. Il est présent chez tous les organismes. Les principales cellules effectrices du système immunitaire inné sont les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les cellules Natural Killer (NK). Les médiateurs circulants sont essentiellement composés du système du complément, des défensines et des cytokines/chimiokines. Après avoir passé les barrières physiques que constituent les épithéliums à jonctions serrées (tight junctions) qui tapissent les interfaces, les bactéries sont au contact de molécules anti-bactériennes comme les cathélicidines présentes dans le surfactant ou bien encore les défensines, ces molécules ont des pore-forming activity et permettent une défense passive face aux bactéries (35-37). Au contact de la circulation, les bactéries et autres micro-

organismes sont rapidement opsonisés par les éléments du complément, en particulier le facteur C3b qui va entraîner leur phagocytose par les neutrophiles tandis que d'autres éléments du complément vont participer directement à la destruction des germes comme le complexe lytique C5-C9. On retrouve également dans la circulation des mannose-binding protein (collectines) qui se fixent à des carbohydrates localisés sur les parois des micro-organismes et des IgM naturelles qui vont contribuer à l'éradication bactérienne. Une infection se produit quand ces mécanismes de défense sont dépassés par un inoculum trop important ou par des mécanismes d'évitement de ces systèmes acquis par les micro-organismes. En parallèle de ces éléments de protection, les cellules de l'immunité innée initient et coordonnent la réponse aux infections.

a. Les Pattern-Recognition Receptors (PRRs)

L'immunité innée fonctionne par la reconnaissance de motifs pathogènes via des récepteurs spécifiques (les pattern-recognition receptors, PRRs) qui va déclencher une cascade réactionnelle inflammatoire stéréotypée. Les motifs reconnus sont exogènes, sous la forme de composants des micro-organismes (ou pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) mais également endogènes, sous la forme de motifs intracellulaires qui témoignent de lésions tissulaires (les damage-associated molecular patterns, DAMPs appelés encore alarmines). Les PRRs représentent un moyen ingénieux d'activer le système immunitaire face à un spectre très large d'agression et d'agents infectieux en utilisant un nombre relativement restreint de récepteurs. Les différents PRRs, acquis au cours de

l'évolution, ont profité de la relative stabilité génétique des eucaryotes pour gagner en efficacité.

Les PRRs :

On démontre à ce jour chez les vertébrés 4 types de PRRs :

1. les Toll-like receptors (TLRs)
2. Les Nod-like receptors (NLRs) (NOD = nucleotide oligomerization domain)
3. Les RIG-like receptors (RLRs) (RIG= retinoic acid inducible gene)
4. Les C-type lectin receptors (CLRs)

On distingue parmi ces 4 PRRs, les récepteurs qui possèdent un domaine hydrophobe qui va leur permettre de s'ancrer dans les membranes cellulaires et les vacuoles intracellulaires : TLRs et CLRs et les récepteurs hydrophiles « solubles » mais présents dans le cytoplasme : NLRs et RLRs.

A ces 4 types de PRRs, on peut rajouter de nouvelles classes récemment découvertes telles que les NAIP ou encore l'identification des dimères/oligomères Caspase 4/5/11 (38) comme nouveau type de PRRs. La recherche de ce type de récepteurs est très active et il est fort probable que de nouveaux types de PRRs soient encore découverts.

Ces PRRs sont exprimés par différents types cellulaires et entraînent plusieurs cascades d'activation intracellulaires. Les principales cellules exprimant les TLRs et qui vont contribuer à la phase aigüe du sepsis sont les

monocytes/macrophages, les cellules dendritiques en particuliers cd11b+ et les neutrophiles. Les monocytes/macrophages sont les cellules qui vont répondre le plus à l'activation des TLRs. Les TLRs sont aussi exprimés par certaines cellules épithéliales, en particuliers les cellules endothéliales. Nous détaillerons par la suite les rôles et fonctions des PRRs les plus décrits (les TLRs) et nous passerons en revue les particularités des autres PRRs.

b. Les TLRs et leur empereur : le TLR4.

La découverte de la protéine Toll et de ses fonctions chez la Drosophile par l'équipe du Dr Hoffmann (39) (Français et prix Nobel de médecine 2011) et les travaux de Medzhitov et Janeway chez les vertébrés et en particulier sur l'« human Toll » (qui sera par la suite identifié et renommé comme étant le TLR4) (40) ont été des révolutions dans le domaine de l'immunologie. Jusque là, l'immunologie s'intéressait principalement aux lymphocytes issus du Thymus (Les lymphocytes T) à l'origine de l'immunité cellulaire et ceux issus de la bourse de Fabricius chez le poulet puis identifiés chez l'homme (les Lymphocytes B comme bursa) à l'origine de l'immunité adaptative humorale et découverts il y a tout juste 50 ans (41, 42). L'identification d'une protéine, qui sera caractérisée comme un récepteur membranaire, capable d'induire une cascade d'activation face à des pathogènes sans nécessiter d'exposition préalable a été le point de départ de la découverte et de l'exploration des mécanismes faisant le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Bruce Beutler (co-récipiendaire avec Hoffman du prix Nobel) a par la suite montré que le TLR4 était le récepteur cellulaire du LPS (43, 44).

Les TLRs se caractérisent par un domaine extracellulaire riche en leucine (leucine-rich repeat domain) et un domaine cytoplasmique toll-interleukin-1 receptor (TIR) qui présente une importante homologie avec la portion intracellulaire du récepteur à l'interleukine 1 (45). L'étude du génome humain a permis de dénombrer 10 TLRs chez l'homme (12 chez la souris) (46) et la liste des ligands reconnus directement ou indirectement par ces TLRs est toujours en extension.

Toll receptor	Micro-organism	Structural component
TLR1	Neisseria meningitides	Triacyllipopeptides
	Mycobacteria	
TLR 2	Gram-positive bacteria	Lipoteichoic acid, lipopetpides
	Cytomegalovirus	Glycoprotein gB and gH
	Leptospirosis interrogans	Atypical lipopolysaccharide
	Porphyromonas gingivalis	Atypical lipopolysaccharide
	Yeast	Zymosan
	Measles	HA
	Herpes simplex virus	Unknown
	Varicella zoster virus	Unknown
TLR 3	Various viruses	ds RNA
TLR4	Gram negative bacteria	Lipopolysaccharide
	Respiratory Syncytial virus	Fusion protein
TLR5	Motile bacteria	Flagellin
TLR6	Mycoplasma	Diaacyl lipopeptides
	Gram-positive bacteria	Lipoteichoic acid
	Yeast	Zymosan
TLR 7	Influenza A	Single-stranded RNA containing uridines and ribose
	HIV	Single-stranded RNA containing uridines and ribose
	Varicella Stomatitis virus	Single-stranded RNA containing uridines and ribose
TLR 8	HIV	Single-stranded RNA
TLR9	Viruses and bacteria	CpG-containing DNA
TLR10	Unknown	Unknown

Table 5. Les TLRs humains et leurs ligands. D'après Gao et coll. (45)

La transduction du signal après fixation d'un ligand sur le TLR (dont certains sont endosomaux) entraîne l'activation de nombreux médiateurs (des protéines adaptatrices) via le domaine TIR (Myeloid differentiation protein 88 (MyD88), le TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP), le TIR receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon β (TRIF) et le TRIF-related adaptor molecule (TRAM) et des protéines kinases. Le résultat final de la cascade d'activation des TLRs mène à l'activation de différents facteurs, en particulier le facteur de transcription nuclear factor kappa B (NFkB) via MyD88 qui entraîne la génération de nombreux médiateurs de l'inflammation comme le TNFa ou l'IL1 β , l'interferon regulatory factor 3 (IRF3) et 7 (IRF7) ou bien encore l'activator protein-1 (AP-1) (46, 47) (figure 3). La synthèse de ces médiateurs de l'inflammation va entraîner l'activation des autres cellules de l'immunité innée ce qui conduit à la cascade réactionnelle (la « tempête cytokinique ») qui va amplifier et propager l'inflammation. Si certains facteurs sont liés à plusieurs TLRs (MyD88), d'autres sont plus spécifiques (TRIF, TRAM). Les effets des activations concomitantes de plusieurs TLRs sont encore mal étudiés et font intervenir des boucles de rétrocontrôle internes. Des molécules cytoplasmiques (MyD88s, IRAK-M (interleukine-1 receptor associated kinase M), Tollip, SOCS1 (suppressor of cytokine signalling 1)) ou membranaires (SIGIRR (single immunoglobulin interleukine-1R related molecule), ST2, ...) inhibent la cascade d'activation induite par les TLRs (48).

La signalisation via les TLRs nécessite leur dimérisation/oligomérisation ou bien l'association avec des protéines partenaires. Le TLR4 peut former un complexe avec le CD14 et peut se dimériser avec un autre TLR4 via la protéine MD2. Ce

complexe protéique va reconnaître le LPS directement (figure 4). Le TLR2 quand à lui peut se dimériser avec le TLR1 ou le TLR6. La variété de ces différents complexes permet de réguler la réponse inflammatoire, ainsi la reconnaissance du LPS via des complexes ne comprenant pas le CD14 va entraîner une activation de NFκB mais pas d'IRF3 (49).

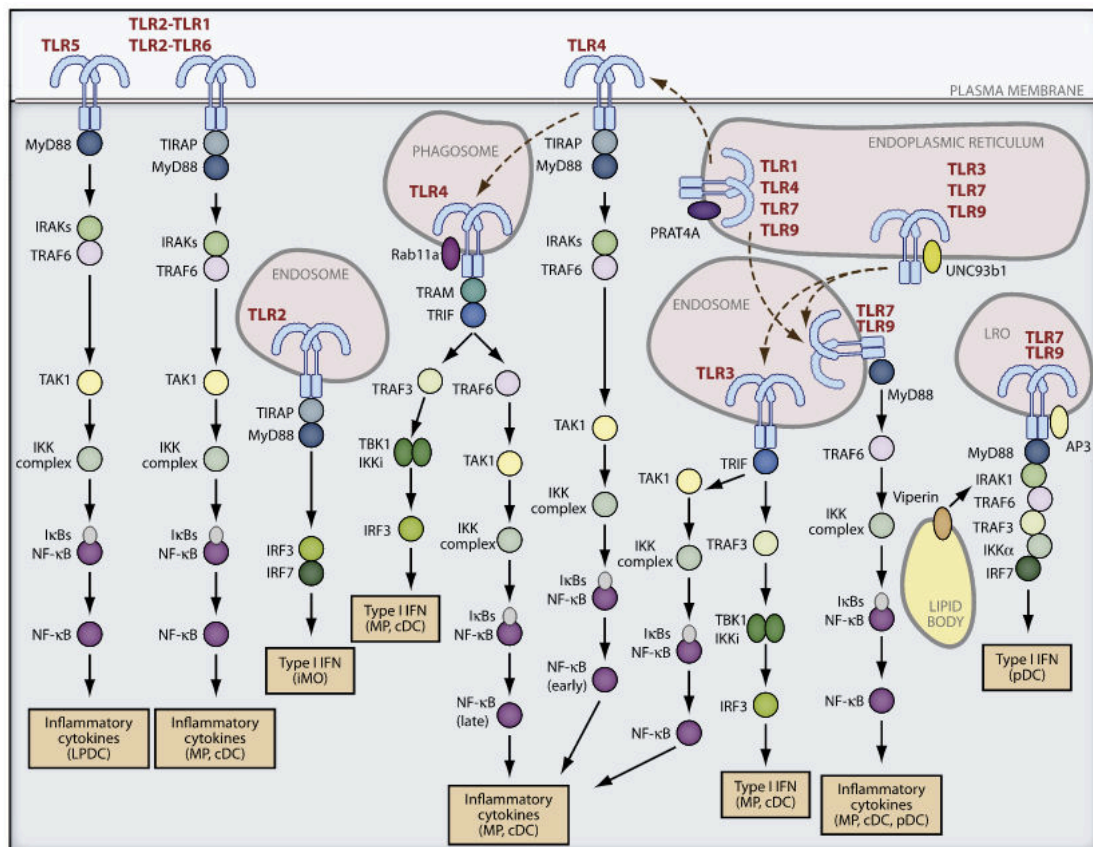


Figure 3. Cascade de signalisation en aval des TLRs. D'après Kawai et al. (45)

Plusieurs composants bactériens vont entrer en jeu lors des infections et activer différents TLRs. Schématiquement, les infections à BGN entraînent un signal TLR4 dominant, les BGP une activation médiée principalement par le TLR2, le TLR1 reconnaît un motif commun aux mycobactéries et le TLR5 reconnaît la flageline qui est un composant des bactéries mobiles. On peut observer des réactions croisées avec une activation des TLR4 par des DAMPs mais on peut

également observer des réactions indirectes comme par exemple la circulation de LPS suite à des souffrances intestinales lors de sepsis à BGP et qui va donc entraîner l'activation du TLR4 (50).

La régulation de la réponse aux TLRs passe par le contrôle des réactions intracellulaires en aval des TLRs mais également par le contrôle de la disponibilité des TLRs via l'augmentation ou la diminution de leur synthèse ou expression en surface et par la captation des motifs bactériens par des récepteurs leurres souvent solubles. Chez les patients en sepsis, les niveaux de transcripts (mRNA) et l'expression membranaire de TLR2 sont augmentés sur les neutrophiles et les monocytes comparativement aux volontaires sains ou aux patients de réanimations non-septiques (51, 52). L'augmentation d'expression de TLR4 à la membrane est quant à elle débattue malgré une augmentation de la transcription du gène. Des récepteurs solubles aux TLR2 et TLR4 ont été décrits mais la réalité de leur existence chez l'homme nécessite plus d'explorations. Ces mécanismes de régulation en amont et en aval des TLRs permettent un contrôle fin de l'inflammation et permettent sa résolution.

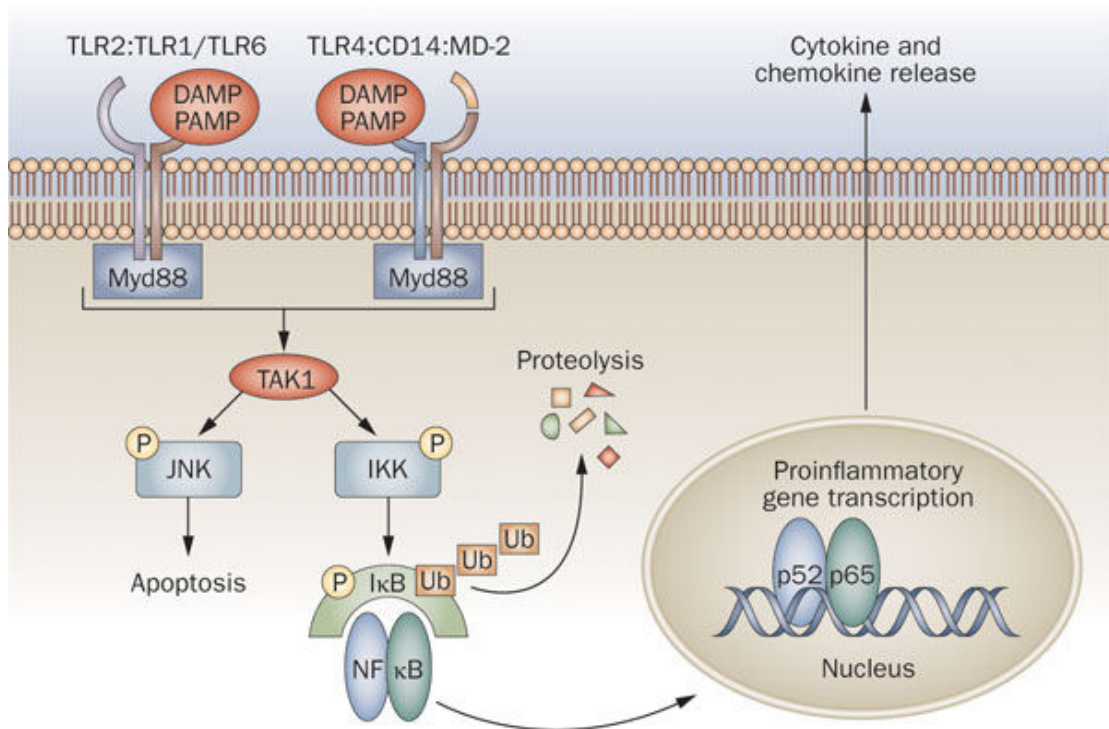


Figure 4. Interaction entre les TLRs. D'après Arslan et coll. (53)

Le rôle clé joué par les TLRs au cours du sepsis a été essentiellement démontré dans des modèles murins de sepsis. Les souris mutées en TLR4 (C3H/HeJ) ne répondent quasiment pas au LPS tandis que la mortalité liée à la ponction sur ligature caecale (CLP) ou aux infections à BGN comme la salmonellose est augmentée, de même la susceptibilité à avoir une infection à BGN est augmentée chez ces souris (54-56). Le déficit en TLR2 entraîne une augmentation de la sensibilité au sepsis induit par des BGP tels que le *Staphylococcus Aureus* ou le *Streptococcus pneumoniae* (57) mais également aux infections fongiques à *Candida Albicans* (58). De plus, les monocytes humains prélevés chez des patients présentant un polymorphisme de TLR2 ont une réponse altérée aux ligands de ce récepteur (59).

Le TLR4 joue un rôle central au cours du sepsis mais également au cours de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'IDM, l'ischémie-reperfusion, l'athérosclérose ou bien encore les brûlures (59-62). Lors des agressions, de toutes sortes, le TLR4 est activé via la reconnaissance des DAMPs, parmi lesquels on retrouve HMGB1, les protéines S100A8/A9, l'ADN mitochondrial, les histones, les fragments de hyaluronane ou encore les heat shock proteins (HSPs), qui sont libérées à la suite de dommages tissulaires et qui vont amplifier l'inflammation. La libération de ces molécules permet d'assurer un nettoyage rapide des zones endommagées et favorise la réparation des tissus (63-65).

c. NLRs

Les NLRs sont des PRRs solubles cytosoliques ; à ce jour on en dénombre 22 différents chez l'homme. La structure commune aux NLRs est le domaine NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) également dénommé NACHT. La majorité des NLRs possède un LRRs, comme les TLRs, en C-terminal. Les NLRs sont divisés en 4 sous-groupes, selon le type de domaine effecteur trouvé dans la partie N-terminale du récepteur, les 4 domaines effecteurs existants sont : le acidic transactivating domain (NLRA), baculovirus inhibitor repeats (BIRs) (NLRB), le caspase recruitment domain (CARD) (NLRC), et pyrin domain (PYD) (NLRP). A ces 4 sous-familles s'ajoute un récepteur atypique le NLRX1. Les NLRs sont exprimés par les cellules de l'immunité innée (essentiellement les monocytes/macrophages), de l'immunité adaptative (lymphocytes T) et par une grande variété de cellules épithéliales.

Les premiers NLRs décrits, NOD1 et NOD2, qui font partie de la famille NLRC reconnaissent différents motifs du peptidoglycane bactérien (motifs dominant chez les BGN et certains BGP pour NOD1 et quasi-ubiquitaire chez les bactéries extra-cellulaires pour NOD2). L'activation de ces NLRs par leur ligand va entraîner leur oligomérisation via le domaine CARD, ce qui entraîne une cascade d'activation intracellulaire dépendant de la kinase RICK qui va entraîner l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NFκB.

Les NLRs de la famille NLRP et le NLRC4 quand ils sont activés participent à la formation d'un complexe cellulaire appelé l'inflammasome. Le récepteur NLRP3 est activé par de nombreuses molécules qui incluent entre autre : l'ATP, diverses toxines, des motifs de *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes* ou bien encore l'ARN bactérien. NLRC4 est activé par la flageline bactérienne. L'activation de l'inflammasome conduit au clivage de la pro-Caspase 1 en Caspase 1 (sa forme active). La Caspase 1 va alors cliver la pro-IL1β et la pro-IL18 pour générer de l'IL-1β et de l'IL-18. L'activation de la caspase 1 par la flageline est NLRC4 dépendante mais TLR5 indépendante alors que le TLR5 a pour ligand la flageline mais en extracellulaire. Ceci témoigne de la fine régulation de la réponse inflammatoire qui peut réagir différemment à la présence d'un même motif bactérien selon que sa localisation soit intra- ou extracellulaire (66, 67).

d. CLRs

Les CLRs regroupent un ensemble de PRRs spécialisés dans la reconnaissance de carbohydrates de façon calcium dépendante (via le CRD pour carbohydrate recognition domain). On distingue 2 familles de CLRs membranaires (mCLR de type I et II) et un CLR soluble (sCLR). Les mCLR de type I comprennent DEC-205 et le macrophage mannose receptor (MMR) et contiennent plusieurs CRDs. Les mCLR de type II comprennent, entre autres, Dectin-1, Dectin-2 et DC-SIGN. Le sCLR est le mannose-binding lectine décrit précédemment. L'identification et la caractérisation précise des CLRs date d'une dizaine d'années.

Les Dectines 1 et 2 participent à l'immunité anti-fongique. Dectin-1 reconnaît les β -glucanes tandis que Dectin-2 reconnaît les alpha-mannanes (68-71). Leurs voies de signalisation incluent les facteurs Src et Syk qui vont conduire à la synthèse de ROS (Reactive Oxygen Species, espèces radicalaires de l'oxygène) et à l'activation de NFkB (72, 73). Ces récepteurs sont en interaction avec le TLR2 (73, 74).

DC-SIGN est un récepteur membranaire qui participe à la reconnaissance de virus (VIH, HCV, dengue, ...), bactéries (Leishmanie) et champignons (Candida sp.). C'est un récepteur spécifique des cellules dendritiques et sa voie de signalisation passe par Raf-1, en interaction avec les TLRs et active in fine NFkB (75).

e. RLRs

Le rôle des RLRs semble encore marginal au cours du sepsis mais leur découverte est encore relativement récente et des investigations sont encore en cours. Les RLRs sont spécialisés dans la reconnaissance de l'ARN viral qui peut être présent sous la forme d'ARN double brin (dsRNA). A ce jour, 3 RLRs différents ont été identifiés (76) : RIG-I, MDA5 et LGP2.

ii. Les médiateurs inflammatoires

La reconnaissance des motifs infectieux par le système immunitaire va générer la synthèse de nombreux médiateurs menant à la réaction inflammatoire. L'inflammation se définit comme étant la réaction de l'organisme face à un processus vulnérant, dans notre cas une infection et des lésions cellulaires (77). Le processus inflammatoire initié par les PRRs conduit à la synthèse locale de médiateurs, au recrutement de leucocytes, à la propagation du signal inflammatoire et in fine à la résolution de cette inflammation pour revenir à l'homéostasie. La recherche sur l'inflammation au cours du sepsis a beaucoup bénéficié des avancées techniques en terme de génération d'anticorps spécifiques et d'animaux mutés pour un ou plusieurs composant(s) de la réponse inflammatoire.

La synthèse accrue des médiateurs de l'inflammation constitue l'étape clé d'amplification du signal. L'activation et la translocation nucléaire de NFkB entraîne la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation que ce soit des protéines de la phase aiguë, des médiateurs lipidiques ou les cytokines et chimiokines (cf. le chapitre dédié aux chimiokines), tels que le TNF α , l'IL-1, IL-6,

IL-12, IL-15, IL-18, MIF, CCL2 (MCP-1) ou encore l'IL-8 (ces 2 derniers étant des chimiokines cruciales en physiopathologie humaine). Au cours du sepsis, on observe une élévation importante des taux circulants et intracellulaires de molécules normalement absentes ou en faible concentration (78-81).

L'activation du TLR4 entraîne également la synthèse d'interférons de type 1 via la voie TRIF (en particuliers IFN α et IFN β). Ceci entraîne la synthèse d'iNOS (inducible nitric oxide synthase) dans les leucocytes et tissus vasculaires qui génère du monoxyde d'azote (NO) (82). Les souris déficientes en NO répondent globalement moins sévèrement à l'endotoxine (83). Chez les patients en sepsis, des niveaux importants de NO sont retrouvés dans les tissus (84) et dans les vaisseaux (85). Le NO va contribuer au dysfonctionnement vasculaire et microvasculaire et induire de l'apoptose.

Le TNF α et l'IL-1 sont décrits comme les cytokines proinflammatoires prototypiques du sepsis et qui agissent de concert avec l'IL-6 pour initier et amplifier la réponse inflammatoire. Ces 2 cytokines, libérées rapidement après la stimulation des TLRs (30 à 90 minutes) sont capables d'induire par elles-mêmes une réponse inflammatoire comparable à celle observée lors de l'injection de LPS (cytokines, médiateurs lipidiques, ROS, molécules d'adhésion) et d'autre part d'activer la quasi-totalité des différents types de leucocytes et entraîner la synthèse des médiateurs sous le contrôle de NF κ B. Ces 2 protéines agissent également sur les cellules endothéliales allant jusqu'à provoquer leur apoptose et activer la cascade de la coagulation, particulièrement délétère au cours du

sepsis. Le TNFalpha agit en activant ses récepteurs TNFR I et II ; l'expression de ces 2 récepteurs contribue à l'équilibre du phénomène apoptose/inflammation et contrôle la mise en jeu de l'immunité adaptative. Ces résultats expérimentaux confirment le rôle physiopathologique majeur de ces 2 protéines et leur capacité à amplifier la réponse inflammatoire. L'IL-6 contribue à l'activation de nombreuses cellules immunitaires, à l'activation de l'endothélium vasculaire, à la synthèse de molécules hépatiques proinflammatoires et aux dysfonctions d'organes telles que la dysfonction myocardique (86).

Parmi la myriade d'autres médiateurs jouant un rôle déterminant au cours du sepsis, le macrophage inhibition factor (MIF) a été étudié avec attention. Initialement décrite dans les lymphocytes T, cette cytokine est produite par l'hypophyse antérieure lors des processus inflammatoires et a pour récepteur le CD74 qui est exprimé par les monocytes et les neutrophiles. Des niveaux élevés de MIF sont retrouvés au cours du sepsis et sont corrélés avec la gravité du patient. Dans des modèles murins de sepsis, l'invalidation génétique ou l'utilisation d'anticorps bloquants a permis de diminuer la mortalité associée à l'endotoxémie, la CLP ou le toxic shock syndrome induit par le staphylococcus aureus (87, 88). MIF participe également à l'amplification de la réponse inflammatoire et à augmenter l'expression membranaire de TLR4. MIF semble toutefois avoir un rôle ambiguë vis à vis de la réponse aux glucocorticoïdes. MIF semble supprimer les effets immunosuppresseurs des glucocorticoïdes (89, 90) mais de faibles doses de glucocorticoïdes induisent la synthèse et la libération de MIF alors que ces faibles doses de glucocorticoïdes ont montré un rôle, maintenant discuté, potentiellement bénéfique au cours du sepsis.

La libération de ces cytokines amplifie la réponse et déclenche de complexes réseaux d'activation qui vont orienter la réponse inflammatoire. L'exemple de l'IL-18 est instructif. L'IL-18 induit la production d'interferon gamma (IFN γ) (Interferon de type II) or l'IFN γ est connu pour augmenter l'expression de TLR4, MD2 et MyD88 sur les monocytes et atténuent la diminution d'expression de TLR4 après stimulation par le LPS (91). Ainsi non seulement le mécanisme est amplifié mais le phénomène de « désensibilisation » peut être en partie inhibé.

Les cytokines proinflammatoires vont entraîner la génération de phospholipase A2, de cyclo-oxygénase, de lipoxygénase et d'acétyltransférase qui vont provoquer la synthèse de dérivés d'eicosanoïdes tels que les leucotriènes, les prostaglandines ou le platelet-activating factor (PAF) qui sont des promoteurs de la dysfonction vasculaire. Néanmoins la prostaglandine E2 contribue à diminuer la synthèse de TNF alpha et joue un rôle régulateur sur les neutrophiles (92).

On observe également

- une importante synthèse hépatique de médiateurs de l'inflammation suite à la stimulation cytokinique. Les taux plasmatique de C-réactive protein (CRP) ou de Serum Amyloid A (SAA) s'élèvent rapidement à l'instar du fibrinogène et de l'alpha-2 macroglobuline.

- une élévation de la dégranulation des mastocytes et des basophiles via l'action des protéines C3a et C5a du complément (dénommées anaphylatoxines) et qui conduit à l'élévation de l'histamine plasmatique (93). L'histamine va alors contribuer à la dysfonction vasculaire et à la fuite capillaire.

Les anaphylatoxines augmentent par elles-mêmes la perte de perméabilité capillaire et ont un rôle de chémoattracteurs. L'invalidation génétique ou pharmacologique du C5a a montré son efficacité dans des modèles murins de sepsis (94) tandis que les inhibitions de C4, C3 ou C3R étaient délétères (95) .

Les cytokines pro-inflammatoires et le NO vont également contribuer aux dysfonctions d'organes en induisant une dysoxie, une perturbation de l'utilisation du dioxygène, en induisant des blocages de la chaîne respiratoire mitochondriale et en perturbant la sécrétion hormonale (96). Le système nerveux autonome est également altéré et la communication inter-organe s'en trouve interrompue et contribue ainsi aux dysfonctions (85, 97).

Les cellules endothéliales exposées aux agents infectieux et aux médiateurs inflammatoires réagissent de façon pathologique et induisent une fuite capillaire du fait d'une apoptose accrue et d'un relâchement des jonctions serrées sous l'action du NO, du TNF α , de l'IFN γ et de l'HMGB1 (98). Par ailleurs, les cellules endothéliales voient l'expression membranaire de molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1, la P-selectin, la E-selectin ou bien encore CX3CR1 (cf chapitre spécifique) qui vont favoriser les différentes étapes du recrutement cellulaire.

L'action concomitante de la synthèse de NO et de l'activation de la coagulation (cf plus bas) qui diminue la vitesse de flux dans les vaisseaux et l'activation des cellules endothéliales associée à une importante production de chimiokines (cf chapitre spécifique) va conduire au recrutement de leucocytes activés de la

circulation vers l'intérieur des tissus. On observe ainsi un rapide recrutement de neutrophiles puis de monocytes au site inflammatoire. Ces leucocytes activés entrent dans les tissus pour éliminer les bactéries et les cellules apoptotiques ou encore repeupler les tissus en macrophages mais ils vont également produire in situ des protéases comme la neutrophile-elastase (99), des cytokines inflammatoires et des ROS qui vont contribuer aux dégâts tissulaires et induire de l'apoptose. Le rôle spécifique des chimiokines au cours du sepsis sera étudié dans un prochain chapitre.

iii. Activation de la coagulation

Lors de la phase aigue du sepsis on observe une élévation de protéines pro-coagulantes comme le fibrinogène ou le kininogène de haut-poids moléculaire, le principal activateur de la coagulation au cours du sepsis reste toutefois le facteur tissulaire (Tissue Factor, TF) qui est libéré par les monocytes et les cellules endothéliales après activation des PRRs et sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires (100). Le TF active la coagulation par la voie extrinsèque dépendant du facteur VII et est sous le contrôle de protéines anti-coagulantes : protéine C, inhibiteur du plasminogène et antithrombine III. On observe qu'au cours du sepsis les taux de ces dernières protéines sont abaissés du fait d'une baisse de production et d'une consommation massive (101) ; dans le même temps le plasminogen-activation inhibitor I (PAI-I) qui empêche la génération de

plasmine à partir de plasminogène voit ses concentrations augmenter. Cette activation de la coagulation va mener à la formation de thrombus vasculaires et micro-vasculaires qui vont limiter le flux dans les organes et provoquer de l'ischémie. Cette ischémie vient s'ajouter aux perturbations de fonctionnements induites par les leucocytes activés dans les organes et en circulation et perpétuer un cercle vicieux de dysfonction-ischémie qui va générer toujours plus d'inflammation.

Location	Action	Immediate consequences	Delayed consequences
Endothelial cell	Loss of barrier	Fluid leakage	Tissue oedema
	Exposed BM	Platelet adherence	Vaso-occlusion
		Contact activation	Vasodilatation
	Adhesion molecule expression	Enhanced leukocyte tethering and transmigration	Bacterial clearance Vaso-occlusion
Platelets	PAR activation	Release of NO	Vasodilatation
	Cytokine release	Release of NO	Vasodilatation
	Adhesion molecule expression	Adherence	Vaso-occlusion
	Increased numbers		
Microparticles from monocytes etc	CD40L release	Promotes TF release	Intravascular coagulation
	Tissue factor	Activates extrinsic pathway of coagulation	Intravascular coagulation
	PSGL-1 expression	Binds P-selectin expressing cells	Clustering of particles and platelets
Circulating proteins	<i>Increased</i>	Enhanced coagulopathy and contact activation	Intravascular coagulation
	Fibrinogen		Vasodilatation
	HMWK		
	<i>Reduced</i>	Reduced anticoagulant effect. Loss of APC	
	APC	inflammation modulation	
	TFPI		
	Antithrombin 3		

Table 6. Impact du sepsis sur la coagulation et l'endothélium. D'après Sriskandan et coll. (102)

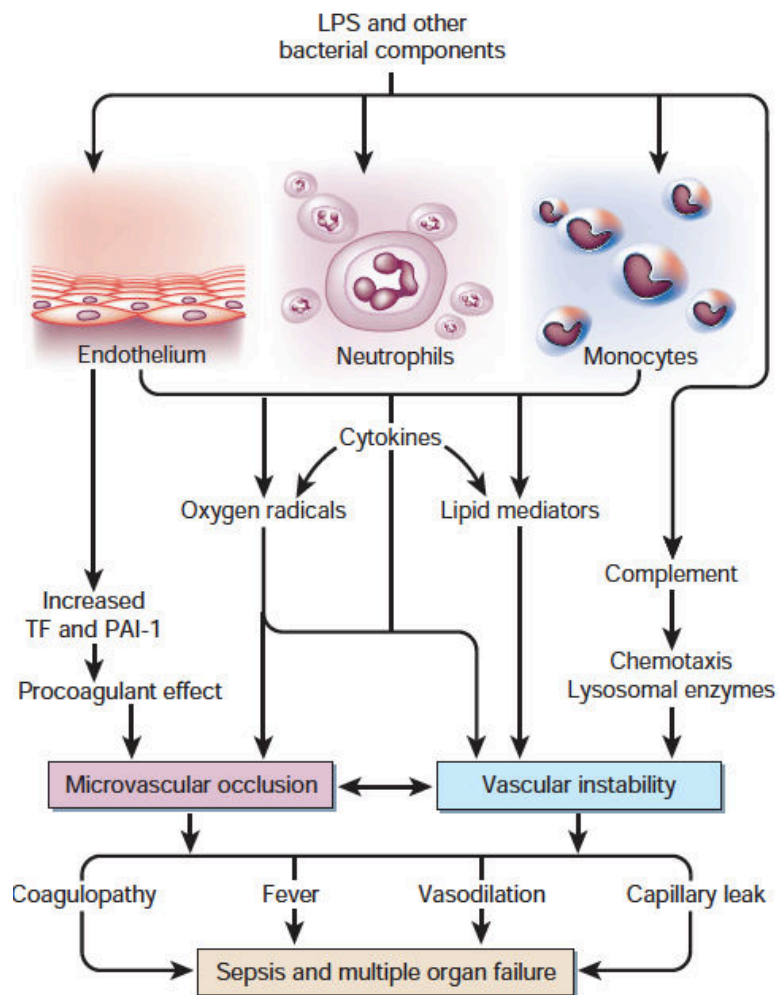


Figure 5. Mécanismes conduisant au sepsis et aux défaillances d'organe. D'après Cohen et coll. (103)

IV. Anti-inflammation et Immunosuppression

Les avancées dans les connaissances physiopathologiques du sepsis se sont faites en parallèle des avancées techniques de prises en charge des patients. Il est rapidement apparu que de façon simultanée à la constitution d'un état pro-inflammatoire au cours du sepsis, des médiateurs anti-inflammatoires (dont la figure de proue est l'IL-10) étaient synthétisés et qu'après la tempête cytokinique menant à l'infiltration leucocytaire et aux dysfonctions d'organes survenait un état d'altération de l'immunité qualifiée : d'immuno-suppression (IS), immuno-dépression ou immuno-allergie.

Du point de vue clinique, l'amélioration de la prise en charge des patients par l'utilisation précoce de l'antibiothérapie, l'apport précoce de solutés liquidiens, la bonne gestion des défaillances d'organes et la prévention des complications liées à la réanimation a conduit à un mouvement de pendule important sur la mortalité liée au sepsis. D'un syndrome qui conduisait au décès dans la majorité des cas au cours des premiers jours suivants l'apparition des premiers signes, on observe maintenant une répartition bi-modale des décès liés au sepsis. Le nombre des décès à la phase aiguë (J0-J4) reste important mais a diminué en proportion pour atteindre environ 30% des décès liés au sepsis dans certaines séries (104) tandis qu'est apparu une nouvelle entité clinique : celle du patient immuno-supprimé. Les patients survivant à la phase aiguë du sepsis peuvent évoluer vers un tableau de stagnation avec une lente récupération des dysfonctions d'organes qui conduit au maintien des soins invasifs de

réanimation et il apparaît que ces patients sont particulièrement sensibles aux infections nosocomiales dont les pneumopathies et les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. Près de 70% des décès liés au sepsis surviennent maintenant lors de cette phase tardive.

La compréhension des mécanismes et la cinétique des processus menant de la phase d'activation à la phase d'IS sont encore mal compris mais des avancées majeures dans l'identification des médiateurs clés et des modalités de la reprogrammation cellulaire ouvrent la voie à de nouvelles thérapeutiques, comme l'immunothérapie, au cours du sepsis.

Au cours du chapitre suivant, nous décrirons, miroir de ce qui a été fait précédemment, le rôle joué par les médiateurs anti-inflammatoire et nous analyserons les composantes de la phase d'IS du sepsis.

i. Médiateurs anti-inflammatoires

Les médiateurs anti-inflammatoires et les récepteurs solubles aux molécules induisant un signal inflammatoire sont produits en grande quantité au cours du sepsis. C'est un mécanisme essentiel pour contrecarrer le phénomène d'auto-amplification de l'inflammation et qui permet donc de la contrôler en intensité, en durée et induire sa résolution. La cytokine prototypique de l'anti-inflammation est l'IL-10 bien que les effets de cette cytokine varient selon les conditions. L'IL-10 inhibe la production des cytokines pro-inflammatoire, réduit

l'expression membranaire des TLRs et du CMH II (HLA-DR), oriente les lymphocytes T vers un profil TH2 et auto-amplifie ses effets en induisant la synthèse de Treg qui eux même vont produire de l'IL-10 (105-107). Les autres molécules impliquées de façon majeure sont le transforming growth factor β (TGF β), l'IFN alpha ou bien encore l'IL-4. Des antagonistes des molécules de l'inflammation comme l'IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) ou des récepteurs solubles comme le LPS binding protein (LBP), le récepteur soluble au TNF (sTNFR) ou le récepteur soluble au CD14 (sCD14) sont également produits en grande quantité et de façon ciblée (108).

Les neuromédiateurs et le système nerveux jouent également un rôle prédominant dans les mécanismes de contrôle et de régulation de l'inflammation. D'un côté la substance P augmente la production des cytokines pro-inflammatoires, le relargage d'histamine et le recrutement leucocytaire. La noradrénaline via son récepteur alpha2-adrénergique augmente la production de TNFa (109) tandis que l'adrénaline via la voie β -adrénergique limite la production des molécules pro-inflammatoires et augmente la production d'IL-10 (110, 111). Les autres substances produites par les neurones qui diminuent l'inflammation sont le VIP (vasointestinal peptide) et le pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PAAP) qui augmente la concentration d'AMP cyclique (cycle AMP, cAMP) leucocytaire. La production d'acétylcholine et leur interaction avec la sous-unité alpha 7 du récepteur nicotinique diminuent la production de TNFa par les monocytes et macrophages (112). Les boucles de contrôle entre le réseau cytokinique et la production de neurohormones jouent également un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie au cours des états de stress en

particulier via la production de glucocorticoïdes. La synthèse de molécules anti-inflammatoires a été initialement décrite comme correspondant au compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) qui suivrait la phase d'activation inflammatoire. Force est de constater que malgré une séquence légèrement décalée de sécrétions dans les modèles murins, chez l'homme les processus semblent survenir de façon simultanée. Dans un récent travail de Xiao et coll. (113), l'analyse du transcriptome des malades de réanimation et en particulier atteints de sepsis montre que les phénomènes miroirs de SIRS et de CARS surviennent plutôt de façon simultanée et vont conduire in fine au phénomène de reprogrammation cellulaire qui se traduit cliniquement par une tolérance à l'endotoxine et par l'immunosuppression (figure 6).

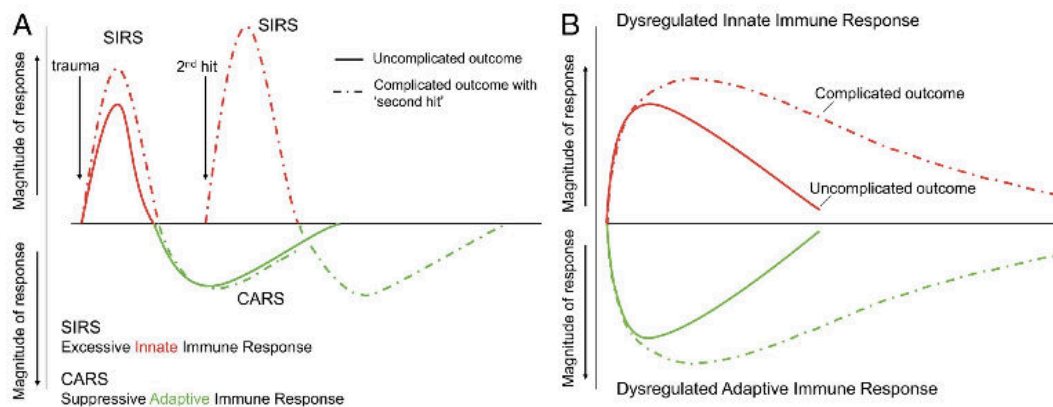


Figure 6. Schémas théorique d'action des mécanismes pro- et anti-inflammatoires. D'après Xiao et coll. (113)

ii. L'immunosuppression au cours du sepsis

En l'état actuel des connaissances, 2 théories opposées sont proposées pour expliquer les dysfonctions immunitaires observées au cours du sepsis. Dans les 2 cas de figure, on observe une activation quasi-simultanée des phénomènes de SIRS et CARS au début du sepsis avec une prédominance phénotypique de l'inflammation. La 1^{ère} théorie suppose que cette phase est suivie d'une phase de réelle immunosuppression qui conduit à l'augmentation du risque d'infections nosocomiales et au décès. La 2^{ème} théorie, à l'opposé, part du principe qu'il existe une non résolution de l'inflammation qui entraîne une inflammation latente qui perpétue les lésions d'organe (113-115). Ces 2 théories sont probablement complémentaires mais les preuves cliniques pointent néanmoins vers la 1^{ère} (figure 7).

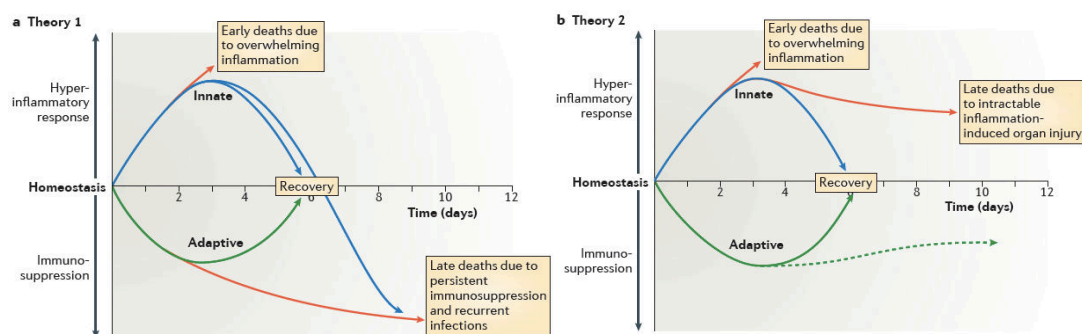


Figure 7. Théories expliquant la dysfonction immunitaire observée au cours du sepsis. D'après Hotchkiss et coll. (116)

Boomer et coll. (117) apportent des éléments déterminants pour la caractérisation de l'immunosuppression au cours du sepsis. Cette étude a consisté en la collecte des rates et poumons de patients décédés de sepsis en

comparant ceux-ci à ceux de patients de réanimation non septiques et de patients contrôles ; un phénotypage de surface et fonctionnel leucocytaire poussé a été réalisé sur ces prélèvements. On observe chez les patients en sepsis une diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et de l'IL-10 après stimulation par anti-CD3-CD28 (stimulation de la réponse lymphocytaire) et par LPS, une élévation du CD86, PDL1 et une diminution de l'HLA-DR sur les cellules présentatrices d'antigènes et les macrophages tissulaires. Une lymphopénie profonde est là encore confirmée avec une élévation du nombre de Treg et de Myeloid Derived Suppressor cells (MDSCs). Ces résultats témoignent de la réalité et de l'amplitude du phénomène et viennent corroborer des résultats antérieurs de cette équipe et d'autres.

Dans une revue récente, Hotchkiss et coll. (116) listent les modifications cellulaires observées au cours de la phase d'immunosuppression du sepsis, celle-ci sont résumées dans la figure 8.

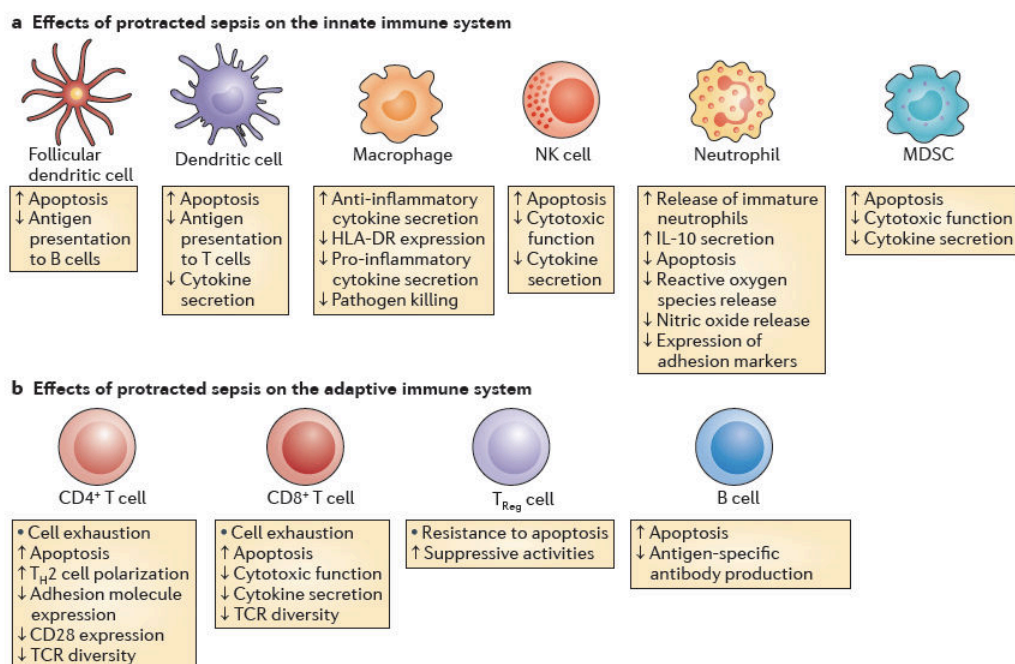


Figure 8. Modification phénotypique des différentes catégories leucocytaires au cours du sepsis. D'après Hotchkiss et coll. (116)

La totalité des cellules de l'immunité (innée et adaptative) sont atteintes au cours du sepsis. Cela fait déjà plusieurs décennies que le phénomène de tolérance à l'endotoxine a été décrit. La stimulation de sang total ou de monocytes de patients atteints de sepsis montre une diminution importante des capacités de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tandis que la synthèse d'IL-10 est accrue (80, 118-120). Plusieurs auteurs ont montré le rôle majeur des modifications épigénétiques dans la constitution de la tolérance à l'endotoxine (figure 9) (121).

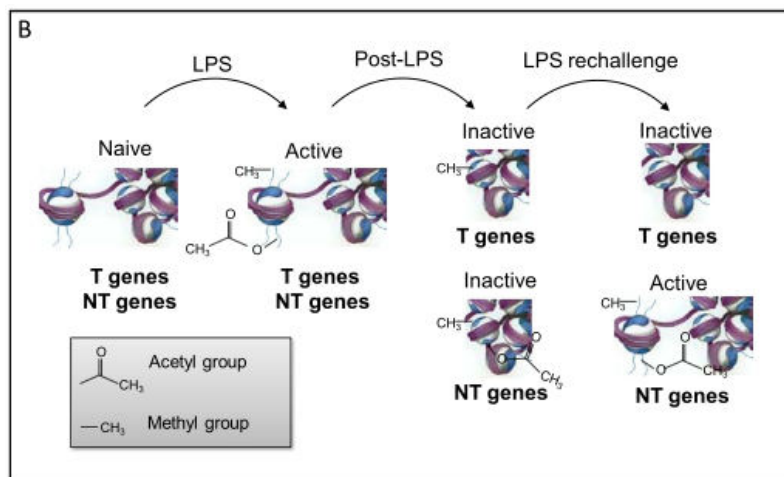


Figure 9. Modifications épigénétiques survenant au cours du sepsis. D'après Leentjens et coll. (121). L'acétylation des histones est un marqueur d'activation tandis que leur méthylation peut être à la fois inhibitrice ou activatrice. Lors du phénomène de tolérance à l'endotoxine, on observe une inactivation des gènes tolérables T et une activation des gènes non tolérables NT.

Un phénomène majeur qui est observé chez les patients en sepsis est celui de l'apoptose. On observe chez les malades et dans les modèles murins, une apoptose marquée des différentes populations lymphocytaires (CD4+, CD8+, lymphocytes B) et de certaines cellules dendritiques (122-124). Le nombre de ces cellules est diminué dans les organes lymphoïdes et les GALT (gut-associated lymphoïdes tissues) ce qui prédispose aux translocations bactériennes secondaires. La seule population lymphocytaire stable (donc croissante en proportion) est celle des Treg qui contribue à l'anergie immunitaire par synthèse élevée d'IL-10. A contrario, le taux d'apoptose des neutrophiles circulants est habituellement élevé (proche de 50%) et se retrouve diminué au cours du sepsis (125). On observe ainsi une accumulation de neutrophiles dysfonctionnels, une augmentation du nombre de neutrophiles « régulateurs » qui vont sécréter de

l'IL-10 et une augmentation des neutrophiles immatures (MDSCs granulocytiques). Le taux de monocytes immatures s'élève également (MDSCs monocytiqes). Une importante phagocytose des cellules apoptotiques est observée, celle-ci entraîne un phénotype cellulaire et local de type anti-inflammatoire qui peut également contribuer à l'immunosuppression et là encore à la synthèse d'IL-10. Les neutrophiles sont alors dysfonctionnels et perdent de leur efficacité dans la clairance bactérienne, la production de ROS et le recrutement aux sites inflammatoires notamment par la diminution de l'expression du récepteur CXCR2 (126). La mobilité altérée des neutrophiles est directement corrélée au risque de développer des infections nosocomiales. Cette apoptose est intimement liée au phénomène inflammatoire et sous la dépendance des TLRs.

MDSCs : Les Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) ont été initialement identifiées dans les années 1970-1980 et décrite comme des Natural Suppressors (NS) cells capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (127). Elles ont été redécouvertes par la suite par 2 groupes indépendants. Les MDSCs sont des cellules myéloïdes immatures retrouvées dans la circulation lors des inflammations (sepsis, cancer, ...). Elles expriment les marqueurs de surface CD11b (commun à la majorité des cellules myéloïdes) et Gr-1 (qui reconnaît à la fois le Ly6C et le Ly6G et qui marque chez la souris à la fois les neutrophiles (Gr-1^{high}) et les monocytes (Gr-1^{low})). On peut distinguer des MDSC monocytiqes (Ly6C⁺Ly6G⁻) et des MDSC granulocytiques (Ly6C^{dim}/+Ly6G⁺). Ces cellules sont donc des monocytes et des neutrophiles immatures. Elles sont identifiées comme telles par la forme annulaire des noyaux ce qui correspond à une

développement incomplet et à l'expression du CD31. Elles sont capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T in vitro et leur polarisation vers un phénotype TH2. Dans le modèle de CLP murin, on observe une augmentation progressive du nombre de MDSCs dans la rate et la moelle (128). La stimulation ex vivo des splénocytes issus de rate prélevée après 7 jours de sepsis induit une forte production de TNF α , d'IL-10, de RANTES (CCL5) et de MIP-1 β . L'apparition de ces cellules est TLR et MyD88 dépendante et nécessite des voies de signalisation comme celles de la PI3K, Ras, Jak/Stat et le TGF β (129). On les retrouve également au cours du sepsis humain et elles sont à l'origine d'une diminution de la synthèse d'INF γ et d'IL-2. Ces cellules dysfonctionnelles et produites en grande quantité pourraient en partie expliquer la lymphopénie observée au cours de la phase secondaire du sepsis mais également la susceptibilité augmentée aux infections. Des données récentes semblent montrer que les mMDSCs sont hautement suppressives tandis que les gMDSCs contribuent plutôt à induire une tolérance des lymphocytes T (130-133). Les MDSCs synthétisent d'importantes quantités d'Arginase 1, anti-inflammatoire, captent les cystéines essentielles aux réponses lymphocytaires T et produisent de hauts niveaux de ROS. L'effet tolérogène des MDSCs serait lié à l'expression du CD40 (134). Le rôle des MDSCs semble également évoluer au cours du temps, ainsi les premières cellules immatures obtenues 3 jours après une CLP sont plutôt caractérisée par une hyporéaction aux stimuli tandis que les MDSCs tardives présentent les caractéristiques décrites précédemment (135). Ainsi, le phénotype des MDSCs évolue et semble correspondre à une réelle reprogrammation cellulaire. Une étude récente montre que les MDSC se caractérisent par la présence en surface de la calgranuline S100A8 et pourrait

constituer un marqueur spécifique (136). On ne connaît pas encore à ce jour le rôle exact des MDSCs mais leur apparition semble être finement contrôlée. Un rôle potentiel pour ces cellules serait le repeuplement des macrophages et mDCs tissulaires dont le nombre a diminué suite à l'apoptose accrue à la phase initiale du sepsis.

Les IRA B cells : Dans un article publié en 2012 dans Science, Rauch et coll. (137) ont montré que lors des pathologies inflammatoires, une source jusque là non connue de GM-CSF, le facteur de croissance commun aux cellules myéloïdes, est une nouvelle catégorie de lymphocytes B : les innate response activator B cells. Ces cellules sont nécessaires à la constitution et de la réponse immunitaire innée. Ces cellules sont issues des lymphocytes B de type B1 qui résident dans les séreuses et qui vont se relocaliser et s'expandre dans la rate lors des pathologies inflammatoires. Dans le modèle de CLP leur absence (l'absence de Lymphocytes B capables de produire du GM-CSF) est associée à une surmortalité, une augmentation de l'infiltration par les cellules myéloïdes et des dégâts tissulaires majorés. Ces cellules sont également retrouvées chez l'homme et constituent une nouvelle ligne d'activation de l'immunité innée jusque là inconnue.

Les phénomènes de sécrétions de cytokines anti-inflammatoires et les mécanismes menant à l'immunodépression post-septique sont donc complexes et encore peu compris mais vont constituer à l'avenir un champ majeur de la recherche dans le sepsis. Les mouvements de pendule concernant le sepsis sont importants. Le dogme ancien qui consistait à penser que le traitement spécifique

du sepsis reposait sur une atténuation de la phase inflammatoire uniquement a vécu. L'immunostimulation, notamment au moyen de l'immunothérapie, est un champ de recherche et d'expérimentation intense. Il apparaît fondamental de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu tant en terme d'inflammation que d'immunosuppression et comprendre de quelle façon se fait la transition. Il se pourrait qu'à l'avenir le traitement du sepsis soit non pas universel et monoforme mais adapté à la cinétique du sepsis et au temps d'intervention pour limiter les dégâts qui pourraient être causé par l'inflammation et stimuler le système immunitaire pour prévenir les infections nosocomiales.

V. Sepsis, l'échec des essais thérapeutiques

Comme nous l'avons vu précédemment le sepsis est un fléau en pleine expansion. Malgré d'immense progrès dans la compréhension des mécanismes menant au sepsis et la prise de conscience du rôle déterminant de l'hôte dans ce syndrome, aucun traitement spécifique n'a fait la preuve de son efficacité. Près de 100 essais contrôlés randomisés ont été réalisés pour traiter ces patients mais n'ont donné lieu à aucune mise sur le marché de traitement du sepsis, à l'exception de la Protéine C activée et du traitement corticoïde, tous deux éphémères. Plusieurs dizaines de milliers de patients ont été inclus dans ces études pour un coût total dépassant le milliard de dollars. Plusieurs difficultés expliquent ces échecs, parmi elles, on retrouve des difficultés méthodologiques comme la taille des échantillons ou des difficultés conceptuelles comme l'identification des catégories de patients à cibler, le choix du calendrier de début de traitement et le choix de la cible thérapeutique. A l'instar des traitements pour le cancer ou le VIH, il est impératif de progresser simultanément dans l'amélioration des thérapeutiques et de la connaissance physiopathologique. Les futurs essais thérapeutiques devront se reposer sur l'expérience acquise et être mieux pensés. Dans le chapitre suivant, nous discuterons brièvement des résultats des essais cliniques thérapeutiques ayant été conduits sur le sepsis.

Le premier essai clinique thérapeutique conduit sur le sepsis date de 1976. Schumer et coll. (138) ont testé l'effet de fortes doses de méthylprednisolone chez 172 patients en choc septique et ont montré une diminution de la mortalité

de 39 à 11%. Quarante ans plus tard, malgré des premiers résultats prometteurs (139), un essai clinique de grande envergure (140) n'a pas permis de retrouver de bénéfice à la corticothérapie chez les patients septiques.

Parmi les essais thérapeutiques ayant pour objectif de limiter l'inflammation au cours du sepsis on retrouve des études sur les AINS, les anticorps anti-LPS, des antagonistes des TLRs, les anticorps anti-cytokines pro-inflammatoires (anti-TNF, anti-IL-1, anti-PAF), des chélateurs du NO, des régulateurs de la réponse immunitaire comme les immunoglobulines polyvalentes, les facteurs de croissance comme le G-CSF, l'INFg ou bien encore des traitements ayant pour but de corriger les troubles de la coagulation comme le tissue factor pathway inhibitor (TFPI), les anticorps anti-facteur tissulaire, des anti-thrombines, la thrombomoduline, l'héparine et la protéine C activée. Cette dernière molécule a suscité de nombreux espoirs après une première étude positive (141) publiée en 2001, hélas l'étude confirmatoire, multicentrique, internationale n'a pas retrouvé de bénéfice clinique à l'utilisation de la PCa ce qui a conduit l'industriel à retirer le produit du marché (142).

Plus récemment, un essai contrôlé randomisé multicentrique mené en France (143) a également infirmé des résultats positifs antérieurs sur les effets bénéfiques de l'hémoperfusion à la polymixine B au cours du sepsis (144). La controverse persiste toutefois chez les partisans de cette méthode (145, 146).

Les essais récents utilisant la lactoferrine et l'Eritoran (un antagoniste du LPS) viennent s'ajouter à la litanie des tentatives infructueuses de développer des traitements spécifiques du sepsis (147).

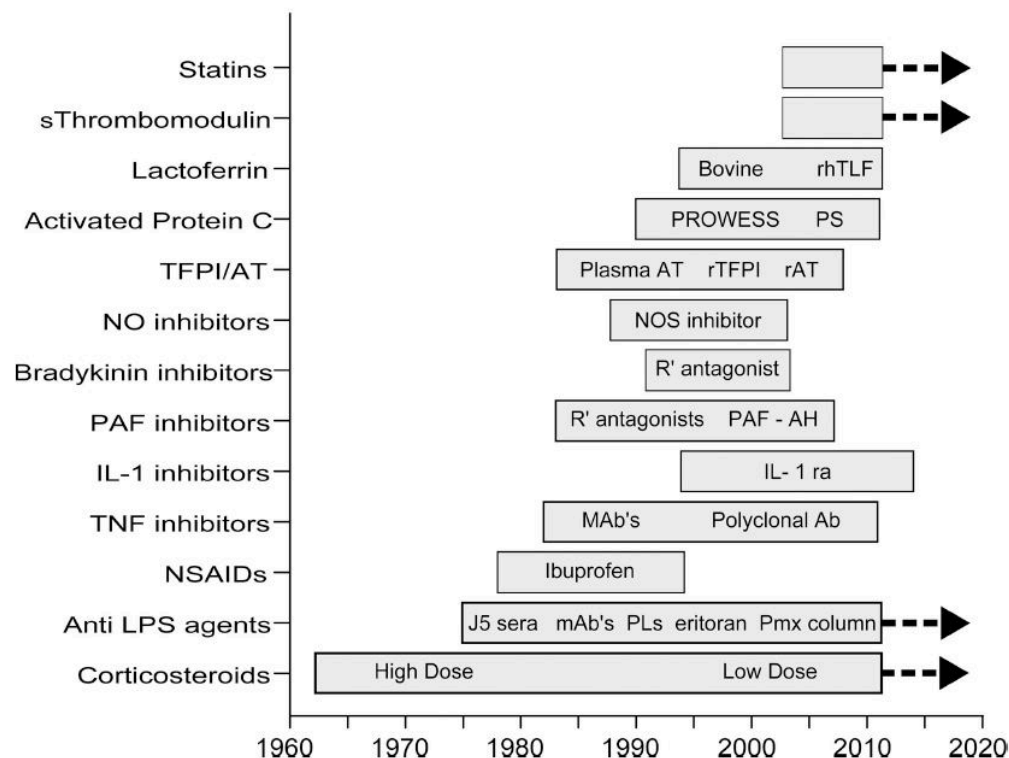


Figure 9. Les différents essais cliniques de traitement du sepsis. d'après Opal et coll. (148)

Pourquoi ces échecs ? Identifier une seule et unique raison est une gageure.

Tout d'abord, on peut questionner le choix des modèles qui ont conduit aux essais cliniques. Les essais se basent sur des résultats pré-cliniques, généralement dans des modèles animaux associés à des résultats observationnels chez l'homme. Cette stratégie d'identification des cibles thérapeutiques potentielles n'est pas sans risques (cf chapitre suivant). A ce

problème s'ajoute un calcul d'effectif souvent insuffisant ou en retard par rapport à la situation clinique actuelle (de nombreux cas de surévaluation de la mortalité dans le groupe contrôle a conduit à de fausses hypothèses).

Se pose ensuite un problème majeur de l'identification des patients à traiter qui renvoie au problème de la définition même du sepsis. De façon provocante on pourrait arguer que le sepsis existe en tant que tel. Si des mécanismes comparables sont en jeu, la pneumonie du sujet jeune ou la méningococcémie fulgurante sont elles comparables à une péritonite sur perforation intestinale survenant chez un patient âgé et diabétique ?

Finalement, la création de la définition du sepsis a conduit à une simplification. Le sepsis est un cadre nosologique plus qu'une entité clinique en soi. La recherche sur le sepsis peut être comparée à la recherche sur le cancer. Au milieu des années 1900, un cancer se caractérisait par la présence d'une tumeur (une masse) et d'un amaigrissement. Aujourd'hui, l'absence d'unicité dans la caractérisation des cancers malgré des processus menant à la cancérisation parfois similaires semble évidente. Le diagnostic du cancer se base sur des paramètres cliniques, d'imagerie et surtout d'anatomopathologie et d'étude en biologie moléculaire, ce qui a permis de décrire différents types de cancers capables de répondre à différents types de traitements. Ceci nous amène à penser que le sepsis est encore à la porte de sa révolution conceptuelle. Dans les années à venir, les études « OMICS » de patients sélectionnés et coordonnées dans le temps permettront de mieux distinguer des groupes de patients (des « clusters ») partageant des caractéristiques cliniques ou biologiques et qui

seront sélectionnés pour investiguer les différents traitements. La difficulté de la recherche du sepsis vis à vis du cancer tient à sa temporalité et à l'intrication des différents paramètres mis en jeu. La phase d'installation du sepsis dure quelques heures et une fois la cascade inflammatoire activée les défaillances d'organe sont multifactorielles. Des biomarqueurs de diagnostic, de prédiction de réponse aux traitements et d'évaluation de la réponse au traitement sont indispensables.

De nombreux essais sont conduits à l'heure actuelle pour tenter de stimuler le système immunitaire au cours de la phase tardive du sepsis, parmi ces essais on trouve celui du GM-CSF, de l'INFg, du Flt3 et bientôt de l'IL-7 (116). Identifier les patients qui bénéficieront le plus de ces thérapeutiques à partir des biomarqueurs existants (HLA-DR monocytaire par exemple) devient un pré-requis pour la conduite de ces expérimentations.

Enfin, l'ouverture des bases de données de patients inclus dans les essais cliniques et de nouvelles méthodes de conduite des essais, comme les essais adaptatifs, pourraient accélérer la découverte de nouveaux traitements.

Ces exemples pointent du doigt les limites actuelles de nos connaissances dans la physiopathologie fine du sepsis et confirment l'intérêt de poursuivre et amplifier toutes les initiatives qui permettent d'arriver à une meilleure compréhension de cette « entité » qu'est le sepsis.

VI. Limites des modèles murins

La recherche *in vivo* sur le sepsis est réalisée sur différents animaux : souris, lapins, rats, agneaux/chèvres ou bien encore cochons pour les mammifères, drosophiles, poissons zèbre ou xénope pour les non mammifères. La souris est de loin l'animal le plus utilisé. Les avantages compétitifs de la souris sont son court cycle de reproduction (fertile entre 5 et 8 semaines, 3 semaines de gestation), son faible encombrement, la facilité à manipuler l'animal et surtout la présence d'un nombre vertigineux de lignées modifiées génétiquement pour un ou plusieurs gènes (invalidés, hyperactivés, couplés à des rapporteurs fluorescents, sous (in)activation sélective, etc.).

Les modèles les plus utilisés sont :

- l'inflammation « stérile » induite par le LPS ou d'autres agonistes des récepteurs Toll/TLR.
- une infection bactérienne (plus rarement virale): avec entre autres pneumopathie, infection urinaire et surtout péritonite polymicrobienne secondaire à une ponction sur ligature caecale (caecal ligation and puncture, CLP).

Tous ces modèles peuvent être utilisés avec des intensités variables et donc induire différentes cinétiques de réaction et causer des taux de mortalité variables.

La CLP est de loin le modèle le plus retrouvé quand il s'agit d'étudier le sepsis. Il existe sous différentes variantes mais il mime, en théorie, le cas du patient

atteint d'un sepsis d'origine digestive (péritonite sur perforation ou post-opératoire) qui représente une large part des admissions pour sepsis.

Il est possible de dissenter à l'infini sur l'apport des modèles murins à la compréhension des pathologies humaines. Humain et souris sont des espèces différentes, ayant des gènes parfois différents, des différences physiologiques, des particularités immunologiques propres à chaque espèce (cf. lignées monocytaires ou cellules exprimant CX3CR1 homme vs souris), toujours est-il que ces modèles ont permis de comprendre bon nombre de phénomènes qui ont été retrouvés chez l'homme sain ou malade (par exemple : recrutement cellulaire lors des infarctus du myocarde, néovascularisation des tumeurs ou bien encore le rôle des hormones dans la gamétogenèse).

En dehors des limites inhérentes au modèle animal en général, plusieurs éléments des expérimentations limitent la superposition directe des résultats observés chez la souris à l'homme. La première limite est liée au choix de l'animal. Classiquement, les CLP sont réalisées chez des souris d'un seul sexe, jeune et en bonne santé alors que le sepsis survient dans les 2 sexes et majoritairement chez des patients âgés et ayant de nombreux antécédents médicaux (diabète, athérosclérose, etc.). Les autres limites proviennent du dessin expérimental. Prenons le cas « classique » de l'évaluation du rôle d'un gène au cours du sepsis. Habituellement, de fortes preuves sont apportées par l'utilisation combinée d'une souris invalidée génétiquement pour ce gène, d'un inhibiteur/antagoniste et si possible de l'apport de la protéine manquante à la souris déficiente. Ces multiples conditions imposent déjà d'avoir un nombre important d'animaux pour avoir un minimum de puissance statistique (au mieux

évaluée en amont par un calcul d'effectif) et tester les différentes conditions. Or, ces conditions « propres » ne sont jamais retrouvées chez le patient de réanimation. Le patient en sepsis peut être sous les effets de ses traitements habituels, il reçoit des solutés de réanimation, des antibiotiques, des électrolytes basées sur les résultats de ses prélèvements sanguins, des amines vasopressives, de la ventilation mécanique, de la dialyse, etc. Chacune de ces interventions va avoir un effet, même si parfois modeste, sur la réponse immunitaire globale. Le modèle murin est plus proche ainsi présenté d'un modèle de sepsis non réanimé très difficilement transposable.

Pour pallier à ces défauts majeurs, des ajustements peuvent être effectués en utilisant des souris plus âgées, en débutant les traitements, notamment par antibiotiques, après avoir laissé le sepsis s'installer afin d'évaluer de façon plus fidèle le retentissement chez l'homme des résultats observés (quand ils sont toujours présents).

Dans un article récent publié dans PNAS, Seok et coll. (149) analysent les réponses transcriptomiques humaines et murines dans différents modèles inflammatoires et concluent que les réponses entre les 2 espèces ne sont pas comparables ce qui pose la question de l'utilisation de ces modèles. La méthodologie de ces résultats est hautement questionnable tant dans le fait de repérer les gènes les plus activés que dans la qualité des échantillons qui comportaient le plus souvent du sang total dont la composition est différente chez la souris et l'homme. En utilisant la même base de données, Takao et coll. (150), dans un article en miroir, concluent eux que les mêmes voies d'activation sont sollicitées dans les 2 espèces avec une très bonne concordance.

Ces différences n'invalident pas pour autant l'intégralité des résultats observés, ils limitent, comme partout en recherche, les conclusions tirées et imposent des règles de bonnes pratiques de la recherche dans ce domaine.

2^{ème} partie : Les monocytes

I. Introduction

C'est à Elie Metchnikoff que nous devons la découverte des « phagocytes ». Metchnikoff a découvert des cellules capables d'ingérer des corps étrangers ou des cellules exogènes et a fait la brillante hypothèse, puis la preuve, de leur implication dans la réponse inflammatoire lors des infections. C'est à ses travaux que nous devons en grande partie l'identification des neutrophiles et monocytes/macrophages. Ces découvertes lui ont valu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1908 et font de lui le père de l'immunité cellulaire.

Comme décrit précédemment, les monocytes sont des éléments clés dans la réponse immunitaire innée au cours du sepsis et au cours de la phase d'immunosuppression. De plus en plus d'études témoignent du rôle crucial de ces cellules dans les pathologies inflammatoires et en particulier infectieuses. Bien qu'ils représentent entre 2 et 5% des leucocytes circulants selon les espèces, les monocytes sont polyfonctionnels et constituent un point de pivot essentiel dans la réponse inflammatoire dans le sens où ils contribuent à l'initiation de l'inflammation mais également à son contrôle et sa résolution. Dans le chapitre suivant, nous analyserons spécifiquement cette population leucocytaire depuis son développement embryonnaire jusqu'à l'analyse de ses fonctions à l'état stable ou en pathologie.

Les monocytes sont des leucocytes majoritairement circulants issus de la lignée myéloïde. Le monocyte est une cellule en transition et en transit. Sa production

est majoritairement médullaire mais parfois splénique (cf. paragraphe spécifique). Une fois matures, les monocytes quittent la moelle pour entrer dans la circulation d'où ils circuleront à travers tout l'organisme jusqu'à être détruits, être recrutés dans des sites inflammatoires ou encore se transformer en macrophages ou cellules dendritiques. Leur durée de vie moyenne est estimée à 24h mais varie grandement selon le « destin » individuel de chaque cellule. Cette fugacité in vivo et également vraie in vitro car le maintien de monocytes primaires en culture est quasi-impossible au delà de quelques heures car ils entrent rapidement en apoptose ou se transforment en macrophages. Malgré cette courte demi-vie, les monocytes n'en sont pas moins des composants actifs et déterminants de la réponse immunitaire et possèdent de nombreuses fonctions indépendantes ou presque de leur transformation en cellules plus pérennes. On distingue à ce jour chez l'homme 3 sous-populations de monocytes et 2 chez la souris qui se différencient par leurs taille, phénotype, fonctions et surtout marqueurs moléculaires à leur surface cellulaire.

II. La synthèse des monocytes

Chez l'adulte sain, la production de monocytes est médullaire et se fait principalement à partir de cellules souches progénitrices (Hematopoietic Stem and Progenitor Cells, HSPCs) pour la plupart auto-renouvelables. Le « circuit » de développement habituel à partir des hematopoietic stem cells (HSCs) passe au cours des divisions cellulaires par la différenciation en différentes populations qui sont :

- les multipotent hematopoietic progenitors (MPP)

- les common myeloid progenitors (CMP)
- les macrophage and dendritic cell progenitors (MDP)
- les common monocyte progenitors (cMoP)

pour finalement arriver aux monocytes circulant qui vont eux-mêmes maturer puis possiblement se transformer (151-155). Cette chaîne de développement peut toutefois être « court-circuitée » en cas de besoin, lors d'une inflammation aiguë, par la transformation des HSPC en myeloid-restricted progenitors (MyRP) qui vont participer à une production accélérée des cellules myéloïdes en se différenciant directement en progéniteurs myéloïdes (156). Des données récentes (157) montrent qu'il existe un progéniteur primitif qui apparaît dans le sac vitellin à E8.5 puis qui va migrer dans le foie fœtal et donner naissance aux monocytes et macrophages (le erythro-myeloid progenitor, EMP) et que cet EMP est indépendant de Myb qui est un facteur de transcription essentiel pour les HSCs. Les monocytes dérivant des HSCs vont ensuite progressivement remplacer les monocytes dérivant de l'EMP contrairement à la majorité des macrophages tissulaires (cf chapitre macrophages).

Plusieurs facteurs transcriptionnels vont contrôler ce circuit de développement, parmi lesquels on trouve PU.1, C/EBPalpha, l'interferon regulatory factor 8 (IRF8), Myb, le Kruppel-like factor 4 (KLF4) (158, 159) et NR4A1 (aussi dénommé Nur77) (160, 161). Ces 2 derniers facteurs sont essentiels pour la synthèse des monocytes inflammatoires et la maturation des monocytes inflammatoires en monocytes dits « résidents », « non-

inflammatoires » ou bien encore « patrouilleurs ». En plus des facteurs transcriptionnels, des facteurs de croissance sont nécessaires au développement adéquat de ces différentes population : le M-CSF, le GM-CSF, le G-CSF et l'IL-3 (162, 163). Ces facteurs de croissance interagissent avec leur récepteur dans la régulation de l'expression des facteurs de transcription. Tous les monocytes circulants, chez l'homme et chez la souris, expriment le récepteur au M-CSF (CD115).

La production de monocytes est également sous le contrôle de l'environnement des HSCs (les « niches ») qui contribuent à la biologie des HSCs via la sécrétion de CXCL12 (SDF-1) (164, 165) ou de stem cell factor (SCF). Le système nerveux central (SNC) contribue également à la synthèse de monocytes via l'action des récepteurs β 3-adrénergiques sur les cellules progénitrices (166, 167).

III. Monocytes et sous-populations monocytaires

i. Les monocytes humains

On retrouve entre 300 et 1000 monocytes / μ l de sang ce qui représente environ 5 à 10 % des leucocyte et près de 2×10^9 monocytes en circulation. Depuis les années 1980, les chercheurs ont compris qu'il existait différentes sous-populations en terme de taille et de densité, ce sont les avancées techniques scientifiques, notamment le développement de la cytométrie en flux et de la biologie moléculaire, qui ont permis de mieux caractériser ces

populations (168). Les sous-populations monocytaires sont maintenant classées en 3 groupes selon l'expression des marqueurs de surface CD14 et CD16 (FcγR III):

- Les Monocytes classiques – CD14⁺⁺CD16⁻ (168, 169): c'est la sous-population la plus abondante (près de 90% des monocytes). Ces cellules sont de grandes tailles (18-20 µm) et ont une forme caractéristique avec un noyau en forme de haricot ou de fer à cheval. Ces monocytes se caractérisent par une forte activité phagocytaire, la capacité de produire des cytokines (IL-1, TNFα) ou des facteurs de croissance (CSF), une haute activité myéloperoxydase (MPO) intracellulaire, une haute capacité d'ADCC (antibody-dependent cell mediated cytotoxicity) et de freiner l'activation des lymphocytes T par les antigènes. Ils expriment à leur surface le récepteur de chimiokines CCR2 et de faibles niveaux du récepteur CX3CR1, ainsi que le CCR1, CXCR2, CD62L, CD11b et des niveaux variables de HLA-DR. Ils augmentent fortement en nombre et sont capables d'augmenter l'expression membranaire de PD-1 en condition inflammatoire.
- Les monocytes non classiques ou alternatifs – CD14⁺CD16⁺⁺ (170-172): anciennement appelés (à tort) « inflammatoires », ces monocytes sont plus petits (14-16 µm), ont une moindre activité phagocytaire mais une expression plus élevée d'HLA-DR. Ils ont une forte capacité à présenter les antigènes et produisent de l'IFNα. Ces monocytes n'expriment pas le CCR2 mais ont une forte expression

membranaire de CX3CR1, ils expriment également CCR5, CD32, CD86 et de hauts niveaux de HLA-DR. Ils représentent 5% des monocytes.

- Les monocytes « intermédiaires » - CD14⁺⁺CD16⁺ : Grage-Griebnow et coll. (173-175) ont proposé de classer les monocytes en 3 sous-population au lieu de 2. Ces monocytes sont intermédiaires pour toutes les caractéristiques des 2 autres sous-populations. Une étude du profil d’expression génique montre qu’il s’agit bien d’une population fonctionnelle distinctes des 2 autres (176). Fonctionnellement, ils sont d’importants producteurs d’IL-10 comparativement aux monocytes non-classiques. Leur nombre s’élève de façon importante (toutes proportions gardées) lors des inflammations aiguës. Ils représentent 5% des monocytes.

Mouse and human monocyte subsets

Subset	Markers	Chemokine receptors	Functions
<i>Mouse</i>			
LY6C ^{hi}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{hi}	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Pro-inflammatory ⁷ and antimicrobial ³ roles
LY6C ^{low}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{low}	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹¹ ; early responses ¹¹ ; tissue repair ¹²⁸
<i>Human</i>			
Classical	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Resemble LY6C ^{hi} monocytes based on gene-expression arrays ^{7,17,140}
Intermediate	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Pro-inflammatory roles ^{12,15}
Non-classical	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹⁴ ; antiviral roles ¹⁴

CCR2, CC-chemokine receptor 2; CX3CR1, CX3C-chemokine receptor 1.

Table 7. Marqueurs phénotypiques des différentes sous-populations de monocytes murins et humains. D’après Shi et coll. (177)

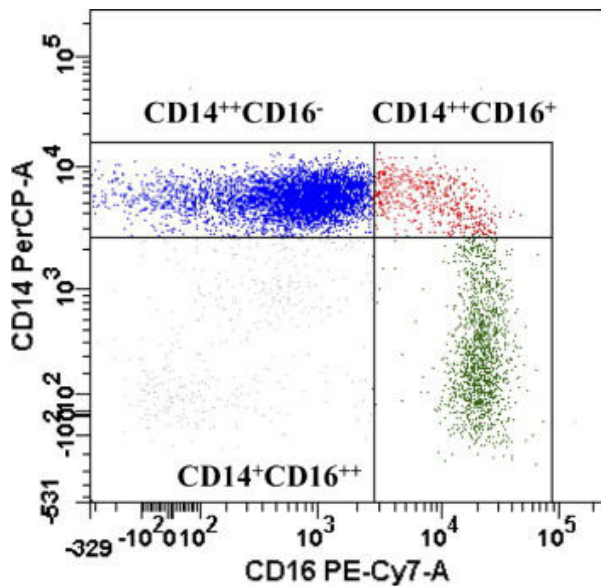


Figure 10. Caractérisation en cytométrie en flux des 3 populations de monocytes humains. D'après Heine et coll. (178).

ii. Les monocytes murins

Les monocytes existent chez tous les mammifères. Il existe toutefois des différences tant phénotypiques que fonctionnelles qui tiennent aux spécificités du système immunitaire de chaque espèce. Si la superposition des conclusions tirées à partir des monocytes murins sur les populations humaines est en théorie logique, un important travail de validation est à effectuer pour confirmer la découverte et son extrapolation. A ce jour on ne distingue que deux sous-populations de monocytes chez la souris mais au sein de ces sous-populations on peut encore distinguer des différences mais qui ne permettent pas de constituer de réelles entités différenciées.

En comparaison avec l'abondance retrouvée chez l'homme, les monocytes murins représentent une population beaucoup plus rare. En effet, ceux-ci

constituent environ 2% des leucocytes circulants et leur nombre est proche de 100 / μ l de sang (on estime à environ 300 000 le pool de monocytes sanguins (179). C'est à partir de l'expression différentielle de CX3CR1 que Palframan et coll. (180) puis Geissman et coll. (181) ont caractérisé 2 sous-populations de monocytes. Les sous-population de monocytes se distinguent par leur expression de Ly6C mais également de CCR2 et CX3CR1.

On distingue :

- Les monocytes inflammatoires – Ly6Chigh CCR2+ CX3CR1low/dim : ce sont lesendants des monocytes humains CD14++CD16- (classiques). Leur caractérisation en cytométrie de flux (qui est utile à expliciter ici pour comprendre nos expérimentations) est : CD11b+CD115+F4/80+/lowCCR2+Ly6Chigh(Gr-1mid)CX3CR1lowCD62L+. Contrairement aux monocytes classiques humains, ils sont plus petits que la sous-population miroir (environ 10 μ m). Il représentent près de 50% des monocytes circulants, ont une durée de vie courte et sont les précurseurs des monocytes Ly6Clow. Ce sont les principaux acteurs de la réponse inflammatoire lors des infections comme en témoigne le fort niveau d'expression du TLR4 à leur membrane et leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires. Les monocytes Ly6Chigh sont hautement mobilisables et sont capable de se transformer au sein des tissus en macrophages ou cellules dendritiques. La mobilisation des monocytes est sous la dépendance d'un nombre important de récepteurs aux chimiokines

dont la figure la plus prééminente est le CCR2. Le CCR2 a pour ligand CCL2 (MCP-1) et CCL7 (MCP-3) mais aussi MCP-2, 4 et 5 (chez la souris) et permet la sortie des monocytes inflammatoires de la moelle. Chez les souris CCR2^{-/-}, on ne retrouve que peu de monocytes Ly6Chigh dans le sang à l'état stable et en pathologie (182, 183). Le récepteur CX3CR1 est aussi un important contributeur du recrutement et de la survie des monocytes inflammatoires bien qu'il soit moins exprimé sur cette cellule (comparativement aux monocytes résidents).

- Les monocytes « résidents » ou « patrouilleurs » - Ly6ClowCCR2-CX3CR1^{high} : ce sont les pendants des monocytes humains CD14^{low}CD16⁺. Leur phénotype membranaire est : CD11b⁺CD115⁺F4/80⁺CCR2-Ly6Clow(Gr-1^{low})CX3CR1^{high}CD62L⁻. Ils sont un peu plus grands (environ 12 µm) que les monocytes Ly6Clow. Après près d'une décennie de polémique sur leur origine (génération directe en plus de la maturation des monocytes Ly6Chigh), l'équipe de Steffen Jung a finalement prouvé que les monocytes résidents étaient toujours générés par l'évolution des monocytes Ly6Chigh (184). Cette maturation est un phénomène actif sous la dépendance du facteur nucléaire NR4A1 (Nur77). Les souris NR4A1^{-/-} n'ont pas de monocytes Ly6Clow du fait d'un 'blocage' de maturation des monocytes inflammatoires. Les travaux de l'équipe de F. Geismann montrent que bien qu'ils ne fassent pas partie des populations rapidement mobilisables, les monocytes Ly6Clow sont

importants pour la réponse à l'inflammation. Auffray et coll. (185) montrent que les monocytes Ly6Clow patrouillent le long des vaisseaux de façon CX3CR1 dépendante et permettent le recrutement rapide des neutrophiles puis des monocytes en cas d'agression. Carlin et al. (186) ont montré que les monocytes Ly6Clow contribuaient à la détersion des cellules endothéliales compromises par des infections virales de façon TLR7 dépendante. L'importante capacité de phagocytose de ces cellules leur confère des propriétés importantes de clairance des tissus endommagés.

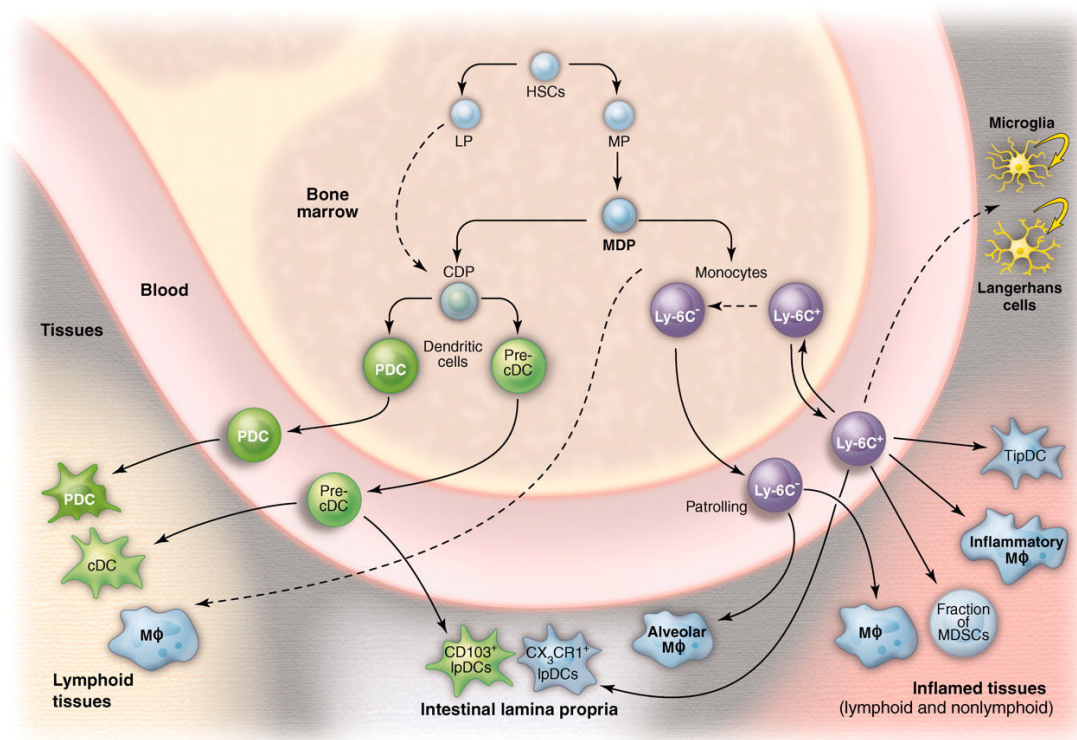


Figure 11. Histoire naturelle des monocytes murins. D'après Geissmann et al. (153)

IV. Les macrophages et cellules dendritiques

Geismann et coll. (153) définissent dans une revue récente les macrophages comme des cellules phagocytaires résidants au sein des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, impliquées dans l'homéostasie tissulaire, le traitement des cellules apoptotiques et qui sécrètent des facteurs de croissance. Les macrophages sont équipés d'un important spectre de PRRs et peuvent produire une importante variété de cytokines. Les cellules dendritiques sont elles spécialisées dans la préparation et la présentation antigénique aux lymphocytes, ont une très importante capacité de phagocytose et de production cytokinique. Les DC classiques (classical DC, cDC) sont hautement mobiles et vont se relocaliser au contact des centres germinatifs et sites de production et d'éducation des lymphocytes T et B. Les DC plasmacytoides (pDC) ont une durée de vie plus longue et semblent jouer un rôle plus local de régulation de l'inflammation au sein des tissus.

Les macrophages sont donc présents dans tous les organes, on distingue une importante variété de macrophages avec une spécialisation phénotypique (morphologique et fonctionnelle) adaptée à l'organe où ils résident. Comme décrit précédemment, un précurseur des macrophages tissulaires a été identifié, c'est l'EMP qui exprime Tie2 et le CD115 (Csf1r) (157). Au sein des tissus, et en conditions normales, les macrophages se renouvellent essentiellement par prolifération mais certains tissus comme l'intestin voient leurs macrophages renouvelés également à partir du pool de monocytes Ly6Chigh circulant.

Ces cellules sont d'une grande plasticité et répondent de façon adaptée à leur environnement que ce soit face à des cellules apoptotiques, des métabolites, des PAMPs, des DAMPs ou des leucocytes activés. Schématiquement, on distingue au moins 2 types d'activation différents : l'activation classique dite M1 induite par les ligands des TLRs, le TNFα ou l'IFNγ et l'activation alternative dite M2 induite par l'IL-4 ou l'IL-13. On parle alors de polarisation des macrophages (187).

Le phénotype M1 est le phénotype identifié comme étant « inflammatoire » dans le sens où il consiste en l'expression de gènes et la synthèse de médiateurs de l'inflammation comme les cytokines pro-inflammatoires (notamment de l'IL-12), les ROS, le NO, ayant une forte activité antimicrobienne et qui promeut une réponse TH1 et TH17. La polarisation M1 fait intervenir entre autres les voies IRF/STAT1 et IRF5 et induit systématiquement l'activation de NFκB.

Le phénotype M2 est le phénotype associé à des phénomènes de type anti-inflammatoire et pro-réparatif. Il est supposé être à l'origine de la résolution des processus inflammatoires, du remodelage tissulaire et la réparation des plaies. Ce phénotype est associé à une forte activité de phagocytose, des expressions élevées de récepteurs « accepteurs/capteurs » (les scavenger receptors) et une activité arginase importante chez la souris. Ils produisent l'IL-1 decoyR (récepteur leurre soluble à l'IL-1) et l'IL-1Ra. On distingue également les macrophages M2-like qui sont induits par des signaux comme l'IL-10, les glucocorticoïdes ou les cellules apoptotiques. La polarisation M2 fait intervenir la voie de signalisation de STAT6 tandis que la M2-like fait plutôt intervenir STAT3.

La classification des états d'activation des macrophages est extrêmement variable. Mosser et Edwards retiennent les phénotypes M1, M2 et réparateurs tandis que d'autres disséquent plus avant les différentes sous-populations (188-190). Les principales avancées de ces dernières années tendent à mettre à l'épreuve ce concept de polarisation (191, 192). En effet, ces considérations apparaissent plus comme étant le résultat d'une orientation in vitro des macrophages par différents agonistes, une caricature qui ressemble finalement peu à ce qui peut être observé in vivo. Cette dichotomie inflammatoire/anti-inflammatoire n'est pas aussi claire et notre expérience nous montre que les marquages intracellulaires des macrophages à la recherche des cytokines pro- ou anti-inflammatoires marquent souvent les mêmes cellules. Les cellules ne sont pas productrices de cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires mais des unes ET des autres. Il y a tout un spectre d'activation des macrophages et une transition qui va faire évoluer les fonctions de ces cellules (notamment via le PPARgamma). Certains auteurs proposent de classifier les macrophages selon le ratio IL-10/IL-12, ce qui illustre cette dualité. Les questions qui se posent aujourd'hui concernent le lien entre les monocytes, les macrophages et leurs états d'activation. Lors des pathologies inflammatoires, on observe souvent une activation puis une mort des macrophages (pour les inflammations aiguës « sévères ») qui seront remplacés par des monocytes Ly6Chigh qui vont rapidement prendre des caractéristiques phénotypiques macrophagiques au sein des tissus. La caractérisation des phénotypes que peuvent exprimer ces macrophages dérivés des monocytes est essentielle et il apparaît qu'ils peuvent être à la fois pro-inflammatoires ou régulateurs. De plus, la résolution de l'inflammation est encore mal comprise. Il semble que les macrophages

tissulaires finissent par reprendre l'intégralité de leur territoire au détriment des macrophages recrutés, issus des monocytes.

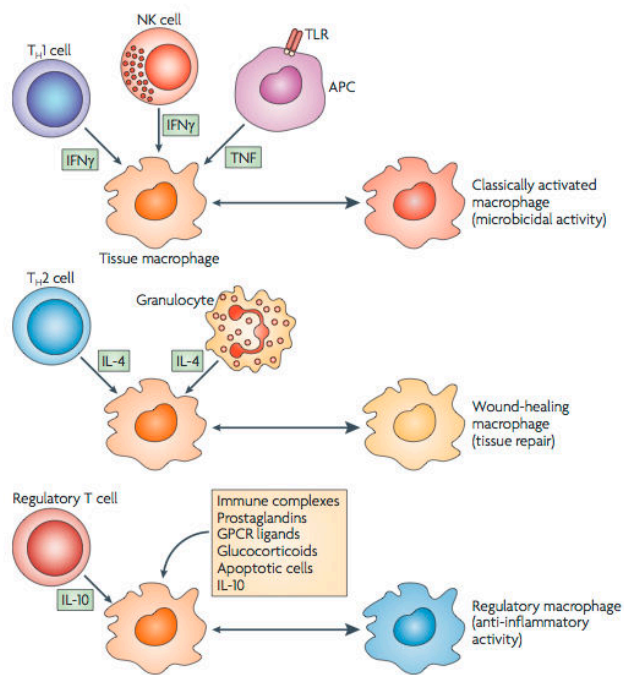


Figure 12. Polarisation des macrophages. D'après Mosser et Edwards (187).

V. L'hématopoïèse extramédullaire

En 2009, dans un article princeps publié dans Science, Swirski et coll. (193) ont montré qu'une production splénique de monocytes avait lieu lors des pathologies inflammatoires. Ces monocytes ne sont pas différenciables des monocytes (majoritaires) issus de la moelle mais contribuent largement à la physiopathologie de l'infarctus du myocarde ou de l'athérosclérose. Ce phénomène d'hématopoïèse extra-médullaire est mal compris mais pourrait reposer sur la libération d'HSCs dans la circulation lors des inflammations, ces

HSCs seraient alors captés dans la rate (en sous capsulaire) par des macrophages exprimant VCAM-1 et le CD169 (194). Une fois cette nouvelle niche constituée, les HSCs sont exposés à des facteurs de croissance comme le GM-CSF ou l'IL-3, en partie produits par les cellules B IRA et donnent naissance à des monocytes inflammatoires qui vont pouvoir se déployer au niveau des différents sites inflammatoires. Si sur le plan phénotypique ces monocytes ne sont pas différents de ceux issus de la moelle, leur contribution fonctionnelle est encore mal connue. On assiste au cours du sepsis à une augmentation de la production de ces cellules. En effet, au cours du sepsis on observe une myélopoïèse d'urgence qui génère essentiellement des neutrophiles et des monocytes. Les IRA B cells qui sont une source majeure de GM-CSF et d'IL-3 contribuent à cette myélopoïèse et pourraient être également responsables de la production de MDSCs. La contribution de la moelle et de la rate dans la génération des MDSCs au cours du sepsis est encore à définir.

VI. Les monocytes dans les pathologies inflammatoires (aiguës ou chroniques).

La contribution des monocytes dans les pathologies inflammatoires a été suggérée depuis l'époque de Metchnikoff. Après un siècle de recherche intensive sur la physiopathologie humaine, le rôle déterminant des monocytes dans la genèse des pathologies inflammatoires, aiguës ou chroniques, a été prouvé. Du schéma simple proposé par Van Furth et coll. en 1968 (195) qui consistait en une relation linéaire entre la production médullaire des monocytes, leur passage dans la circulation et leur transformation dans les tissus en macrophage, on

assiste maintenant à une caractérisation plus avancée témoignant d'une importante complexité et diversité du rôle joué par les monocytes. Le monocyte étant une cellule en circulation, son recrutement nécessite l'activation d'un important réseau de chimiokines et de leurs récepteurs. Une fois in situ le monocyte pourrait en théorie : effectuer son action et repartir ou mourir ou bien encore se transformer en macrophage/DC (151). L'expérimentation et les données anatomopathologiques humaines suggèrent que les 2 phénomènes se produisent. Ces phénomènes de recrutement sont essentiellement contrôlés par les récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 (cf chapitre suivant).

C'est dans les maladies cardiovasculaires que le rôle des monocytes a probablement été le plus investigué. Dans le modèle d'inflammation aiguë qu'est l'infarctus du myocarde ou, de façon comparable, dans le modèle de lésion musculaire, l'absence de monocytes est associée à une absence d'infiltration aiguë lors de la lésion et un manque de macrophages réparateurs ce qui conduit à une aggravation des dommages (196, 197). Dans le modèle d'inflammation chronique qu'est l'athérosclérose, l'accumulation de cholestérol en zone sous-endothéliale suite à une hypercholestérolémie conduit à l'infiltration de monocytes qui vont devenir des macrophages spumeux et attirer de nouveaux monocytes, ce cercle vicieux conduit à la formation de la plaque et est totalement sous la dépendance du recrutement des monocytes (198). Dans ces modèles, les récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 jouent un rôle prépondérant (199, 200).

Les monocytes sont également essentiels dans diverses maladies inflammatoires allant de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (201, 202), à la sclérose en plaque, en passant par les arthrites micro-cristallines ou l'obésité (203, 204). La tâche la plus évidente et la plus constamment mise à l'épreuve est toutefois celle de la réponse aux infections (205).

La physiopathologie de la réponse de l'hôte a été décrite dans le chapitre précédent et le rôle précis des monocytes lié à l'expression de leurs récepteurs aux chimiokines sera détaillé dans le prochain chapitre.

Lors des infections, les monocytes sont au centre du dispositif anti-bactérien et du contrôle de l'inflammation (177). Selon le modèle et la sévérité de l'infection, la réponse peut varier dans sa forme, son intensité et sa cinétique.

Lors des infections, on observe une diminution des DC spléniques qui peuvent être remplacés par des monocytes Ly6Chigh qui se différencient en cellules CD11b+CD11cintMac-3+(CD107b+) qui sont des DCs « inflammatoires » (TipDCs pour TNF- and Inducible nitric oxide synthase producing DCs) (177, 205).

Dans le poumon, qui est une interface entre le compartiment intérieur et l'extérieur, les monocytes participent à l'immuno-surveillance vasculaire et intra-alvéolaire en addition des macrophages alvéolaires ou interstitiels (206).

Le tube digestif est une porte d'entrée infectieuse privilégiée. Dans cet organe, on assiste de façon continue à l'entrée de monocytes Ly6Chigh qui se différencient

en DCs et macrophages dans la lamina propria et qui participent à l'échantillonnage bactérien dans cette zone d'interface mais également au flux continu de monocytes dans les vaisseaux (207). C'est ainsi une porte d'entrée pour *Salmonella Typhimurium* qui peut infecter les monocytes exprimant le CD18 et ainsi disséminer jusqu'à la rate et le foie et y causer des lésions (208). Lors de l'infection à *Listeria monocytogenes* (un nom qui ne laisse pas de doute sur l'effecteur de l'immunité qui est impliqué !) qui est une bactérie gram-positive facultativement intracellulaire et qui s'acquiète par le tractus digestif, on assiste à un afflux de cellules myéloïdes qui vont limiter in situ la croissance bactérienne. La déplétion en monocytes favorise leur développement et aggrave la maladie (209). Néanmoins, la *Listeria* peut entrer à l'intérieur des monocytes qui eux mêmes peuvent librement naviguer au sein des organes et déclencher des infections secondaires telles que des méningites. Là encore, les monocytes chargés de combattre les infections peuvent être des chevaux de Troie et favoriser la dissémination bactérienne. La listériose systémique entraîne la génération de TipDCs dans la rate mais en cas de déplétion des monocytes ou chez les souris CCR2-/- cette génération n'a pas lieu et est délétère (210).

En cas d'infection à *Toxoplasma Gondii*, on assiste au recrutement de monocytes Ly6Chigh qui vont à la fois participer à l'établissement de la réponse anti-bactérienne mais également se transformer en cellules régulatrices chargées de résoudre l'inflammation via la sécrétion de PGE2 capable d'inhiber les neutrophiles (92). Cette dualité d'action des monocytes est en parfait accord avec la nécessité d'un fin contrôle de l'inflammation tel que cela a été discuté dans le chapitre précédent.

Lors du sepsis, on observe une monocytose et une infiltration des organes tels que le rein (211) ou le poumon (212) par un grand nombre de monocytes, ces résultats montrent là encore le rôle central des monocytes au cours du sepsis.

VII. Conclusion

Les monocytes sont des cellules d'une incroyable diversité et qui ont de multiples destins. Loin d'être de simples cellules en transit, les monocytes sont de vrais effecteurs de la réponse immunitaire innée. La dynamique complexe entre les différentes populations de monocytes, macrophages et DCs offre une explication à la multiplicité des réactions mises en jeu et permettent de concevoir de nouvelles thérapies ciblées pour les pathologies inflammatoires. L'activation des monocytes est un processus en plusieurs étapes qui sont dépendantes de l'environnement et donc intimement liées aux capacités migratoires de ces cellules. Ce sont les chimiokines qui sont responsables de la fine régulation de cette mobilisation des monocytes et qui vont réguler les processus inflammatoires.

Chapitre III : Les chimiokines monocytaires

I. Généralités

Les chimiokines (CK) sont des petites molécules, le plus souvent solubles, d'environ 8-12 kDa, constituées de 100+/-20 acides aminées, spécialisées dans l'attraction des leucocytes (le chimiotactisme). Loin d'être les seules molécules capables de faire migrer les cellules, elles sont néanmoins les plus efficaces et s'appuient sur des récepteurs aux chimiokines (RCK) transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) pour induire des modifications structurelles et fonctionnelles des cellules cibles (213, 214).

On distingue 4 familles de CK basées sur des différences structurelles. Les chimiokines assurent leur activité via leur conformation spécifique qui met à proximité 4 cystéines. Une nomenclature commune a été adoptée afin d'éviter les confusions et permettre des analogies structuro-fonctionnelles. Les 4 familles de CK sont les : CC, CXC, CX3C et XC (figure 13) (213).

i. Les CC CK :

C'est la plus importante famille de CK. Elle se distingue structurellement par la contiguïté de la première paire de cystéines qui la compose. Le CCL2 (autrement appelé MCP-1) est le membre le plus décrit (cf paragraphe spécifique) et intervient dans le recrutement des monocytes, DCs, lymphocytes T mémoire ou les basophiles. Les autres membres de cette famille qui ont prouvé un rôle

majeur en physiologie ou en physiopathologie sont le CCL3 (MIP-1a), le CCL4 (MIP1-β), le CCL7 (MCP-2) ou encore RANTES (CCL5).

ii. Les CXC CK :

Cette famille de CK compte une quinzaine de membres et se caractérise par un intercalement d'un acide aminé entre ces 2 cystéines initiales. Chez l'homme, la cytokine prototypique de cette famille est le CXCL8 (IL-8) spécialisée dans le recrutement des neutrophiles et monocytes. On retrouve également un rôle majeur de CXCL1 et CXCL2 dans le recrutement des neutrophiles. Le domaine ELR (Glutamine-Leucine-Arginine) permet l'attraction sélective des neutrophiles alors que son absence semble définir des CK sélective des lymphocytes (ex CXCL10)..

iii. Les CX3C CK (Delta-CK):

Cette famille ne comporte qu'un seul membre : CX3CL1 (appelée également fractalkine). Cette CK est unique pour de multiples raisons. Elle existe sous forme membranaire (domaine transmembranaire couplé à un bras mucine) ce qui lui confère des capacités d'adhésion quand elle est liée à son récepteur (fonction adhéckine) ou sous forme soluble quand elle est clivée par la TNFa-converting enzyme ou des metallo-protéases et agit alors comme les autres CK. Chez la souris et chez l'homme son action est prédominante sur les monocytes, macrophages et DCs ; chez l'homme elle aurait une action sur les lymphocytes T. Nous étudierons spécifiquement cette CK dans un prochain paragraphe. Il est

intéressant de noter qu'il existe une CK aux propriétés proches mais encore mal étudiées : CXCL16.

iv. Les XC CK (gamma-CK):

Cette famille comporte 2 membres : XCL1 et XCL2 et a la particularité de n'avoir qu'une seule cystéine dans sa portion initiale. Leur récepteur XCR1 est exprimé à la surface des lymphocytes T NK.

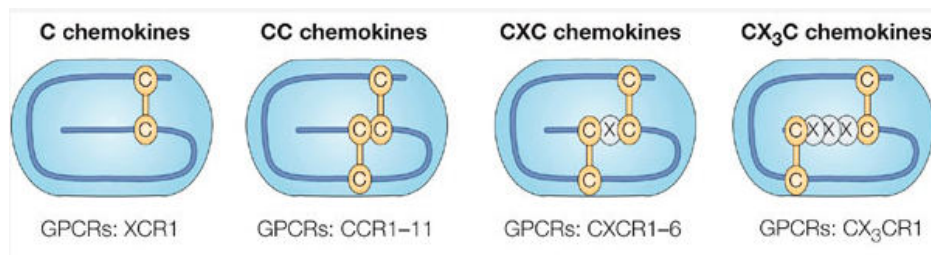


Figure 13. Structure des 4 familles de chimiokines. D'après Sodhi et coll. (215).

II. Les récepteurs aux chimiokines (RCK) :

Les RCK sont au nombre de 20 environ, moins nombreux que les CK et sont à l'origine de leurs effets cellulaires. La nomenclature des RCK est en miroir des CK (on trouve ainsi les CCRCKs, les CXCRCKs, CX₃CR1 et XCR1) Comme dit précédemment, les RCK sont des RCPG qui vont déclencher une cascade d'activation cellulaire quand ils lient leurs ligands. Si les sources et la cinétique de sécrétion des CK est déterminante dans le phénomène de chimiotactisme et d'activation cellulaire, la disposition et l'expression membranaire des RCK est également fondamentale. La relation entre CK et RCK n'est pas linéaire dans le

sens où une CK ne se lie pas qu'à un seul RCK et inversement (Figure 14). Ainsi parmi les CK les plus actives sur les monocytes on trouve CCL2, CCL7, CCL8 ou CCL13. Le CCR2 va toutes les lier, CCL7 va se lier à CCR1 également, CCL8 va se lier à CCR5. Il y a ainsi des RCK dits « monogames » qui ne vont lier qu'un seul ligand et d'autres « polygames » qui vont en lier plusieurs. Loin d'être redondantes, ces associations sont en fait un moyen extrêmement évolué de réguler finement la mobilité des cellules dans l'espace et le temps (213, 216). Un autre niveau de complexité est induit par le fait que certaines CK sont agonistes d'un récepteur et antagonistes pour un autre par exemple CXCL4 active CXCR3 tandis que CCL11 l'inhibe, CCR5 est activé par CCL3, CCL4 et CCL5 mais inhibé par CCL7 qui active CCR2.

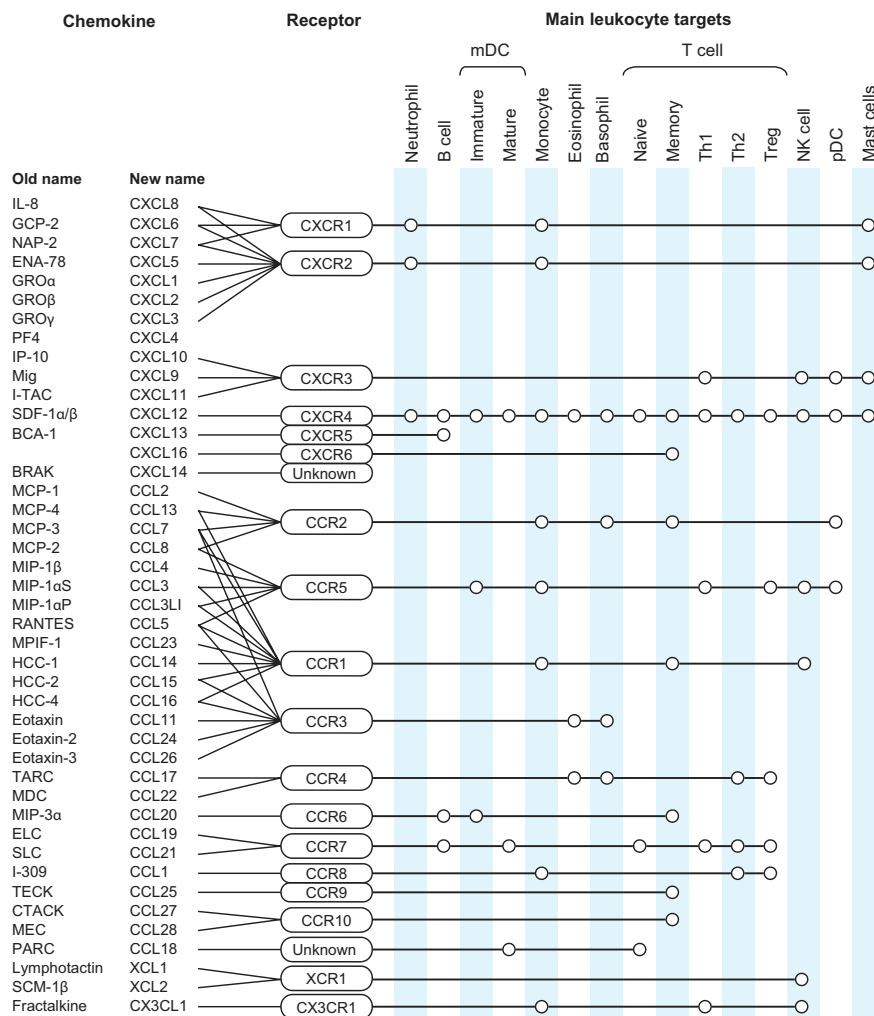


Figure 14. Les chimiokines et leurs récepteurs. D'après Viola et coll. (217)

Plus récemment, l'attention des chercheurs s'est portée sur des récepteurs aux chimiokines n'entraînant pas la transduction classique de signal des RCPG. Ces récepteurs aux chimiokines « leurres » (on en dénombre 4 à ce jour) semblent être nécessaires à la résolution de l'inflammation et permettent de limiter les dommages liés au recrutement trop important des CK. Ainsi CCBP2 (D6) lie un grand nombre de CC CK tandis que Darc (Duffy associated receptor for chemokines) lie à la fois des CC CK et des CXC CK. Ces 2 classes de CK sont

essentielles pour le recrutement des cellules myéloïdes lors des infections où elles sont produites en très grande quantité. Avoir un système capable d'épurer la surproduction permettrait à la fois d'être plus efficace en maintenant un gradient de CK et en limitant la diffusion de l'inflammation (218).

III. Transduction du signal

Les RCK comme les autres membres des RCPG transduisent leur signal via des protéines G hétérotrimériques (Figure 15) mais d'autres voies de signalisation sont également mises à contribution (notamment JAK/STAT et ERK) (219, 220).

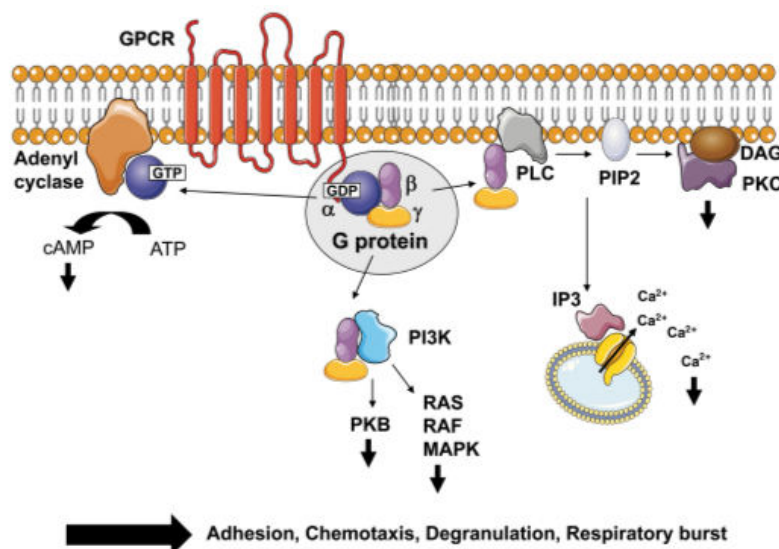


Figure 15. Cascade de signalisation en aval des RCK/RCPG (I). D'après Bestebroer et coll. (221)

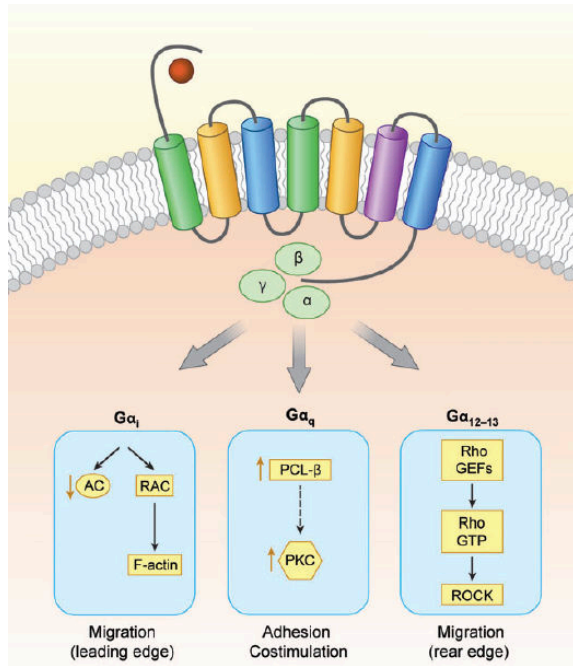


Figure 16. Rôle des sous unité Galpha dans la signalisation en aval des récepteurs aux chimiokines. (217)

La constatation du blocage de la migration cellulaire en réponse à certaines CK (dont l'exemple prototypique est CCL2-CCR2) par la toxine pertussique laissait à penser qu'une sous-unité G α_i était responsable du chimiotactisme (222, 223). Plusieurs G α_i peuvent être associées aux RCK et avoir des actions différentes. Schématiquement, la fixation du ligand à son récepteur va entraîner un échange du GDP couplé à la protéine G α en GTP ce qui va séparer la protéine G α et rompre l'hétérotrimère alpha, beta gamma. Chaque sous-unité va alors activer ou inhiber des enzymes spécifiques. G α est une protéine contrôlant l'adénylate cyclase (qui transforme l'ATP en cAMP) qui active la PKA (proteine kinase A), la voie GRK/ β -arrestines (qui contribuent à l'internalisation des RCK) et la cascade en aval de Rho. En parallèle on assiste à l'activation de la phospholipase C et de la PI3K ce qui va produire du PIP2 qui active alors la voie

des MAPK et l'accumulation d'IP3 et de DAG. Ces derniers médiateurs vont alors induire un flux calcique intracellulaire et activer la PKC (protein kinase C) (figure 16). Cette cascade d'activation intracellulaire va entraîner l'activation de nombreux facteurs de transcriptions et la modification du cytosquelette qui va alors permettre la formation de pseudopodes qui vont tracter la cellule vers le gradient croissant de CK mais également être à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires via NFκB.

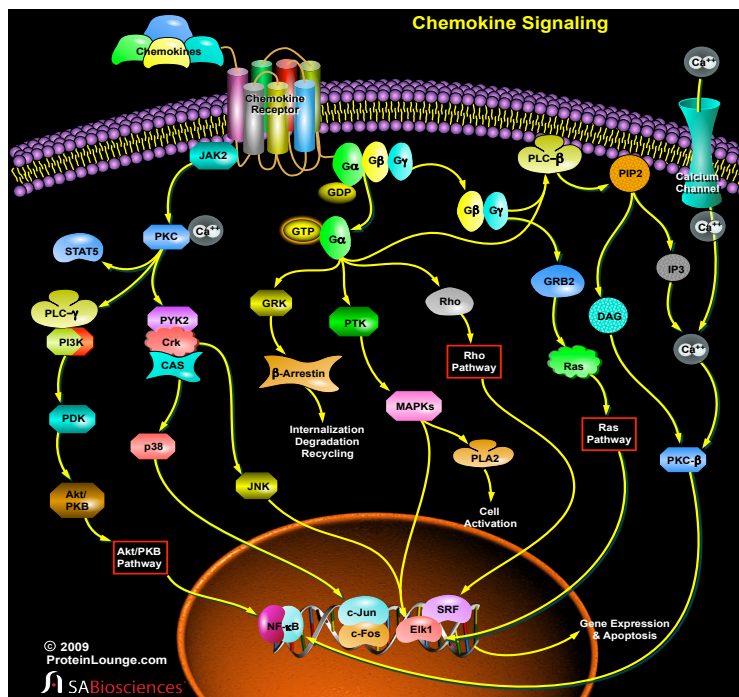


Figure 16. Signalisation en aval des récepteurs aux chimiokines (II). D'après SABiosciences 2009.

De même, le chimiotactisme peut être altéré par les bloqueurs de la PI3K et chez la souris déficiente en sous-unité gamma de la PI3K (224) ce qui s'explique par l'activation de JAK directement par les RCK.

Les voies d'activation des RCK et des TLR sont étroitement liées et peuvent notamment entrer en interaction via la phosphorylation de GRK2 par la voie p38/MAPK (figure 17,) ce qui in fine conduit à l'augmentation du chimiotactisme (225).

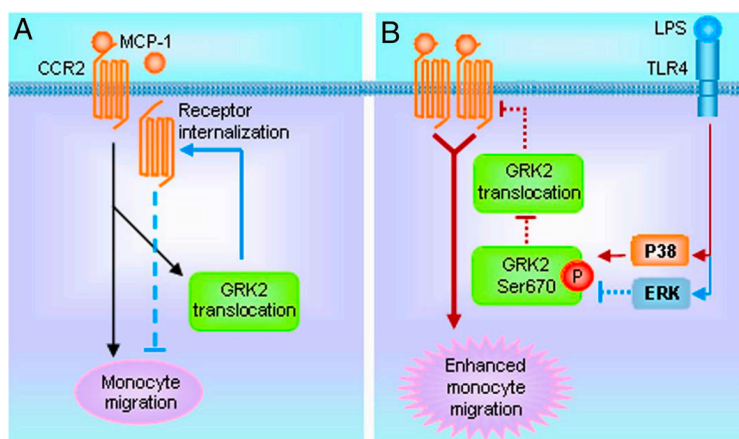


Figure 17. Interaction entre CCR2 et le TLR4. D'après Liu et coll. (225)

Les RCK peuvent également s'auto- ou s'auto dimériser et ainsi exercer un contrôle encore plus fin sur la cascade d'activation cellulaire. Les RCK CCR2, CCR5 ou CXCR1/2 ou bien encore CX3CR1 sont capable de se dimériser (226). La dimérisation de CXCR1/CXCR2 est capable d'augmenter le chimiotactisme (227), tandis que la dimérisation CCR5/CCR2 limite l'action de CCL2 sur son récepteur (228, 229). Cette oligomérisation pourrait contrôler l'internalisation des RCK qui est un mécanisme de rétrocontrôle négatif de leur activation.

IV. Rôle CK-RCK à l'état stable et en pathologie

Le réseau CK-RCK est essentiel pour le recrutement des leucocytes lors des différents états pathologiques mais il contribue également de façon fondamentale à l'embryogenèse et à l'homéostasie (216, 230, 231).

Les CK et RCK contribuent à l'organogenèse par le recrutement des cellules souches et par activation de l'angiogenèse. Ils sont nécessaires à la constitution et au fonctionnement des organes lymphoïdes en permettant le recrutement des lymphocytes B via CXCR5 ou bien encore en permettant la mise en contact des DCs avec les lymphocytes via l'interaction CCR7-CCL19/CCL21 qui est également impliquée dans le développement du thymus. Dans la moelle, le développement des leucocytes est étroitement lié à l'interaction CXCL12 (SDF-1) / CXCR4. Les CARs (CXCL12 abundant reticular cells) sont au cœur de la formation des niches médullaires (figure 18) (232-234).

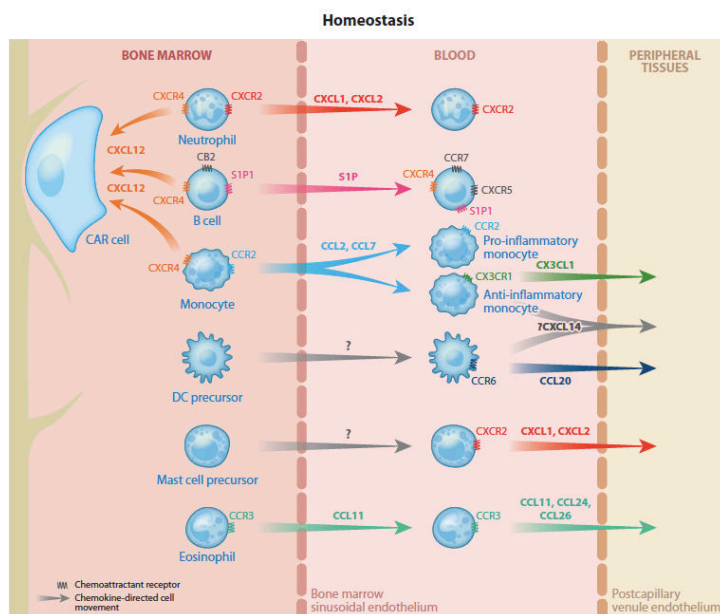


Figure 18. Rôle du réseau chimiokines-récepteurs à l'état stable. D'après Giffith et coll. (216)

CCR2 contrôle la sortie des monocytes de la moelle (cf paragraphe suivant) et CX3CR1 contribue à la formation, la survie et à la localisation des cellules dendritiques rénales et des lymphocytes Ly6Clow.

Les CK/RCK sont impliqués directement ou indirectement dans toutes les pathologies (214, 235, 236). Lors des pathologies inflammatoires, le rôle des CK et RCK est varié et versatile (figure 19). Dans certains cas l'inhibition de CK ou RCK améliore la pathologie (CCL2/CCR2/CX3CR1/CCR5 dans l'athérosclérose) mais peut en aggraver d'autres (CX3CR1 et infections ou DMLA). Toutes les pathologies peuvent virtuellement impliquer un ou plusieurs couples CK/RCK (cf tableau 8).

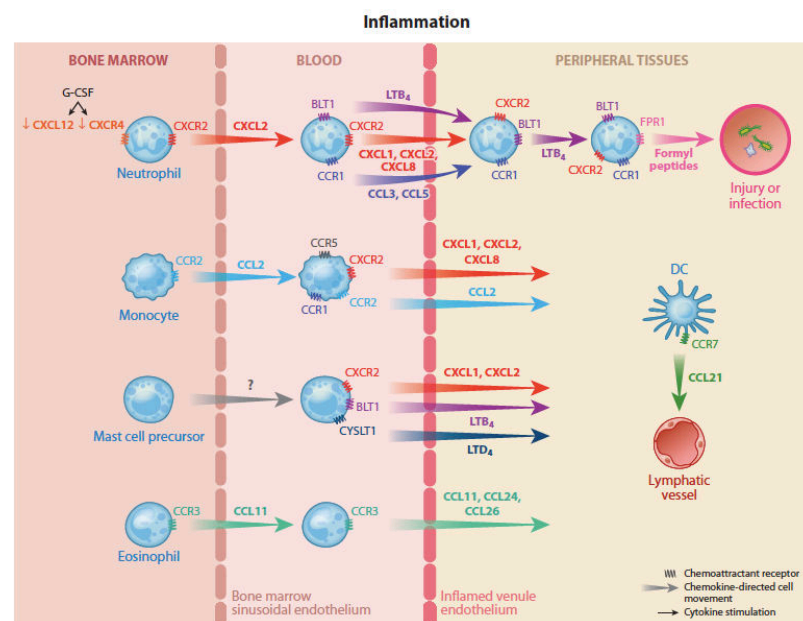


Figure 19. Rôle du réseau chimiokines-récepteurs lors des pathologies inflammatoires. D'après Griffith et coll. (216)

À titre d'exemple CXCL1 (anciennement appelé KC) est responsable du recrutement des neutrophiles. Sa surexpression dans les tissus entraîne une accumulation de neutrophiles mais sans dégâts tissulaires ce qui témoigne des capacité de recrutement sans activation de certaines CK (237, 238). Paradoxalement, sa surexpression dans plusieurs tissus n'est pas associée à une neutrophilie, du fait d'une réduction de l'expression de CXCR2 par un rétrocontrôle négatif et probablement par la perte du gradient (surcharge du système) (239). En pathologie, l'expression de CXCL1 permet de lutter contre les pathologies infectieuses. L'augmentation de l'expression de CXCL1 permet de lutter contre les infections à *Aspergillus fumigatus* ou à *Klebsiella Pneumonia* et agit en synergie avec CXCL2 et CXCL5 dont elle augmente l'expression (240, 241). Les axes CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 sont des contributeurs majeurs dans les pathologies impliquant la mobilisation des monocytes et en particuliers lors des pathologies infectieuses.

Disease	Key cell	Chemokine	Chemokine receptor
Acute inflammation			
Myocardial infarction	Neutrophil	CXCL1, CXCL2, CXCL8	CXCR1, CXCR2
Ischemia-reperfusion	Monocyte	CCL2	CCR2
Autoimmune			
Atherosclerosis	Monocyte Th1 cell	CCL2, CCL5, CX3CL1, CXCR2 CXCL9, CXCL10, CXCL11	CCR2, CCR5, CX3CR1 CXCL2 CXCR3
Multiple sclerosis	Monocyte Th17 cell	CCL2, CCL4, CCL4, CCL5 CXCL10, CCL21	CCR1, CCR2, CCR5 CXCR3, CCR7
Rheumatoid arthritis	Monocyte Th1 cell Neutrophil	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 CXCL9, CXCL10, CXCL12 CXCL1, CXCL5, CXCL8	CCR1, CCR2, CCR5 CXCR3, CXCR4 CXCR1, CXCR2
Psoriasis	Th1/17 cell Neutrophil	CCL4, CCL20, CCL27 CXCL9, CXCL10 CXCL1, CXCL2, CXCL8	CCR5, CCR6 CXCR3 CXCR2
Type I diabetes	Th1/CD8	CXCL9, CXCL10	CXCR3, CCR4
Crohn's	Gut homing Th1	CCL28	CCR9
Chronic hepatitis	CD8	CCL3, CCL4 CXCL9, CXCL10	CCR5 CXCR3
Lupus	Plasmacytoid DC B cells	CXCL9, CXCL10, CXCL11 CXCL13	CXCR3 CXCR5
Transplantation			
Allograft	CD8 T cell	CCL3, CCL4, CCL5 CXCL9, CXCL10	CCR5 CXCR3
Allergic inflammation			
Asthma	Th2 cell Eosinophil Mast cell	CCL17, CCL22, CCL1 CCL11, CCL26 CXCL10	CCR4, CCR8 CCR3 CCR3, CXCR3
Atopic dermatitis	Skin homing Th2 cells	CCL1, CCL13, CCL17, CCL18, CCL27	CCR4, CCR8, CCR10
Cancer			
Growth	Malignant cell	CXCL12	CXCR4
Metastatic		CCL19, CCL21	CCR7
Lymph node		CXCL9, CXCL10, CXCL11	CXCR3
Gut		CCL25	CCR9
Skin		CCL17, CCL28	CCR4, CCR10
Stem cell	Stem cell		
Mobilization		CXCL12	CXCR4
Engraftment		CXCL12	CXCR4

Table 8. Implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans différentes pathologies. D'après Viola et coll. (217)

Dans la mesure où notre travail s'intéresse à la mobilisation et au rôle des monocytes au cours du sepsis. Nous allons nous intéresser dans les prochaines parties à des axes chimiokines impliqués dans le recrutement et l'activation de ces cellules.

V. Axe CCL2/CCR2

CCL2 est la première CC CK identifiée chez l'homme. Elle est localisée sur le chromosome 17 chez l'homme et sur le chromosome 11 chez la souris. Elle est composée de 76 (homme) ou 125 (souris) acides aminés et possède deux sites

d'action. CCL2 est produite par de nombreux types cellulaires : cellules épithéliales, endothéliales, mesangiales, astrocytes, microglies et monocytes/macrophages/DCs. CCL2 via son action sur son récepteur CCR2 est responsable d'une mobilisation monocytaire mais également des lymphocytes T mémoires ou des cellules NK. Des données controversées laissent à supposer que les neutrophiles pourraient exprimer CCR2 en condition inflammatoire et donc être sous la dépendance de CCL2. Il existe 2 isoformes de CCR2 : CCR2A et CCR2B. CCR2A est l'isoforme majoritaire exprimée par les monocytes et les VSMCs (Vascular Smooth Muscle Cells) (242-248). L'activation de CCR2 participe également à l'augmentation de l'adhésion des monocytes à la FKN (249).

Bien qu'étant impliqué dans la réponse inflammatoire, le couple CCL2-CCR2 est également nécessaire au contrôle de l'inflammation par son effet sur le recrutement de lymphocyte T régulateurs (Tregs), la polarisation TH2 et la production d'IL-4 (250-252).

Plusieurs polymorphismes du gène de la CK, du RCK ou de leurs promoteurs ont été identifiés et associés à des phénotypes particuliers. Par exemple, G-927C ou A-2578G, des polymorphismes du promoteurs de CCL2, sont associés à une élévation des taux circulants de CCL2 et de monocytes et aggravent l'athérosclérose (253, 254). Paradoxalement, être hétérozygote AG ou GG pour le polymorphisme A-2578G augmente fortement le risque de développer une tuberculose, ce qui est contre-intuitif car l'élévation du nombre de monocytes pourrait logiquement être associé à une meilleure défense antimicrobienne mais la relation là encore n'est pas linéaire et il apparaît que ce polymorphisme limite

la production d'IL-12p40 qui est nécessaire à la lutte anti-mycobactéries (255). Un polymorphisme de CCR2 est également identifié (V64I) mais le phénotype associé n'est pas encore clairement défini (256-259).

En dehors des pathologies infectieuses, le rôle du couple CCL2-CCR2 a été objectivé dans diverses maladies inflammatoires aiguës ou chroniques : l'ischémie-reperfusion (260), l'infarctus du myocarde (197), la lésion musculaire (196), la sclérose en plaque (261), la polyarthrite rhumatoïde (262), l'athérosclérose (263), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (202) ou bien l'insulino-résistance liée à l'obésité (264).

La littérature étudiant le rôle de CCL2-CCR2 au cours des infections est large et parfois contradictoire. La variété des modèles et des conditions expérimentales peut expliquer certaines variations.

Dans la majorité des cas, le phénotype associé au déficit en CCL2 (ou son inhibition) va dans le même sens mais avec une moindre intensité que celui associé au déficit en CCR2. Ainsi dans la souris CCL2^{-/-}, le nombre de monocytes Ly6Chigh est diminué de 20 à 40% tandis qu'ils ont quasiment disparu chez la souris CCR2^{-/-}.

L'absence de CCL2/CCR2 est délétère dans les modèles d'infection à *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* (92, 265) ou bien encore *Cryptococcus neoformans* (251, 266, 267) donc dans des modèles d'infections bactériennes, parasitaires ou fongiques. La protection anti-virale est

également médiée par ce couple CK-CKR comme dans l'infection à CMV, le HIV ou le chikungunya. Shi et coll. (268) ont montré que l'activation des TLRs est associée à une sortie médullaire des monocytes inflammatoires via une activation de CCR2 et une sécrétion locale de CCL2 qui viendrait amplifier la sécrétion à distance de CCL2 qui arriverait en concentration trop faible dans la moelle. La diminution de CCL2 est associée à une augmentation de la mortalité en cas de pneumonie à *S. Pneumoniae* qui n'est pas associée à une diminution de recrutement de neutrophiles mais à une diminution du nombre de macrophages et DCs pulmonaire (269), ce qui confirme le rôle de ce couple de CK dans le recrutement des monocytes circulant pour repeupler les macrophages et DCs. En miroir la surexpression de CCL2 diminue la mortalité dans le même modèle et augmente la clairance bactérienne probablement par les Mac/DCs (270).

En 1997, Zisman et coll. (271) montrent que l'injection de CCL2 protège contre l'endotoxémie léthale. Slimani et coll. (272) et Labbe et coll. retrouvent que lors de l'endotoxémie, l'augmentation de MCP-1 est délétère pour la fonction cardiaque ou pour la fonction diaphragmatique. Munshi et coll. (273) ont étudié le rôle de MCP-1 dans l'AKI induite par l'endotoxémie et montre que cette CK est délétère. Ces résultats posent la question de l'utilisation de l'injection de LPS comme modèle mimant une infection et pose surtout celle du rôle des monocytes dans les inflammations aiguës. Si dans une inflammation stérile, les monocytes peuvent être protecteurs alors qu'ils agissent dans la vague inflammatoire de l'immunité innée, c'est probablement via leur effet régulateur.

Un article de Souto et coll. (274) s'est intéressé au rôle de CCR2 dans le modèle de CLP. Ces auteurs ont retrouvé une amélioration de la survie liée au déficit en CCR2 mais sans effet sur les populations monocytaires. Ces résultats surprenant sont en contradiction avec les travaux de Ng et coll. (275) qui montrent dans un modèle de candidémie que l'absence de monocytes Ly6Chigh lié au déficit en CCR2 était néfaste et augmentait la mortalité et les lésions d'organe.

VI. Axe CX3CR1/CX3CL1

C'est en 1997 que CX3CR1 et CX3CL1 ont été formellement caractérisés (276), CX3CR1 a été identifié (277) puis cloné en 1998 par C. Combadière (278). Bazan et coll. ont quant à eux identifié CX3CL1 (279). C'est le seul RCK et la seule CK de leur classe respective. Leur unicité ne tient pas seulement à leur structure particulière mais également à leurs fonctions. Ce couple CK-RCK existe à la fois chez l'homme et chez la souris. Chez l'homme le gène de CX3CR1 est sur le chromosome 3 et son ligand sur le chromosome 16 tandis qu'il est sur le chromosome 9 chez la souris et le ligand sur le chromosome 8.

Le CX3CL1 dans sa forme complète est constitué de 375 acides aminés (76 pour le domaine chimiokine, 241 pour le bras mucine, 21 pour la portion transmembranaire et 37 pour la portion C-terminale intracytosolique) (280).

Sous sa forme membranaire, CX3CL1 contribue à l'adhésion des monocytes à la paroi vasculaire (279) en addition de l'adhésion dépendante des intégrines qu'elle amplifie. Une fois clivée par des MMP (Matrix Metallo-Proteases) comme ADAM-10, ADAM-17, MMP-2 ou la cathepsine S, la forme soluble contribue à

l'action de la CK uniquement par son domaine chimiokine responsable du chimiotactisme et d'autres fonctions cellulaires.

CX3CL1 est exprimée à la surface de nombreuses cellules comme les neurones, les cellules épithéliales du poumon et du rein ou bien encore l'intestin (281). En conditions inflammatoires, l'endothélium vasculaire ou les SMCs (Smooth muscle cells) peuvent fortement exprimer cette CK. CX3CR1 est exprimé par les monocytes, les cellules NK et les lymphocytes T (chez l'homme uniquement pour ce dernier).

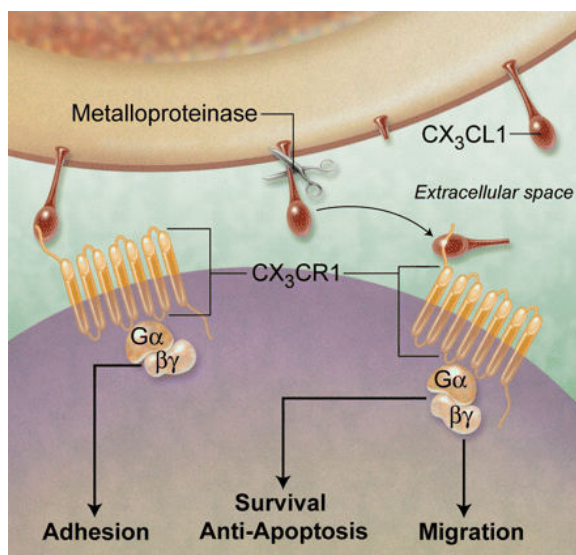


Figure 20. Rôle des formes membranaires et solubles de CX3CL1. D'après white and greaves (282).

Bien que le déficit en CX3CR1 soit associé à des anomalies de constitution des organes lymphoïdes, des résultats expérimentaux obtenus à partir d'expériences de transferts adoptifs de cellules proficientes ou déficientes en CX3CR1 montrent que ce RCK ne semble pas impliqué dans le « homing » des cellules dans les

ganglions mais plutôt dans leur survie (283). CX3CR1 contrôle par ailleurs la mobilité dans et en dehors de la moelle et contribue à la récupération de l'aplasie induite par les chimiothérapies (284).

L'absence de CX3CR1 entraîne une diminution des monocytes circulant au dépend des monocytes Ly6Clow (285). La survie de ces monocytes était améliorée en cas de surexpression de Bcl-2 ce qui témoigne du rôle apoptogène lié à la carence en signal de CX3CR1 (285). Ce phénomène est également observé in vitro et in vivo lors des inflammations sur les macrophages et DCs résidents dans les tissus comme par exemple les microglies (286). En utilisant un ingénieux procédé consistant à générer une souris déficiente en forme membranaire de CX3CL1 (mais ayant une forme soluble existante), Kim et coll. ont montré que les 2 formes sont complémentaires et que la forme membranaire est essentielle pour le signal de survie (281). CX3CR1 est nécessaire pour le renouvellement continu des macrophages et DCs intestinaux, son absence favorise la translocation bactérienne (287, 288).

Le rôle physiopathologique de l'axe CX3CL1/CX3CR1 a été reconnu dans de nombreuses pathologies inflammatoires. Chez la souris Apoe^{-/-} qui, sous une diète riche en cholestérol, développe de l'athérosclérose importante, le déficit en CX3CR1 a été associé à la diminution de la taille des plaques (199). Notre équipe a par ailleurs montré que l'utilisation d'un antagoniste de CX3CR1 (F1) était également capable de réduire la taille des plaques et que son effet était en partie médié par un effet sur les monocytes Ly6Chigh (289). Plus récemment, la contribution de CX3CR1 dans la physiopathologie de l'IDM a été montrée chez

l'homme et de façon surprenante cet effet semble dépendre de l'expression de CX3CR1 par les lymphocytes T (290). Dans le modèle d'ischémie-reperfusion rénale, l'expression de CX3CR1 est également montrée comme délétère (260). Les souris CX3CR1^{-/-} soumis à 3h d'ischémie rénale subissent un large influx de monocytes dans le rein qui est sous le contrôle de CX3CR1. L'absence de ce récepteur est associée à une dégradation plus importante de la fonction rénale et à plus de lésions histologiques. Ramos et coll. (291) ont montré que l'absence de CX3CR1 limitait les lésions rénales dans le syndrome hémolytique et urémique, l'effet délétère de l'axe CX3CL1-CX3CR1 semble être lié à la captation intravasculaire et aux propriétés adhésives de ce couple CK-RCK.

A contrario, CX3CR1 a été retrouvé comme facteur protecteur au cours de l'inflammation hépatique. Dans un modèle d'hépatopathie induite par le CCl₄, les souris CX3CR1^{gfp/gfp} développaient des lésions plus sévères tandis que dans les modèles d'inflammation chronique hépatique les souris CX3CR1^{gfp/gfp} génèrent plus de fibroses mais également plus d'infiltration monocyttaire (292). Les macrophages locaux (cellules de Kupfer) et les hépatocytes ont été montrés comme source de CX3CL1 en cas d'inflammation ce qui montre la régulation des signaux de survie au sein même des organes. Au cours de la DMLA, CX3CR1 contribue au recrutement microglial, le déficit en CX3CR1 induit l'accumulation des microglies et provoque la maladie (201, 293). CX3CR1 est également responsable de la réponse immunitaire anti-tumorale en particulier via le recrutement des cellules NK (293). Récemment Lee et coll. (294) ont montré que CX3CR1 contribuait à la genèse du diabète et au fonctionnement des cellules β

pancréatiques. Les auteurs ont observés un effet bénéfique de l'injection de FKN sur l'insulinorésistance.

De la même façon, dans les pathologies infectieuses, CX3CR1 est montré, le plus souvent, comme étant un facteur protecteur. Le déficit en CX3CR1 est associé à plus de morbidité et de mortalité dans les infections pulmonaire à vaccinia virus (295) ou les infections systémiques à *Candida* (296) et promeut la survie des macrophages rénaux.

D'autres résultats sont en apparence contradiction avec ces résultats. Hoccheiser et coll. (297), toutefois, retrouvent peu d'effets du déficit en CX3CR1 dans le modèle de pyélonéphrite bactérienne.

Le déficit en CX3CR1 peut également être protecteur pour certaines infections. En effet, il constitue également une porte d'entrée pour le VIH et favorise la maladie (278). Dans le modèle d'infection parasitaire d'infection à *Schistosoma japonicum*, le déficit en CX3CR1 conduit à une diminution de la formation des granulomes hépatiques liée à une polarisation M2 des macrophages (298).

Dans le modèle de CLP, Ishida et coll. (299) montrent que le déficit en CX3CR1 est associé à une plus importante mortalité sans modification du recrutement cellulaire. Les auteurs évoquent un effet de CX3CR1 sur les capacités bactéricides des leucocytes. He et coll. (300) montrent également que l'injection de FKN est bénéfique au cours du sepsis. Raspé et coll. (301) ont montré que le mRNA de CX3CL1 était induit de façon NFkB dépendante dans le cœur, les poumons, le foie

et les reins au cours du sepsis. C'est dans ces derniers que la production de cette cytokine est la plus abondante. Par ailleurs, l'inflammation induit une diminution de l'expression membranaire de CX3CR1 et cette diminution est pour Pachot et coll. (302) associée à des caractéristiques d'immunosuppression post-septique.

Deux polymorphismes de CX3CR1 ont été décrits : V249I et T280M, ce dernier n'apparaissant que sur l'allèle 249I. L'allèle 249I a une incidence élevée mais variable selon les populations, il dépasse souvent les 20%. Les effets de ces polymorphismes ont été étudiés dans de nombreuses pathologies inflammatoires. Au cours du glioblastome, notre équipe a montré que l'allèle I249 était un facteur pronostic favorable et qu'il était associé à une diminution de l'infiltration microgliale (303). Fonctionnellement, cet allèle est associé à un gain de fonction d'adhésion qui peut se traduire par une diminution du recrutement (304). Le génotype II-MM est lui associé à un risque accru de DMLA. I249 et M280 sont également impliqués dans les maladies cardiovasculaires avec un risque accru d'infarctus cérébraux ou d'athérosclérose mais ce dernier point est débattu dans la littérature (305).

VII. Développement d'antagonistes des récepteurs aux chimiokines

Une composante immunologique peut être retrouvée dans toutes les pathologies, aiguës ou chroniques. L'action du système immunitaire nécessitant un positionnement spatial, quantitatif et qualitatif précis de ses effecteurs (les leucocytes), les chimiokines et leurs récepteurs constituent des cibles logiques de traitement pour un éventail large de maladies. Dans la mesure où les sources

de CK sont multiples et que seule une infime portion des CK produites va effectivement se lier à son récepteur et que les récepteurs sont responsable de l'action des CK, ce sont en général les RCK qui sont choisis comme cible de choix avec en conséquence une focalisation sur le développement d'antagonistes aux RCK. Dans la table 9, une liste des essais cliniques en cours en 2009 impliquant des antagonistes des récepteurs aux chimiokines est rapportée et montre la diversité des pathologies concernées.

Comme le rapporte Horuk et coll. (306), le développement des antagonistes aux RCKs a généré de nombreux espoirs qui ont hélas été souvent déçus. La difficulté à utiliser les antagonistes ou bloqueurs des RCK comme traitement est multifactorielle. L'implication spécifique des CK-RCK et le potentiel de leur blocage comme traitement efficace d'une pathologie dépend énormément des modèles utilisés. La correspondance entre des résultats obtenus *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins n'est pas toujours optimale et les parallélismes peuvent être erronés. La superposabilité imparfaite de l'expression des RCK entre les leucocytes humains et murins est une source importante d'erreur et d'hétérogénéité. Une autre difficulté résulte dans la complexité du réseau CK-CKR. Cibler un RCK spécifique est un défi technique dans la mesure où les RCK partagent des motifs structurels communs. En outre, plusieurs CK peuvent cibler un RCK et comme vu précédemment certaines CK activent des RCK et en inhibent d'autres. De plus, les RCK peuvent être exprimés par différents types ou sous-type cellulaires. De fait, le résultat final du blocage d'un récepteur est difficilement prévisible et peut parfois être contre-productif.

L'antagonisation des RCK expose également au risque d'immunodépression pharmaco-induite. Le blocage au long cours des RCK va par définition limiter la mobilisation de certaines populations leucocytaires et majorer le risque d'infection.

Cibler les voies de signalisation des RCK est également périlleux car les RCPGs partagent de nombreuses voies de signalisation.

L'antagoniste idéal serait à même de cibler spécifiquement un couple CK-RCK sur un ou des types cellulaires précis avec une action limitée dans le temps où il serait capable de bloquer la progression de la maladie sans pour autant perturber le système immunitaire dans ses missions essentielles.

Table 2 Clinical trials reported for chemokine receptor antagonists*					
Receptor	Company	Highest clinical phase	Compound	Indication	Status
CCR1	Berlex/Schering	II	BX471	MS, psoriasis, endometriosis	No efficacy, trials halted
CCR1	Millennium	II	MLN 3701, MLN 3897	RA, MS	MLN 3897, no efficacy in RA
CCR1	Pfizer	II	CP 481,715	RA	No efficacy, trials halted
CCR1	ChemoCentryx	I	CCX354	RA	Ongoing
CCR2	Millennium	II	MLN 1202 [†]	Atherosclerosis, MS, RA	No efficacy in RA, ongoing in atherosclerosis and MS
CCR2	Incyte	I	INCB8696	MS, lupus	Ongoing
CCR2	ChemoCentryx	I	CCX140	MS, restenosis	Ongoing
CCR2	Merck	II	MK-0812	RA, MS	No efficacy
CCR2	Pfizer	II	PF-4136309	Pain	Ongoing
CCR3	Topigen	II	TPI ASM8 [†]	Asthma	Ongoing
CCR3	GlaxoSmithKline	I	776994	Asthma, allergic rhinitis	No longer reported
CCR3	Bristol-Myers Squibb	I	DPC-168	Asthma	No longer reported
CCR4	Amgen	I	KW-0761 [†]	Oncology	Ongoing
CCR5	Pfizer	Approved	Maraviroc	HIV	Approved
CCR5	Pfizer	II	Maraviroc	RA	Ongoing
CCR5	Schering-Plough	II	Vicriviroc	HIV	Ongoing
CCR5	GlaxoSmithKline	III	Aplaviroc	HIV	Toxicity, development uncertain
CCR5	Incyte	II	INCB9471	HIV	Ongoing
CCR5	Progenics	I	Pro 140 [†]	HIV	Ongoing
CCR9	ChemoCentryx	III	CCX-282	IBD, Crohn's disease	Ongoing
CXCR1/ CXCR2	Schering-Plough	II	SCH 527123	COPD	Ongoing
CXCR1/ CXCR2	Dampé	II	Reparixin	Reperfusion injury	Ongoing
CXCR2	GlaxoSmithKline	I	SB 656933	COPD, cystic fibrosis	Ongoing
CXCR3	Amgen/Tularik	II	T-487/ AMG-487	Psoriasis	No efficacy, trial halted
CXCR4	Genzyme	III	Plerixafor	Multiple myeloma, NHL	Ongoing

*All programmes are non-peptide in approach except where indicated otherwise with [†]. Data were obtained from the Investigational Drugs Database from Thomson Reuters. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; IBD, irritable bowel syndrome; MS, multiple sclerosis; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; RA, rheumatoid arthritis.

Table 9. Essais cliniques en cours impliquant des antagonistes des RCK. D'après Horuk et coll. (306)

VIII. Conclusion

Les chimiokines et leurs récepteurs sont donc des acteurs majeurs de la mobilité des monocytes à l'homéostasie et en pathologie. Le rôle des récepteurs aux

chimiokines au cours des pathologies infectieuses nécessite d'être clairement défini et leur modulation pourrait représenter une nouvelle voie thérapeutique.

Chapitre 4 : Objectifs du travail

Le sepsis survient à la suite d'une activation complexe de l'immunité innée en réponse à un agent infectieux. Les neutrophiles et monocytes sont en première ligne de cette réponse immunitaire. Dans cette réponse à la phase aiguë de l'hôte face au pathogène, une réaction adaptée doit être équilibrée entre :

- la génération d'une inflammation au moyen d'une machinerie complexe faisant intervenir les PRRs qui va permettre de recruter les leucocytes afin d'éliminer l'agent infectieux, nettoyer les tissus lésés et induire le processus de réparation
- le contrôle de l'extension puis la résolution de cette inflammation afin de prévenir la dissémination du processus inflammatoire et son auto-amplification qui mènent à l'infiltration leucocytaire des organes à distance du site infectieux, à la dysfonction de ces organes qui entretient un cercle vicieux dysfonction-inflammation qui mène finalement au décès.

Nos hypothèses de travail reposent sur le rôle ambivalent des monocytes au cours des inflammations aiguës. En effet, comme nous l'avons détaillé précédemment, les monocytes sont au cœur de l'initiation de la cascade inflammatoire mais contrôlent également in situ l'intensité de cette inflammation.

Les données de la littérature sur la contribution des monocytes et la cinétique précise des séquences d'évènements survenant au cours du sepsis

sont encore incomplètement connus. De la même façon, la contribution des récepteurs CCR2 et CX3CR1 à cette physiopathologie nécessitent d'être explorés plus avant.

Nous utiliserons un modèle courant de sepsis : la ponction sur ligature caecale qui est à l'origine d'un sepsis polymicrobien qui mime de façon réaliste le sepsis humain d'origine abdominale. Nous utiliserons également le modèle d'endotoxémie pour tester l'effet de la modulation des récepteurs aux chimiokines lors d'une inflammation stérile TLR4 dépendante.

Nous étudierons plus particulièrement l'effet du déficit en CCR2 et en CX3CR1 et nous insisterons sur l'effet de la modulation de ces récepteurs sur les dommages tissulaires rénaux au cours du sepsis car le rein est une source majeure de CCL2 et de CX3CL1 au cours des inflammations aiguës.

Dans un premier temps nous caractériserons, la cinétique, quantitative et qualitative de mobilisation et de recrutement des cellules myéloïdes et en particuliers des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques au cours du sepsis. Nous étudierons le comportement de ces cellules dans le rein au moyen de la microscopie multiphotonique intravitale et via l'utilisation de souris modifiées génétiquement pour exprimer des rapporteurs fluorescents sous le contrôle des promoteurs des RCK ou de CD115 afin de caractériser les comportements monocytaires en termes de mobilité et d'adhésion in vivo. Les effets phénotypiques de la modulation des récepteurs CX3CR1 et CCR2 par invalidation génique ou inhibition pharmacologique seront déterminés par l'étude de la survie, l'analyse des lésions rénales (marqueurs circulants

de la fonction rénale et histologie), l'évaluation en microscopie intravitale et en cytométrie en flux des modifications de nombre et phénotype membranaire des monocytes. Le rôle mécanistique de la modulation de ces récepteurs sera investigué par l'étude de la production des cytokines pro- et anti-inflammatoire par qPCR, marquages intracellulaires en cytométrie en flux et ELISA. Des transferts adoptifs permettront de déterminer le rôle des monocytes et de l'expression spécifique de l'expression monocyttaire de CX3CR1 et CCR2 dans la physiopathologie du sepsis.

Chez les patients atteints de sepsis, nous étudierons l'impact d'une modulation naturelle de la fonction de l'axe CX3CL1-CX3CR1 qui survient avec la présence de l'allèle I249 dont nous évaluerons la présence par génotypage (méthode Taqman) sur l'incidence de l'insuffisance rénale aiguë.

Article

Ly6C^{high} monocytes protect against kidney damage during sepsis via a CX3CR1-dependent adhesion mechanism

Par Benjamin G. Chousterman et al. – Publié dans le **Journal of the American Society of Nephrology**

Ly6C^{high} Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism

Benjamin G. Chousterman,^{*†‡§} Alexandre Boissonnas,^{*†‡} Lucie Poupel,^{*†‡} Camille Baudesson de Chanville,^{*†‡} Julien Adam,^{||} Nahid Tabibzadeh,^{*||} Fabrice Licata,^{*†‡} Anne-Claire Lukaszewicz,^{§**} Amélie Lombès,^{*†‡} Philippe Deterre,^{*†‡} Didier Payen,^{§**} and Christophe Combadière^{*†‡}

^{*}Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), University of Paris 06, Paris, France; [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1135, Paris, France; [‡]Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, France; [§]Département d'Anesthésie-Réanimation-Service d'Aide Médicale Urgente (SMUR), Hôpital Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; ^{||}Institut Gustave-Roussy, Université Paris-Sud Villejuif, France; ^{||}Service des Explorations Fonctionnelles and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Paris, France; and ^{**}INSERM, U1160, Paris, France

ABSTRACT

Monocytes have a crucial role in both proinflammatory and anti-inflammatory phenomena occurring during sepsis. Monocyte recruitment and activation are orchestrated by the chemokine receptors CX3CR1 and CCR2 and their cognate ligands. However, little is known about the roles of these cells and chemokines during the acute phase of inflammation in sepsis. Using intravital microscopy in a murine model of polymicrobial sepsis, we showed that inflammatory Ly6C^{high} monocytes infiltrated kidneys, exhibited altered motility, and adhered strongly to the renal vascular wall in a chemokine receptor CX3CR1-dependent manner. Adoptive transfer of Cx3cr1-proficient monocyte-enriched bone marrow cells into septic Cx3cr1-depleted mice prevented kidney damage and promoted mouse survival. Modulation of CX3CR1 activation in septic mice controlled monocyte adhesion, regulated proinflammatory and anti-inflammatory cytokine expression, and was associated with the extent of kidney lesions such that the number of lesions decreased when CX3CR1 activity increased. Consistent with these results, the pro-adhesive I249 CX3CR1 allele in humans was associated with a lower incidence of AKI in patients with sepsis. These data show that inflammatory monocytes have a protective effect during sepsis via a CX3CR1-dependent adhesion mechanism. This receptor might be a new therapeutic target for kidney injury during sepsis.

J Am Soc Nephrol 27: ●●●-●●●, 2015. doi: 10.1681/ASN.2015010009

Sepsis is defined as widespread inflammation secondary to infection.¹ It is the major cause of admission and death in intensive care units.^{2,3} Its pathophysiology involves numerous components of innate immunity, especially mononuclear phagocytes.^{4,5}

Monocytes are believed to generate the cytokine storm that triggers a chain reaction leading to tissue damage and death.⁵ They also perform regulatory functions during inflammatory processes.⁶⁻⁹ They are divided into two subsets: inflammatory monocytes, which are recruited early during inflammation,^{6,10} and resident monocytes, which patrol the steady-state

Received January 5, 2015. Accepted May 20, 2015.

B.G.C. and A.B. contributed equally to this work.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Boissonnas or Dr. Combadière, Sorbonne Universités, UPMC University of Paris 06, CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI). 91 Boulevard de l'hôpital, F-75013 Paris, France. Email: alexandre.boissonnas@upmc.fr or christophe.combadiere@upmc.fr

Copyright © 2015 by the American Society of Nephrology

endothelium.¹¹ Recent studies have called attention to the dual role of inflammatory monocytes in acute inflammation and especially infection. They protect tissues during infectious processes, such as pneumonia or gastrointestinal toxoplasmosis, notably *via* their secretion of IL-1 receptor antagonist^{9,12,13} (IL-1ra) or prostaglandin E2.⁸ Essential crosstalk among monocytes, neutrophils, and tissue (especially epithelial cells) controls the equilibrium between inflammatory and anti-inflammatory processes.

CX3CR1, the receptor of CX3CL1, may be involved in the pathophysiology of sepsis. Kidneys are subject to insult during septic episodes; AKI is a common feature of sepsis and is associated with increased mortality. AKI results, in part, from leukocyte infiltration of kidney tissue and the generation of proinflammatory and proapoptotic mediators.^{14,15} Studies have shown that sepsis is associated with monocyte infiltration of the kidneys¹⁴ and with increased levels of CX3CL1 *in situ*.¹⁶

Here, we show that during polymicrobial sepsis, inflammatory monocytes emigrated from the bone marrow and induced monocytoysis accompanied within a few hours by enhanced CX3CR1-dependent adhesion to the renal cortex endothelium. CX3CR1 deficiency increased renal damage and mouse mortality and was correlated with reduced monocyte margination. We further confirmed that the CX3CR1 conferred protective functions linked to inflammatory monocyte adhesiveness and reduced production of IL-1ra in Ly6C^{high} monocytes. The involvement of CX3CR1 in the physiopathology of sepsis was confirmed in humans, through a CX3CR1 gene polymorphism study that showed that the I249 CX3CR1 allele is associated with both increased monocyte adhesiveness and reduced kidney damage. Our work describes the protection conferred by inflammatory monocytes against the distant kidney damage caused by septic inflammation.

RESULTS

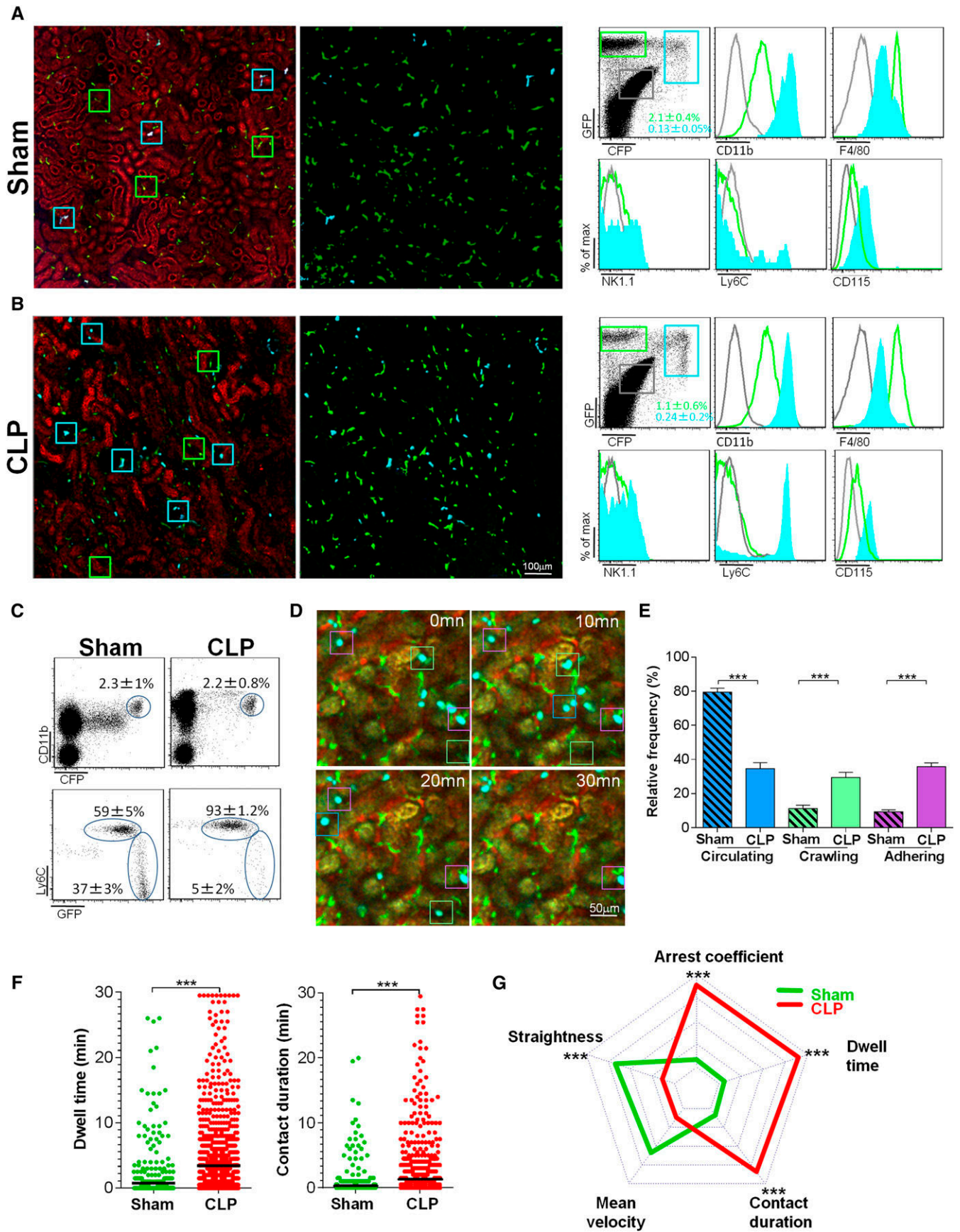
Ly6C^{high} Monocytes Exhibit Increased Adhesion to the Renal Endothelium during Sepsis

To determine the role of monocytes in kidney damage during sepsis, we used a standard murine model of abdominal sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP).¹⁷ In our experimental conditions, 50% of the mice died of sepsis in 4 days (Supplemental Figure 1A). Six hours after sepsis induction, the number of CD11b⁺NK1.1^{neg}F4/80⁺Ly6C^{high} cells defined as Ly6C^{high} monocytes increased in the blood, concomitant to their release from the bone marrow, while the number of CD11b⁺NK1.1^{neg}F4/80⁺Ly6C^{low} cells defined as Ly6C^{low} monocytes remained constant. Few Ly6C^{high} monocytes accumulated in the kidneys, while the number of Ly6C^{low} monocytes and of CD11b⁺NK1.1^{neg}F4/80^{high}CD11c^{high} cells defined as renal dendritic cells (renal DCs^{18,19}) number did not change (Supplemental Figure 1B). Twenty-four hours after CLP, the number of Ly6C^{high} monocytes reverted to that in the sham (control) group. The kinetics of mobilization in the blood and infiltration into the kidneys was the same for neutrophils as for Ly6C^{high} monocytes (Supplemental Figure 1B).

To examine the functional role of monocytes, we performed multiphoton intravital imaging on kidneys from sham- and CLP-

operated MacBlue×C*x3cr1*^{gfp/+} mice. In the MacBlue mouse,²⁰ all blood monocytes are strongly positive for enhanced cyan fluorescent protein (ECFP), whereas most tissue macrophages do not express the reporter protein.²¹ In contrast, renal DCs are CX3CR1⁺ and strongly express the green fluorescent protein (GFP) reporter.²² In the sham-operated group, two particular subsets of myeloid cells were distinguished in the renal cortex, according to their expression of GFP and/or ECFP: A dominant population of stellate GFP⁺ECFP^{neg} cells was evenly distributed throughout the tissue, while a few sparse GFP⁺ECFP⁺ cells were found (Figure 1A). GFP⁺ECFP^{neg} cells expressed high levels of F4/80 and low levels of CD11b, Ly6C, and CD115 and may correspond to renal interstitial DCs.^{18,19} The GFP⁺ECFP⁺ cell phenotypes were stellate or round in shape, were CD11b⁺CD115⁺F4/80^{low}, and expressed high or low levels of Ly6C (Figure 1A). Six hours after CLP, the number of GFP⁺ECFP^{neg} cells remained constant, and small, round intravascular GFP⁺ECFP⁺ cells (likely monocytes) accumulated in large numbers (Figure 1B). Of the blood ECFP⁺ cells in the sham-operated mice, 60% were CX3CR1^{low/dim}Ly6C^{high}, corresponding to the phenotype of inflammatory monocytes, and 40% were CX3CR1^{high}Ly6C^{low}, corresponding to the phenotype of patrolling monocytes. At 6 hours after CLP, >90% of the ECFP⁺ cells were Ly6C^{high} monocytes (Figure 1C). Time-lapse imaging of the kidneys of the sham-operated mice showed that numerous ECFP⁺ cells traveled through the cortex in the bloodstream, interacting very little with the endothelium, while the activity of renal DCs was strongly protrusive (Supplemental Movie 1). At 6 hours after CLP, renal DC behavior did not change, but the number of ECFP⁺ cells adhering to the luminal side of the vessel increased (Supplemental Movie 2). We defined three motility patterns of ECFP⁺ cells: circulating, crawling, and adhering (Figure 1D). Six hours after CLP, the proportion of circulating ECFP⁺ cells had fallen by >50%, while the proportion of crawling and adhering ECFP⁺ cells had increased above the levels in the sham-operated mice (Figure 1E). Mean dwell time and mean contact duration quadrupled (Figure 1F). Contact duration increased for ECFP⁺, but they were mainly released without any evidence of extravasation toward the kidney tissue.

Intravital imaging on CLP-operated MacBlue×C*x3cr1*^{gfp/+}×C*cr2*^{-/-} mice, defective for circulating Ly6C^{high} monocytes,²³ showed a near-complete abolition of the accumulation of ECFP⁺ adherent cells on the renal endothelium strongly suggests that they were Ly6C^{high} monocytes (Supplemental Movie 3). This phenotype was further confirmed by the intravital imaging of the combined C*x3cr1*^{gfp/+}C*cr2*^{gfp/+} mice, which showed that the adhering cells coexpressed red fluorescent protein (RFP) and GFP (Supplemental Movie 4). In C*cr2*^{-/-} mice, Ly6C^{high} monocytes did not accumulate after CLP in blood or in the kidney. After CLP, Ly6C^{low} monocytes were more numerous in the blood of C*cr2*^{-/-} mice than in wild-type (WT) mice, and their numbers were similar in the kidney for both groups (Supplemental Figure 2A). However, no ECFP⁺ cells adhering to the renal vascular wall were imaged in C*cr2*^{-/-} mice, in contrast to WT mice (Supplemental Movie 3). Altogether these results indicate that Ly6C^{high}



monocytes are the main cells imaged by intravital imaging. Radar chart representation of the different cell dynamic measures provides a signature of the ECFP⁺ cell dynamic behavior (Figure 1G). Overall, CLP strongly modified the signature of ECFP⁺ cells compared with that of sham-operated mice. Adhesion of the ECFP⁺ cells increased after CLP, and their track straightness declined, as did their mean velocity. At the same time, their arrest coefficient, dwell time, and contact duration with the endothelium all increased (Figure 1G).

These findings show that within a few hours after CLP, the number of Ly6C^{high} monocytes in the blood increased and they interacted with the renal endothelium.

CX3CR1 Promotes Ly6C^{high} Monocyte Adhesion and Prevents Renal Damage during Sepsis

Previous reports have shown that CX3CR1 deficiency is associated with increased mortality after CLP,²⁴ but the precise mechanisms involved have not been adequately defined. We sought to determine the role of CX3CR1 in the pathogenesis of organ damage during sepsis. *Cx3cr1*^{-/-} mice had conspicuously more kidney histologic lesions than WT mice (Figure 2A). The proportion of damaged tubules during CLP was two times higher in the *Cx3cr1*^{-/-} mice (Figure 2B), which also had substantially higher levels of markers of renal failure, such as creatinemia and uremia (Figure 2C). The kidney was not the only affected organ, but renal damages were associated with increased mortality after CLP (Supplemental Figure 3A). To determine whether this phenotype could be due to impaired bactericidal activity, as suggested,²⁵ we compared mice survival in a sterile inflammation model, by injecting mice with a lethal dose of LPS. The strong reduction in survival of *Cx3cr1*^{-/-} mice suggests that the phenotype observed was independent of control of the bacterial burden and emphasizes the relationship with organ damage (Supplemental Figure 3B). On the other hand, and as others have recently reported,²⁶ these two types of mice did not differ in the number of Ly6C^{high} monocytes (Figure

2D) or neutrophils (not shown) in bone marrow, kidneys, or blood. This prompted us to perform functional imaging to compare dynamic behavior of Ly6C^{high} monocytes from CX3CR1-deficient and WT mice during sepsis.

Thus, we used MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice 6 hours after CLP (Figure 2E). In the absence of CX3CR1, the proportion of adhering and crawling ECFP⁺ cells fell (Figure 2F), as did ECFP⁺ cell dwell time and contact duration (Figure 2G). The radar chart representation of the motility pattern showed distinct cell dynamic signature between septic MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} and septic MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice (Figure 2H). This loss of adhesion was specific to ECFP⁺ cells: Neutrophil behavior did not differ between the two strains (Supplemental Figure 3, C–E). To further address that the reduced adherence is intrinsic to the CX3CR1 deficiency, *Cx3cr1*^{-/-} and *Cx3cr1*^{+/+} ECFP⁺ cells were transferred into septic WT mice and the proportion that adhered to the renal vascular wall was determined (Supplemental Figure 3F). Accordingly, *Cx3cr1*^{-/-} ECFP⁺ cells adherence was much weaker than that of *Cx3cr1*^{+/+} ECFP⁺ cells. We conclude that the CX3CR1 receptor is functionally important during sepsis; its absence leads to reduced inflammatory monocyte adhesion to the renal vascular wall, more numerous kidney lesions, and increased mortality. This observation suggests that inflammatory monocytes have a potent unexpected protective effect during sepsis.

Bone Marrow–Derived Monocytes Protect against Damage to Kidney Tissue during Sepsis

To examine the protective role circulating Ly6C^{high} monocytes may play, we first performed CLP in *Ccr2*^{-/-} mice that display a Ly6C^{high} monocytopenia (Supplemental Figure 2A). Consistent with our hypothesis, the number of kidney lesions was dramatically higher in *Ccr2*^{-/-} than in WT mice (Figure 3A). It has also been reported that phagocyte are renoprotective during sepsis and that *Cx3cr1*^{-/-} mice have a defect in renal DC

Figure 1. Ly6C^{high} monocytes exhibit increased adhesion to the renal endothelium during sepsis. Two-photon laser scanning microscopic images (left) with volume rendering (right) of ECFP⁺ (cyan squares) and GFP⁺ (green squares) cells in kidneys of MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} mice 6 hours after (A) sham or (B) CLP operations. CFP signals are in blue, GFP signals are in green, and autofluorescent renal tubules are in red. Overlay of flow cytometric surface marker expression gated on GFP⁺ (green histograms) and ECFP⁺ cells (cyan histograms) in kidneys are shown for each condition. Mean percentages±SD of gated cells are indicated (*n*=6 mice per group out of three independent experiments). Background staining (gray histograms) gated on nonfluorescent cells is represented. (C) Dot plots represent Ly6C and CX3CR1-GFP expression, gated on blood CD11b⁺ECFP⁺ cells 6 hours after sham or CLP operations. Mean percentages±SD of gated cells are indicated (*n*=6 mice per group out of three independent experiments). (D) Time series two-photon laser scanning microscopic images of kidney cortex of MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} mice 6 hours after CLP. Examples of circulating (blue squares), crawling (green squares), and adhering monocytes (purple squares) are presented. ECFP signals are in cyan, GFP signals are in green, renal tubules are autofluorescent, and blood vessels are visualized by 2 MDa rhodamine-dextran. (E) Relative frequency of the three behaviors. Bars represent mean±SEM (*n*=4 sham and *n*=3 control from independent experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment for multiple comparisons were used; ****P*<0.001). (F) Dwell time and contact duration with renal endothelium of ECFP⁺ monocytes. Black bars indicate means. (*n*=4 sham and *n*=4 control from independent experiments; Mann-Whitney test were used; ****P*<0.001). (G) Radar chart representation shows ECFP⁺ cell dynamic signatures in sham-operated (green) and CLP-operated (red) mice. Mean values are presented within the 95% confidence interval of the measured value scale for each parameter. Data represent a pool of cells from (*n*=4 sham and *n*=4 control from independent experiments; Mann-Whitney test were used; *** *P*<0.001). (See also Supplemental Figure 1 and Supplemental Movies 1–4).

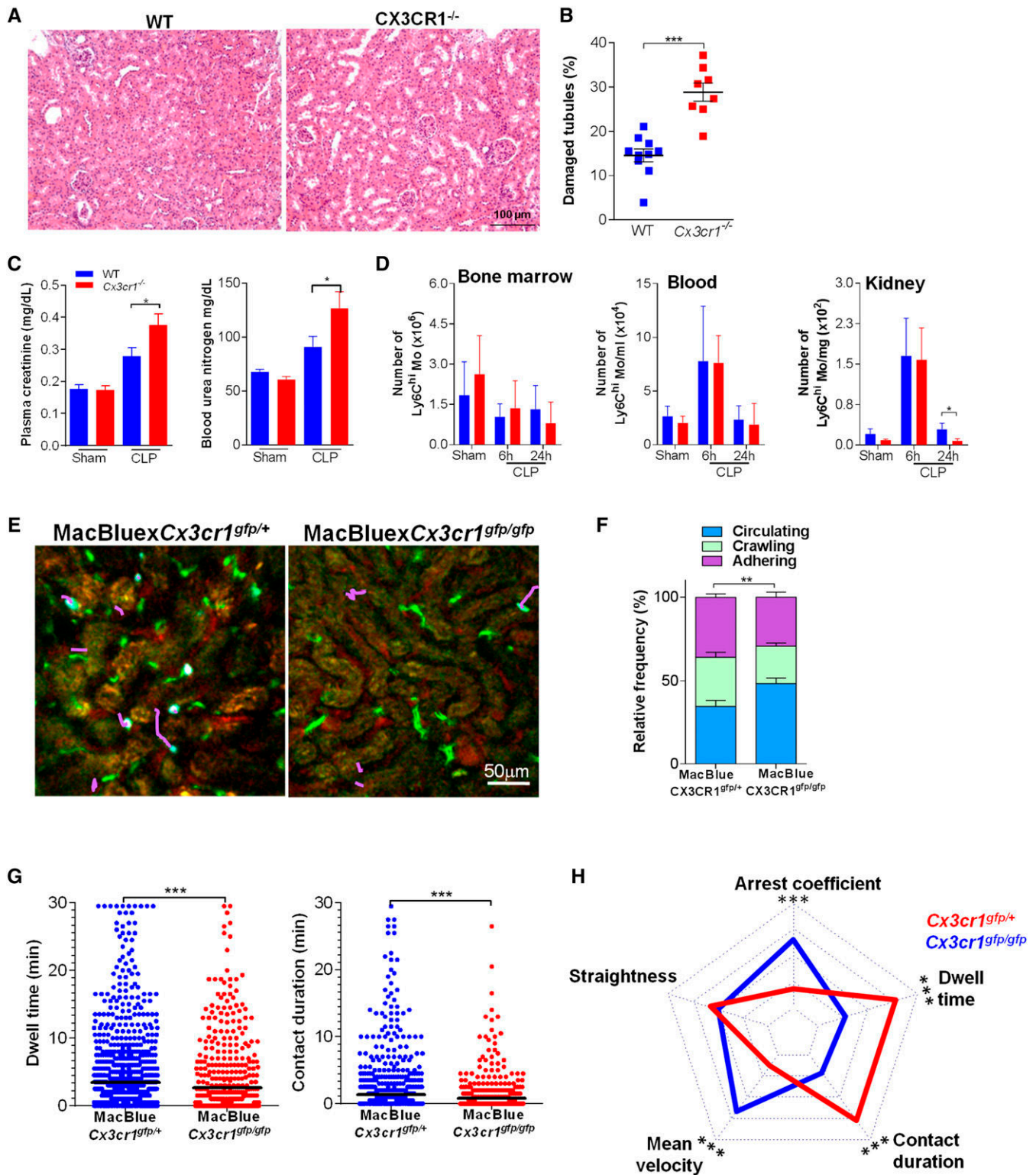


Figure 2. CX3CR1 promotes Ly6C^{high} monocyte adhesion and prevents renal damage during sepsis. (A) Photomicrographs and (B) quantification of kidney histologic lesions 24 hours after CLP in WT (blue) and *Cx3cr1*^{-/-} mice (red). Bars represent mean ± SD (*n* = 10 WT, *n* = 8 *Cx3cr1*^{-/-}, from at least two repeated experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment was used; ****P* < 0.001). (C) Urea and creatinine measurements in plasma of CLP-operated WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice bars represent mean ± SEM (*n* = 10 WT sham, 6 *Cx3cr1*^{-/-} sham, 15 WT, and 15 *Cx3cr1*^{-/-} CLP, from at least two repeated experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment was used; **P* < 0.05). (D) Number of Ly6C^{high} monocytes in bone marrow, blood, and kidney of WT (blue) and *Cx3cr1*^{-/-} (red) mice. Bars represent mean ± SD (*n* = 10

number.^{26,27} The number of renal DCs in *Ccr2*^{-/-} mice was not impaired compared with the number in WT mice, confirming that the presence of renal DCs was not sufficient to protect from renal lesion (Supplemental Figure 2B).

Adoptive transfers of CCR2-proficient monocyte-enriched bone marrow cells (MBMs) into *Ccr2*^{-/-} mice drastically reduced kidney lesions during sepsis and thus further confirmed their protective effect (Figure 3A). Finally, adoptive transfer of *Cx3cr1*-proficient MBM into septic *Cx3cr1*^{-/-} mice provided significant protection against mortality (Figure 3B) and resulted in a diminution in kidney lesions to a level similar to that of WT mice (Figure 3C), compared with the transfer of *Cx3cr1*-deficient MBMs. These observations confirm that bone marrow-derived monocytes have a protective role in organ damage during sepsis *via* a CX3CR1-dependent mechanism.

CX3CR1 Activation Controls Ly6C^{high} Monocyte Adherence and Outcome of CLP-Mediated Sepsis

In further considering the role of CX3CR1-dependent adhesion of Ly6C^{high} monocytes during sepsis, we treated septic mice with the CX3CR1 ligand (CX3CL1) or the antagonist (F1) of CX3CR1 that we have previously shown to inhibit monocyte adhesion to CX3CL1.²⁸ The proportion of adherent monocytes increased in the presence of the agonist and diminished in the presence of the antagonist (Figure 4, A and B). In addition, dwell time and contact duration of monocytes increased after treatment with CX3CL1 and decreased after treatment with F1 (Figure 4C). The cell dynamic signature was inversely affected by treatment with CX3CL1 and F1 compared with control CLP-operated mice (Figure 4D). These different signatures were associated with a different level of organ failure. In particular, injection of the antagonist, F1, led to increased lesions (Figure 4E) and mortality (data not shown) without altering renal DC numbers (Supplemental Figure 2B). In contrast, CX3CL1 injection diminished the

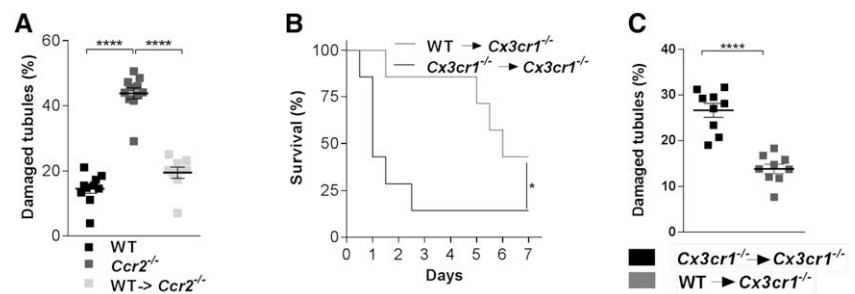


Figure 3. Bone marrow-derived monocytes protect against damage to kidney tissue during sepsis. (A) Quantification of kidney histologic lesions 24 hours after CLP in WT, *Ccr2*^{-/-} and *Ccr2*^{-/-} mice with adoptive transfer of WT bone marrow monocytes before surgery. Bars represent mean $\pm$ SD ($n=10$ WT, 11 *Ccr2*^{-/-}, 9 WT in *Ccr2*^{-/-}; data from at least two repeated experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment was used; **** $P<0.0001$). (B) Survival of CLP-operated *Cx3cr1*^{-/-} mice after adoptive transfer of WT (gray line) or *Cx3cr1*^{-/-} bone marrow monocytes (black line) ($n=7$ per group out of three independent experiments; survival curves were compared with a log-rank test; * $P<0.05$). (C) Quantification of kidney histologic lesions 24 hours after CLP in *Cx3cr1*^{-/-} mice with adoptive transfer of WT (gray) or *Cx3cr1*^{-/-} (black) bone marrow monocytes before surgery ($n=9$ per group from at least two repeated experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment was used; **** $P<0.0001$).

number of kidney lesions (Figure 4E). These findings show that pharmacologic modulation of CX3CR1 activation strongly correlates with Ly6C^{high} monocyte margination and kidney damage, thereby demonstrating CX3CR1 as a potential therapeutic target.

CX3CR1 Blockade Increases Kidney Inflammation and Reduces IL-1ra Production by Ly6C^{high} Monocyte during Sepsis

To further investigate the molecular mechanism involved in protective effect by Ly6C^{high} monocytes, we measured by flow cytometry the intracellular production of IL-1ra that was previously shown to attenuate lung injury after LPS treatment⁹ (Figure 5A). IL-1ra mean fluorescence intensities were nearly doubled in Ly6C^{high} monocytes 6 hours after CLP compared with sham-operated mice. F1 treatment efficiently reduced IL-1ra mean fluorescence intensities in Ly6C^{high} monocytes (Figure 5B) and leads to increased TNF- α (Figure 5C), decreased TGF- β (Figure 5D), and IL1ra (Figure 5E) transcripts in the whole kidney 6

WT sham, 5 WT CLP at 6 hours, 12 WT CLP at 24 hours, and 6 *Cx3cr1*^{-/-} sham, CLP at 6 hours, and CLP at 24 hours, from at least two repeated experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment was used; * $P<0.05$). (E) Two-photon laser scanning microscopic images with overlay of monocyte migratory tracks (pink) in kidney cortex of MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/+} and MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice, 6 hours after CLP. ECFP signals are in cyan, GFP signals are in green, renal tubules are autofluorescent, and blood vessels are visualized by 2 MDa rhodamine-dextran. (F) Relative frequency of the three monocyte behaviors in MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/+} and MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice. Bars represent mean $\pm$ SEM ($n=3$ MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/+}; $n=4$ MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/gfp} from independent experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment was used; ** $P<0.01$). (G) Dwell time and contact duration with the renal endothelium of ECFP⁺ *Cx3cr1*^{gfp/+} and ECFP⁺ *Cx3cr1*^{gfp/gfp} monocytes. Black bars indicate means. (H) Radar chart representation shows ECFP⁺ cell dynamic signatures in CLP-operated MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/+} (red) and MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/gfp} (blue) mice. Mean values are presented within the 95% confidence interval of the measured value scale for each parameter (for all two-photon experiments, $n=3$ MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/+}; $n=4$ MacBlue $\times$ *Cx3cr1*^{gfp/gfp} from independent experiments; Mann-Whitney test for multiple comparisons was used; *** $P<0.001$). (See also Supplemental Figure 2 and Supplemental Movie 5).

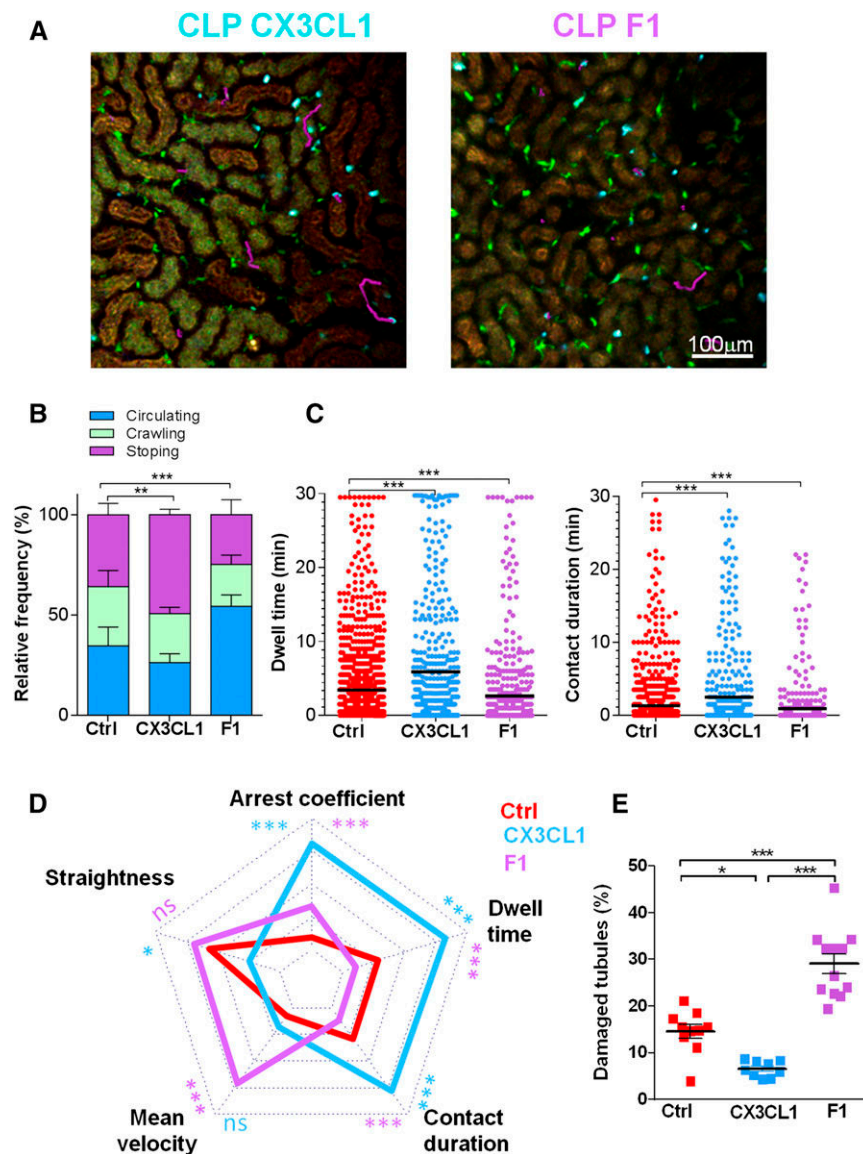


Figure 4. CX3CR1 activation controls Ly6C^{high} monocyte adherence and the outcome of CLP-mediated sepsis. (A) Two-photon laser scanning microscopic images with overlay of monocyte migratory tracks (pink) in kidney cortex of MacBlue×Cx3cr1^{gfp/+} mice treated with CX3CL1 or F1, 6 hours after CLP. ECFP signals are in cyan, GFP signals are in green, and renal tubules are autofluorescent. (B) Relative frequency of the three behaviors and (C) dwell time and contact duration in MacBlue×Cx3cr1^{gfp/+} untreated (red), treated with CX3CL1 (blue), or treated with F1 (purple). Bars represent mean±SEM (n=3 mice per group from independent experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment was used; **P<0.01; ***P<0.001). (D) Radar chart representation shows ECFP⁺ cell dynamic signatures in the different experimental conditions. Mean values are presented within the 95% confidence interval of the measured value scale for each parameter. For all two-photon experiments (n=3 mice per group from independent experiments; Mann-Whitney test was used; *P<0.05; ***P<0.001). (E) Quantification of kidney histologic lesions 24 hours after CLP in control, CX3CL1, and F1-treated mice. Bars represent mean±SD (n=10 control, 12 F1, and 9 CX3CL1, from at least two independent experiments; ANOVA with Bonferroni adjustment was used; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001). (See also Supplemental Movies 6 and 7.)

hours after CLP. In conclusion, CX3CR1 blockade is associated with reduced production of IL-1ra by monocytes and with a higher proinflammatory environment in the kidney.

The Proadhesive CX3CR1 I249 Allele Is Associated with a Reduced Incidence of AKI in Septic Patients

To evaluate whether the mechanism we described in this murine model might be relevant to the pathophysiology of human disease, we studied the effect of a frequent CX3CR1 polymorphism, I249. This polymorphism was shown to increase monocyte adhesion to CX3CL1 and could modulate the course of coronary artery disease, atherosclerosis, age-related macular degeneration, glioblastoma, or obesity.^{29–33} We tested the effects of this polymorphism *in vitro* in cell adhesion assays and in a cohort of patient admitted to intensive care for sepsis. PBMCs from individuals with CX3CR1 VV genotype or VI genotype were assayed for adhesion (Figure 6, A and B). PBMCs from donors heterozygous for the I249 allele adhere significantly more than those homozygous for V249 allele, confirming our previous results.³⁴ We then studied the effect of the I249 allele on the occurrence of AKI in a cohort of patients with sepsis. This study included 239 patients without chronic renal failure. In most cases, sepsis origins were in primary or secondary peritonitis and respiratory tract infections, with no difference between groups. At least one I249 allele was present in nearly 50% of the patients, with a distribution of the VV, VI, and II genotype of 52%, 41%, and 6%, respectively. The I249 allele (VI or II genotypes) was associated with a lower incidence of AKI (Figure 6C), with no differences between the groups in terms of age, disease severity, or comorbidities. Patients carrying the I249 allele had fewer coagulation disorders but the same rate of circulatory or respiratory failures and the same 28-day mortality (Supplemental Table 1). In the multivariate analysis, CX3CR1 was still significantly associated with a reduced occurrence of AKI after adjustment for age, Simplified Acute Physiology Score II, IL-6 levels, and number of comorbidities. The odds ratio for AKI in a patient with the I249 allele was 0.43 (95% confidence interval, 0.27 to 0.93) (Table 1). Thus, we

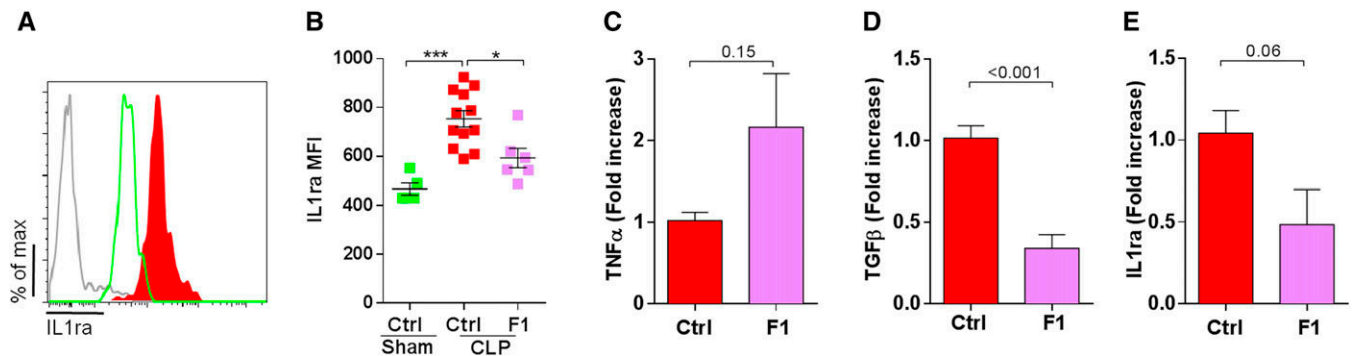


Figure 5. CX3CR1 blockade increases kidney inflammation and reduces IL-1ra production by Ly6C^{high} monocyte during sepsis. (A) Intracellular production of IL-1ra was evaluated by intracellular cytokine staining gated on CD11b⁺ Ly6G^{neg} NK1.1^{neg} Ly6C^{high} cells from sham-operated (green) and CLP-operated mice (red) 6 hours after surgery. Gray histogram represents isotype staining. (B) Mean fluorescence intensity of IL-1ra intracellular staining was compared between sham-operated (green) and CLP-operated mice (red) treated or not treated with F1 (purple), 6 hours after surgery ($n=6$ sham, F1, and 12 WT CLP from two independent experiments; ANOVA t test was used; $*P<0.05$; $***P<0.001$). Kidneys from CLP-operated mice treated with PBS (control) or F1 were extracted 6 hours after CLP and were evaluated by quantitative PCR for (C) TNF- α production, (D) TGF- β production, and (E) IL1ra production. Results are represented as fold increase of CLP-operated mice ($n=6$ in each groups from two independent experiments; t test was performed; P value are indicated).

showed that the I249 allele of *CX3CR1* is associated with reduced AKI incidence in septic patients.

DISCUSSION

Inflammatory monocytes play crucial roles during sepsis through cytokine secretion and direct cell contact.^{5,35–37} Recent studies have identified a regulatory protective role for inflammatory monocytes in infectious diseases as they synthesize and secrete anti-inflammatory mediators, such as IL-1ra and prostaglandin E2.^{8,9} However, the specific contribution of inflammatory

monocytes to the regulation of inflammation in early phases of sepsis remains unclear. Our results have unveiled a key role these monocytes play in renal tissue protection *via* a CX3CR1-dependent adhesion of inflammatory monocytes to the renal vascular endothelium.

Previous studies have shown that inflammatory monocytes are involved in controlling inflammation in gram-negative pneumonia and abdominal infections.^{8,9,38–42} A lower number of inflammatory monocytes has been associated with increased lesions in the lung and in the intestinal lamina propria.^{8,9,38,41} Other studies have shown that the CX3CR1/CX3CL1 axis is involved in the pathogenesis of sepsis. Genetic disruption of the *Cx3cr1* gene has been associated with increased mortality without any effect on neutrophil or monocyte recruitment.²⁴ In that study, the indirect interaction of monocytes with neutrophils reduced the ability of *Cx3cr1*^{−/−} mice to eradicate bacteria. Recent findings by Hochheiser *et al.*²⁶ showed that CX3CR1 deficiency was associated with a reduced entry of DC precursors in the inflamed kidney. Additionally, this work showed that in a model of infectious GN, the absence of CX3CR1 was not associated with an increased bacterial burden in the kidney.²⁶ Antibacterial role associated with *Cx3cr1* was unlikely to be the main role for this gene during sepsis. Indeed, we showed that mortality increased in *Cx3cr1*^{−/−} mice subjected to sterile lethal inflammation induced by LPS injection. Regarding our result during CLP, the reduced number

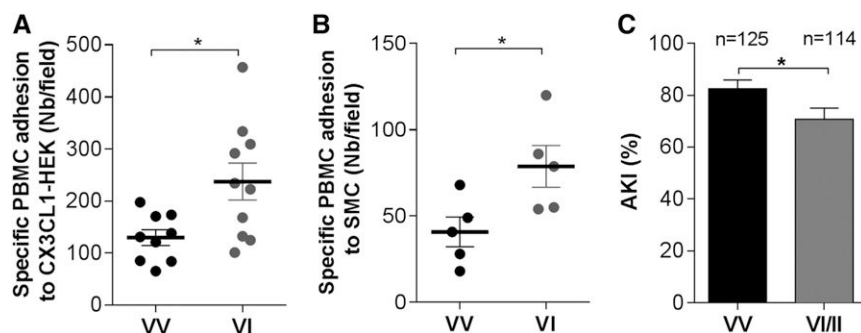


Figure 6. The proadhesive CX3CR1 I249 allele is associated with a reduced incidence of AKI in septic patients. PBMCs from individuals with CX3CR1 VV (black) or VI (gray) genotypes were assayed for adhesion with (A) CX3CL1-expressing HEK ($n=9$ –10 individuals) or (B) with adherent smooth muscle cells (SMCs) treated with TNF- α and IFN- γ ($n=5$ individuals in each group). Bars indicate mean $\pm$ SEM. A t test was used; $*P<0.05$. (C) V249I polymorphism distribution and incidence of AKI in patients with VV[−] (black bar) or VI/II[−] (gray bar) polymorphisms ($n=239$; chi-squared test was used; and 95% confidence intervals of the estimate are presented).

Table 1. Univariate and multivariate analyses of measures associated with AKI

Variable	Univariate/Multivariate	OR (95% CI)
CX3CR1 ^{V/II}	Univariate	0.50 (0.27 to 0.93)
CX3CR1 ^{V/II}	Multivariate	0.43 (0.21 to 0.89)
SAPS II	Multivariate	1.05 (1.01 to 1.08)
Age	Multivariate	0.97 (0.94 to 0.99)
Log ₁₀ IL-6	Multivariate	1.69 (1.12 to 2.55)
Comorbidities	Multivariate	1.76 (1.25 to 2.49)

Data are presented as mean±SEM. Comparison of incidence of AKI was made with a two-tailed t test. See also Supplemental Table 1. SAPS, Simplified Acute Physiology Score; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

of renal DCs in *Cx3cr1*^{−/−} mice is unlikely the only cause of the adverse phenotype because in both bone marrow–derived cell-adoptive transfer that rescued CX3CR1-deficient mice from renal lesions and treatment of the antagonist F1 that mimicked the knockout phenotype in WT mice, renal DC numbers were unchanged.

Carlin *et al.*⁴³ showed that Ly6C^{low} monocytes were specifically retained by inflamed capillaries in a Gαi- and *Toll-like receptor* (TLR)-7–dependent manner and cleared dead cells. In accordance with our results, they observed that TLR4 activation by LPS painting did not induce any recruitment of Ly6C^{low} monocytes. Thus, these data could delineate a specific role of Ly6C^{low} monocytes during viral infections (while Ly6C^{high} would be more recruited in bacterial infections) or a specific biphasic response with a first wave of Ly6C^{high} monocytes recruited in a TLR4-dependent manner followed by a second wave of Ly6C^{low} monocytes that will clear the vessels from dead cells.

Both *Cx3cr1* gene deletion and pharmacologic inhibition of CX3CR1 led to enhanced renal damage and reduced survival, whereas treatment by the chemokine agonist CX3CL1 prevented kidney damage. In addition, adoptive transfer of *Cx3cr1*^{−/−} monocytes confirmed that reduced adherence is due to CX3CR1 expression by monocytes. The CX3CR1 receptor is involved in monocyte adhesion to the vascular wall *via* various mechanisms; the first is direct binding of CX3CR1 to the membrane-anchored form of CX3CL1⁴⁴ and the other is an integrin-mediated adhesion. Treatments with Inflammatory agents such as LPS, TNF-α or IL-1 induce CX3CL1 overexpression by endothelial cells.⁴⁵ During sepsis, levels of soluble CX3CL1 also increase within 6 hours after sepsis onset and peak by 24 hours.^{24,46} The activation of CX3CR1 promotes the integrin-dependent adhesion mechanisms that are responsible for cell adhesion.^{47,48} Indeed, during sepsis the integrins cd11a and cd11b are involved in leukocyte adhesion to the pulmonary vascular wall.⁴⁹ We showed here that CX3CR1 is a major determinant of this phenomenon and that CX3CR1 deficiency reduces the adhesive properties of Ly6C^{high} monocytes.

The result that CX3CR1 play a protective role during sepsis is consistent with previous work^{24,46} showing that the administration of CX3CL1 can improve inflammatory response during sepsis and even reduce mortality.^{24,46} We did not observe improved survival, but we did observe reduced kidney lesions. Some of the anti-inflammatory functions of monocytes are closely related to

their endothelial adhesion. The anti-inflammatory properties that IL-10 can exert on monocytes appear to occur only when these cells are adhesive.⁵⁰ Furthermore, integrin signaling is also responsible for increased expression of the *IL-1ra* gene.⁵¹ Consistently, we have shown that CX3CR1 blockade led to reduced intracellular IL-1ra content in Ly6C^{high} monocytes. This may explain how a deficiency in the CX3CR1 receptor could increase mortality and/or kidney lesions in mice and how the CX3CR1 I249 allele might reduce the incidence of AKI in septic patients. The I249 allele was also associated with a lower incidence of coagulation disorders during sepsis. This is consistent with a more pronounced endothelium protective effect of the monocytes carrying the rare allele. This observation could also participate in the reduction of AKI by diminishing the rate of microvascular dysfunction and clots that could account for AKI.⁵² We observed no difference in patients' mortality at day 28. This could be due to an insufficient number of patients to observe an effect or to possible other effects of CX3CR1 polymorphism that we could not investigate in this study. CX3CL1 might therefore be proposed as a new therapeutic agent to prevent or to cure AKI in patients with sepsis.

In summary, our data delineated a CX3CR1-dependent renoprotective role played by Ly6C^{high} monocytes during the early phase of sepsis.

CONCISE METHODS

Experimental details are provided in the Supplemental Material.

Mice

Male C57BL/6 mice were purchased from Elevage Janvier (Saint Isle, France). *Cx3cr1*^{gfp/+}-*Ccr2*^{flp/+} mice were kindly provided by Israel Charo (Gladstone Institute, San Francisco).⁵³ *Ccr2*^{−/−} and *Cx3cr1*^{−/−} C57BL/6 mice, *Cx3cr1*^{gfp/+54} and *Cx3cr1*^{gfp/gfp}, *Csf1r*-Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue),²⁰ MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+}, MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/gfp}, and MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+}-*Ccr2*^{flp/+} mice were bred in our animal facility. All experiments and protocols were approved by the local animal experimentation ethics committee.

Human Polymorphism Study

We retrospectively studied DNA from patients included in previous studies.⁵⁵ Patients meeting the criteria for severe sepsis/septic shock and who had at least two organ failures defined by the Sepsis-related Organ Failure Assessment²⁵ were included. Patients with chronic renal failure were excluded. The *Cx3cr1* V249I polymorphism (rs3732379) was detected as previously described.³² The AP-HP Cochin Hospital Ethics Committee approved the study. The patient or the patient's next-of-kin provided written informed consent.

Polymicrobial Sepsis Induction

Polymicrobial sepsis was generated after a CLP procedure as described using a 21-gauge needle.²⁴ In the control animals, the cecum was exteriorized and reinserted in the abdomen. For some experiments, 3 μg of fractalkine (full-length fractalkine/CX3CL1; R&D Systems) was injected

intraperitoneally 30 minutes before surgery. For F1 (kindly provided by A. Proudfoot), 50 μ g was injected intraperitoneally 30 minutes before and 6 hours after surgery.

LPS Injection

LPS (*Escherichia coli* O111:B4) was injected at a dose of 15 mg/kg intraperitoneally.

Histologic Analysis

Quantification was performed on periodic acid-Schiff–stained, 3- to 5- μ m kidney sections and on at least three mice per condition. For each mouse, the percentage of damaged tubules was calculated on three to five different randomly chosen fields comprising 200–300 tubules.

Flow Cytometry

Cell staining for flow cytometry and antibodies used are described in the Supplemental Material. Flow cytometry was performed with the FACScanto (BD Biosciences) flow cytometer. Analysis was performed with FlowJo software (TreeStar, Inc.).

Adoptive Transfer Experiments

Bone marrow cells were isolated from MacBlue-*Cx3cr1*^{gfp/+} and MacBlue-*Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice; cells were co-transferred at a 1:1 ratio 30 minutes before the CLP procedure. Analyses were done 6 hours after CLP. Bone marrow monocytes were extracted after negative selection removal of other cell types (see Supplemental Material). Before sorting, Ly6Chi monocytes represented nearly 16% of myeloid cells and were enriched to nearly 60% after sorting, while the neutrophils population was drastically reduced. In all experimental conditions, mice were injected with 4–5 $\times 10^6$ monocytes just before the CLP procedure.

Multiphoton Imaging

Mice were anesthetized with isoflurane. Their temperatures were maintained at 37°C. An incision was made in the flank, and the kidney was exposed. In some experiments, 2 $\times 10^6$ molecular weight tetramethylrhodamine-dextran (Invitrogen) was injected to stain the vasculature. Cell motility was measured every 30 seconds. Cells were tracked for 30 minutes with three-dimensional automatic tracking and manual correction with Imaris software. Definition of cells behavior and additional details are provided in the Supplemental Material.

Statistical Analyses

Data are reported as mean $\pm$ SD or mean $\pm$ SEM $\pm$ SD/SEM as indicated. Groups were compared using a two-tailed unpaired *t* test and adjusted for multiple comparison analysis. Nonparametric Mann-Whitney test or ANOVA with adjustments was performed according to Gaussian distribution of each sample. Survival curves were compared using a log-rank test. Multivariate analysis of the human cohort was performed with JMP (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. Medhi Daoudi, Ludovic Arnold, and Valérie Faivre for their advice and technical assistance; Jo Ann Cahn for

manuscript editing; the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière for assistance with the two-photon microscope; and the animal facility NAC for assistance with mice breeding.

DISCLOSURES

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Pierre et Marie Curie (UPMC), the European Community's Seventh Framework Project FP7-Health-2009 ENDOSTEM and the ANR Programme Emergence 2012 (ANR-EMMA-050). A.L. is a recipient of École de l'Inserm Bettencourt. B.G.C. is a recipient of a contract Inserm Poste d'accueil and was supported by Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ; The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101: 1644–1655, 1992
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29: 1303–1310, 2001
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D; Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators: Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 34: 344–353, 2006
- Angus DC, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369: 840–851, 2013
- Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885–891, 2002
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B: Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204: 1057–1069, 2007
- Frantz S, Hofmann U, Fraccarollo D, Schäfer A, Kranepuhl S, Hagedorn I, Nieswandt B, Nahrendorf M, Wagner H, Bayer B, Pachel C, Schön MP, Kneitz S, Bobinger T, Weidemann F, Ertl G, Bauersachs J: Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J* 27: 871–881, 2013
- Grainger JR, Wohlfert EA, Fuss IJ, Bouladoux N, Askenase MH, Legrand F, Koo LY, Brechley JM, Fraser ID, Belkaid Y: Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nat Med* 19: 713–721, 2013
- Herold S, Tabar TS, Janssen H, Hoegner K, Cabanski M, Lewe-Schlosser P, Albrecht J, Driever F, Vadasz I, Seeger W, Steinmueller M, Lohmeyer J: Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 1380–1390, 2011
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ: The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204: 3037–3047, 2007
- Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F: Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666–670, 2007
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C: Interleukin-1 receptor antagonist: Role in biology. *Annu Rev Immunol* 16: 27–55, 1998

13. Remick DG, Call DR, Ebong SJ, Newcomb DE, Nybom P, Nemzek JA, Bolgos GE: Combination immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1 receptor antagonist decreases sepsis mortality. *Crit Care Med* 29: 473–481, 2001
14. Lerolle N, Nochy D, Guérot E, Bruneval P, Fagon JY, Diehl JL, Hill G: Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: Apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med* 36: 471–478, 2010
15. Schrier RW, Wang W: Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 351: 159–169, 2004
16. Raspé C, Höcherl K, Rath S, Sauvant C, Bucher M: NF- κ B-mediated inverse regulation of fractalkine and CX3CR1 during CLP-induced sepsis. *Cytokine* 61: 97–103, 2013
17. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA: Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4: 31–36, 2009
18. John R, Nelson PJ: Dendritic cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 18: 2628–2635, 2007
19. Schraml BU, van Blijswijk J, Zelenay S, Whitney PG, Filby A, Acton SE, Rogers NC, Moncaut N, Carvajal JJ, Reis e Sousa C: Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell* 154: 843–858, 2013
20. Ovchinnikov DA, van Zuylen WJ, DeBats CE, Alexander KA, Kellie S, Hume DA: Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J Leukoc Biol* 83: 430–433, 2008
21. Sauter KA, Pridans C, Sehgal A, Bain CC, Scott C, Moffat L, Rojo R, Stutchfield BM, Davies CL, Donaldson DS, Renault K, McColl BW, Mowat AM, Serrels A, Frame MC, Mabbott NA, Hume DA: The MacBlue binary transgene (csf1r-gal4VP16/UAS-ECFP) provides a novel marker for visualisation of subsets of monocytes, macrophages and dendritic cells and responsiveness to CSF1 administration. *PLoS ONE* 9: e105429, 2014
22. Soos TJ, Sims TN, Barisoni L, Lin K, Littman DR, Dustin ML, Nelson PJ: CX3CR1⁺ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int* 70: 591–596, 2006
23. Serbina NV, Pamer EG: Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7: 311–317, 2006
24. Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, Kondo T: Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol* 181: 4208–4218, 2008
25. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22: 707–710, 1996
26. Hochheiser K, Heuser C, Krause TA, Teteris S, Ilias A, Weisheit C, Hoss F, Tittel AP, Knolle PA, Panzer U, Engel DR, Tharaux PL, Kurts C: Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *J Clin Invest* 123: 4242–4254, 2013
27. Lionakis MS, Swamydas M, Fischer BG, Plantinga TS, Johnson MD, Jaeger M, Green NM, Masedunskas A, Weigert R, Mikelis C, Wan W, Lee CC, Lim JK, Rivollier A, Yang JC, Laird GM, Wheeler RT, Alexander BD, Perfect JR, Gao JL, Kullberg BJ, Netea MG, Murphy PM: CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes Candida control and host survival. *J Clin Invest* 123: 5035–5051, 2013
28. Dorgham K, Ghadiri A, Hermand P, Rodero M, Poupel L, Iga M, Hartley O, Gorochov G, Combadière C, Deterre P: An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol* 86: 903–911, 2009
29. Lavergne E, Labreuche J, Daoudi M, Debré P, Cambien F, Deterre P, Amarenco P, Combadière C; GENIC Investigators: Adverse associations between CX3CR1 polymorphisms and risk of cardiovascular or cerebrovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 847–853, 2005
30. Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara M-W, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadière C: Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 97: 1925–1928, 2001
31. McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM: Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res* 89: 401–407, 2001
32. Rodero M, Marie Y, Coudert M, Blondet E, Mokhtari K, Rousseau A, Raoul W, Carpentier C, Sennlaub F, Deterre P, Delattre JY, Debré P, Sanson M, Combadière C: Polymorphism in the microglial cell-mobilizing CX3CR1 gene is associated with survival in patients with glioblastoma. *J Clin Oncol* 26: 5957–5964, 2008
33. Sirois-Gagnon D, Chamberland A, Perron S, Brisson D, Gaudet D, Laprise C: Association of common polymorphisms in the fractalkine receptor (CX3CR1) with obesity. *Obesity (Silver Spring)* 19: 222–227, 2011
34. Daoudi M, Lavergne E, Garin A, Tarantino N, Debré P, Pincet F, Combadière C, Deterre P: Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1. *J Biol Chem* 279: 19649–19657, 2004
35. Aird WC: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101: 3765–3777, 2003
36. Cavaillon JM, Adib-Conquy M: Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med* 33[Suppl]: S506–S509, 2005
37. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG: Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421–452, 2008
38. Winter C, Taut K, Srivastava M, Länger F, Mack M, Briles DE, Paton JC, Maus R, Welte T, Gunn MD, Maus UA: Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to Streptococcus pneumoniae infection in mice: Role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol* 178: 5828–5838, 2007
39. Chen L, Zhang Z, Barletta KE, Burdick MD, Mehrad B: Heterogeneity of lung mononuclear phagocytes during pneumonia: Contribution of chemokine receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305: L702–L711, 2013
40. Seeley EJ, Barry SS, Narala S, Matthay MA, Wolters PJ: Noradrenergic neurons regulate monocyte trafficking and mortality during gram-negative peritonitis in mice. *J Immunol* 190: 4717–4724, 2013
41. Winter C, Herbold W, Maus R, Länger F, Briles DE, Paton JC, Welte T, Maus UA: Important role for CC chemokine ligand 2-dependent lung mononuclear phagocyte recruitment to inhibit sepsis in mice infected with Streptococcus pneumoniae. *J Immunol* 182: 4931–4937, 2009
42. Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, Sibley LD: Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen Toxoplasma gondii. *Immunity* 29: 306–317, 2008
43. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, Hedrick CC, Cook HT, Diebold S, Geissmann F: Nr4a1-dependent Ly6C (low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153: 362–375, 2013
44. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640–644, 1997
45. Harrison JK, Jiang Y, Wees EA, Salafranca MN, Liang HX, Feng L, Belardinelli L: Inflammatory agents regulate in vivo expression of fractalkine in endothelial cells of the rat heart. *J Leukoc Biol* 66: 937–944, 1999
46. He M, Mochhala SM, Adhikari S, Bhatia M: Administration of exogenous fractalkine, a CX3C chemokine, is capable of modulating inflammatory response in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Shock* 31: 33–39, 2009
47. Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H: CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through

- integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 164: 4313–4320, 2000
48. Kerfoot SM, Lord SE, Bell RB, Gill V, Robbins SM, Kubes P: Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *Eur J Immunol* 33: 729–739, 2003
 49. Wang Y, Roller J, Menger MD, Thorlacius H: Sepsis-induced leukocyte adhesion in the pulmonary microvasculature in vivo is mediated by CD11a and CD11b. *Eur J Pharmacol* 702: 135–141, 2013
 50. Petit-Bertron AF, Fitting C, Cavaillon JM, Adib-Conquy M: Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10. *J Leukoc Biol* 73: 145–154, 2003
 51. Yurochko AD, Liu DY, Eierman D, Haskill S: Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9034–9038, 1992
 52. Zarbock A, Gomez H, Kellum JA: Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care* 20: 588–595, 2014
 53. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Coteleur AC, Tsou CL, Ransohoff RM, Charo IF: Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS ONE* 5: e13693, 2010
 54. Combadière C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debré P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z: Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107: 1009–1016, 2003
 55. Payen D, Lukaszewicz AC, Legrand M, Gayat E, Faivre V, Megarbane B, Azoulay E, Fieux F, Charron D, Loiseau P, Busson M: A multicentre study of acute kidney injury in severe sepsis and septic shock: Association with inflammatory phenotype and HLA genotype. *PLoS ONE* 7: e35838, 2012

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2015010009/-/DCSupplemental>.

Supplementary Online Material

Detailed Methods

Ethics Statement

For animal study

All experiments and protocols were approved by the national animal experimentation ethics committee (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Charles Darwin, agreement Ce5/2011/060) which received the agreement from the French Minister, Ministère de l'Enseignement et de la Recherche, following the European guidelines 2010/63/UE.

For human study

The study's approval by the AP-HP Cochin Hospital Ethics Committee (#CCPPRB 2061) was valid for all AP-HP hospitals. Written informed consent was obtained for each patient from the patient or next-of-kin

Mice. Male C57BL/6 mice were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, Saint Isle, France). $Cx3cr1^{gfp/+}$ - $CCR2^{rfp/+}$ and $CCR2^{-/-}$ mice were kindly provided by Israel Charo (Gladstone Institute, San Francisco, USA)⁴⁷. $Cx3cr1^{-/-}$ C57BL/6 mice⁴⁸, $Cx3cr1^{gfp/+}$ and $Cx3cr1^{gfp/gfp}$ ⁴⁹, $Csf1r$ -Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue)⁵⁰, $MacBlue \times Cx3cr1^{gfp/+}$, $MacBlue \times Cx3cr1^{gfp/gfp}$ and $MacBlue \times Cx3cr1^{gfp/+}$ - $CCR2^{rfp/-}$ mice were bred in the Nouvelle Animalerie

Commune animal facility at Pitié-Salpêtrière. All mice were aged between 8 and 16 weeks old.

Human cell preparation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy donors by venipuncture, using EDTA as anticoagulant. PBMC isolated by the Ficoll–Hypaque gradient technique contained 20–30% monocytes, 60–70% lymphocytes. Human embryonic Kidney (HEK) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen). Human aortic SMC from Clonetics (San Diego, CA) were cultured as recommended by the manufacturer. Subconfluent SMC were starved for 16 h before experiments, in the absence of fetal calf serum. All cells were grown in suspension in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS), 2mM L -glutamine, 100U/ ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 9 µg/ml insulin.

Flow chamber adhesion of PBMC

Adhesion experiments were done as previously described ³⁰. Briefly, coverslips were cultured with either adherent HEK cells (HEK-pBlast or HEK-CX3CL1 clones) or aortic primary smooth muscle cells (SMC) treated with 20ng/ml TNF α and 500u/ml IFN γ (R&D systems, Lille, France) as described ⁵¹. The coverslip was mounted in a flow chamber set on the stage of an

inverted microscope (TE300, Nikon, France) equipped with a phase contrast 10x objective (Nikon, n.a. 0.25) and a cooled CCD camera (Sensicam, PCO, Kelheim, Germany). PBMC were incubated for 30 min at 37°C with 1 μ M 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) for labeling and resuspended in flow buffer (HBSS supplemented with, 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 2 mg/ml BSA) at $2 \cdot 10^6$ cells per ml. A syringe pump (PHD 2000; Harvard Apparatus, Les Ulis, France) drove 0.5 ml of cell suspension through the chamber at a wall shear stress of 1.5 dynes.cm⁻². Fluorescent images were recorded to count the adherent cells (excitation 450-500 nm, emission 510-560 nm, dichroic filter Q505lp, Chroma, Brattleboro, VT, USA). Specific adhesion to CX3CL1-HEK was calculated by subtracting the number of PBMCs adhering to the control HEK from the number of cells adhering to HEK-CX3CL1. Specific adhesion to activated SMC was calculated by subtracting the number of PBMCs adhering to the untreated SMC from the number of cells adhering to $TNF\alpha$ /IFN γ treated SMC.

Human Polymorphism study

We retrospectively studied DNA from patients included in previous studies⁵². These studies involved patients from 4 ICUs in Paris, France, 2 medical and 2 surgical. Patients meeting the criteria for severe sepsis or septic shock, defined according to the ACCP/SCCM consensus conference¹ and who had at least two organ failures defined by the SOFA (sequential organ failure assessment) score (values ≥ 1 for each organ failure were considered)²⁵

were included between January 2004 and December 2005. Patients with chronic renal failure were excluded. Since the studies were designed before the publication of the RIFLE and AKIN scores^{53, 54}, patients with renal failure were classified on the basis of the renal item of the SOFA score, AKI was defined by a SOFA score ≥ 1 (creatinine value > 1.2 (110) mg/dl ($\mu\text{mol/l}$)). The *Cx3cr1* V249I polymorphism (referred in dbSNP as rs3732379) was detected as previously described⁵⁵, with a TaqMan™ fluorogenic 5'-exonuclease assay. Primer and probe sets were designed and manufactured with Applied Biosystems Assay-by-Design' custom service (Applied Biosystems, Vienna, Austria).

Polymicrobial sepsis induction

Polymicrobial sepsis was generated after a caecal ligation and puncture (CLP) procedure. After anaesthesia by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine/xylazine (respectively 100 and 10 mg/kg body weight), the mice were put on a heating plate, and CLP was performed as previously described to induce midgrade sepsis²¹. Briefly, a midline incision (1 cm) was made below the diaphragm, exposing the caecum; the caecum was then exteriorized and ligated at 50% of its length, and punctured through and through with a 21-gauge needle; a small amount of feces was extruded through each needle puncture. In the control (sham) animals, the caecum was located, exteriorized, and simply reinserted in the abdomen. The abdominal incision was then closed in layers. After surgery, mice were resuscitated with 1 ml of sterile saline s.c. and received buprenorphine s.c. (0.05 mg/kg body

weight) every 12 h for 48 h for analgesia. For the survival study, animals were monitored every 12 h for 7 days. We chose to ligate 50% of the caecum to obtain, as reported in the literature, a mortality rate around 50-60% of male mice. Mice were all kept in the animal facility for at least one week before the procedure to ensure relatively homogeneous microbiota. For some experiments, 3 µg in 50 µl of CX3CL1 (full length CX3CL1, R&D Systems, Lille, France) was injected i.p. 30 minutes before surgery. For F1 (kindly provided by A. Proudfoot, Merck-Serono), 50 µg was injected i.p. 30 minutes before and then 6 hours after surgery.

Sterile inflammation model

LPS (*E. coli* O111:B4) (Sigma-Aldrich) was injected at a dose of 15 mg/kg i.p., previously determined to induce 50% mortality according to the CLP model. Survival was monitored every 12 h for 7 days after the LPS challenge.

Histological analysis

After mice were euthanized, the whole body vasculature was flushed with a 10-ml injection of fresh PBS through a cardiac puncture. Kidneys were harvested 24 h after CLP, sliced in half after the capsule was removed, and incubated in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 h at 4°C. The kidneys were then washed and stored in ethanol 70°. Sections 3-5 µm in thickness were prepared from paraffin-embedded tissue; they were dewaxed and stained with haematoxylin-eosin (H&E) or periodic acid Schiff (PAS). Pathologists with

expertise in kidney disease (J.A and N.T.) performed the histological analyses blinded to treatment groups. Quantification was performed on at least 3 mice per condition. For each mouse, the percentage of damaged tubules was calculated on 3-5 different randomly chosen fields comprising 200-300 tubules.

Mouse Cell preparation

Blood was drawn via retroorbital puncture with heparin. After mice were euthanized, the whole mouse vasculature was flushed by intracardiac injection of 10 ml of PBS. Bone marrow and kidneys were then harvested. Bone marrow cells were collected by flushing the thigh and shin bones with PBS 0.5% BSA 2 mM EDTA. Kidneys were weighed and then cut in small pieces and digested in DMEM containing 400 IU/ml collagenase IV (Sigma Aldrich), 0.1 mg/ml DNase I (Roche) and 0.05 M EDTA for 1 h at 37°C. The solution was then filtered through a 40 µm cell strainer (BD) and washed with cold PBS. Tubes were then centrifuged, the supernatant was discarded and cells were resuspended in 500 µl of PBS 0.5% BSA 2 mM EDTA. We stained 50 µl (1/10th) of each cell suspension for flow cytometry.

Flow cytometry

Before antibody staining, erythrocytes were lysed with buffer containing 0.15 M NH₄Cl, 0.01 mM KHCO₃ and 0.1 mM EDTA and then resuspended in 50 ml PBS 0.5% BSA EDTA 2 mM with 1 µg/ml purified anti-CD16/32 (2.4G2, BD Biosciences) for 15 minutes at 4°C and for an additional 20 minutes with

the appropriate dilution of specific antibodies. The panel of antibodies comprised: anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6C (clone AL-21), anti-Ly6G (clone 1A8), NK1.1 (clone PK136) and CD11c (clone HL3) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and F4/80 (clone BM8) and CD115 (Clone AFS98) (eBioscience, San Diego, CA, USA). For intracellular staining, cells were incubated in DMEM with Brefeldin A (10 µg/mL) for 2h at 37°C. Surface staining was done as described above. Cells were then fixed in paraformaldehyde 4% for 30 min then permeabilized with in PBS BSA 0.5% with 0.1% saponin in the presence of 1 µg/ml purified anti-CD16/32 for 10 min. IL-1ra antibody (Abcam, clone ab124962) was added for an additional 30 min at room temperature. Cells were washed in PBS-BSA 0.5% - 0.1% saponin and incubated in the same buffer with a secondary antibody (goat anti-rabbit IgG, clone ab96899). Secondary antibody alone was used as a control and for baseline fluorescence determination. Flow cytometry was performed with the FACScanto[®] (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) flow cytometer and DIVA[®] Flow Cytometry acquisition software. Analysis was performed with FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, OR, USA). Absolute numbers were calculated by adding to each vial a fixed number (10,000) of nonfluorescent 10-µm polybead[®] carboxylate microspheres (Polysciences, Niles, IL, USA) according to the formula: No. cells = (No. acquired cells×10,000)/(No. acquired beads).

qPCR

Kidneys were harvested 6h or 24h after sham surgery or CLP after vascular flush as described above. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit with on-column DNase digestion (QIAGEN) according to manufacturer instructions. RNA concentration was determined by fluorescent absorption 260 nm. cDNA synthesis was performed with SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Polymerase chain reaction was performed on an ABI prism 7300 using Power SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies). Primers for TNF α forward : 5' ACGGCATGGATCTCAAAGAC 3' , reverse : 5' AGATAGCAAATCGGCTGACG 3', TGF β forward : 5' ATGCTAAAGAGGTCACCCGC 3', reverse : 5' GTATCAGTGGGGGTCAGCAG 3' , IL-1ra forward :5' TCACCCATGGCTTCAGAGGCAGCC 3', reverse : 5' GGCCTTTCTCAGAGCGGATGAAGG 3' and GAPDH forward : 5' CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG 3', reverse : 5' AGAGTGGGAGTTGCTGTTGAACTC 3'. GAPDH gene expression was used as control. Relative expression was calculated using $\Delta\Delta C_t$ method.

Adoptive transfer experiments

For intravital imaging experiments, bone marrow cells were isolated from MacBlue-Cx3cr1^{gfp/+} and MacBlue-Cx3cr1^{gfp/gfp} mice; the latter were labelled in PBS with CMTMR (10 μ M). Twenty millions cells were then co-transferred at a 1 to 1 ratio to C57Bl/6 recipient mice 30 minutes before the CLP procedure. The proportions of Ly6C^{high} monocytes adoptively transferred from each strain were controlled before transfer by flow cytometry and were

identical. Comparative adhesion of ECFP⁺ subset (WT phenotype) and ECFP⁺CMTMR⁺ subset (Cx3cr1^{-/-} phenotype) to the renal endothelium was measured by intravital imaging 6 h after the CLP. The number of ECFP⁺ and ECFP⁺CMTMR⁺ cells were calculated on static 3D images and normalized to the renal cortex volume and expressed as a percent of the number of Ly6C^{high} monocytes transferred. Fields were chosen when at least one adoptively transferred cell (ECFP⁺ or CMTMR/ECFP) was present. For kidney lesion measurement: bone marrow cells were extracted as previously described. Monocytes were negatively selected after removal of other cell types, with Ly6G, CD3, CD4, B220, DX5, and NK1.1 PE-labelled antibodies. Marked cells were then captured via a magnetic device for cell separation and anti-PE magnetic beads, according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). In all experimental conditions, mice were injected with $4-5 \times 10^6$ monocytes just before the CLP procedure and monitored every 12 h for 7 days for survival or euthanized 24 h after the procedure for histological analysis.

Creatinine and urea quantifications

Creatinine concentrations in serum samples were determined by the Jaffe method with the QuantiChrom Creatinine Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), and serum urea nitrogen (BUN) concentrations by the Jung method with the QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems).

Multi-photon Imaging

Intravital imaging was performed on mouse kidneys. Briefly, mice were anaesthetized with isofluran 2.5% vaporized in a 70/30 mixture of O₂/N₂O. Their temperatures were monitored and maintained at 37°C. An incision was made in the flank, and the kidney was exposed gently. It was placed between two plates. The upper plate had an aperture to allow light transmission, and a coverslip was fixed to the lower face of the upper plate, in contact with the kidney. In some experiments before the imaging session, 2×10⁶ MW tetramethylrhodamine-Dextran (Invitrogen) was injected to stain the vasculature and define the parenchymal areas and vessels.

The two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) set-up used was a Zeiss LSM 710 NLO multiphoton microscope (Carl Zeiss, Germany) coupled to a titanium:sapphire crystal laser (Coherent Chameleon, CA, USA), which provides 140 fs pulses of NIR light, selectively tunable between 680 and 1080 nm, and an acousto-optic modulator to control laser power. The system included three external non-descanned detectors with a combination of 2 dichroic mirrors (565 nm and 690 nm) with 565/610 and 500/550 bandpass filters and a 485 lowpass filter to enable the simultaneous recording of three fluorescent channels. The excitation wavelength was 870 nm. Cell motility was measured every 30 s by 5 consecutive 3-μm z spacing stacks (total 12-μm thickness allowing sufficient 3D cell tracking in the renal microvasculature) with a plan apochromat ×20 (NA = 1) water immersion objective.

ECFP⁺ and/or GFP⁺ cells were tracked for 30 minutes with 3-D automatic tracking and manual correction with Imaris software. Cells were defined as

circulating if they appeared on only one picture, crawling if they were on more than 2 pictures with an estimated speed greater than 2 $\mu\text{m}/\text{min}$, and adhering if at any time their speed was lower than 2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (no movement of more than 1 μm between 2 pictures). Dwell time was defined as the total length of time for which the cell was tracked. Interaction time was defined as the total time in an adherent state. The arrest coefficient was defined as interaction time divided by dwell time.

Track straightness was defined by the ratio of the distance between the initial and the final positions of each cell to the total distance covered by that cell. Velocity was calculated at any time by measuring the mobility of cells every 30 seconds. In some experiment before the imaging session, 10 μg Ly6G-PE antibody was injected i.v. to image the neutrophils, and the laser excitation wavelength was set at 810 nm. For some experiments, F1 (50 μg) was injected i.v. 5 min before the imaging session. 2D time lapse imaging of *Cx3cr1^{gfp/+}-CCR2^{gfp/+}* cells was possible by sequential exposure with alternance of 810 and 900-nm excitation wavelengths at each time point.

Statistical analysis

Group were compared with Prism software (Graphpad) with two tailed unpaired t test. For multiple comparison analysis Non-parametrics Mann-Whitney test or ANOVA with adjustments were performed according to Gaussian distribution of each sample. Survival curves were compared with a log-rank test. Multivariate analysis of the human cohort was made with JMP (SAS institute Inc.) and included relevant parameters associated with the

occurrence of Acute Kidney Injury. Samples or animals were excluded if they appeared as true outlier as defined by a value lesser or higher than mean $\pm$ 5 SD. No blinding was used for in vivo experiments; Histological analyses and monocyte tracking were done blinded. * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$; **** for $p < 0.0001$.

Supplemental figure, table and video legends

Figure S1. Effect of CLP on survival and myeloid cell mobilization.

(a) Survival of sham- and CLP-operated WT mice (n= 10 (SHAM) and 15 (CLP). **(b)** Number of Ly6C^{high}, Ly6C^{low} monocytes, Ly6G⁺ (neutrophils) and CD11c⁺ Renal DCs in bone marrow, blood and kidney of sham- vs CLP-operated mice at different time points, determined by flow cytometry gated on CD11b⁺NK1.1^{neg}F4/80⁺ cells. Bars represents means±SD (n=6 from 2 independent experiments, ANOVA analyses adjusted for multiple comparisons (Bonferroni) were used. No differences were observed between time points in sham-operated mice).

Figure S2. Comparative analysis of mononuclear phagocyte subsets in the mouse strains

(a) Number of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in blood and kidney of sham- vs CLP-operated WT and *Ccr2*^{-/-} mice 6h after surgery. **(b)** Number of renal DC of sham- vs CLP-operated WT, *Cx3cr1*^{-/-} and *Ccr2*^{-/-} mice 6h and 24h after surgery. (n= 4 to 6 mice from two independent experiments, ANOVA analyses adjusted for multiple comparisons (Bonferroni) were used.

Figure S3. Role of CX3CR1 in mouse survival during sterile lethal inflammation.

(a) Survival after CLP in *Cx3cr1*^{+/+} (blue line) and *Cx3cr1*^{-/-} mice (red line). n=10 mice per group. Survival curves were compared with a log-rank test. *, p<0.05). Data are the results of 2 experiments. **(b)** Survival in WT (blue line) versus *Cx3cr1*^{-/-} (red line) mice after lethal dose of LPS (i.p. injection, 15 mg/kg). n=13 mice per group. Survival curves were compared with a log-rank test. Presented data are the results of 2 experiments. **(c)** TPLSM pictures of kidney cortex from *Cx3cr1*^{gfp/+} mice 6 h after CLP show neutrophil (red) adhesion. Neutrophils were visualized by injection of 10 µg of Ly6G-PE antibody 5 minutes before the imaging session. Examples of circulating (blue squares), crawling (green squares) and adhering neutrophils (purple squares) are indicated. PE signals are in red, GFP signals in green, and renal tubules are autofluorescent. **(d)** Relative frequency of the three neutrophil behaviours in *Cx3cr1*^{gfp/+} and *Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice. Bars represent means±SEM (n=2 mice per group). **(e)** Neutrophil dwell time and contact duration with renal endothelium in CLP-operated *Cx3cr1*^{gfp/+} and *Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice. Red bars indicate means. Data represent a pool of cells from 2 mice per group. Two-sided t-tests and ANOVA analyses adjusted for multiple comparisons (Bonferroni) were used as statistical tests. **(f)** 1:1 ratio of MacBlue×*CX3CR1*^{gfp/+} and CMTMR-labelled MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/gfp} bone marrow cells were injected into WT mice before CLP. Intravital imaging of kidney cortex was performed 6 h after CLP, and the number of ECFP⁺ and ECFP⁺/CMTMR⁺ adherent cells/mm³ was counted in 20 different fields in 2 independent experiments. Two-sided t-test was used for statistical analysis.

Table S1. Demographic and clinical characteristics of the human cohort.

Demographic and clinical characteristics of septic patient at the time of inclusion. Organ failure is defined by a sequential organ failure assessment (SOFA) score ≥ 1 for each organ. Results are expressed as median (IQR). Two-sided Student t-test and Chi-square tests with Yates correction were used to compare characteristics and proportions between the two groups. SAPS 2: Simplified Acute Physiology Score 2. ***: $p < 0.001$.

Supplementary video 1

In vivo 3D-imaging of a sham-operated MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mouse showing monocyte behaviour in the vascular kidney cortex 6 h after surgery. ECFP⁺ signals are in cyan, GFP signals in green, and 2×10^6 MW rhodamine-dextran was injected before the imaging session to visualize vasculature (red) around autofluorescent kidney tubules.

Supplementary video 2

In vivo 3D-imaging of a CLP-operated MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mouse showing monocyte behaviour in the vascular kidney cortex 6 h after surgery. ECFP⁺ signals are in cyan, GFP signals in green, and 2×10^6 MW rhodamine-dextran was injected before the imaging session to visualize vasculature (red) around autofluorescent kidney tubules.

Supplementary video 3

In vivo 3D-imaging of a CLP-operated MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* *Ccr2^{-/-}* mouse showing monocyte behaviour in the vascular kidney cortex, 6 h after surgery. ECFP⁺ signals are in cyan, GFP signals in green, and kidney tubules are visualized by autofluorescence.

Supplementary video 4

In vivo imaging of a CLP-operated *Cx3cr1^{gfp/+}* *Ccr2^{RFP/+}* mouse showing monocyte behaviour in the vascular kidney cortex, 6 h after surgery. The RFP⁺ signals are in red, GFP signals in green, and kidney tubules are visualized by autofluorescence. RFP and GFP are detected by sequential excitation at 750 nm and 900 nm respectively on a 2D-field.

Supplementary video 5

In vivo 3D-imaging of a CLP-operated MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mouse showing monocyte behaviour in the vascular kidney cortex, 6 h after surgery. ECFP⁺ signals are in cyan, GFP signals in green, and 2×10⁶ MW rhodamine-dextran was injected before the imaging session to visualize vasculature (red) around autofluorescent kidney tubules.

Supplementary video 6

In vivo 3D-imaging of a CLP-operated MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mouse showing monocyte behaviour in the vascular kidney cortex, 6 h after surgery. ECFP⁺

signals are in cyan, GFP signals in green, and kidney tubules are visualized by autofluorescence. The mouse was treated with 50 µg F1 before surgery and 10 min before the imaging session.

Supplementary video 7

In vivo 3D-imaging of a CLP-operated MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mouse showing monocyte behaviour in the vascular kidney cortex, 6 h after surgery. ECFP⁺ signals are in cyan, GFP signals in green, and kidney tubules are visualized by autofluorescence. The mouse was treated with 50 µg CX3CL1 before surgery.

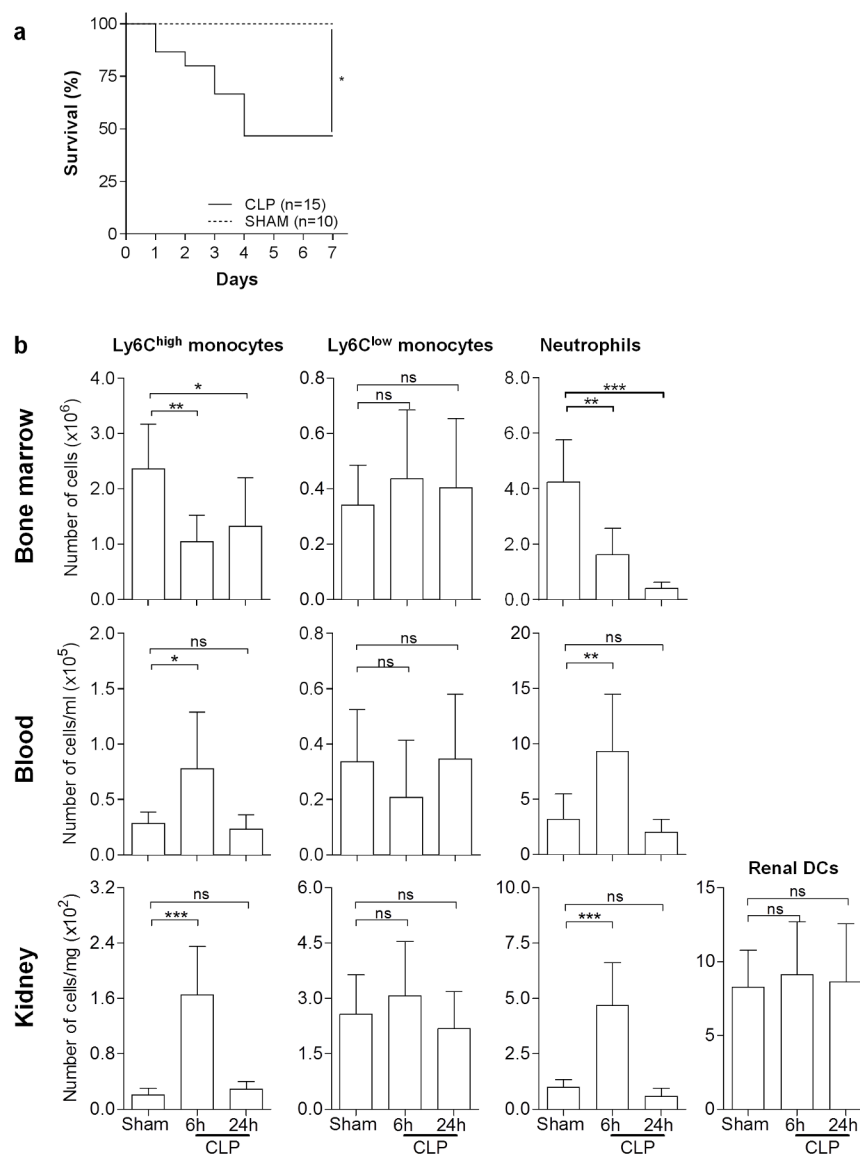


Figure S1 related to Figure 1. Effect of CLP on survival and myeloid cell mobilization

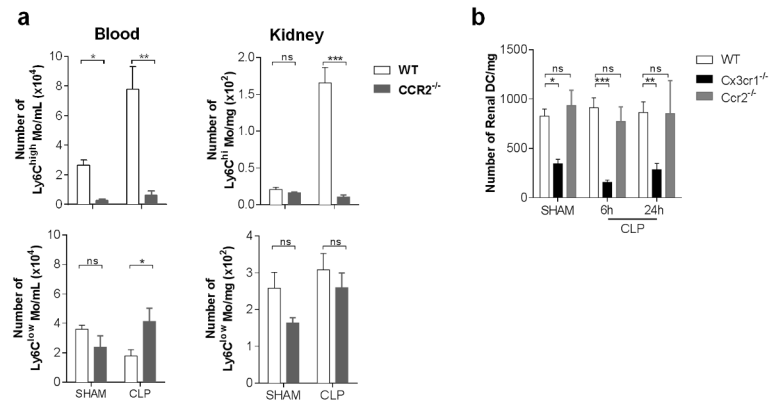


Figure S2 related to Figure 1 and 3. Comparative analysis of mononuclear phagocyte subsets in the mouse strains

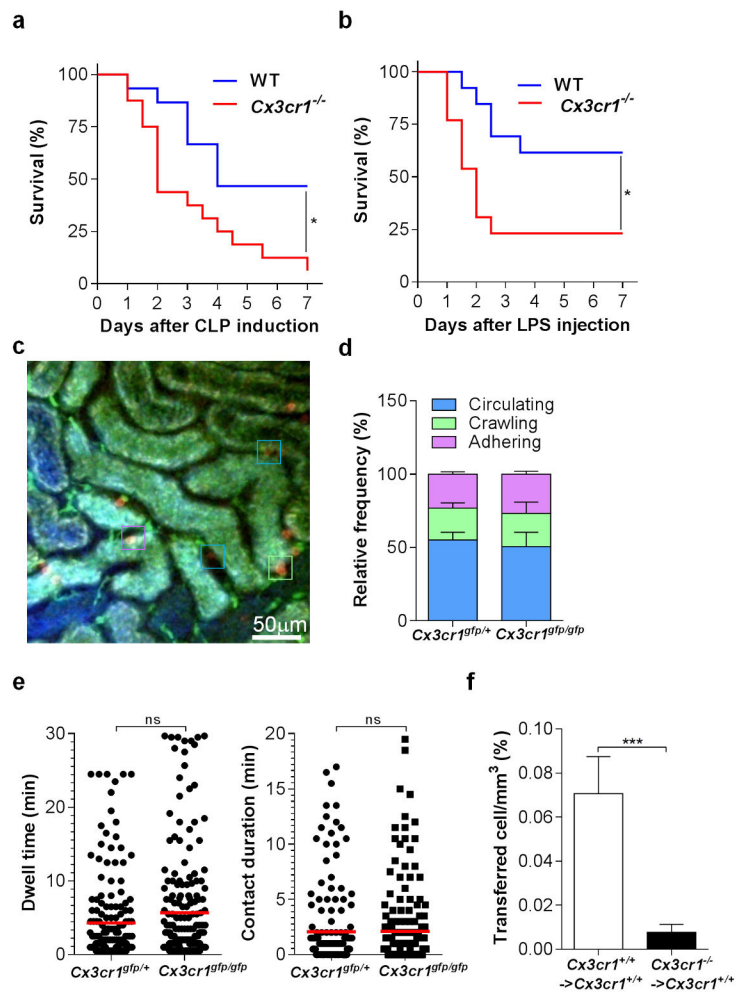


Figure S3 related to Figure 2. Role of CX3CR1 during polymicrobial sepsis

	CX3CR1-VV n = 125	CX3CR1-VI/II n = 114	p
Age, n	63 (52-78)	65 (53-75.25)	0.65
SAPS 2, n	50 (36-64.5)	48 (40.5-59)	0.85
28-day mortality (%)	30.4	31.6	0.95
IL-6 pg/mL	573 (235-5547)	890 (216-9345)	0.60
Comorbidities, n	1 (0.5-3)	2 (1-3)	0.37
Organ failure :			
- Cardiovascular, %	87.2	94	0.12
- Respiratory, %	85.6	92.9	0.10
- Coagulation, %	56.8	35.1	0.001***
- Liver, %	38.4	30.7	0.27

Table S1. Demographic and clinical characteristics of the human cohort.

Résultats complémentaires

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Filip Swirski, j'ai pu développer et participer à des projets de recherche axés sur le rôle des innate response activator B cell au cours du sepsis. C'est un prolongement logique de ma thématique de thèse dans la mesure où les cellules B IRA sont des acteurs nouvellement identifiés de la réponse immunitaire innée et qui contribue à la fois à la synthèse mais également au recrutement des monocytes.

En utilisant un modèle de pneumopathie à E. Coli, nous avons pu montrer que les lymphocytes B B1a qui résident dans les séreuses migrent dans le poumon, se transforment en IRA B cells et induisent la synthèse d'IgM naturelles polyvalentes. Cette synthèse d'IgM est sous la dépendance d'un axe GM-CSF-IgM. On retrouve également dans les cellules pleurales humaines des lymphocytes B de type B1 capables de synthétiser du GM-CSF lors des pathologies inflammatoires.

Les IRA B cells sont une source majeure de GM-CSF mais également d'IL-3. Le rôle de cette cytokine qui est un facteur de croissance dans la physiopathologie du sepsis est encore inconnu. En utilisant la CLP comme modèle de sepsis, nous avons pu montrer que les souris déficientes en IL-3 avaient une meilleure survie que les souris WT, que les souris soient ou pas sous traitées par antibiotiques, et développent moins de lésions d'organe. On remarque que les souris IL-3^{-/-} développent une monocytose et une neutrophilie de façon moins importante que les souris WT. Cette diminution du nombre de cellules s'explique pas une atténuation de l'induction de l'hématopoïèse d'urgence, ce qui limite la cascade

inflammatoire à la phase aigue du sepsis. Chez l'homme, des taux élevés d'IL-3 plasmatiques sont associés à une surmortalité au cours du sepsis.

Ces résultats viennent s'ajouter à mes résultats antérieurs et témoignent de la complexité du rôle des monocytes (et des autres acteurs de la réponse immunitaire innée). Ainsi, nous voyons qu'il existe un équilibre étroit entre l'absence de monocytes (que nous avons montré être délétère) et l'hyperproduction induite par l'hématopoïèse d'urgence (que nous avons montré être délétère également). Ainsi, la fonction des monocytes au cours du sepsis est bien due et finement contrôlée dans le temps. Le GM-CSF, nécessaire à la production des cellules myéloïdes, est un acteur majeur de la réponse innée et contribue à l'immunité humorale précoce IgM médiée.

Conclusion et perspectives

La prise en charge du sepsis est un enjeu majeur des décennies à venir. A la différence d'autres domaines pathologiques, le sepsis est à la fois 1. Réellement multifactoriel avec une intrication extrêmement forte de ses composantes vasculaires et immunes 2. Avec une temporalité des événements, particulièrement véloce, rendant encore plus ardue l'administration d'un traitement adapté.

En plus des mesures « générales » de prise en charge des malades, l'amélioration du pronostic du sepsis nécessitera des thérapeutiques spécifiques. Comme nous l'avons vu lors des chapitres précédents, la cinétique des événements est extrêmement rapide. En à peine 6h, plusieurs étapes clés se sont déroulées et elles ont un impact fort sur la morbi-mortalité. Nous avons discuté précédemment de l'absence d'unicité dans les signes cliniques ou biologiques du sepsis. Aucun paramètre biologique mesurable rapidement ne permet de caractériser précisément à quel moment de la cascade d'activation du sepsis le patient est pris en charge. Il est donc nécessaire de détailler plus avant la physiopathologie du sepsis et identifier des biomarqueurs (au sens large) utiles à la pratique clinique.

La limite de l'utilisation de plusieurs biomarqueurs est le temps nécessaire à l'obtention des résultats. Un dosage par ELISA ou par PCR prend au bas mot 4 à 6h or ces heures sont cruciales pour le patient, il est donc urgent de mettre au point des méthodes rapides, au pied du lit, de caractérisation de l'état immunitaire du patient. Dans cette perspective plusieurs techniques déjà

disponibles comme la micro-NMR (307), de spectrométrie de masse ou de vidéo-microscopie pourraient apporter rapidement des informations précieuses permettant au praticien d'adapter sa thérapeutique. Nous avons montré dans nos travaux que la visualisation et l'analyse du profil de mobilité des monocytes étaient de bons marqueurs de leur état d'activation et une méthode de substitution aux dosages habituels. Nos résultats montrent que l'allèle I249 est associé à une moindre incidence d'Acute Kidney Injury. On peut identifier cet allèle en quelques secondes/minutes par diverses méthodes. L'identification des patients plus à risque (VV) permettrait de limiter chez eux l'administration de substances néphrotoxiques.

Nos travaux ont montré que les monocytes étaient à la fois responsables de la cascade inflammatoire mais qu'ils étaient également aux manettes du contrôle de cette inflammation. Il est possible qu'à la phase hyper aiguë du sepsis, la mobilisation des monocytes via CCL2 par exemple soit bénéfique, alors qu'une fois la cascade lancée, il ne s'agit peut être plus de recruter des monocytes mais de polariser leur action vers la protection des tissus, peut être par l'injection de CX3CL1.

Nos travaux ont une implication limitée dans la mesure où ils se limitent à l'étude de la pathogenèse rénale au cours du sepsis. L'impact de la modulation de CCR2 et CX3CR1 sur les autres organes cibles (foie, poumons, etc.) mériterait d'être investigué dans de futurs travaux.

Certains auteurs tendent à opposer la phase aiguë et la phase tardive du sepsis et restent sceptiques sur la possibilité ou la nécessité de contrôler l'inflammation à la phase aiguë. Ces assertions sont pour le moins hasardeuses et pour plusieurs raisons :

1. La phase aiguë du sepsis est toujours associée à près de 30% de mortalité. Vu l'incidence galopante du sepsis, cela représente en France des milliers de patients.
2. Les mécanismes de transition de la phase inflammatoire vers la phase d'immunosuppression sont encore mal compris. Comme certains auteurs le soulignent, la reprogrammation des monocytes/macrophages a lieu dans les toutes premières heures qui suivent leur activation. Il reste encore à montrer s'il existe ou non un lien entre l'intensité de la phase inflammatoire initiale et la durée et le phénotype de l'immunosuppression. Si une telle association existait, la limitation de l'inflammation serait d'autant plus un réel objectif thérapeutique.

La phase d'immunosuppression est caractérisée par des dysfonctions cellulaires et une anomalie dans le nombre des lymphocytes (lymphopénie sauf pour les Tregs) et une élévation des MDSCs circulants.

CCR2 et CX3CR1 semblent être des candidats idéaux pour investiguer ces mécanismes. En effet, la mobilisation et le recrutement des monocytes permet probablement la formation de néo-macrophages et serait sous la dépendance de CCL2 et CX3CR1.

La baisse d'expression membranaire de CX3CR1 a été montré comme étant un facteur associé à l'immunosuppression mais on ne sait pas encore à ce jour si cela est une cause ou une conséquence. Il est logique de faire l'hypothèse que l'expression de CX3CR1 et sa cascade d'activation contrôlent la survie de cellules potentiellement impliquées dans cette immunosuppression.

Le développement et l'amélioration des modulateurs des RCK existant pourraient être une option thérapeutique à l'avenir. Une meilleure caractérisation de la compartimentation spatiale de la réponse immunitaire et donc des sites où l'activation ou l'inhibition de CCR2 et CX3CR1 serait bénéfique permettra de mieux définir les cibles thérapeutiques. Comme discuté précédemment, le développement d'inhibiteurs des RCK efficaces *in vivo* est un immense enjeu thérapeutique et financier pour le secteur pharmaceutique.

L'IL-3 semble également contribuer à cette phase tardive du sepsis. Bien que l'IL-3 soit un puissant facteur de croissance à l'origine de l'absence d'augmentation du nombre de cellules chez les souris IL-3^{-/-} comparativement aux WTS, au cours de la phase tardive du sepsis, on observe un nombre plus important de MDSCs chez les souris déficientes. Ce résultat paradoxal peut s'expliquer de diverses façons, une hypothèse possible serait que le faible nombre de monocytes circulant ne permet pas de repopuler correctement les macrophages tissulaires, or ceux-ci ont une fonction majeure en homéostasie : l'efferocytose, c'est à dire la capacité à phagocyter les cellules anciennes ou endommagées. L'augmentation du nombre de MDSCs serait alors lié à une accumulation de cellules dysfonctionnelles.

Les progrès techniques et les nouveaux outils mis à la disposition des chercheurs vont permettre de répondre à ces nouvelles questions dans les années à venir. La passionnante quête de la compréhension du sepsis et de l'élaboration de traitements adaptés n'en est encore qu'à ses balbutiements, les années à venir vont être mouvementées !

Annexes

Weber GF, **Chousterman BG**, Hilgendorf I, Robbins CS, Theurl I, Gerhardt LM, Iwamoto Y, Quach TD, Ali M, Chen JW, Rothstein TL, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. **Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis.** J Exp Med. 2014

Weber GF*, **Chousterman BG***, He S*, Fenn AM, Nairz M, Anzai A, Brenner T, Uhle F, Iwamoto Y, Robbins CS, Noiret L, Maier SL, Zönnchen T, Rahbari NN, Schölch S, Klotzsche-von Ameln A, Chavakis T, Weitz J, Hofer S, Weigand MA, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. **Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis.** Science. 2015

Chousterman BG, Swirski FK. **Innate response activator B cells: origins and functions.** Int Immunol. 2015

Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis

Georg F. Weber,^{1,2} Benjamin G. Chousterman,¹ Ingo Hilgendorf,¹ Clinton S. Robbins,¹ Igor Theurl,¹ Louisa M.S. Gerhardt,¹ Yoshiko Iwamoto,¹ Tam D. Quach,³ Muhammad Ali,¹ John W. Chen,¹ Thomas L. Rothstein,³ Matthias Nahrendorf,¹ Ralph Weissleder,^{1,4} and Filip K. Swirski¹

¹Center for Systems Biology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02114

²Department of Visceral, Thoracic and Vascular Surgery, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, 01307 Dresden, Germany

³Center for Oncology and Cell Biology, The Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, NY 11030

⁴Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

Pneumonia is a major cause of mortality worldwide and a serious problem in critical care medicine, but the immunophysiological processes that confer either protection or morbidity are not completely understood. We show that in response to lung infection, B1a B cells migrate from the pleural space to the lung parenchyma to secrete polyreactive emergency immunoglobulin M (IgM). The process requires innate response activator (IRA) B cells, a transitional B1a-derived inflammatory subset which controls IgM production via autocrine granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling. The strategic location of these cells, coupled with the capacity to produce GM-CSF-dependent IgM, ensures effective early frontline defense against bacteria invading the lungs. The study describes a previously unrecognized GM-CSF-IgM axis and positions IRA B cells as orchestrators of protective IgM immunity.

CORRESPONDENCE

F.K. Swirski:
fswirski@mgh.harvard.edu
OR
G.F. Weber:
georg.weber@uniklinikum-
dresden.de

Abbreviations used: BAL, bronchoalveolar lavage fluid; CB, cord blood; CT, computed tomography; ICAPS, intercostal approach of the pleural space; i.n., intranasally; i.pls., into the pleural space; IRA, innate response activator; i.t., intratracheal.

Respiratory infections are an acute challenge in critical care medicine, typically affecting the very old, very young, and chronically ill. The Center for Disease Control and Prevention estimates that, in the United States, 1.7 million hospital-acquired respiratory infections claim 90,000 lives every year. This mortality rate is rising due to an increased number of immunosuppressed patients, exposure to drug-resistant organisms, and a growing elderly population (Mizgerd, 2008; Esperatti et al., 2010; Magret et al., 2011; Venkatachalam et al., 2011). There is, therefore, an urgent need to find novel therapeutic targets, and to do so requires deeper understanding of the disease's underlying pathophysiology.

Vertebrate animals rely on their diverse leukocyte populations to recognize and clear pathogens that breach mucosal barriers (Medzhitov, 2007). Infection of the lung mobilizes lymphocytes, granulocytes, and mononuclear phagocytes. Among the lymphocytes, the innate-like B1 B cells reside predominantly in serosal cavities. In response to infection, serosal B1 B cells relocate from either the pleural space or peritoneum and accumulate in either lung-draining

lymph nodes or the spleen, respectively (Kawahara et al., 2003; Ha et al., 2006; Yang et al., 2007; Choi and Baumgarth, 2008; Moon et al., 2012). B1 cells are major producers of natural IgM antibodies that protect the host by opsonizing pathogens and promoting complement receptor-mediated phagocytosis (Boes et al., 1998; Baumgarth et al., 2000; Ansel et al., 2002; Fabrizio et al., 2007; Choi and Baumgarth, 2008; Racine and Winslow, 2009; Ehrenstein and Notley, 2010; Baumgarth, 2011; Litvack et al., 2011; Schwartz et al., 2012), but the mechanisms controlling B cell activation, as well as the consequences of relocating from serosal sites, are not fully known. We have recently shown in an abdominal sepsis model that peritoneal B1a B cells (a subset of B1 B cells) give rise to a population of B cells called innate response activator (IRA) B cells that produce the growth factor GM-CSF (Rauch et al., 2012). IRA B cells arise in the mouse by recognizing microbes via

© 2014 Weber et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

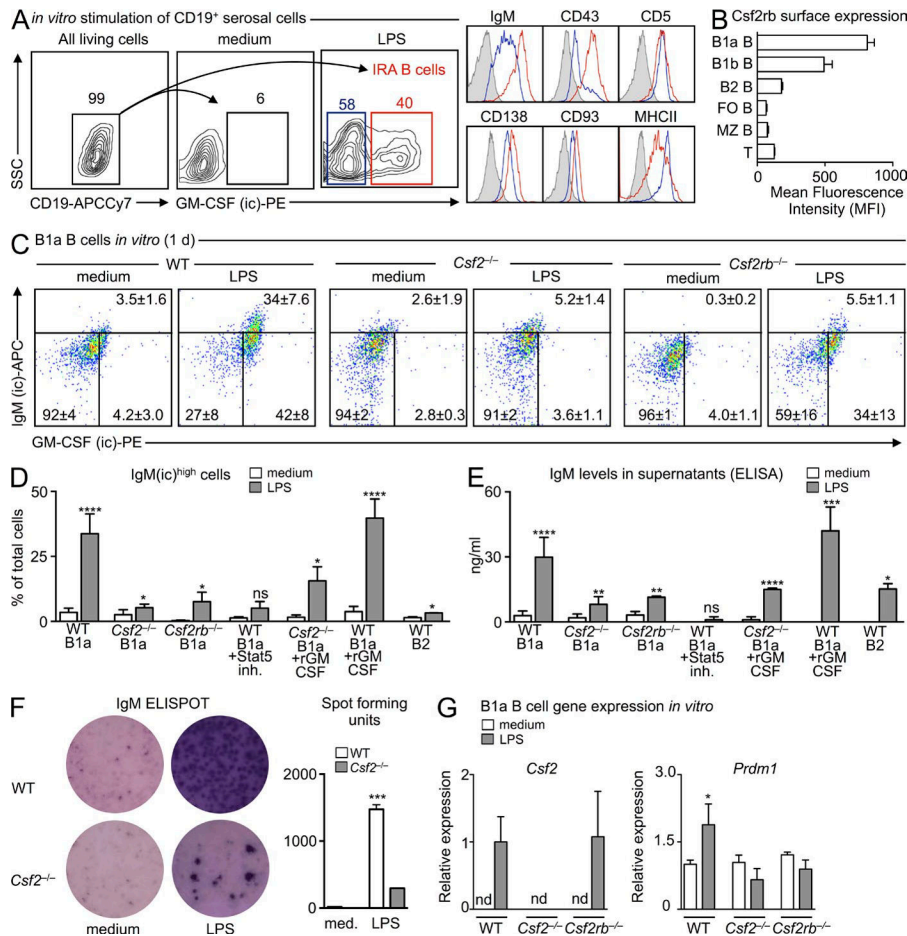


Figure 1. GM-CSF controls IgM production. (A) *In vitro* culture of CD19⁺ serosal B cells. Gating strategy and phenotyping of IRA B cells 2 d after culture in medium or with 10 μ g/ml LPS. A representative contour plot of $n > 5$ is shown. (B) CD131 (Csf2rb) expression on selected cells from WT mice ($n = 4$). (C) *In vitro* culture of serosal B1a cells sorted from WT, *Csf2*^{-/-}, and *Csf2rb*^{-/-} mice. Data show intra-cellular IgM and GM-CSF in cells cultured in medium alone or after LPS (10 μ g/ml) stimulation after 1 d of culture ($n = 3-5$). The gate for GM-CSF was set using an isotype control (IgG2a) and the gate for intracellular IgM represents the upper 99% limit of intracellular IgM staining at baseline. (D) *In vitro* culture of serosal B1a cells sorted from WT, *Csf2*^{-/-}, and *Csf2rb*^{-/-} mice, and B2 cells sorted from WT mice. Percentage of IgM(ic)^{high} cells cultured for 1 d in medium, after stimulation with 10 μ g/ml LPS alone, or 10 μ g/ml LPS + rGM-CSF, or with a Stat5 inhibitor ($n = 3-8$, mean $\pm$ SD). ns, not significant. (E) IgM ELISA of culture supernatants from the same groups as in D ($n = 3-8$, mean $\pm$ SD). ns, not significant. (F) IgM ELISPOT of cultured B1a cells. A representative ELISPOT of $n = 3$ is shown. (G) Quantitative RT-PCR analysis of *Csf2* and *Prdm1* expression in cultured serosal B1a cells from WT, *Csf2*^{-/-}, and *Csf2rb*^{-/-} mice with and without LPS (10 μ g/ml) stimulation for 1 d ($n = 3$). *Csf2* expression levels after LPS stimulation is shown relative to WT LPS as mean $\pm$ SD. *Prdm1* expression after LPS stimulation is shown relative to WT medium as mean $\pm$ SD (nd, not detected). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

TLR4 in the peritoneum and accumulate in large numbers in the splenic red pulp. The mechanisms by which B cell-derived GM-CSF protects against sepsis, however, are not known.

In this study, we show that in response to microbial airway infection, pleural B1a B cells relocate to the lung where they produce protective IgM. The process requires IRA B cells; animals with a B cell-restricted GM-CSF deficiency fail to secrete abundant IgM and consequently succumb to pneumonia. Mechanistically, autocrine GM-CSF activates B cells for IgM production via the common β chain receptor CD131. The study therefore identifies a GM-CSF-IgM activation axis that is critical in the response to infection and reveals the pleural space as a source of innate-like B cells that infiltrate the lung in response to bacterial lung infection.

RESULTS

GM-CSF controls IgM production

IgM production is a defining feature of innate-like B cells (Ehrenstein and Notley, 2010; Baumgarth, 2011; Cerutti et al., 2013). We have previously shown that IRA B cells are B1a-derived GM-CSF and IgM-producing cells (Rauch et al., 2012), whereas others have documented that GM-CSF can

induce immunoglobulin secretion (Snapper et al., 1995). IgM and GM-CSF co-expression by the same cell prompted us to test for a direct link between the antibody and the growth factor. We sorted B1a B cells from serosal cavities (peritoneal and pleural), locations known to contain B1a B cells. After *in vitro* LPS stimulation, B1a B cells gave rise to GM-CSF-producing IRA B cells, defined as CD19⁺ IgM^{high} CD43⁺ CD5⁺ CD138⁺ CD93⁺ MHCII⁺ (Fig. 1 A). B1a B cells also expressed the common β chain high-affinity receptor for GM-CSF (Csf2rb, also known as CD131) at high levels (Fig. 1 B), which corresponded with transcriptional profiling data obtained by the Immunological Genome Project (ImmGen) and suggested that B cell-derived GM-CSF might be acting in an autocrine manner to produce IgM. To test this, we placed sorted B1a B cells from WT, *Csf2*^{-/-} (i.e., GM-CSF-deficient), and *Csf2rb*^{-/-} mice into culture and used flow cytometry to detect intracellular IgM reservoirs (Fig. 2, A and B). In response to LPS, WT but neither *Csf2*^{-/-} nor *Csf2rb*^{-/-} B1a B cells gave rise to a large population of IgM-producing cells (Fig. 1, C and D). GM-CSF was necessary but not sufficient to elicit robust IgM production because adding GM-CSF to WT cells in medium had no

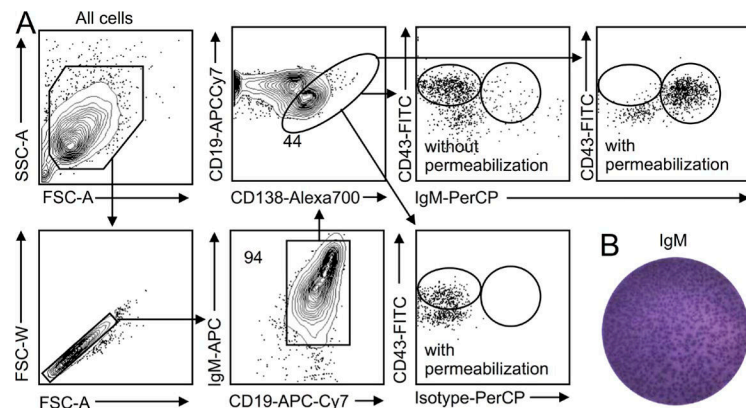


Figure 2. Intracellular staining of IgM. (A) Serosal B1a cells were sorted, placed in culture with LPS for 1 d, and stained for surface and intracellular IgM. Data show that the procedure can stain for intracellular IgM and that both surface and intracellular staining can be resolved. Surface IgM staining is followed by intracellular staining. A representative analysis of $n > 5$ is shown. (B) Validation of IgM production by ELISPOT on sorted B1a cavity cells 1 d after in vitro LPS stimulation. Shown is a representative analysis from $n > 5$.

effect. Adding recombinant (r) GM-CSF to *Csf2*^{-/-} B1a cell cultures partially restored, whereas adding rGM-CSF to WT B1a cells augmented IgM production (Fig. 1 D). Although the rescue effect was partial in absolute values, the ~10-fold increase of IgM by *Csf2*^{-/-} cells after rGM-CSF was similar to that observed in WT cells. These data suggest that despite GM-CSF's absence during B1 cell development in *Csf2*^{-/-} mice, which might affect the cells' ability to respond to LPS, a relatively robust response nevertheless occurs, providing evidence that GM-CSF stimulates IgM production. To illustrate the link between GM-CSF and IgM in WT cells, we focused on Stat5, which is crucial in the GM-CSF signaling pathway (Mui et al., 1995). Adding a Stat5 inhibitor to B1a cell cultures abrogated IgM production. B2 cells cultured with LPS likewise produced IgM, albeit at much lower levels. The intracellular IgM reservoirs correlated with secreted IgM, as measured by ELISA (Fig. 1 E) and ELISPOT (Fig. 1 F). RT-PCR confirmed that WT and *Csf2rb*^{-/-} but not *Csf2*^{-/-} cells produced GM-CSF in response to LPS (Fig. 1 G). When compared with *Csf2*^{-/-} and *Csf2rb*^{-/-} B1a B cells, stimulated WT B1a B cells expressed moderately higher levels of *Prdm1* (Fig. 1 H), the gene which codes for Blimp-1, which is an essential transcription factor in plasma cell generation (Shapiro-Shelef et al., 2003; Savitsky and Calame, 2006; Fairfax et al.,

2007; Nutt et al., 2007). In sum, the data show that B1a-derived IRA B cell secretion of GM-CSF promotes IgM production via CD131. This is a previously unrecognized GM-CSF-IgM axis that may be central to the early response to bacterial infection.

Protection against pneumonia requires pleural IRA B cells

The in vitro generation of IRA B cells from serosal B1a B cells led us to test whether IRA B cells can arise in the airways in vivo. We delivered LPS intranasally (i.n.) to WT mice and profiled the appearance of IRA B cells in various compartments 1 and 2 d later. Absolute IRA B cell numbers were highest in the lung and pleural space 2 d after LPS injection, with small numbers of IRA B cells accumulating in the bronchoalveolar lavage (BAL) and negligible numbers accumulating in both the lung-draining LN and blood at any point in time (Fig. 3, A and B). Expressing the increase of IRA B cells as a percentage of total B cells revealed dramatic increases in the pleural space, lung, and BAL (Fig. 3 C).

To determine whether IRA B cells are important in the host response to airway infection, we generated mixed chimeric mice with a B cell-restricted GM-CSF deficiency (Fig. 4). The procedure involved lethal irradiation of WT mice and reconstitution with a mixture of bone marrow cells from

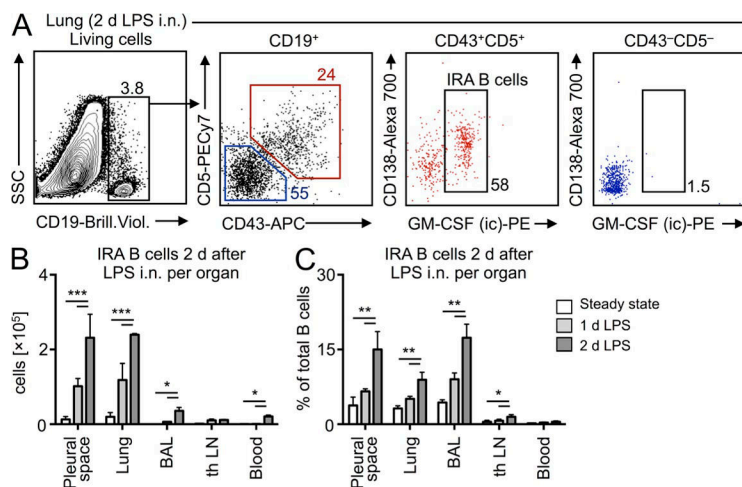


Figure 3. Identification of IRA B cells after airway challenge.

(A) Identification of IRA B cells in the lung 2 d after LPS i.n. challenge. A representative dot plot of $n > 5$ is shown. (B) Enumeration of IRA B cells in different organs in steady-state and after LPS challenge ($n = 4$ /group). (C) Enumeration as percentage increase ($n = 4$). Relevant data are presented as mean $\pm$ SD and tested by ANOVA; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

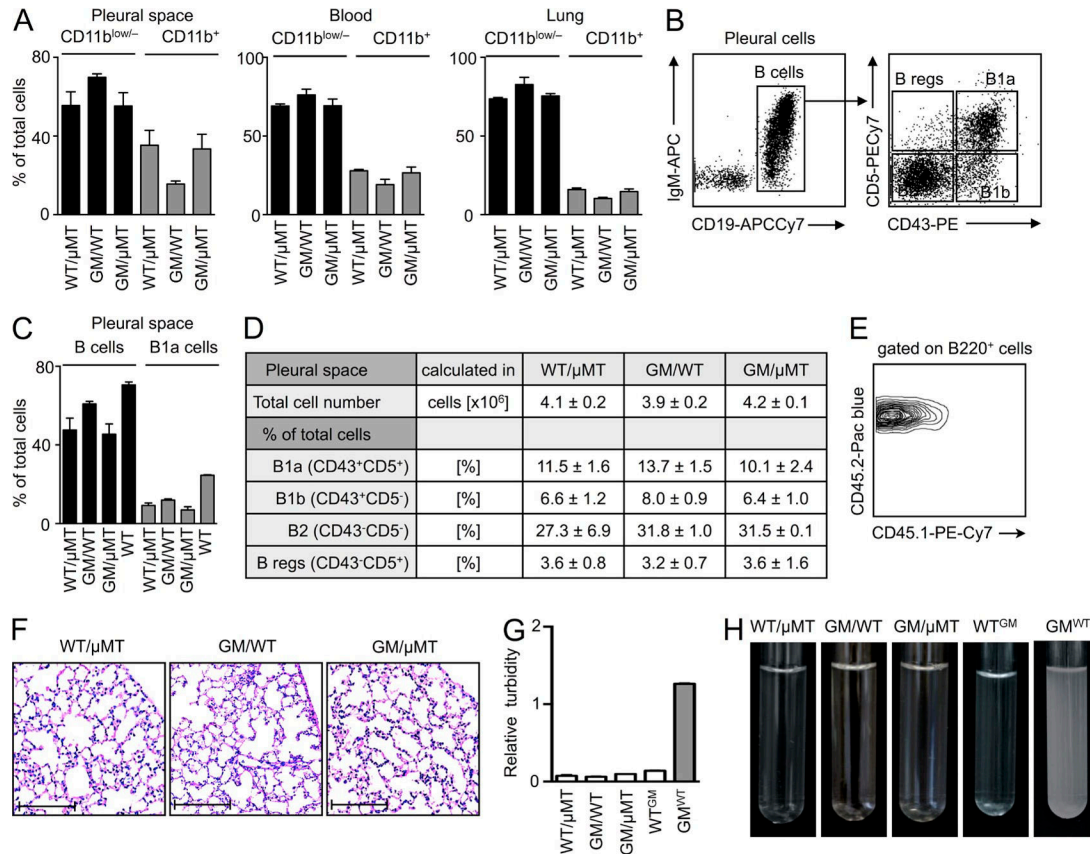


Figure 4. Generation of mixed chimeras. (A) Leukocyte reconstitution in WT/μMT, GM/WT, and GM/μMT mice in the pleural space, blood, and lung 10 wk after irradiation and bone marrow transfer. Data show the relative percentages of myeloid (CD11b⁺) and nonmyeloid (CD11b⁻) cells in the three compartments ($n = 4$, mean ± SD). (B) B cells in the pleural space of a WT mouse. Gating strategy for B1a (CD19⁺IgM^{high}CD43⁺CD5⁺), B1b (CD19⁺IgM^{high}CD43⁺CD5⁻), B2 (CD19⁺IgM^{low}CD43⁻CD5⁻), and B reg (CD19⁺IgM⁺CD43⁻CD5⁺) B cells is shown. (C) Relative proportions of total B cells and B1a B cells in the pleural space of WT/μMT, GM/WT, and GM/μMT chimeric mice and non-irradiated WT mice in the steady state. The chimeric mice were analyzed 8 wk after bone marrow transfer ($n = 3-5$, mean ± SD). (D) Enumeration of the various subsets in the three chimeras ($n = 3-5$, mean ± SD). (E) CD45.2 expression on blood leukocytes in CD45.1⁺ mice that had been lethally irradiated and reconstituted with CD45.2⁺ bone marrow cells 10 wk earlier. The plot is representative from that of the three chimeras. (F) Lung H&E in the three sets of chimeric mice 10 wk after bone marrow reconstitution (bars, 200 μm). (G) Turbidity analysis of BAL at 600 nm from WT/μMT, GM/μMT, WT^{GM} (lethal irradiation of WT mouse and 100% reconstitution with Csf2^{-/-} BM), and GM^{WT} (lethal irradiation of Csf2^{-/-} mouse and 100% reconstitution with WT BM) chimera ($n = 3$; mean ± SD). (H) BAL of WT/μMT, GM/WT, GM/μMT, WT^{GM}, and GM^{WT} chimeric mice.

μMT and GM-CSF-deficient mice. Accordingly, the μMT bone marrow gave rise to GM-CSF-sufficient leukocytes, but not B cells, whereas the GM-CSF-deficient bone marrow gave rise to GM-CSF-deficient leukocytes, including B cells. After 10 wk of reconstitution, all B cells (which necessarily derived from GM-CSF-deficient mice) lacked the capacity to produce GM-CSF in the mixed chimeras (GM/μMT). The remaining leukocytes were a mixture of WT and GM-CSF-deficient cells, whereas radiation-resistant and tissue-resident nonhematopoietic cells were GM-CSF-sufficient. We also generated two types of controls: WT mice reconstituted with a mixture of WT and μMT bone marrow cells (WT/μMT), which controlled for the μMT contribution, and WT mice reconstituted with a mixture of GM-CSF-deficient and WT bone marrow cells (GM/WT), which controlled for the contribution of any GM-CSF-deficient non-B cells in the GM/μMT group. The leukocyte profiles

in the pleural space, blood, and lung in the steady-state were most similar between the GM/μMT and WT/μMT chimeras (Fig. 4 A), but all three chimeras developed various B cell subsets (Baumgarth, 2011), including B1a B cells, as expected (Düber et al., 2009; Esplin et al., 2009; Holodick et al., 2009). Even though reconstitution was sub-optimal compared with non-irradiated WT mice (Fig. 4, B–D), the chimeras' leukocytes were of donor origin (Fig. 4 E), and the mice had normal lung histology (Fig. 4 F) without evidence of alveolar proteinosis (Fig. 4, G and H). Complete GM-CSF deficiency leads to the development of spontaneous alveolar proteinosis (Dranoff et al., 1994; Stanley et al., 1994). Previous data have shown (Huffman et al., 1996), and our data confirm, that pulmonary epithelial (i.e., nonhematopoietic) GM-CSF-producing cells prevent proteinosis by stimulating alveolar macrophages to clear surfactant; B cells are dispensable in this context.

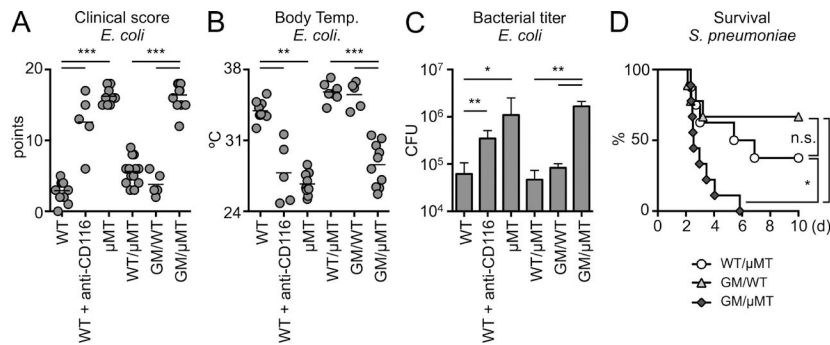


Figure 5. IRA B cells protect against pneumonia. (A) Clinical score of WT, WT receiving anti-CD116, μ MT, WT/ μ MT, GM/WT, and GM/ μ MT mice 9 h after infection with *E. coli* ($n = 5$ –10 mice). (B) Body temperature of the groups above. (C) Bacterial titer in BAL after *E. coli* infection of WT, WT receiving anti-CD116, μ MT, WT/ μ MT, GM/WT, and GM/ μ MT mice ($n = 5$ –10 mice). (D) Kaplan-Meier survival curves after *S. pneumoniae* i.t. infection for WT/ μ MT, GM/WT, and GM/ μ MT mice ($n = 8$ –10). Relevant data are presented as mean $\pm$ SD and tested by ANOVA; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

After reconstitution, we infected GM/ μ MT, WT/ μ MT, and GM/WT mice with *Escherichia coli*. Although *E. coli* are not the predominant pneumonia-causing pathogen, they are Gram-negative, LPS-bearing bacteria and are responsible for a significant proportion of hospital-acquired pneumonias (Williams et al., 2002; Kleven et al., 2007; Scott et al., 2008; Esperatti et al., 2010; Jones, 2010; Magret et al., 2011; Venkatachalam et al., 2011). We monitored infected mice for morbidity and bacterial titer. As additional controls, we infected WT, B cell-deficient μ MT mice (i.e., nonirradiated, nonchimeric), and WT mice that received anti-CD116 intrapleurally (i.e., anti-GM-CSFR α , the subunit of the GM-CSF receptor which is specific to GM-CSF; the antibody has been reported to be neutralizing). Three groups of mice— μ MT, WT receiving anti-CD116, and chimeric GM/ μ MT (i.e., IRA KO)—became very morbid (Fig. 5 A), hypothermic (Fig. 5 B), and had increased bacterial counts in the BAL (Fig. 5 C). In contrast, WT mice and the two chimeric controls were more resistant to infection. The data show that B cell-derived GM-CSF is important and beneficial to the early response to airway infection. The similarity between μ MT and GM/ μ MT mice in failing to protect against infection illustrates that GM-CSF production by B cells is an essential component of the overall B cell response at this early time point. Blocking CD116, GM-CSF's specific receptor subunit, confirmed that GM-CSF signaling is important in WT mice in vivo. We also wondered whether the key finding that IRA B cells are protective was specific to *E. coli* or might also apply to other bacterial pathogens. GM/ μ MT mice infected with *Streptococcus pneumoniae*, a major cause of disease in humans worldwide and the primary pathogen responsible for pneumonia (Mizgerd, 2008), died earlier and in larger numbers than controls (Fig. 5 D). These data underscore the importance of IRA B cells in pneumonia, thereby prompting us to delve further into these protective processes.

Impaired IgM production in the absence of IRA B cells

Having observed that B cell-derived GM-CSF protected against pneumonia, we next examined the mixed chimeras' cellular and humoral response, particularly whether the absence of B cell-derived GM-CSF associates with impaired IgM production in vivo. In the steady-state, IgM was readily detectable, and its similar concentrations in GM/ μ MT and

WT/ μ MT mice indicated that IRA B cells are dispensable to steady-state IgM production. After infection, control but not GM/ μ MT mice showed augmented IgM in the pleural space, lung, and serum, indicating impaired emergency IgM production in mice lacking IRA B cells (Fig. 6 A). Immunofluorescence microscopy showed lung B cells in GM/ μ MT mice to be weakly positive for IgM compared with controls (Fig. 6 B). The data suggest that B cell-derived GM-CSF is required for IgM production in vivo in response to lung infection.

Given GM-CSF's reported role in emergency hematopoiesis (Zhan et al., 1998), we also tested whether the absence of B cell-derived GM-CSF impaired the generation of monocytes and granulopoiesis. Surprisingly, the GM/ μ MT chimeras generated more, not fewer, myeloid cells. Compared with WT/ μ MT controls, GM/ μ MT mice had higher numbers of neutrophils in the lungs, blood, and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid (Fig. 6, C and D). Interestingly, neutrophils in GM/ μ MT mice phagocytosed bacteria poorly (Fig. 6 E), possibly reflecting insufficiency of IgM, an isotype known to facilitate complement receptor-mediated phagocytosis (Baumgarth, 2011; Schwartz et al., 2012). Finally, GM/ μ MT mice expressed higher levels of the inflammatory mediators IL-1 α , IL-6, TNF, and CXCL1 in the BAL (Fig. 6 F). We did not detect IL-10 in the groups, which argues against a B regulatory phenotype in this model. Thus, impaired IgM production, rather than impaired myelopoiesis, appeared to contribute to infection susceptibility in animals lacking B cell-derived GM-CSF.

Pleural B1a B cells migrate to the lung parenchyma

Coelomate animals contain peritoneal, pleural, and pericardial cavities that shield and support internal organs. The pleural cavity is the space between the outer parietal pleura attached to the chest wall and the inner visceral pleura that covers the lungs. Its primary purpose may be to aid lung function, as the pleural fluid allows the membranes to slide effortlessly during ventilation, but the space also contains immune cells such as macrophages and B cells. Such leukocyte location could be strategic; pleural cells may function as either sentinels against barrier-breaching or reservoirs for lung infiltration. Our observations that serosal B1a B cells can give rise to IRA B cells in vitro (Fig. 1 A); that IRA B cells arise in the pleural space/lung during airway infection (Fig. 3); and that B cell-derived GM-CSF controls IgM production in the airways

(Fig. 6, A–C) prompted the hypothesis that the pleural space sources lung-infiltrating IgM-producing B cells in response to bacterial airway infection. To test this, we developed the intercostal approach of the pleural space (ICAPS) method (Fig. 7 A), in which a catheter is intercostally inserted into the organism's thorax at a low angle to bypass the diaphragm and reduce the risk of puncturing the lung. When the catheter is removed, the intercostal muscles seal the puncture canal and prevent a pneumothorax. We confirmed the validity of this procedure by injecting a CT imaging contrast agent into the pleural space (Fig. 7 B) and transferring GFP⁺ leukocytes for in vivo fate mapping (Fig. 7 C).

To track leukocyte migration, we transferred total pleural and peritoneal GFP⁺ cells to either the pleural or peritoneal space of mice receiving LPS. 2 d after transfer, we enumerated GFP⁺ cells that had accumulated in various organs. Cells transferred to the pleural space accumulated in the lung preferentially and were enriched for B cells (Fig. 7, D and E). In contrast, only a small number of GFP⁺ cells accumulated in

the lung from the peritoneum, and only a small number of cells accumulated in the spleen from either source (Fig. 7 E). To focus on pleural B1a B cells specifically, we adoptively transferred sorted pleural GFP⁺ B1a B cells to the pleural space. After 2 d of LPS challenge, a substantial fraction (~26%) of all B1a cells in the lung were GFP⁺ (Fig. 7 F), and the cells were readily visible by fluorescence microscopy (Fig. 7 G). The pleural space, but not the blood, still contained many GFP⁺ B1a B cells at this time point (Fig. 7 F), which suggested that pleural B1a cells relocated directly from the pleural space to the lungs. Indeed, pleural cells were readily observed in regions close to the mesothelial layer, the single-cell barrier known to express adhesion molecules—such as VCAM-1 (Jonjić et al., 1992)—that separates lung tissue from the pleural space.

Pleural B1a B cells produce protective IgM in the lungs

The leukocyte profile and the differences between the two delivery routes suggested that the pleural space was the preferential

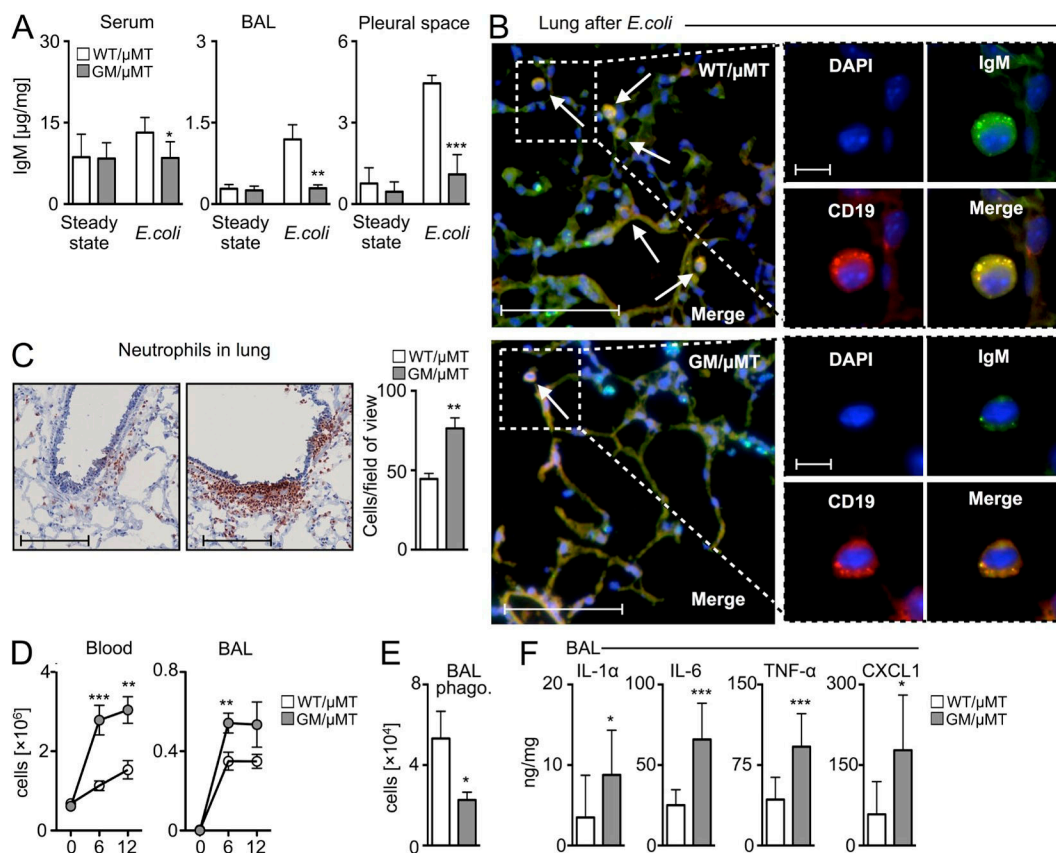


Figure 6. Enhanced inflammation but attenuated IgM after *E. coli* airway infection in the absence of IRA B cells. (A) IgM levels detected by ELISA in serum, BAL, and pleural space 9 h after *E. coli* infection ($n = 6-10$ mice). (B) Lung histology after *E. coli* infection. DAPI: blue; CD19: red; IgM: green; merge: yellow. Representative pictographs of $n = 6-10$ animals/group are shown (bars: overview, 100 μ m; inset, 10 μ m). Arrows indicate IgM⁺CD19⁺ cells. (C) Analysis of WT/μMT and GM/μMT mice after i.t. *E. coli* infection. Immunohistochemical staining for neutrophils in lung tissue and enumeration of neutrophils measured by counts of neutrophils per field of view. A representative slide of $n = 6-10$ is shown (bars, 400 μ m). (D) Enumeration of neutrophils in blood and BAL ($n = 6-10$). (E) Analysis of the phagocytic capacity of neutrophils from the BAL of WT/μMT and GM/μMT mice. Shown are total cell numbers with phagocytosed Pkh26⁺ bacteria ($n = 4$). (F) Analysis of BAL levels for IL-1 α , IL-6, TNF, and CXCL1 ($n = 5-15$ mice). Relevant data are presented as mean $\pm$ SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

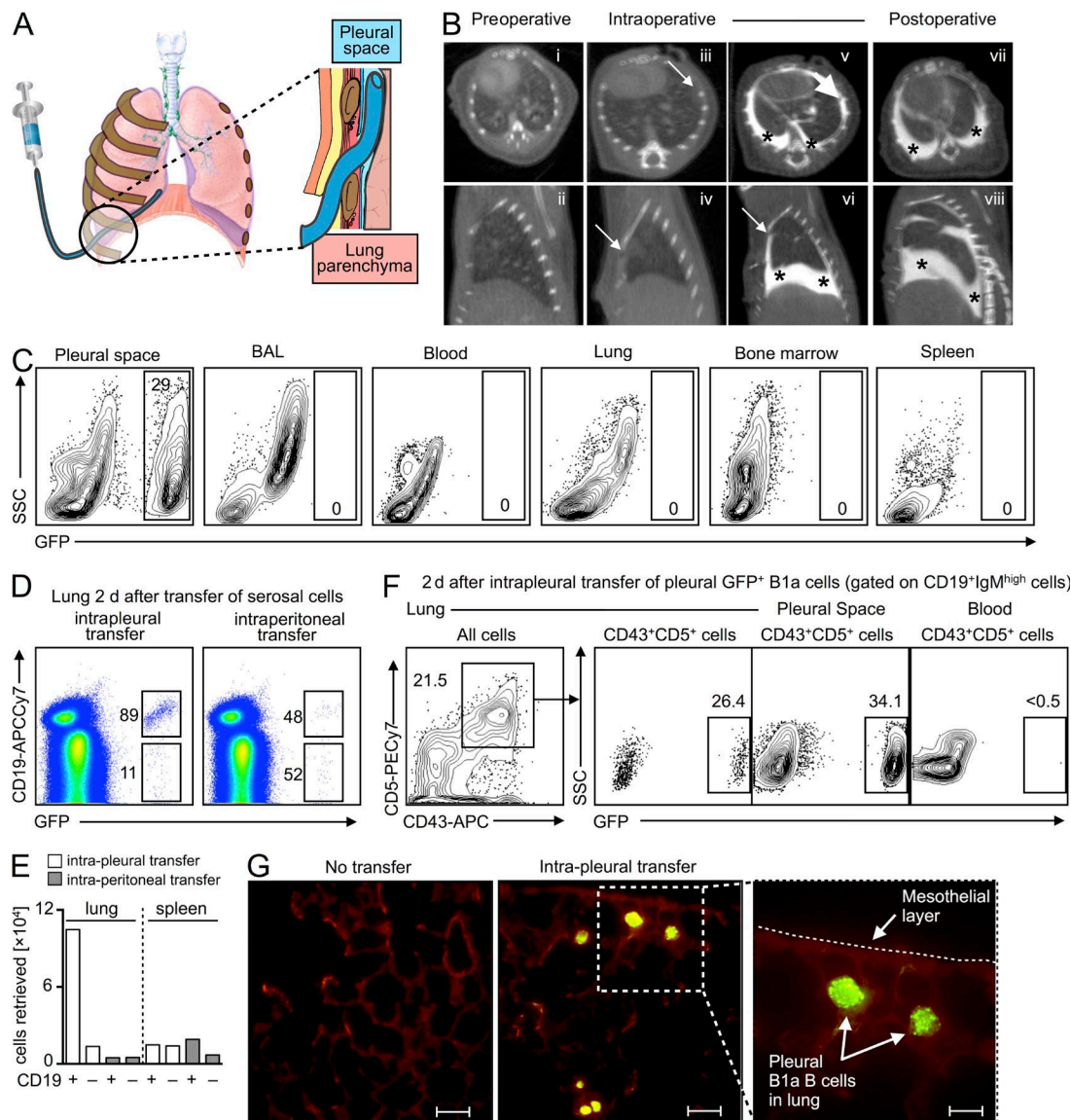


Figure 7. The pleural space is a reservoir of lung-infiltrating B1a B cells. (A) Cartoon depicting the ICAPS model. After skin incision, a small catheter can be navigated through the intercostal space and placed in the pleural space. (B) Preoperative: (i and ii) CT scans before insertion of the catheter. Intraoperative: (iii and iv) CT scans immediately after insertion of the catheter. (v and vi) CT scans after injection of 300 μ l lopamidol iodine CT contrast agent. Postoperative: (vii and viii) CT scans 10 min after the catheter was removed. There were no signs of injection into lung parenchyma, pneumothorax, or leakage (top row of CT scans: axial view; bottom rows of CT scans: sagittal view; arrows denote the tip of the catheter; stars denote the injected lopamidol iodine CT contrast agent). (C) Intrapleural (i.e., by ICAPS) transfer of GFP⁺ serosal cells. Cells were transferred into WT mice which were sacrificed 10 min after transfer. Data show transferred cells in the pleural space, BAL, blood, lung, bone marrow, and spleen. (D) Unsorted GFP⁺ serosal cells were adoptively transferred to the pleural or peritoneal spaces of WT mice that received pulmonary LPS challenge. Data show profile of lung accumulation in recipients 2 d after transfer. A representative experiment of $n = 5$ is shown. (E) Enumeration of CD19⁺ and CD19⁻ cells accumulating in the lung and spleen after intrapleural or intraperitoneal transfer of unsorted GFP⁺ serosal cells. A representative enumeration of $n = 5$ is shown. (F) Intrapleural adoptive transfer of serosal B1a GFP⁺ cells. Data show frequency of adoptively transferred (GFP⁺) cells in the lung, pleural space, and blood 2 d after pulmonary LPS challenge. A representative dot plot from $n = 4$ is shown. (G) Fluorescence microscopy of lung tissue 2 d after intrapleural adoptive transfer of sorted GFP⁺ serosal B1a cells (bars: overview, 20 μ m; inset, 10 μ m).

source of lung-accumulating serosal B cells. B1a B cells retrieved from the lung contained large reservoirs of IgM (Fig. 8, A and B), which they secreted locally, as measured by ELISPOT assays performed on GFP⁺ cells that had relocated from the pleural space to lung tissue (Fig. 8 C). To determine

the importance of pleural B cells to the host response, we profiled mortality in WT and μ MT (i.e., B cell-deficient) mice infected with a high dose of *E. coli*. After 48 h, $\sim$ 40% of WT mice died but $\sim$ 60% completely recovered. In contrast, $\sim$ 80% of B cell-deficient μ MT mice died within 12 h (Fig. 8 D).

Additionally, we used ICAPS to transfer pleural B cells from WT mice to the pleural spaces of μ MT mice. The μ MT pleural B cell recipients, which now contained B cells but only in the pleural space, were then infected with *E. coli*. Remarkably, this B cell supplementation completely reversed the severe mortality otherwise observed in μ MT mice (Fig. 8 D). For controls, we transferred pleural B cells from *Csf2*^{-/-} mice to the pleural spaces of μ MT mice and B cells sorted from the blood of WT mice to the blood (by i.v.) of μ MT mice. Neither approach rescued the μ MT mice, indicating that GM-CSF produced by pleural B cells was required for protection. The data show that pleural B cells defend against pneumonia.

IgM is one of the first antibody isotypes secreted during infection. IgM recognizes multiple epitopes with low affinity and is therefore polyreactive and innate-like, but its pentameric structure increases avidity and allows for potent opsonizing and complement-fixing functions. To determine whether IgM recognized bacteria in our model, we infected μ MT mice and μ MT mice that received pleural B cells into the pleural space (Fig. 8 E) with Pkh26-labeled *E. coli*. 6 h later, the BAL fluid contained labeled bacteria in both groups, but only bacteria in μ MT animals receiving pleural B cells were opsonized with IgM (Fig. 8 E). Newly produced IgM (i.e., IgM retrieved from the BAL 6 h after LPS intratracheal [i.t.] delivery) recognized gram-positive *Staphylococcus aureus* and gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*, indicating polyreactivity (Fig. 8 F).

Moreover, IgM titers were increased in the BAL and pleural space of μ MT mice receiving WT pleural B cells but not *Csf2*^{-/-} pleural B cells (Fig. 8 G). These data indicate that in response to airway infection, pleural B cells relocate to the lung and produce opsonizing, polyreactive, GM-CSF-dependent IgM.

Secreted IgM is necessary for protection against pneumonia

At this point, the data can be summarized as follows: in response to pulmonary infection, IRA B cells arise in the pleural space and lung; in the absence of IRA B cells (absence of B cell-derived GM-CSF), mice fail to produce IgM and succumb to pneumonia; and pulmonary infection mobilizes pleural B1a B cells, which relocate to the lung and produce IgM. To further validate these findings, we wished to test the importance of pleural B cell-derived GM-CSF and secreted IgM in our model. We pursued a rescue strategy involving the adoptive transfer of different cell populations to the pleural spaces of GM/ μ MT mice. We transferred *Csf2*^{-/-} pleural B cells, WT pleural non-B cells, pleural B cells from secretory IgM-deficient (*sIgM*^{-/-}) mice, and WT pleural B cells (Fig. 9 A). Comparing the adoptive transfer of WT pleural B cells with *Csf2*^{-/-} pleural B cells and WT pleural non-B cells allowed us to determine the importance of B cell-derived GM-CSF, whereas *sIgM*^{-/-} mice demonstrated the importance of secreted IgM. Mice that received WT pleural B cells into the

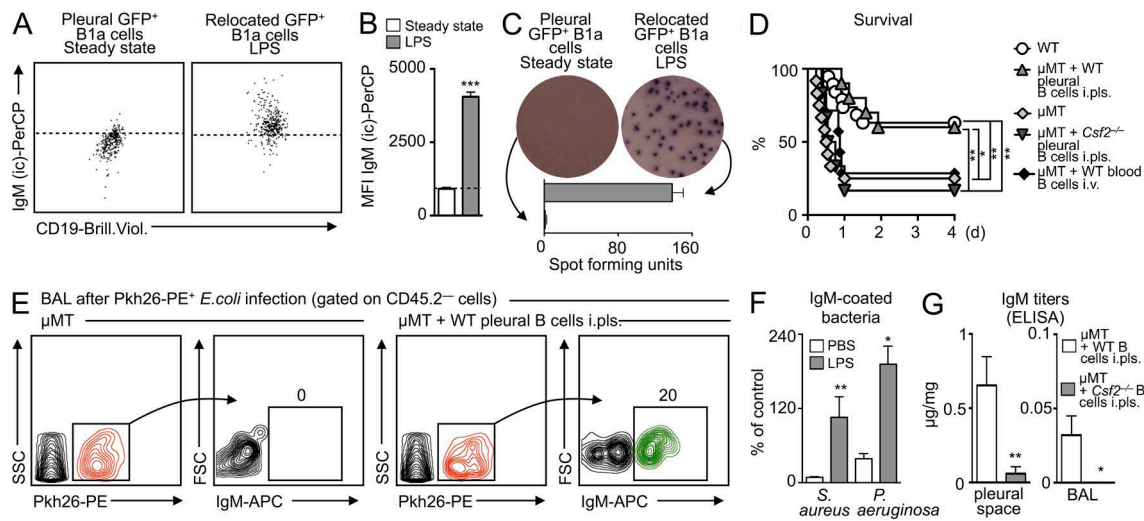


Figure 8. Pleural B1a B cells accumulating in the lung produce opsonizing IgM that is sufficient to confer survival. (A) Intracellular IgM (IgM (ic)) reservoirs in steady-state pleural GFP⁺ B1a cells (left dot plot) and in GFP⁺ B1a cells that had infiltrated LPS-challenged lungs after intrapleural transfer (right dot plot). The dotted line represents the upper 99% limit of intracellular IgM staining in steady-state cells. Representative analysis from $n = 4$ is shown. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of IgM (ic) from A ($n = 4$). (C) IgM ELISPOT analysis of cells as in A. Representative analysis from $n = 2$ experiments is shown. (D) Kaplan-Meier survival curves in response to *E. coli* infection in WT mice; μ MT mice; and μ MT mice that received WT pleural B cells in the pleural space, *Csf2*^{-/-} pleural cells in the pleural space, and WT blood cells into the blood at the time of infection ($n = 10$ mice). (E) Opsonization of bacteria with IgM. Data show Pkh26-labeled *E. coli* retrieved from the BAL of either μ MT mice or μ MT mice spiked with pleural WT B cells in the pleural space. Bacteria (i.t.) and cell transfer (i.p.s.) were conducted 6 h before BAL. An antibody against IgM shows opsonization of labeled bacteria. A representative analysis of $n = 3$ is shown. (F) IgM is polyclonal. WT mice received PBS or LPS. 6 h later, BAL was collected, and capacity of IgM to bind to *S. aureus* and *P. aeruginosa* was measured. Data show binding relative to a commercially available polyclonal IgM ($n = 3$). (G) IgM ELISA of pleural fluid and BAL after *E. coli* infection. μ MT mice received WT or *Csf2*^{-/-} pleural B1a cells into the pleural space at the time of infection ($n = 3$). Relevant data are presented as mean $\pm$ SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

pleural space were healthier, as judged by their clinical scores, body temperatures, and bacterial titers (Fig. 9 B). Moreover, mice that received WT pleural B cells had increased titers of IgM (Fig. 9 B). That none of the other three strategies protected the animals indicated that B cell–derived GM-CSF is essential. To determine whether polyclonal IgM could indeed rescue IRA B cell–deficient, GM/ μ MT chimeras, we injected polyclonal IgM i.t. into GM/ μ MT mice infected with a high dose of *E. coli*. Compared with controls receiving PBS, poly-IgM recipients were protected (Fig. 9 C).

Previously, we demonstrated that the human spleen contains a population of GM-CSF–producing IRA B-like cells (Rauch et al., 2012). To determine whether humans also contain, or can develop, IRA B-like cells in the pleural space, we obtained human pleural fluid by thoracentesis, and cultured B cells in either medium or a classical human B cell stimulation cocktail containing anti-Ig and IL-2. After 2 d of culture, human pleural CD19⁺ CD20⁺ IgM⁺ B cells produced GM-CSF (Fig. 10, A–C). The GM-CSF producers clustered in a single rather than bimodal distribution, suggesting indiscriminate activation in this in vitro setting. To reveal whether the appearance of IRA B-like cells was unique to the pleural space, we also cultured B cells from cord and peripheral blood. In the cord blood, which contains predominantly naive and transitional cells, a large GM-CSF–producing population likewise arose (Fig. 10 C). In contrast, culturing peripheral blood B cell did not stimulate GM-CSF production (Fig. 10 C), a result which supports the concept that IRA B cells arise in specific locations. Adding nontoxic doses of anti-GM-CSF, anti-CD116, or a STAT5 inhibitor to the culture containing pleural cells prevented the appearance of IRA B-like cells, further indicating an important role of the GM-CSF pathway

(Fig. 10 D). Although further work is required to elucidate the similarities and differences between murine and human IRA B cells, these data nevertheless illustrate our current findings' potential translatability. In sum, the production of GM-CSF by IRA B cells orchestrates the generation of protective IgM, which is critical in the early defense to infection (Fig. 10 E).

DISCUSSION

The innate immune mechanism described here clears bacteria and protects against pneumonia. We show that in response to infection, pleural B cells relocate to the lung and produce abundant natural IgM, which is known to protect against infection (Boes et al., 1998; Baumgarth et al., 2000; Fabrizio et al., 2007; Choi and Baumgarth, 2008; Litvack et al., 2011; Schwartz et al., 2012). B cell–derived GM-CSF is the auto-crine instructor required for emergency IgM production. Recently identified IRA B cells, which differentiate from B1a B cells in the mouse via direct TLR–dependent pathogen recognition, are key to this process and therefore to early innate immune defense.

GM-CSF was identified in the 1960s as a colony stimulator of granulocytes and mononuclear cells, though not erythrocytes (Bradley and Metcalf, 1966). GM-CSF–deficient mice, which were independently generated by two groups in 1994 (Dranoff et al., 1994; Stanley et al., 1994), show no striking perturbations of hematopoiesis in the steady state but develop alveolar proteinosis. This condition's human counterpart is characterized by elevated anti-GM-CSF autoantibodies (Carey and Trapnell, 2010). In the mouse, GM-CSF is produced by pulmonary epithelial cells (Huffman et al., 1996), T cells, and macrophages (Hamilton, 2008; Hamilton and Achuthan, 2013). The growth factor promotes the maturation, survival,

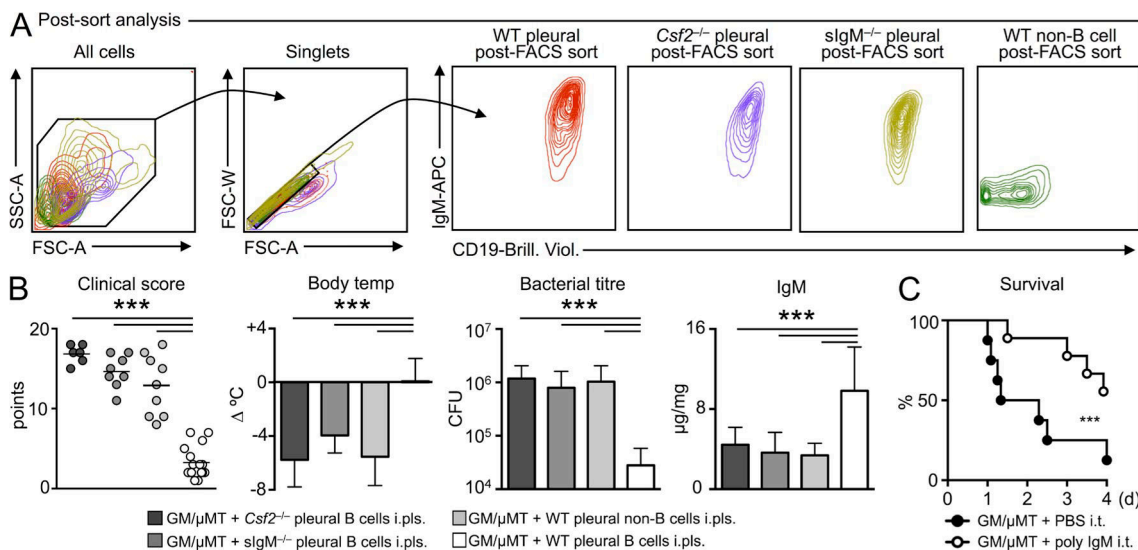


Figure 9. IRA B cells and secreted IgM are required for protection against pneumonia. (A) Postsort analysis of sorted WT, *slgM*^{-/-}, *Csf2*^{-/-} serosal B cells, or WT serosal non-B cells. Representative plots are shown of $n > 10$. (B) GM/ μ MT (i.e., IRA B cell KO) mice received intrapleural transfer of WT, *slgM*^{-/-}, *Csf2*^{-/-} serosal B cells, and WT non-B cells ($n = 6$ –15 mice). 6 h later, mice were infected i.t. with *E. coli*. 9 h later, clinical score, body temperature, bacterial titer in the BAL, and IgM in serum were measured. Data are presented as mean $\pm$ SD and tested by ANOVA. (C) Kaplan-Meier Survival Curve of GM/ μ MT mice infected with *E. coli* receiving either PBS or polyclonal IgM i.t. ($n = 10$). Relevant data are presented as mean $\pm$ SD; ***, $P < 0.001$.

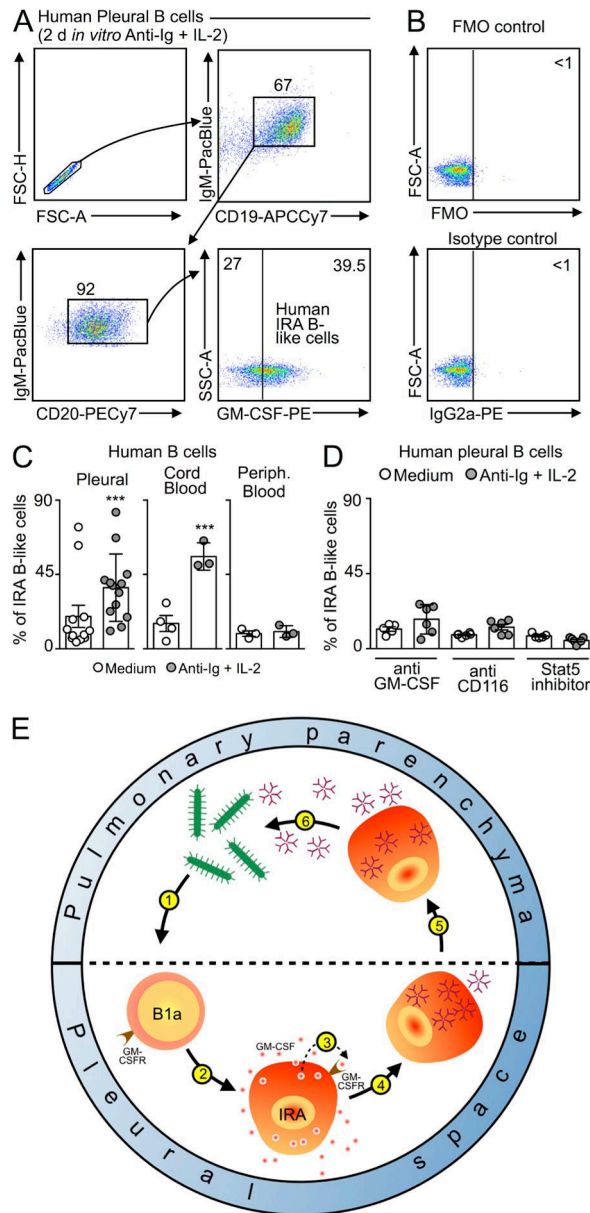


Figure 10. IRA B cells in humans. (A) Human pleural B cells were placed *in vitro* for 2 d and stimulated with anti-Ig and IL-2. Data show the appearance of GM-CSF-producing, IRA-like B cells. (B) Fluorescence-minus-one (FMO) and isotype controls of stimulated human B cells. (C) Total B cells were collected from human pleural space, cord blood, and peripheral blood and cultured for 2 d either in medium or with anti-Ig and IL-2 stimulation. Data show quantity of IRA-like B cells appearing in each condition. (D) Total B cells from the pleural space were cultured as in C, and with anti-GM-CSF, anti-CD116, or a Stat5 inhibitor. Data show quantity of IRA-like B cells appearing in each condition ($n = 4-15$). Relevant data are presented as mean $\pm$ SD. ***, $P < 0.001$. (E) Model for the function of IRA B cells in mouse pneumonia. During airway infection pleural space B1a cells recognize bacteria or its components (1). This leads to the generation (2) of IRA B cells which produce GM-CSF and express the GM-CSF receptor. GM-CSF acts on its receptor in an autocrine (3) manner. The signaling orchestrates generation of IgM-producing cells (4) which relocate to the lung (5). IgM derived from pleural space B cells is essential to the control of bacteremia (6).

and proliferation of its target cells; it controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis (Greter et al., 2012), emergency granulopoiesis (Kimura et al., 2009), iNKT cell differentiation (Bezbradica et al., 2006), sensitization to allergen (Stämpfli et al., 1998), and other effects related to immune activation (Hege et al., 2006; Timmerman et al., 2009; Le et al., 2010). *In vitro*, GM-CSF remains a standard for differentiating bone marrow progenitors to dendritic cells.

The early appearance of a unique GM-CSF-producing B cell in sepsis suggests a leukocyte communication hierarchy in which IRA B cells educate their client myeloid cells. A major finding of this study is therefore unexpected: IRA B cells produce GM-CSF for themselves. This autocrine function is all the more surprising considering its outcome, which is IgM production. At the signaling level, this may involve Blimp-1, a transcriptional repressor required for the formation of immunoglobulin-secreting B1-derived plasma cells (Shapiro-Shelef et al., 2003; Savitsky and Calame, 2006; Fairfax et al., 2007; Nutt et al., 2007) and Stat5, a transcription factor downstream of GM-CSF signaling (Mui et al., 1995; Kimura et al., 2009) which has been recently shown to amplify Blimp-1 in T cells (Nurieva et al., 2012). Future studies will need to elucidate the precise sequence of events that link GM-CSF signaling to IgM production. In addition to investigating how signals downstream of GM-CSF and LPS integrate, activate Stat5 and Blimp-1, and cooperate to produce IgM, additional questions remain as to whether and how GM-CSF contributes to the generation of mature B1 cells. Because pleural B cells can also accumulate in the lung-draining lymph nodes (Choi and Baumgarth, 2008), future work must determine whether IRA B cell-derived GM-CSF elicits other responses, such as generating or activating dendritic cells.

Many cytokines have an endocrine function. IL-1 β , IL-6, and TNF, for example, travel in the bloodstream and affect tissues at distance from injury or infection. Evidence suggests that GM-CSF's activity is more spatially restricted. Serum levels of GM-CSF tend to be low in steady state and inflammation because of receptor and autoantibody-mediated clearance (Metcalf et al., 1999). GM-CSF's pleiotropy relies on a binary, concentration-dependent switch (Guthridge et al., 2006). In this study, we show that B cell-derived GM-CSF is necessary for protective IgM responses but dispensable to surfactant clearance by alveolar macrophages. The cellular source and location of GM-CSF, our data indicate, is important and may be particularly relevant during clinical intervention. Indeed, on the basis of GM-CSF's capacity to augment HLA-DR and potentially arm the host for effective immunity, clinical trials have explored using recombinant GM-CSF for sepsis treatment (LaRosa and Opal, 2012). A few studies showed an all-survival benefit, but a meta-analysis found no consensus among the trials, and thus no evidence to support routine GM-CSF use (Bo et al., 2011). In all trials, however, GM-CSF was delivered either intravenously or subcutaneously. Future studies will need to determine whether locally administering GM-CSF to strategic locations, such as the

pleural space, can overcome host clearance mechanisms and engender a durable clinical benefit.

The adaptive arm of the immune system requires lymphoid tissues in which leukocytes interact, proliferate, and, over time, generate antigen specificity and memory. For innate immunity to be effective, it must respond to a different challenge: it has to act quickly. The pleural space's proximity to the lung gives pleural leukocytes an advantage in meeting this challenge. The observation that pleural space B cells control the early response to infection is significant because it broadens our understanding of the immune system's spatio-cellular dynamics. Additionally, the mechanistic insight that a particular B cell controls this event via a previously unrecognized GM-CSF-IgM axis might have important biological and therapeutic implications for the treatment of infectious diseases.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57BL/6J (WT), B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyJ (CD45.1⁺), C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J (GFP⁺), and B10.129S2(B6)-Ighmtm1Cgn/J (μ MT) female mice (The Jackson Laboratory) were used in this study. GM-CSF-deficient mice (*Csf2*^{-/-}) were a gift from R. Seeley (University of Cincinnati, Cincinnati, OH). Secretory IgM-deficient mice (*sIgM*^{-/-}) were a gift from K. Alugupalli (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA). GM-CSF receptor-deficient mice (*Csf2rb*^{-/-}) were a gift from J. Whitsett (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH). All mice were 8–20 wk of age at the time of sacrifice. All protocols were approved by the Animal Review Committee at Massachusetts General Hospital.

Animal models and in vivo interventions

For the adoptive transfer of cells i.v., i.p., or into the pleural space (i.p.s.), mice were anesthetized with isoflurane.

Intrapleural injection using the ICAPS model. After fixation of the mice with tape, a right anterolateral thoracic incision was performed over 2–3 cm, followed by careful sharp dissection of the attached muscles from the thoracic wall. A polyethylene catheter (Intramedic, I.D. 0.28 mm; BD) was then tangentially inserted into the pleural space without harming the lung parenchyma. Cells, contrast agent, or PBS was injected. After removing the catheter, we controlled for pneumothorax and adequate breathing. Skin closure was performed with an Ethilon 5/0 suture and pain medication (0.1 mg/kg buprenorphine) was injected i.p.

Mixed bone marrow chimeras. Naive WT mice were lethally irradiated (10 Gy). 4–7 h after irradiation, animals were reconstituted with a 1:1 mixture of total bone marrow cells from μ MT, WT, or *Csf2*^{-/-} mice (Rauch et al., 2012). A total of 4×10^6 cells were injected intravenously. Animals were allowed to recover for a minimum of 8 wk.

Pneumonia models. Animals were infected i.n. or i.t. with 20 μ g LPS; 2.5, 5, 7.5, or 15×10^6 CFU *E. coli* (American Type Culture Collection); or 2.5×10^4 *S. pneumoniae* (American Type Culture Collection) in a volume of 50 μ l saline.

Survival. Animals injected i.t. with high doses of bacteria were monitored for survival over the course of 10 d.

Clinical score. The clinical score of each animal was assessed blinded as follows (points in parentheses). [a] appearance: normal (0), lack of grooming (1), piloerection (2), hunched up (3), above and eyes half closed (4); [b] behavior – unprovoked: normal (0), minor changes (1), less mobile and isolated (2), restless or very still (3); behavior – provoked: responsive and alert (0), unresponsive and not alert (3); [c] clinical signs: normal respiratory rate (0), slight changes (1), decreased rate with abdominal breathing (2), marked abdominal

breathing and cyanosis (3); [d] hydration status: normal (0), dehydrated (5). The higher the score is, the worse the clinical situation of the animal.

Temperature. The body temperature of each animal was measured by rectal insertion of a temperature sensor while the mouse was under anesthesia.

CD116 (GM-CSF-R α) antibody injection. 200 μ g anti-GM-CSF-R α (anti-CD116; R&D Systems) was i.p.s. injected 2 h before infection with *E. coli*.

Polyclonal IgM injection. 25 μ g in 50 μ l polyclonal IgM (Rockland) was injected i.t. 3 h after *E. coli* infection.

Cell injection. Sorted cells, as defined below and in figures, were injected i.p.s., i.p., and i.v. at time points defined in figures.

Bacteria

Bacterial titer. Bronchoalveolar lavage (BAL) samples were diluted, plated on tryptic soy agar (BD), and incubated at 37°C. The number of bacterial colonies was assessed 12–14 h later.

Detection of bacterial IgM coating after Pkh26 labeling. *E. coli* were labeled with Pkh26 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. After i.t. infection with 5×10^6 CFU labeled *E. coli*, bacteria in the BAL were stained with anti-IgM-APC and anti-CD45.2-Pacific blue. For FACS analysis, the flow cytometric FSC and SSC setting was set to detect bacteria.

Phagocytosis assay. Phagocytosis was assessed using a pHrodo *E. coli* BioParticles Phagocytosis kit (Invitrogen) as instructed by the manufacturer.

Polyclonality assay. High protein binding capacity microtiter plate wells (Nunc Maxisorp; Sigma-Aldrich) were coated overnight at 4°C with 10^7 CFU of *S. aureus* or *P. aeruginosa*. After washing, a 1% BSA blocking solution was added to each well for 4 h at room temperature. Wells were washed and 200 μ l BAL obtained 6 h after challenging WT mice with either PBS or LPS (*E. coli* O55:B5; Sigma-Aldrich) was added to each well for 4 h at room temperature. After washing, 200 μ l polyclonal anti-IgM-Alexa Fluor 488 antibodies (Abcam) diluted to 1:200 were added for 1 h at room temperature in the dark. Fluorescence was read on a Spectramax M3 plate reader (Molecular Devices). Mouse polyclonal IgM (Rockland) diluted to 1:1,000 served as a positive control for IgM.

Murine leukocytes

Isolation. Peripheral blood for flow cytometry was collected by aortic puncture, using a 50 mM EDTA solution as anticoagulant. Erythrocytes were lysed using RBC Lysis Buffer (BioLegend). Total white blood cell count was obtained by preparing a 1:10 dilution of (undiluted) peripheral blood from the orbital sinus using heparin-coated capillary tubes in RBC Lysis Buffer (BioLegend). After organ harvest, single cell suspensions were obtained as follows: for bone marrow, the femur and tibia of one leg were flushed with PBS through a 40- μ m nylon mesh. Spleens and lymph nodes were homogenized through a 40- μ m nylon mesh, after which erythrocyte lysis was performed using RBC Lysis Buffer (BioLegend). Lungs and liver were cut into small pieces and subjected to enzymatic digestion with 450 U/ml collagenase I, 125 U/ml collagenase XI, 60 U/ml DNase I, and 60 U/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C while shaking. Total viable cell numbers were obtained using Trypan Blue (Cellgro; Corning). For selected experiments, the pleural space was lavaged with 2×1 ml PBS and the peritoneal space was lavaged with 2×5 ml of PBS to retrieve leukocytes. BAL was performed by flushing the lungs with 4×1 ml PBS to retrieve the infiltrated and resident leukocytes. Single-cell suspensions were prepared or cells were MACS-sorted according to the manufacturer's instructions and as described below.

In vitro culture. Cells were cultured in 96-well round-bottom plates (Corning) and kept in a humidified CO₂ incubator at 37°C for 24 h. B1a cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine

serum, 25 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, and 50 μ M β -mercaptoethanol. All cell types were seeded at a density of 30,000 cells/100 μ l medium. Where indicated, LPS was added at 10 μ g/ml. Stimulation of the cells was performed by adding 0.2 μ g/ml rGM-CSF in PBS. The Stat5 inhibitor (CAS 285986–31–4; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) was used at 50 μ g/ml (i.e., 200 nM).

Human leukocytes

Isolation. As part of a collaboration with the Feinstein Institute, cells were separately obtained from fresh peripheral blood samples of human adult healthy donors according to IRB-approved protocols (North Shore-LIJ Health System), and from fresh umbilical cord blood of anonymous donors provided by the Tissue Donation Program at the Feinstein Institute for Medical Research. Mononuclear cells from both adult peripheral (PBL) and umbilical cord (CB) blood were obtained by density gradient separation using lymphocyte separation medium (Cellgro). Cells were also obtained from fresh fluid of patients undergoing paracentesis or thoracentesis at Massachusetts General Hospital who required the procedure for diverse conditions, most frequently cancer. The samples were de-identified for the purposes of this study. The centesis involved sterile prepping of the skin and subcutaneous anesthesia of tissue with Lidocaine. A small 7 Fr thoracentesis catheter was placed in the fluid containing space, allowing removal of the fluid.

In vitro culture. Mononuclear cells (10^5 /200 μ l) were plated in medium alone (RPMI, 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, and $1 \times$ non-essential amino acids [Life Technologies]), or in medium with 2.5 μ g/ml goat anti-human IgA + IgG + IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) and 10 ng/ml IL-2 (PeproTech) in 96-well U-bottom plates. Blocking antibodies were added at 10 μ g/ml and STAT5 inhibitor at 50 μ g/ml. Cells were cultured at 37°C, 5% CO₂ for 2 d. 3 h before harvesting, 0.2 μ l Golgi-Plug (BD) was added to the cultured cells to inhibit intracellular protein transportation. Cultured cells were then harvested and immunofluorescently stained for flow cytometric analysis (see below).

Flow cytometry

The following antibodies were used for flow cytometric analyses. Mouse: anti-CD43-FITC, S7 (BD); anti-Ly6C-FITC, AL-21 (BD); anti-IgM-FITC, II/41 (BD); anti-CD3e-FITC, 145-2C11 (BD); anti-B220-PE, RA3-6B2 (BD); anti-CD19-PE, 1D3 (BD); anti-NK1.1-PE, PK136 (BD); anti-CD49b-PE, DX5 (BD); anti-90.2-PE, 53-2.1 (BD); anti-Ly6G-PE, 1A8 (BD); anti-Ter119-PE, TER-119 (BD); anti-CD43-PE, S7 (BD); anti-GM-CSF-PE, MP1-22E9 (BD); anti-CD131-PE, JRO50 (BD); anti-IgG2A-PE, RTK2758 (BD); anti-IgG1-PE, A85-1 (BD); anti-IgM-PerCPCy5.5, R6-60.2 (BD); anti-MHCII-PerCPCy5.5, AF6-120.1 (BioLegend); anti-CD11c-PerCPCy5.5, HL3 (BD); anti-CD8-PerCPCy5.5, 53-6.7 (BD); anti-IgG2A-PerCP, RTK2758 (BD); anti-CD5-PECy7, 53-7.3 (eBioscience); anti-CD90.2-PECy7, 53-2.1 (BD); anti-CD45.1-PECy7, A20 (BD); anti-F4/80-PECy7, BM8 (BioLegend); anti-IgM-APC, II/41 (BD); anti-CD43-APC, S7 (BD); anti-BrdU-APC (BD); anti-Ly6C-APC, AL-21 (BD); anti-CD25-APC, PC61 (BD); anti-CD138-biotin, 281-2 (BD); anti-MHCII-Alexa Fluor 700, M5/114.15.2 (eBioscience); anti-CD4-Alexa Fluor 700, GK1.5 (eBioscience); anti-CD19-APCCy7, 6D5 (BioLegend); anti-CD11b-APCCy7, M1/70 (BD); anti-IgM-APCCy7, RMM-1 (BioLegend); anti-CD45.2-Pacific blue (BD); anti-CD19-Brilliant Violet 421, 6D5 (BioLegend); anti-IgM-Brilliant Violet 421, RMM-1 (BioLegend); anti-CD11b-Brilliant Violet 421, M1/70 (BioLegend); and anti-CD93, AA4.1-FITC (BD). Streptavidin-Alexa Fluor 700 (Invitrogen) was used to label biotinylated antibodies. B cell populations were identified as described previously (Rauch et al., 2012). Human: anti-CD19-APC-A700, J3-119 (Beckman Coulter); anti-GM-CSF-PE, BVD2-21C11 (BD); anti-CD20-PE-Cy7, L27 (BD); anti-IgM-PacBlue, G20-127 (BD); anti-GM-CSF (blocking), 3209 (R&D Systems); anti-GM-CSFR α (blocking), CD116, K2B7.17A (Millipore); Aqua Live/Dead Stain (Life Technologies), rat IgG2a-isotype-PE (BD).

Intracytoplasmatic staining of IgM. Isolated cells were stained for 30 min with a primary IgM antibody (i.e., APC channel) in a high concentration (1:200) to ensure saturation of surface IgM together with additional surface antibodies in normal concentration (1:700). After cell membrane permeabilization using the Cytofix/Cytoperm Plus kit (BD), intracytoplasmatic IgM was performed using the secondary IgM antibody (i.e., PerCP channel) in a lower concentration (1:350). Data were acquired on either LSRII (BD) or Gallios (Beckman Coulter) flow cytometers and analyzed with FlowJo (v8.8.6/v9.7.2; Tree Star). Cells were sorted on a FACSaria II (BD) cell sorter.

Histology and imaging

Preparation. The lungs were filled with a mixture of O.C.T. compound (Sakura) and PBS (1:1) through trachea before harvesting and embedding in a 2-methylbutane bath (Sigma-Aldrich) on dry ice. Serial 6- μ m fresh-frozen sections were prepared and stored at -80°C until immunohistochemical staining was performed. Lungs from WT/ μ MT, GM/WT, and GM/ μ MT mice were stained with hematoxylin and eosin for overall histological analysis.

Immunohistochemistry. Frozen lung sections were briefly treated with 0.3% hydrogen peroxidase solution for endogenous peroxidase inactivation. The sections were incubated with a neutrophil antibody (NIMP-R14; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 1 h at room temperature, followed by a biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories) and an avidin-biotin complex (ABC) kit (Vector Laboratories). AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) substrate (Dako), which forms a red end-product, was used for the color development. All sections were counterstained with Harris hematoxylin solution (Sigma-Aldrich) and coverslipped using an aqueous mounting medium. All the histological images were captured using a digital slide scanner (Nano-Zoomer 2.0RS; Hamamatsu).

Immunofluorescence microscopy. The lung sections were incubated with anti-CD19, 1D3 (BD), overnight at 4°C and Alexa Fluor 594 goat anti-rat IgG (Invitrogen), followed by anti-IgM-FITC, II/41 (BD). The slides were coverslipped using a mounting medium with DAPI (Vector Laboratories) to identify the nuclei. Images were captured and processed using an epifluorescence microscope (Eclipse 80i; Nikon Instruments Inc.).

Computed tomography (CT). Mice were imaged with CT using an Inveon small animal scanner (Siemens). CT images were reconstructed from 360 cone-beam x-ray projections with a power of 80 keV and 500 μ A. The isotropic resolution of the CT images was 60 μ m. Before CT acquisition, iodine contrast was infused into the pleural space. The CT acquisition time was $\sim$ 10 min. Reconstruction of datasets was done using IRW software (Siemens). Three-dimensional visualizations were produced using the DICOM viewer OsiriX (The OsiriX foundation).

Molecular Biology

ELISA. Human and mouse IgM was measured with an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Bethyl Laboratories, Inc.).

Luminex. Cytokines and chemokines in the bronchoalveolar lavage, the pleural space lavage, and serum were measured using a Luminex panel from Invitrogen.

ELISPOT. Cells were seeded at a density of 1,000–5,000 cells/100 μ l medium. The assay (Mabtech) was performed according to the manufacturer's instructions.

RT-PCR. Total RNA was isolated from $3\text{--}10 \times 10^4$ FACS-sorted cells using the RNeasy Micro kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. cDNA was generated using the iScript Select cDNA Synthesis kit (Bio-Rad Laboratories). Real-time PCR was performed in duplicates using the TaqMan Gene Expression Assay System on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primers for GM-CSF (*Csf2*; *Mm01290062_m1*), Blimp1 (*Prdm1*; *Mm00476128_m1*), and housekeeping gene β -actin

(4352341E) were used (Applied Biosystems). Relative gene expression levels were calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Statistics

Results were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical tests included unpaired, two-tailed Student's *t* test using Welch's correction for unequal variances and one-way ANOVA, followed by Tukey's or Newman-Keuls Multiple Comparison Test. *P*-values of 0.05 or less were considered to denote significance.

The authors thank R. Gorbato and J. Truelove for technical assistance; M. Pectasides for assistance with human cell collection; M. Greene for secretarial assistance; C. Vanderburg for help with Luminex analysis; and M. Waring and A. Chicoine for sorting cells.

This work was supported by National Institutes of Health grant R01HL095612 and R56AI104695 (to F.K. Swirski) and A1029690 (to T.L. Rothstein). G.F. Weber and I. Hilgendorf were supported by the German Research Foundation. B.G. Chousterman was supported by Société Française d'Anesthésie-Réanimation, Institut Servier, Fondation Groupe Pasteur Mutualité, and a Fulbright Scholarship (Monahan Foundation and Harvard French Scholarship Fund). C.S. Robbins was supported by the MGH Executive Committee on Research (ECOR) Postdoctoral Award. I. Theurl was supported by the Max Kade Foundation. L.M.S. Gerhardt was supported by the Boehringer Ingelheim Fonds.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 12 July 2013

Accepted: 4 April 2014

REFERENCES

- Ansel, K.M., R.B. Harris, and J.G. Cyster. 2002. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*. 16:67–76. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00257-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00257-6)
- Baumgarth, N. 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11:34–46. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2901>
- Baumgarth, N., O.C. Herman, G.C. Jager, L.E. Brown, L.A. Herzenberg, and J. Chen. 2000. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 192:271–280. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.192.2.271>
- Bezbradica, J.S., L.E. Gordy, A.K. Stanic, S. Dragovic, T. Hill, J. Hawiger, D. Unutmaz, L. Van Kaer, and S. Joyce. 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates effector differentiation of invariant natural killer T cells during thymic ontogeny. *Immunity*. 25:487–497. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.017>
- Bo, L., F. Wang, J. Zhu, J. Li, and X. Deng. 2011. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit. Care*. 15:R58. <http://dx.doi.org/10.1186/cc10031>
- Boes, M., A.P. Prodeus, T. Schmidt, M.C. Carroll, and J. Chen. 1998. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J. Exp. Med.* 188:2381–2386. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.188.12.2381>
- Bradley, T.R., and D. Metcalf. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:287–300. <http://dx.doi.org/10.1038/icb.1966.28>
- Carey, B., and B.C. Trapnell. 2010. The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clin. Immunol.* 135:223–235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2010.02.017>
- Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga. 2013. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 13:118–132. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3383>
- Choi, Y.S., and N. Baumgarth. 2008. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 205:3053–3064. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20080979>
- Dranoff, G., A.D. Crawford, M. Sadelain, B. Ream, A. Rashid, R.T. Bronson, G.R. Dickersin, C.J. Bachurski, E.L. Mark, J.A. Whitsett, et al. 1994. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*. 264:713–716. <http://dx.doi.org/10.1126/science.8171324>
- Düber, S., M. Hafner, M. Krey, S. Lienenklaus, B. Roy, E. Hobeika, M. Reth, T. Buch, A. Waisman, K. Kretschmer, and S. Weiss. 2009. Induction of B-cell development in adult mice reveals the ability of bone marrow to produce B-1a cells. *Blood*. 114:4960–4967. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-04-218156>
- Ehrenstein, M.R., and C.A. Notley. 2010. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* 10:778–786. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2849>
- Esperatti, M., M. Ferrer, A. Theessen, A. Liapikou, M. Valencia, L.M. Saucedo, E. Zavala, T. Welte, and A. Torres. 2010. Nosocomial pneumonia in the intensive care unit acquired by mechanically ventilated versus nonventilated patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182:1533–1539. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201001-0094OC>
- Esplin, B.L., R.S. Welner, Q. Zhang, L.A. Borghesi, and P.W. Kincade. 2009. A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106:5773–5778. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0811632106>
- Fabrizio, K., A. Groner, M. Boes, and L.A. Pirofski. 2007. A human monoclonal immunoglobulin M reduces bacteremia and inflammation in a mouse model of systemic pneumococcal infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:382–390. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00374-06>
- Fairfax, K.A., L.M. Corcoran, C. Pridans, N.D. Huntington, A. Kallies, S.L. Nutt, and D.M. Tarlinton. 2007. Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene. *J. Immunol.* 178:4104–4111. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4104>
- Greter, M., J. Helft, A. Chow, D. Hashimoto, A. Mortha, J. Agudo-Cantero, M. Bogunovic, E.L. Gautier, J. Miller, M. Leboeuf, et al. 2012. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity*. 36:1031–1046. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.027>
- Guthridge, M.A., J.A. Powell, E.F. Barry, F.C. Stomski, B.J. McClure, H. Ramshaw, F.A. Felquer, M. Dottore, D.T. Thomas, B. To, et al. 2006. Growth factor pleiotropy is controlled by a receptor Tyr/Ser motif that acts as a binary switch. *EMBO J.* 25:479–489. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600948>
- Ha, S.A., M. Tsuji, K. Suzuki, B. Meek, N. Yasuda, T. Kaisho, and S. Fagarasan. 2006. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J. Exp. Med.* 203:2541–2550. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20061041>
- Hamilton, J.A. 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8:533–544. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2356>
- Hamilton, J.A., and A. Achuthan. 2013. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol.* 34:81–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.08.006>
- Hege, K.M., K. Jooss, and D. Pardoll. 2006. GM-CSF gene-modified cancer cell immunotherapies: of mice and men. *Int. Rev. Immunol.* 25:321–352. <http://dx.doi.org/10.1080/08830180600992498>
- Holodick, N.E., K. Repetny, X. Zhong, and T.L. Rothstein. 2009. Adult BM generates CD5⁺ B1 cells containing abundant N-region additions. *Eur. J. Immunol.* 39:2383–2394. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200838920>
- Huffman, J.A., W.M. Hull, G. Dranoff, R.C. Mulligan, and J.A. Whitsett. 1996. Pulmonary epithelial cell expression of GM-CSF corrects the alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 97:649–655. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118461>
- Jones, R.N. 2010. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 51:S81–S87. <http://dx.doi.org/10.1086/653053>
- Jonjić, N., G. Peri, S. Bernasconi, F.L. Sciacca, F. Colotta, P. Pelicci, L. Lanfrancione, and A. Mantovani. 1992. Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J. Exp. Med.* 176:1165–1174. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.176.4.1165>
- Kawahara, T., H. Ohdan, G. Zhao, Y.G. Yang, and M. Sykes. 2003. Peritoneal cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody-producing cells. *J. Immunol.* 171:5406–5414. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5406>

- Kimura, A., M.A. Rieger, J.M. Simone, W. Chen, M.C. Wickre, B.M. Zhu, P.S. Hoppe, J.J. O'Shea, T. Schroeder, and L. Hennighausen. 2009. The transcription factors STAT5A/B regulate GM-CSF-mediated granulopoiesis. *Blood*. 114:4721–4728. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-04-216390>
- Klevens, R.M., J.R. Edwards, C.L.J. Richards Jr., T.C. Horan, R.P. Gaynes, D.A. Pollock, and D.M. Cardo. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep.* 122:160–166.
- LaRosa, S.P., and S.M. Opal. 2012. Immune aspects of sepsis and hope for new therapeutics. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 14:474–483. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-012-0276-2>
- Le, D.T., D.M. Pardoll, and E.M. Jaffee. 2010. Cellular vaccine approaches. *Cancer J.* 16:304–310. <http://dx.doi.org/10.1097/PP0.0b013e3181eb33d7>
- Litvack, M.L., M. Post, and N. Palaniyar. 2011. IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. *PLoS ONE*. 6:e17223. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017223>
- Magret, M., T. Lisboa, I. Martin-Loeches, R. Mániz, M. Nauwynck, H. Wrigge, S. Cardellino, E. Díaz, D. Koulenti, and J. Rello; EU-VAP/CAP Study Group. 2011. Bacteremia is an independent risk factor for mortality in nosocomial pneumonia: a prospective and observational multicenter study. *Crit. Care*. 15:R62. <http://dx.doi.org/10.1186/cc10036>
- Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449:819–826. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06246>
- Metcalf, D., N.A. Nicola, S. Mifsud, and L. Di Rago. 1999. Receptor clearance obscures the magnitude of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses in mice to endotoxin or local infections. *Blood*. 93:1579–1585.
- Mizgerd, J.P. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* 358:716–727. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra074111>
- Moon, H., J.G. Lee, S.H. Shin, and T.J. Kim. 2012. LPS-induced migration of peritoneal B-1 cells is associated with upregulation of CXCR4 and increased migratory sensitivity to CXCL12. *J. Korean Med. Sci.* 27:27–35. <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2012.27.1.27>
- Mui, A.L., H. Wakao, A.M. O'Farrell, N. Harada, and A. Miyajima. 1995. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J.* 14:1166–1175.
- Nurieva, R.I., A. Podd, Y. Chen, A.M. Alekseev, M. Yu, X. Qi, H. Huang, R. Wen, J. Wang, H.S. Li, et al. 2012. STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (T_{fh}) cell generation and function. *J. Biol. Chem.* 287:11234–11239. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.324046>
- Nutt, S.L., K.A. Fairfax, and A. Kallies. 2007. BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 7:923–927. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2204>
- Racine, R., and G.M. Winslow. 2009. IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol. Lett.* 125:79–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.06.003>
- Rauch, P.J., A. Chudnovskiy, C.S. Robbins, G.F. Weber, M. Etzrodt, I. Hilgendorf, E. Tigla, J.L. Figueiredo, Y. Iwamoto, I. Theurl, et al. 2012. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science*. 335:597–601. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1215173>
- Savitsky, D., and K. Calame. 2006. B-1 B lymphocytes require Blimp-1 for immunoglobulin secretion. *J. Exp. Med.* 203:2305–2314. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20060411>
- Schwartz, J.T., J.H. Barker, M.E. Long, J. Kaufman, J. McCracken, and L.A. Allen. 2012. Natural IgM mediates complement-dependent uptake of *Francisella tularensis* by human neutrophils via complement receptors 1 and 3 in nonimmune serum. *J. Immunol.* 189:3064–3077. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200816>
- Scott, J.A., W.A. Brooks, J.S. Peiris, D. Holtzman, and E.K. Mulholland. 2008. Pneumonia research to reduce childhood mortality in the developing world. *J. Clin. Invest.* 118:1291–1300. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI33947>
- Shapiro-Shelef, M., K.I. Lin, L.J. McHeyzer-Williams, J. Liao, M.G. McHeyzer-Williams, and K. Calame. 2003. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. 19:607–620. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00267-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00267-X)
- Snapper, C.M., M.A. Moorman, F.R. Rosas, M.R. Kehry, C.R. Maliszewski, and J.J. Mond. 1995. IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor strongly induce Ig secretion by sort-purified murine B cell activated through the membrane Ig, but not the CD40, signaling pathway. *J. Immunol.* 154:5842–5850.
- Stämpfli, M.R., R.E. Wiley, G.S. Neigh, B.U. Gajewska, X.F. Lei, D.P. Snider, Z. Xing, and M. Jordana. 1998. GM-CSF transgene expression in the airway allows aerosolized ovalbumin to induce allergic sensitization in mice. *J. Clin. Invest.* 102:1704–1714. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI4160>
- Stanley, E., G.J. Lieschke, D. Grail, D. Metcalf, G. Hodgson, J.A. Gall, D.W. Maher, J. Cebon, V. Sinickas, and A.R. Dunn. 1994. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:5592–5596. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.12.5592>
- Timmerman, J.M., J.M. Vose, D.K. Czerwinski, W.K. Weng, D. Ingolia, M. Mayo, D.W. Denney, and R. Levy. 2009. Tumor-specific recombinant idiotype immunisation after chemotherapy as initial treatment for follicular non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma*. 50:37–46. <http://dx.doi.org/10.1080/10428190802563355>
- Venkatachalam, V., J.O. Hendley, and D.F. Willson. 2011. The diagnostic dilemma of ventilator-associated pneumonia in critically ill children. *Pediatr. Crit. Care Med.* 12:286–296. <http://dx.doi.org/10.1097/PCC.0b013e3181fe2ffb>
- Williams, B.G., E. Gouws, C. Boschi-Pinto, J. Bryce, and C. Dye. 2002. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect. Dis.* 2:25–32. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00170-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00170-0)
- Yang, Y., J.W. Tung, E.E. Ghosn, L.A. Herzenberg, and L.A. Herzenberg. 2007. Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:4542–4546. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0700001104>
- Zhan, Y., G.J. Lieschke, D. Grail, A.R. Dunn, and C. Cheers. 1998. Essential roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood*. 91:863–869.

SEPSIS

Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis

Georg F. Weber,^{1,2*} Benjamin G. Chousterman,^{1*} Shun He,^{1*} Ashley M. Fenn,¹ Manfred Nairz,¹ Atsushi Anzai,¹ Thorsten Brenner,³ Florian Uhle,³ Yoshiko Iwamoto,¹ Clinton S. Robbins,¹ Lorette Noiret,¹ Sarah L. Maier,² Tina Zönnchen,² Nuh N. Rahbari,² Sebastian Schölch,² Anne Klotzsche-von Ameln,⁴ Triantafyllos Chavakis,⁴ Jürgen Weitz,² Stefan Hofer,³ Markus A. Weigand,³ Matthias Nahrendorf,¹ Ralph Weissleder,^{1,5} Filip K. Swirski^{1*†}

Sepsis is a frequently fatal condition characterized by an uncontrolled and harmful host reaction to microbial infection. Despite the prevalence and severity of sepsis, we lack a fundamental grasp of its pathophysiology. Here we report that the cytokine interleukin-3 (IL-3) potentiates inflammation in sepsis. Using a mouse model of abdominal sepsis, we showed that innate response activator B cells produce IL-3, which induces myelopoiesis of Ly-6C^{high} monocytes and neutrophils and fuels a cytokine storm. IL-3 deficiency protects mice against sepsis. In humans with sepsis, high plasma IL-3 levels are associated with high mortality even after adjusting for prognostic indicators. This study deepens our understanding of immune activation, identifies IL-3 as an orchestrator of emergency myelopoiesis, and reveals a new therapeutic target for treating sepsis.

Interleukin-3 (IL-3) contributes to leukocyte production, proliferation, and survival (1–4). Myeloid cells such as monocytes and neutrophils produce IL-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), the three inflammatory hallmark cytokines constituting the cytokine storm during septic shock (5–7). Yet despite these links, IL-3's role in sepsis remains unknown. *IL3*^{−/−} mice have normal blood monocyte and neutrophil profiles (fig. S1, A to G) (8) and thus do not require IL-3 for myelopoiesis in the steady state. To test whether IL-3 is important in sepsis, we subjected *IL3*^{−/−} and control wild-type (WT) mice to cecal ligation and puncture (CLP), a model of polymicrobial sepsis (9). Compared to WT mice, *IL3*^{−/−} mice were protected from sepsis, as seen in their lower mortality rates, even after antibiotic treatment (Fig. 1A). *IL3*^{−/−} mice had better clinical scores, body temperatures (Fig. 1B), and blood pressure (Fig. 1C), and their recovery was associated with efficient microbial clearance, indicating that the absence of IL-3 did not compromise bactericidal activity or recognition (Fig. 1D and fig. S2).

To characterize the host response more completely, we performed time-course tissue, cellular, and molecular experiments. At 1 day after CLP, WT mice developed neutrophilia and inflammatory Ly-6C^{high} monocytosis (Fig. 1E), whereas in *IL3*^{−/−} mice, monocyte and neutrophil numbers remained relatively unchanged. The increased cell numbers in WT mice were associated with higher serum levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Fig. 1F). Phagocytic leukocytes were major sources of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , because phagocyte depletion with clodronate liposomes and anti-Ly-6G before CLP abolished the cytokine storm (fig. S3A). However, IL-3-mediated cytokine induction was indirect: Both WT and *IL3*^{−/−} neutrophils and monocytes contained similar intracellular reservoirs of the three cytokines (fig. S3B). Analyzing other leukocytes showed IL-3-dependent differences in T and B cell numbers after CLP (fig. S4A), but no differences in basophils, mast cells (10–12) (fig. S4, B and C), or histamine (fig. S4D), which suggests that IL-3 had little to no effect on basophil and mast cell production and function during the initial inflammation-dominant phase. Consequently, WT but not *IL3*^{−/−} mice accumulated monocytes and neutrophils in the lung (Fig. 1G) and liver (Fig. 1H); developed lung pathology (fig. S5A) with increased protein in bronchoalveolar lavage (fig. S5B); and evolved abnormal liver morphology (fig. S5C) with increased markers of cytolysis in serum (fig. S5D). These data show that IL-3 contributed to septic shock, the most severe form of sepsis (13, 14).

IL-3 promotes hematopoiesis by acting on its receptor, a heterodimer that consists of the IL-

3-specific α chain (CD123) and the common β chain (CD131) (4). In the steady state, Lin[−] c-kit⁺ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), including megakaryocyte and erythrocyte progenitors (MEPs), common myeloid progenitors (CMPs), granulocyte and macrophage progenitors (GMPs), and macrophage and dendritic progenitors (MDPs), expressed CD123 at the same level in both WT and *IL3*^{−/−} mice (Fig. 2A and S6). One day after CLP, the numbers of medullary HSPCs, CMPs, MEPs, and GMPs/MDPs increased over the steady state in WT but not *IL3*^{−/−} mice (Fig. 2B). GMPs are committed to differentiate into monocytes and neutrophils (15). We therefore pursued fate-mapping experiments involving adoptively transferring green fluorescent protein-positive (GFP⁺) GMPs into WT or *IL3*^{−/−} mice. In response to CLP, the bone marrow of WT mice contained a larger population of GFP⁺ cells than the bone marrow of *IL3*^{−/−} mice, indicating IL-3-dependent progenitor expansion (Fig. 2C). To bolster this observation, we placed Lin[−] bone marrow cells (containing predominantly HSPCs) in vitro in medium either alone or supplemented with IL-3, lipopolysaccharide (LPS), or both. We found that IL-3, but not LPS, increased cell expansion and generated myeloid cells well above the numbers initially placed into culture (Fig. 2D). Although IL-3 alone modestly affected IL-1 β , IL-6, and TNF- α production, combined IL-3 and LPS exacerbated the response (Fig. 2E). These data suggest that IL-3 is responsible for the cytokine storm, albeit indirectly, by generating a large pool of cells that, upon recognizing bacterial components, produce cytokines in larger quantities.

To determine whether IL-3 can trigger severe sepsis in vivo, whether it can do so alone or in combination with infection, and whether it relies on its specific receptor, we injected (i) recombinant IL-3 (rIL-3) into otherwise healthy WT mice; (ii) anti-CD123 into WT mice subjected to CLP; and (iii) rIL-3 into *IL3*^{−/−} mice subjected to CLP. rIL-3 augmented GMPs in the bone marrow and leukocyte numbers in the blood of healthy WT mice to levels akin to those in WT mice subjected to CLP (Fig. 2F). Despite this increase, rIL-3 per se did not induce a cytokine storm in the absence of infection (Fig. 2G), thus confirming our in vitro observations. Conversely, anti-CD123 attenuated cell numbers in WT CLP mice (Fig. 2F) and tended to decrease serum cytokines (although the differences were not statistically significant) (Fig. 2G) without depleting HSPCs (fig. S7). *IL3*^{−/−} mice receiving rIL-3 in the context of CLP augmented medullary GMP, circulating neutrophil, and Ly-6C^{high} monocyte numbers (Fig. 2F). These increases corresponded to higher cytokine levels in serum (Fig. 2G). Ultimately, WT mice treated with anti-CD123 had a modest but significant improvement in survival (Fig. 2H), whereas *IL3*^{−/−} mice receiving rIL-3 succumbed to infection and died as often as WT mice (Fig. 2I). These data confirm the effects of IL-3 on cell production and survival and identify the IL-3–CD123 axis as a potential new therapeutic target for treating sepsis.

Activated T cells (16) and thymic epithelial cells (17) produce IL-3 in the steady state, but the

¹Center for Systems Biology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. ²Department of Visceral, Thoracic and Vascular Surgery, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany. ³Department of Anesthesiology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. ⁴Department of Clinical Pathobiochemistry and Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany. ⁵Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. E-mail: fswirski@mgh.harvard.edu (F.K.S.); georg.weber@uniklinikum-dresden.de (G.F.W.)

cytokine's source in sepsis is unknown. mRNA profiling identified the spleen, thymus, and lymph nodes as hubs of basal *Il3* expression. After CLP, *Il3* mRNA progressively increased in the spleen, followed by the thymus and lymph nodes, with no signal in the bone marrow, lung, liver, peritoneum, or duodenum (Fig. 3A). As indicated by flow cytometry (Fig. 3, B and C) and Western blots

(Fig. 3D), IL-3⁺ cells were CD19⁺ B cells. According to enzyme-linked immunosorbent assay, IL-3 levels increased in serum after CLP (Fig. 3E) but to a lesser extent in splenectomized mice (Fig. 3E).

Identifying B cells as sources of IL-3 prompted testing of whether IL-3-producing B cells resemble innate response activator (IRA) B cells (fig. S8A),

whose GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) product protects against sepsis and pneumonia via polyreactive immunoglobulin M (IgM) (18, 19). Phenotypic profiling showed that splenic IL-3 producers were IgM^{high} CD23^{low} CD19⁺ CD138^{high} CD43⁺ VLA4⁺ (Fig. 3F and fig. S8B), as well as CD5^{int} LFA1⁺ CD284⁺ CD11b^{low/-} (fig. S8C). This phenotype matches that of IRA

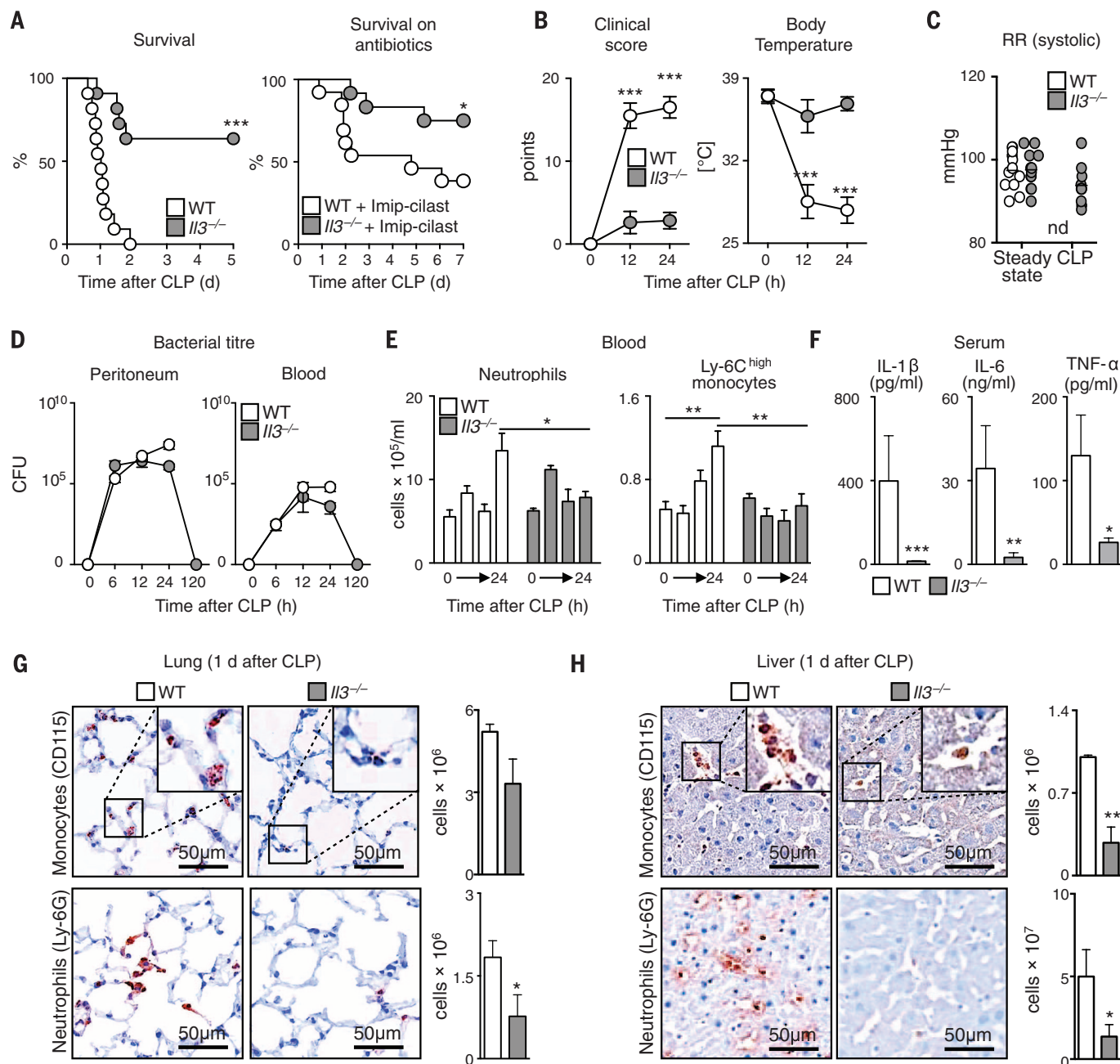


Fig. 1. IL-3 is detrimental in experimental sepsis. Comparison of *Il3*^{-/-} and Balb/c (WT) mice during experimental sepsis using the CLP model. **(A)** Kaplan-Meier survival curve in mice not receiving antibiotics ($n = 10$ mice per group) and in mice receiving antibiotics (Imipenem) ($n = 12$ or 13 per group), d, days. **(B)** Clinical score and body temperature ($n = 6$ to 10 per group), h, hours. **(C)** Blood pressure. The blood pressure in WT mice was below the detection limit ($n = 6$ to 10 per group). **(D)** Bacterial titer of peritoneal cavity and blood ($n = 3$ to 10 per group). **(E)** Enumeration of neutrophils and Ly-6C^{high} mono-

cytes in 1 ml of blood at 0, 6, 12, and 24 hours after CLP ($n = 3$ to 12 per group). **(F)** Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in serum 1 day after CLP ($n = 8$ or 9 per group). **(G** and **H)** Immunohistochemical staining and flow cytometric enumeration of monocytes (CD115) and neutrophils (Ly-6G) in entire lung (G) and liver (H) tissue 1 day after CLP ($n = 6$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Error bars indicate means $\pm$ SEM. Significance was assessed by log rank test (A) or Mann-Whitney test [(B) to (H)]. Data are the result of $N \geq 2$ independent experiments and are grouped.

B cells (18–20). The remaining, non-B IL-3-positive cells in the spleen and thymus were CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and non-T, non-B cells (fig. S8D).

By comparing IL-3 and GM-CSF, which are two IRA B cell products, we determined that the growth factors are not interdependent: In response to CLP, the spleens of *Cs2*^{-/-} mice accumulated IL-3-producing IRA B cells, whereas *Il3*^{-/-} mice accumulated GM-CSF-producing IRA B cells (fig. S9A). On the one hand, in contrast to GM-CSF (19), IL-3 was not essential to IgM production (fig. S9, B and C). On the other hand, unlike IL-3, GM-CSF was dispensable for emergency myelopoiesis (fig. S9D, E). The IL-3-producing IRA B cells were readily visualized by

immunofluorescence and increased in frequency after CLP (Fig. 3, G and H, and fig. S10). Thus, IRA B cells can both protect against and aggravate sepsis, depending on the particular growth factor they produce.

Peritoneal B1 cells relocate to the spleen after peritoneal LPS challenge (21) and differentiate to IRA B cells (18). To determine whether IL-3⁺ B cells arise similarly, we transferred B1 cells from the peritoneum of naïve GFP⁺ mice into the peritoneum of WT mice. Two days after CLP, IL-3⁺ (Fig. 3I) and GM-CSF⁺ B cells (fig. S11) accumulated in the spleen, indicating peritoneal B cell relocation, splenic accumulation, and IRA B cell differentiation. To test whether IL-3-producing B cells are important in sepsis, we transferred peri-

toneal B1 B cells from WT or *Il3*^{-/-} mice into *Il3*^{-/-} mice subjected to CLP and found increased monocyte levels, cytokine levels, and morbidity in WT B cell recipients (Fig. 3J). Overall, the data show that IL-3-producing IRA B cells induce emergency myelopoiesis and potentiate septic shock in a mouse sepsis model.

Because the validity of mouse sepsis models as mirrors of human disease has been challenged (22, 23), we sought to determine whether our experimental findings correlate with the pathogenesis of human sepsis. First, we retrospectively analyzed plasma from a cohort of septic patients [RAMSES cohort, *n* = 60 (table S1)] (24) and found that IL-3 levels during the first 24 hours after the onset of sepsis predicted death: Patients

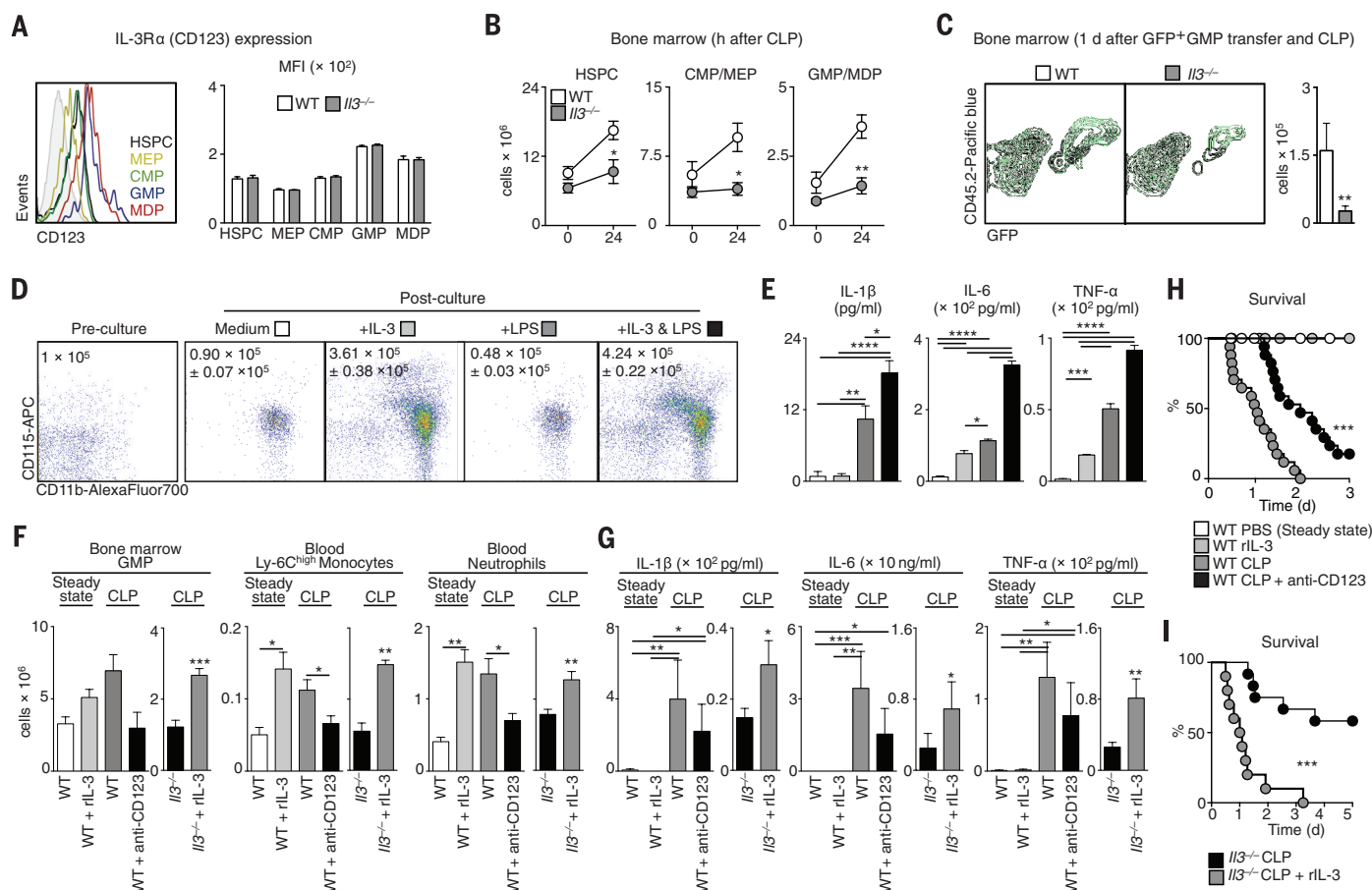


Fig. 2. IL-3 induces emergency hematopoiesis and potentiates the cytokine storm in sepsis. (A) Surface expression of IL-3Rα (CD123) on HSPCs, MEPS, CMPs, GMPs, and MDPs in bone marrow of WT and *Il3*^{-/-} mice (*n* = 3 per group). A representative plot of *n* = 3 is shown. (B) Enumeration of HSPCs, CMPs/MEPs, and GMPs/MDPs in bone marrow in a steady state and 1 day after CLP in WT and *Il3*^{-/-} mice (*n* = 3 per group). (C) Analysis and enumeration of GFP⁺ cells retrieved from the bone marrow 1 day after CLP from WT and *Il3*^{-/-} mice that received 2 × 10⁵ GFP⁺ GMP intravenously before CLP (*n* = 3 per group). (D) Bone marrow cells were sorted for Lin⁻ cells (i.e., enriched in HSPCs). Shown are representative CD11b versus CD115 flow cytometry plots showing cell phenotype just before placement into culture and 4 days after in vitro culture in the indicated conditions. The numbers inside the plots denote cells plated and retrieved (*n* = 4 per group). (E) Supernatant levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α in the four post-culture groups shown in (D). Values are the result of

technical triplicates from *n* = 2 experiments. (F) Enumeration of indicated cell types in (i) WT mice at a steady state; (ii) WT mice receiving rIL-3 alone; (iii) WT mice subjected to CLP; (iv) WT mice subjected to CLP and receiving antibody to CD123; (v) *Il3*^{-/-} mice subjected to CLP; and (vi) *Il3*^{-/-} mice subjected to CLP and receiving rIL-3 (*n* = 4 to 10). (G) Serum levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α in the six groups shown in (F) (*n* = 4 to 10). (H) Kaplan-Meier survival curves showing the four WT mouse groups (*n* = 6 to 17 per group). (I) Kaplan-Meier survival curves showing the two *Il3*^{-/-} mouse groups (*n* = 10 per group) (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001). Error bars indicate means ± SEM. Significance was assessed by Mann-Whitney test [(B), (C), (F), and (G)]; one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison test (E); Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test [(F) and (G)]; and log rank [(H) and (I)]. Data are the result of *N* = 2 independent experiments acquired in triplicates (in vitro) and *n* ≥ 2 independent experiments (in vivo), and are grouped.

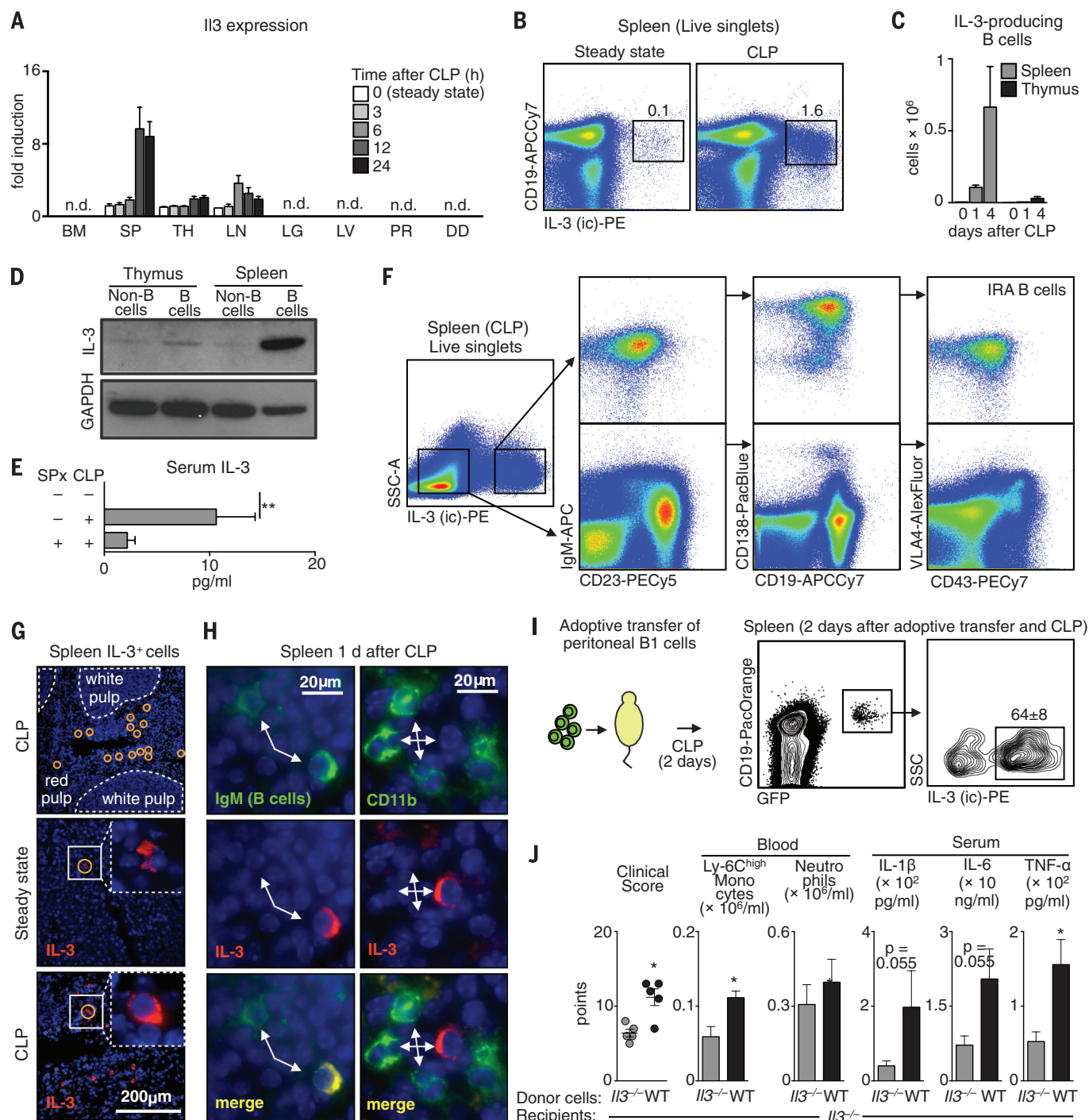


Fig. 3. IRA B cells are major sources of IL-3 in sepsis. (A) *Il3* mRNA expression in the indicated organs during a steady state and 3, 6, 12, and 24 hours after CLP ($n = 6$ to 8). (B) Identification of IL-3-producing cells in the spleen 4 days after CLP. (C) Enumeration of IL-3-producing B cells in spleen and thymus in a steady state and 1 and 4 days after CLP ($n = 5$). (D) Western blot showing IL-3 expression by B cells and non-B cells sorted from the spleen and thymus 1 day after CLP. (E) IL-3 serum levels in a steady state and 1 day after CLP with and without splenectomy (SPx) ($n = 3$ to 6). (F) Flow cytometric plots show the phenotype of IL-3⁺ and IL-3⁻ cells retrieved from the spleen after CLP. A representative plot of $n = 5$ is shown. (G) Immunofluorescence

microscopy of spleen tissue in the steady state and 1 day after CLP. (H) Co-staining of representative IL-3⁺ cells with IgM. (I) Adoptive transfer of 1.5×10^6 peritoneal B1 B cells from GFP⁺ mice into WT mice subjected to CLP at the time of cell transfer. Representative plots from flow cytometric analysis of $n = 3$ mice are shown. (J) Adoptive transfer of 3×10^6 peritoneal B1 B cells from WT or *Il3*^{-/-} mice to the peritoneum of *Il3*^{-/-} recipients subjected to CLP. Data show the clinical score, number of Ly-6C^{high} monocytes, neutrophils, and serum cytokines 1 day after CLP ($n = 5$). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Error bars indicate means $\pm$ SEM. Significance was assessed by a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test (E) and a Mann-Whitney test (J).

with IL-3 plasma levels >87.4 pg/ml at admission had a poor prognosis (fig. S12, A and B, and table S2). We therefore decided to test, in a new prospective cohort [SEPI-3 cohort, $n = 37$ (table S3)], whether IL-3 and blood monocytes correlate. In septic patients monitored over 28 days, blood leukocyte numbers peaked at the onset of sepsis and decreased slowly thereafter (Fig. 4A). The increase was associated with a sharp spike of plasma cytokines (Fig. 4B). Compared to healthy volunteers, mean IL-3 in septic patient plasma did not differ (Fig. 4C). Nevertheless, the detectable levels of IL-3 correlated with circu-

lating monocyte levels in septic patients (Fig. 4D). Kaplan-Meier survival analysis showed that patients with plasma levels of >89.4 pg/ml had a poor prognosis (fig. S13 and table S4), thus confirming the results from the RAMMSES cohort. Pooling the cohorts showed the impact of IL-3 on survival to be even more striking (odds ratio: 4.979; confidence interval: 1.680 to 14.738 and $P = 0.001$ for the Kaplan-Meier survival curve) (Fig. 4E). The association remained significant after adjusting for prognostic parameters in multivariate analyses (table S5), whereas multivariate logistic regression analyses con-

sistently showed improvement in the death prediction when IL-3 was included, as shown by a reduction of the Akaike information criterion and an increase of McFadden's pseudo R^2 (table S6). We also conducted flow cytometry and immunofluorescence on human spleens from patients undergoing splenectomy. By flow cytometry, we found $CD20^+ HLADR^{int} CD19^{high} IgM^{int/high}$ B and $CD3^+$ T cells to be producers of IL-3 (Fig. 4F and fig. S14A). In tissue sections, human spleens contained IL-3-producing $CD19^+$ and IgM^+ B cells (Fig. 4G and fig. S14, B and C), suggesting that IL-3-producing IRA B cells

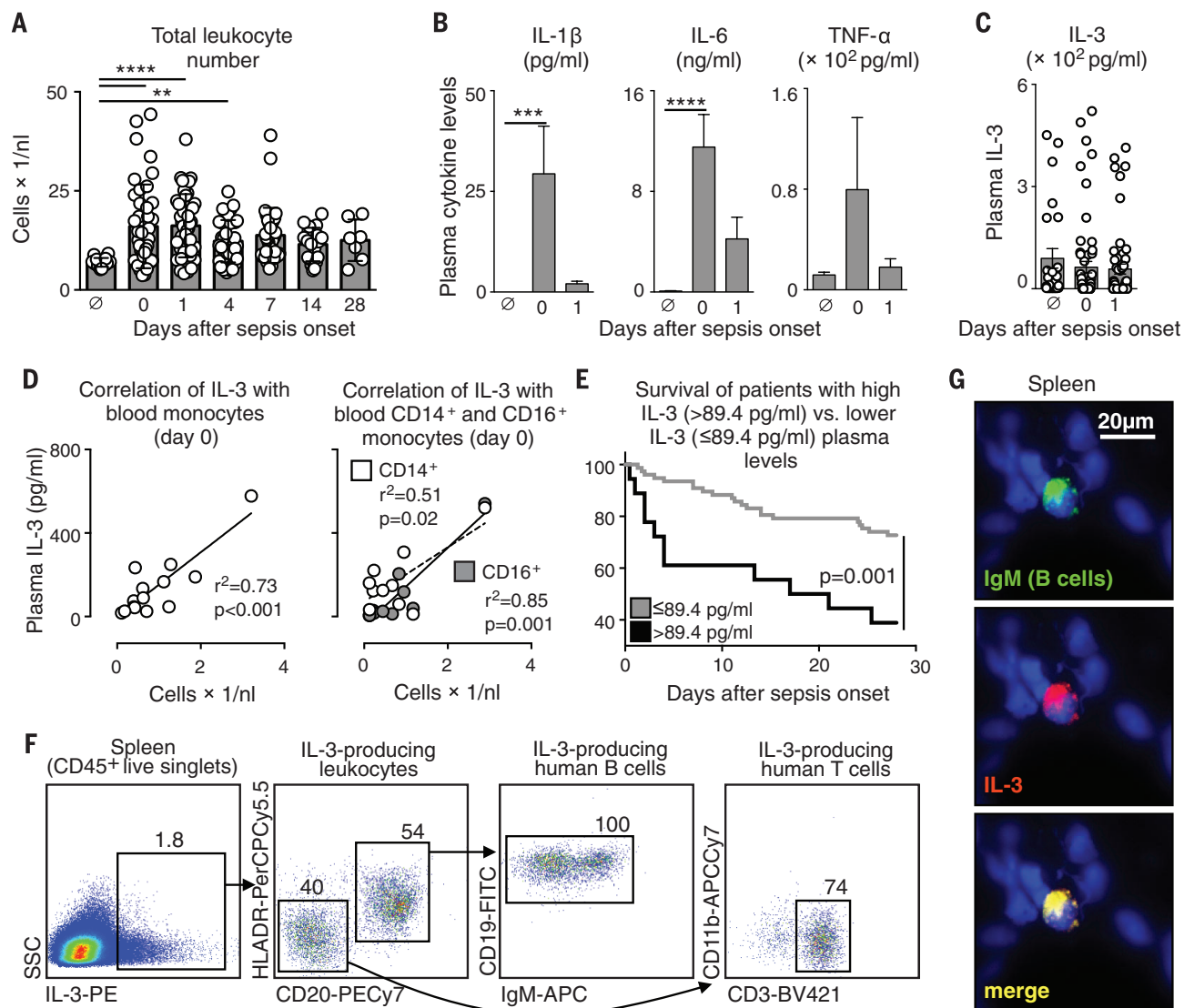


Fig. 4. IL-3 is an independent early predictor for outcome in human sepsis.

(A) Total leukocyte number in nonseptic people and in septic patients at the time of sepsis onset (0) and 1, 4, 7, 14, and 28 days later. (B) Plasma levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in nonseptic people ($n = 18$) and in septic patients at the time of sepsis onset ($n = 37$) and 1 day later ($n = 17$). (C) IL-3 plasma levels in healthy people and in patients at sepsis onset and 1 day later. (D) Correlation of IL-3 plasma levels with total blood monocytes and with CD14 $^+$ and CD16 $^+$ blood monocytes in septic patients with measurable IL-3 plasma levels. (E) Kaplan-Meier analysis showing the survival of patients in the RAMMSES and SEPI-3 studies with IL-3 at >89.4 pg/ml (top quintile, measured within

1 day after sepsis onset) versus the survival of patients with IL-3 ≤ 89.4 pg/ml. (F) Representative flow cytometry plot of $n = 2$ patients showing the identity of IL-3-producing human splenocytes. (G) Immunofluorescence of human spleen showing IL-3-producing B cells in high magnification ($\times 60$). A representative immunofluorescence section of $n = 6$ spleens is shown ($*P < 0.05$, **** $P < 0.0001$). Error bars indicate means $\pm$ SEM. Significance was assessed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test [(A) and (C)], a Pearson correlation test (D), and log rank (E). Data in (A) to (D) are from the SEPI-3 cohort; data in (E) are pooled from the RAMMSES and SEPI-3 cohorts.

amplify inflammation in humans as well as mice (fig. S15).

Mortality from sepsis ranges between 30 and 50% and is rising because of drug-resistant organisms, a growing elderly population, and an increased incidence of immunosuppression (25–28). The failures of anti-Toll-like receptor 4, recombinant activated protein C, and anti-TNF- α therapies in clinical trials necessitate a rethinking of sepsis' pathophysiology (6, 29–33). Because many early-phase inflammatory cytokines operate concurrently and redundantly, identifying upstream triggers may generate therapies with broad downstream benefits. Altogether, the evidence shown here supports the hypothesis that IL-3 mediates experimental and human sepsis, is a major upstream orchestrator of the septic inflammatory phase, and can be harnessed for therapeutic intervention.

REFERENCES AND NOTES

- Y. C. Yang *et al.*, *Cell* **47**, 3–10 (1986).
- A. J. Hapel, J. C. Lee, W. L. Farrar, J. N. Ihle, *Cell* **25**, 179–186 (1981).
- J. N. Ihle, L. Peppersack, L. Rebar, *J. Immunol.* **126**, 2184–2189 (1981).
- G. T. Williams, C. A. Smith, E. Spooner, T. M. Dexter, D. R. Taylor, *Nature* **343**, 76–79 (1990).
- D. C. Angus, T. van der Poll, *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
- R. S. Hotchkiss, G. Monneret, D. Payen, *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–874 (2013).
- C. S. Deutschman, K. J. Tracey, *Immunity* **40**, 463–475 (2014).
- Materials and methods are available as supplementary materials on Science Online.
- D. Rittirsch, M. S. Huber-Lang, M. A. Flierl, P. A. Ward, *Nat. Protoc.* **4**, 31–36 (2009).
- M. C. Jamur, C. Oliver, *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **S3**, 1390–1406 (2011).
- D. Voehringer, *Eur. J. Immunol.* **42**, 2544–2550 (2012).
- E. Rönneberg *et al.*, *Immunology* **143**, 155–163 (2014).
- D. Annane, E. Bellissant, J. M. Cavallion, *Lancet* **365**, 63–78 (2005).
- P. A. Ward, *EMBO Mol. Med.* **4**, 1234–1243 (2012).
- M. Kondo *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 759–806 (2003).
- J. E. Groopman, J. M. Molina, D. T. Scadden, *N. Engl. J. Med.* **321**, 1449–1459 (1989).
- A. H. Dalloul *et al.*, *Blood* **77**, 69–74 (1991).
- P. J. Rauch *et al.*, *Science* **335**, 597–601 (2012).
- G. F. Weber *et al.*, *J. Exp. Med.* **211**, 1243–1256 (2014).
- I. Hilgendorf *et al.*, *Circulation* **129**, 1677–1687 (2014).
- S. A. Ha *et al.*, *J. Exp. Med.* **203**, 2541–2550 (2006).
- J. Seok *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3507–3512 (2013).
- K. Takao, T. Miyakawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 1167–1172 (2015).
- T. Brenner *et al.*, *Crit. Care Med.* **18**, 683 (2014).
- G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, M. Moss, *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546–1554 (2003).
- K. A. Wood, D. C. Angus, *Pharmacoeconomics* **22**, 895–906 (2004).
- M. Bosmann, P. A. Ward, *Trends Immunol.* **34**, 129–136 (2013).
- C. M. Coopersmith *et al.*, *Crit. Care Med.* **40**, 1072–1079 (2012).
- E. Dolgin, *Nat. Med.* **18**, 1000 (2012).
- S. M. Opal *et al.*, *Crit. Care Med.* **25**, 1115–1124 (1997).
- J. S. Boomer *et al.*, *JAMA* **306**, 2594–2605 (2011).
- R. S. Hotchkiss, C. M. Coopersmith, J. E. McDunn, T. A. Ferguson, *Nat. Med.* **15**, 496–497 (2009).
- P. A. Ward, *JAMA* **306**, 2618–2619 (2011).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Greene for secretarial assistance, M. Waring and A. Chicoine for sorting cells, and K. Joyes for editing the

manuscript. The data presented in this manuscript are tabulated in the main paper and in the supplementary materials. The General Hospital Corporation has filed a patent application (61/973,458) with the U.S. Patent and Trademark Office entitled “Agents and Methods for Diagnosing and Treating Sepsis,” which names F.K.S. and G.F.W. as inventors. *IL3^{-/-}* mice are available from Riken, Japan, under a materials transfer agreement. This work was supported by NIH grants 5R01HL095612 and R56-AI104695 and the Massachusetts General Hospital Howard M. Goodman Fellowship (F.K.S.). G.F.W. was supported by the German Research Foundation (WE4892/1-2 and 3-1). B.G.C. was supported by the Société Française d’Anesthésie-Réanimation (SFAR), Institut Servier, Fondation Groupe Pasteur Mutualité, and Fulbright Scholarships (Monahan Foundation and Harvard French

Scholarship Fund). M.N. was supported by an Erwin Schrödinger Fellowship of the Austrian Science Fund FWF (J3486-B13). The authors declare no conflicts of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencemag.org/content/347/6227/1260/suppl/DC1

Materials and Methods

Figs. S1 to S15

Tables S1 to S6

References (34–36)

4 December 2014; accepted 21 January 2015
10.1126/science.aaa4268

CIRCADIAN RHYTHMS

Time-restricted feeding attenuates age-related cardiac decline in *Drosophila*

Shubhroz Gill,^{1,2} Hiep D. Le,¹ Girish C. Melkani,^{3*} Satchidananda Panda^{1*}

Circadian clocks orchestrate periods of rest or activity and feeding or fasting over the course of a 24-hour day and maintain homeostasis. To assess whether a consolidated 24-hour cycle of feeding and fasting can sustain health, we explored the effect of time-restricted feeding (TRF; food access limited to daytime 12 hours every day) on neural, peripheral, and cardiovascular physiology in *Drosophila melanogaster*. We detected improved sleep, prevention of body weight gain, and deceleration of cardiac aging under TRF, even when caloric intake and activity were unchanged. We used temporal gene expression profiling and validation through classical genetics to identify the TCP-1 ring complex (TRiC) chaperonin, the mitochondrial electron transport chain complexes, and the circadian clock as pathways mediating the benefits of TRF.

To determine whether a daily rhythm of feeding and fasting without reducing caloric intake can improve health metrics, we subjected a 2-week-old wild-type (WT) Oregon-R strain (table S1) of *Drosophila melanogaster* adults to ad libitum feeding (ALF) or 12-hour time-restricted feeding (TRF) of a standard cornmeal diet exclusively during daytime. At nighttime, the TRF cohorts were placed in vials with 1.1% agar to prevent desiccation (fig. S1A). The daily food intake was equivalent in both groups, although ALF flies consumed some of their food during nighttime (Fig. 1A). Unlike ALF flies, the TRF group did not gain body weight at 5 and 7 weeks of age (Fig. 1B). The ability to fly (flight index) was slightly improved in the TRF group (Fig. 1C). Although the total daily activity was equivalent between both groups of flies (Fig. 1D), the TRF flies were more active during daytime. Sleep (defined as five consecutive minutes of

inactivity) (*I*) assessment revealed that flies on TRF had less daytime sleep, but more nighttime and more total sleep, than the ALF flies (Fig. 1E and fig. S1).

Increase in sleep duration correlates with improved cardiac function (2). Therefore, by high-speed video imaging of ex vivo denervated hearts bathed in artificial hemolymph (3), we measured the diameter of the beating *Drosophila* heart at full relaxation and contraction and the time interval between successive contractions to calculate cardiac function parameters (Fig. 2A). At 3 weeks of age, the performance of both ALF and TRF hearts was indistinguishable with equivalent heart period (HP), systolic diameter (SD), systolic interval (SI), diastolic diameter (DD), diastolic interval (DI), arrhythmia index (AI), and heart contractility, measured as fractional shortening (FS) (Fig. 2, B to F; fig. S2; and movie S1). In the next 2 weeks, the cardiac performance in ALF flies exhibited characteristic age-dependent deterioration (4), with increased SI, DI, HP, and AI and reduced DD, SD, and FS. TRF flies showed smaller changes in these cardiac performance parameters in both genders (fig. S2).

We investigated whether a limited period of TRF early or late in life could attenuate age-dependent

¹Regulatory Biology Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA 92037, USA. ²Division of Biological Sciences, University of California San Diego, La Jolla, CA 92037, USA. ³Department of Biology, Molecular Biology Institute, and Heart Institute, San Diego State University, San Diego, CA 92182, USA.

*Corresponding author. E-mail: gmelkani@mail.sdsu.edu (G.C.M.); satchin@salk.edu (S.P.)

This copy is for your personal, non-commercial use only.

If you wish to distribute this article to others, you can order high-quality copies for your colleagues, clients, or customers by [clicking here](#).

Permission to republish or repurpose articles or portions of articles can be obtained by following the guidelines [here](#).

The following resources related to this article are available online at www.sciencemag.org (this information is current as of August 11, 2015):

Updated information and services, including high-resolution figures, can be found in the online version of this article at:

<http://www.sciencemag.org/content/347/6227/1260.full.html>

Supporting Online Material can be found at:

<http://www.sciencemag.org/content/suppl/2015/03/11/347.6227.1260.DC1.html>

A list of selected additional articles on the Science Web sites **related to this article** can be found at:

<http://www.sciencemag.org/content/347/6227/1260.full.html#related>

This article **cites 35 articles**, 10 of which can be accessed free:

<http://www.sciencemag.org/content/347/6227/1260.full.html#ref-list-1>

This article has been **cited by** 2 articles hosted by HighWire Press; see:

<http://www.sciencemag.org/content/347/6227/1260.full.html#related-urls>

This article appears in the following **subject collections**:

Immunology

<http://www.sciencemag.org/cgi/collection/immunology>



Supplementary Materials for

Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis

Georg F. Weber,* Benjamin G. Chousterman, Shun He, Ashley M. Fenn, Manfred Nairz, Atsushi Anzai, Thorsten Brenner, Florian Uhle, Yoshiko Iwamoto, Clinton S. Robbins, Lorette Noiret, Sarah L. Maier, Tina Zönnchen, Nuh N. Rahbari, Sebastian Schölch, Anne Klotzsche-von Ameln, Triantafyllos Chavakis, Jürgen Weitz, Stefan Hofer, Markus A. Weigand, Matthias Nahrendorf, Ralph Weissleder, Filip K. Swirski*

*Corresponding author. E-mail: fswirski@mgh.harvard.edu (F.K.S.); georg.weber@uniklinikum-dresden.de (G.F.W.)

Published 13 March 2015, *Science* **347**, 1260 (2015)
DOI: 10.1126/science.aaa4268

This PDF file includes:

Materials and Methods
Figs. S1 to S15
Tables S1 to S6
References (34–36)

Materials and Methods

Humans

Human data from prospective measurements of Interleukin-3 and secondary analyses of patients participating in the RAMMSES-trial (German Clinical Trials Register: DRKS00000505). This observational clinical study was first approved by the local ethics committee (Trial-Code-Nr.: S123-2009) on June, 8th 2009. For the presented IL-3 measurements an amendment was submitted to the local ethics committee which was approved on November, 22th 2013. *Human data from prospective measurements of Interleukin-3 and analyses of patients participating in the SEPIL-3-trial.* This observational clinical study was first approved by the local ethics committee (Trial-Code-Nr.: EK 308082013) on September, 19th 2013. The observational clinical studies were conducted in the surgical intensive care unit of the University Hospital of Heidelberg, Germany, and the surgical intensive care unit of the University Hospital of Dresden, Germany. Study patients or their legal designees signed written informed consent. In total, 60 patients within the *RAMMSES-cohort* and 40 patients within the *SEPIL-3-cohort* with septic shock, classified according to the criteria of the International Sepsis Definitions Conference (34), were enrolled with an onset of sepsis syndrome ≤ 24 hours. 3 patients in *SEPIL-3* were excluded from analysis for not meeting study criteria. Blood samples from patients were collected at sepsis onset, and 1, 4, 7, 14, and 28 days later. After blood collection, plasma of all study participants was immediately obtained by centrifugation, transferred into cryotubes, and stored at -80°C until further processing. Quantification of IL-3 in human plasma samples was performed using an enzyme linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) in combination with chemiluminescent detection for increased sensitivity. The assays were performed according to the manufacturer's instructions and measured in a microplate reader set to luminescence mode (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) with an integration time of 2 seconds per well, yielding a sensitivity of 3.9 pg/ml IL-3. Quantification of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in human samples was performed using an enzyme linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) according to the manufacturer's

instructions. In the *SEPIL-3-trial* heparinized blood samples were immediately processed for flow cytometric analysis of leukocyte surface markers after Erythrocytes were lysed using RBC Lysis Buffer (BioLegend). *Spleen tissue (6 patients)*: After splenectomy for various indications (within an additional clinical study approved by the local ethics committee with Trial-Code-Nr.: EK 76032013; study patients signed written informed consent) fresh spleen samples were obtained, directly embedded in O.C.T. compound (Sakura), frozen at -80°C, and stored for immunofluorescence staining and microscopy. Two additional spleens were directly processed for flow cytometric analysis. Spleen tissue was homogenized through a 40 µm-nylon mesh, after which erythrocyte lysis was performed on the spleen sample using RBC Lysis Buffer (BioLegend). *Controls*: Within the *RAMMSES*- and *SEPIL-3-trial* healthy volunteers without signs of sepsis served as controls.

Animals

Balb/c mice (WT), C57BL/6 (WT), and CByJ.B6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J (GFP⁺) female mice (from Jackson Laboratories) were used in this study. IL-3 deficient mice (*Il3*^{-/-}) on a Balb/c background were obtained from RIKEN BRC Laboratories, Japan. GM-CSF-deficient mice (*Csf2*^{-/-}) on a C57BL/6 background were bred in-house. All mice were 8-12 weeks of age at the time of sacrifice. All protocols were approved by the Animal Review Committee at Massachusetts General Hospital.

Animal models and *in vivo* interventions

Endotoxin-induced peritonitis and peritoneal lavage: Where indicated, mice were administered 25 µg of LPS (Sigma), by i.p. injections in PBS. *Cecal ligation and puncture (CLP)*: This rodent model of sepsis was carried out as previously described (9). In brief, the peritoneal cavity was opened during isoflurane anesthesia, and the cecum was exteriorized and ligated at different points distal of the ileo-cecal valve using a non-absorbable 7-0 suture. To induce high-grade CLP ~60-80% of the cecum was ligated; to induce mid-grade CLP ~30-50% of the cecum was ligated. The distal end of the cecum

was then perforated using a 23 G needle, and a small drop of feces was extruded through the puncture. The cecum was relocated into the peritoneal cavity and the peritoneum was closed. Animals were resuscitated by s.c. injection of 1 mL of saline. Age-matched controls were included for all procedures. In general, only experiments testing survival utilized high-grade CLP. *Splenectomy*: Under isofluorane anesthesia, the peritoneal cavity of mice was opened and the splenic vessels were ligated using a 6.0 silk suture. The spleen was then carefully removed. For control experiments, the peritoneum was opened, but the spleen was not excised. *Cell and protein transfer*: B1 cells, B1a cells, and GMP were FACS sorted from the peritoneum or bone marrow of WT, *Il3*^{-/-}, or naïve GFP⁺ mice. Cells were injected into the peritoneum or the tail vein of recipient mice as indicated. *IL-3 injection*: *Il3*^{-/-} mice were injected with 5 µg recombinant IL-3 (R&D Systems), twice, in 50 µl PBS or 50 µl PBS alone into the tail vein 30 min and 12 h after CLP. WT animals were injected with an IL-3 complex, as previously described (35). IL-3 (10 µg; R&D Systems) was mixed with anti-IL-3 Ab (5 µg; MP2-8F8, BD Pharmingen) at RT for 1 min and the complex (in 200 µl saline) was injected into each mouse into the tail vein at the beginning of the experiment. Mice were sacrificed at 24 h. *Anti-CD123 injection*: 200 µg anti-CD123 or 200 µg IgG1 isotype control (Biolegend) in 200 µl PBS were injected into the tail vein of WT mice 1, 6, and 24 h after CLP was performed. Mice were sacrificed at 24 h (cytokine analysis) or 48 h (cell analysis). *Phagocyte depletion*: To deplete neutrophils and monocytes, 200 µg of anti-Ly6G (isotype 1A8, Biolegend) antibody were injected into the tail vein 48 h before the CLP and 200 µl of clodronate liposome were injected into the tail vein 24 h and 6 h before CLP; control mice were injected with 200 µg IgG2a isotype control (Biolegend) and 200 µl of PBS liposomes. Mice were sacrificed at 24 h after CLP. Clodronate and PBS liposomes were obtained from clodronateliposomes.com. *Temperature*: The temperature of each animal was measured by rectal insertion of a temperature sensor while the mouse was under anesthesia. *Clinical score*: The clinical score of each animal was assessed as follows (points). [a] appearance: normal (0), lack of grooming (1), piloerection (2), hunched up (3), above and eyes half closed (4); [b] behaviour - unprovoked: normal (0), minor

changes (1), less mobil and isolated (2), restless or very still (3); behaviour - provoked: responsive and alert (0), unresponsive and not alert (3); [c] clinical signs: normal respiratory rate (0), slight changes (1), decreased rate with abdominal breathing (2), marked abdominal breathing and cyanosis (3); [d] hydration status: normal (0), dehydrated (5). The higher the score the worse the clinical situation of the animal. *Blood pressure measurement*: The blood pressure of WT and *Il3^{-/-}* mice was measured by using a tail-cuff plethysmograph according to the manufacturer's instructions. Mice were placed on a 37°C heated plate and measurements were performed 5 times/each animal. Per animal the mean systolic value was then calculated.

Cells

Isolation and ex vivo methods: Peripheral blood for flow cytometric analysis was collected by aortic puncture, using heparin as the anticoagulant. Erythrocytes were lysed using RBC Lysis Buffer (BioLegend). Total white blood cell count was determined by preparing a 1:10 dilution of (undiluted) peripheral blood obtained from the orbital sinus using heparin-coated capillary tubes in RBC Lysis Buffer (BioLegend). After organ harvest, single cell suspensions were obtained as follows: for bone marrow, the femur and tibia of one leg were flushed with PBS through a 40 µm-nylon mesh. The peritoneal space was lavaged with 3 × 3 ml of PBS to retrieve infiltrated and resident leukocytes. Spleens were homogenized through a 40 µm-nylon mesh, after which erythrocyte lysis was performed on the spleens using RBC Lysis Buffer (BioLegend). Liver, lung, thymus, lymph node tissue were cut into small pieces and subjected to enzymatic digestion with 450 U/ml collagenase I, 125 U/ml collagenase XI, 60 U/ml DNase I and 60 U/ml hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 1 h at 37°C while shaking at 750 rpm. Total viable cell numbers were obtained using Trypan Blue (Cellgro, Mediatech, Inc, VA). To determine total bone marrow cellularity, one femur and one tibia were estimated to represent 7% of total marrow(36). *In vitro*: For all *in vitro* experiments, cells were cultured in medium (RPMI-1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, 2mM L- glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin) or B

cell medium (medium + 50 μ M β -mercaptoethanol), and kept in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. For *in vitro* experiments involving IL-3 stimulation, bone marrow cells were stained with anti-Lineage-PE antibodies, followed by incubation with anti-PE MicroBeads (Miltenyi). Lin⁻ bone marrow cells were then negatively selected through MACS cell separation columns and separators (Miltenyi) for *in vitro* stimulation. Cells were seeded at a density of 50,000 cells/100 μ l in 24-well flat-bottom, or 96-well round-bottom plates (Corning) and cultured 24 or 96 h in medium. Where indicated, LPS was added at 1 μ g/ml and rIL-3 was added at 20 ng/ml in PBS. To determine IgM production, serosal B1a cells were obtained from Balb/C (WT), C57BL/6 (WT), *Csf2*^{-/-} and *Il3*^{-/-} mice. Cells were sorted on a BD FACS Aria II (BD Biosciences) and cultured at 37°C for 48h in B cell medium. Where indicated, LPS (Sigma) was added at a dose of 10 μ g/mL.

Flow Cytometry

The following antibodies were used for flow cytometric analyses. *Mouse*: anti-CD43-FITC, S7 (BD Biosciences); anti-Ly6C-FITC, AL-21 (BD Biosciences); anti-Ly6G-FITC, 1A8 (BD Biosciences); anti-CD11b-FITC, M1/70 (BD Biosciences); anti-CD3e-FITC, 145-2C11 (BD Biosciences); anti-CD4-FITC, RM4-5 (BD Biosciences); anti-CD8-FITC, 53-6.7 (BD Biosciences); anti-IL-6-FITC, MP5-20F3 (BD Biosciences); anti-B220-PE, RA3-6B2 (BD Biosciences); anti-CD19-PE, 1D3 (BD Biosciences); anti-CD49b-PE, DX5 (BD Biosciences); anti-90.2-PE, 53-2.1 (BD Biosciences); anti-Ly6G-PE, 1A8 (BD Biosciences); anti-Ter119-PE, TER-119 (BD Biosciences); anti-IL-3-PE, MP2-8F8 (BD Biosciences); anti-GM-CSF-PE, MP1-22E9 (BD Biosciences); anti-CD131-PE, JORO50 (BD Biosciences); anti-CD123-PE, 5B11 (BioLegend); anti-IgG2A-PE, RTK2758 (BD Biosciences); anti-IgG1-PE, A85-1 (BD Biosciences); anti-CD11b-PE, M1/70 (BD Biosciences); anti-CD11c-PE, N418 (eBioscience); anti-CD127-PE, A7R34 (eBioscience); anti-CD11c-PerCPCy5.5, HL3 (BD Biosciences); anti-Ly6C-PerCPCy5.5, HK1.4 (eBioscience); anti-CD90.2-PECy7, 53-2.1 (BD Biosciences); anti-F4/80-PECy7, BM8 (BioLegend); anti-TLR4-PECy7, MTS510 (BioLegend); anti-ckit-PECy7, 2B8 (BD Biosciences); anti-Sca-1-PECy7, D7 (eBioscience); anti-CD45.2-

PECy7, 104 (BioLegend); anti-CD23-PECy7, B3B4 (BioLegend); anti-IL-1 β , APC, NJTEN3 (eBioscience); anti-TNF- α -APC, MP6-XT22 (Bd Biosciences); anti-Fc ϵ R1-APC, MAR-1 (eBioscience); anti-ckit-APC, 2B8 (BD Biosciences); anti-Annexin V-APC, anti-CD115-APC, AFS98 (eBioscience); anti-IgM-APC, II/41 (BD Biosciences); anti-CD8-APC, 53-6.7 (BD Biosciences); anti-CD19-biotin, 6D5 (BioLegend); anti-CD138-biotin, 281-2 (BD Biosciences); anti-CD123-biotin, 5B11 (BioLegend); anti-CD45.2-biotin, 104 (BioLegend); anti-Sca-1-Alexa Fluor 700, D7 (eBioscience); anti-MHCII-Alexa Fluor 700, M5/114.15.2 (eBioscience); anti-CD4-Alexa Fluor 700, GK1.5 (eBioscience); anti-CD19-APCCy7, 6D5 (BioLegend); anti-CD11b-APCCy7, M1/70 (BD Biosciences); anti-IgM-APCCy7, RMM-1 (BioLegend); anti-CD16/32-APCCy7, 2.4G2 (BD Biosciences); anti-CD4-Pacific blue, GK1.5 (BioLegend); anti-CD8-Pacific blue, 53-6.7 (BioLegend); anti-IgD-Pacific blue, 11-26c.2a (BioLegend); anti-CD45.2-Pacific blue (BD Biosciences); anti-CD19-Brilliant Violet 421, 6D5 (BioLegend); anti-IgM-Brilliant Violet 421, RMM-1 (BioLegend); anti-CD11b-Brilliant Violet 421, M1/70 (BioLegend). *Human*: anti-CD19-FITC, HIB19 (BD Biosciences); anti-CD16-FITC, 3G8 (BD Biosciences); anti-IL-3-PE, BVD3-1F9 (BD Biosciences); anti-IgG1-PE, R3-34 (BD Biosciences); anti-CD2-PE, RPA-2.10 (BD Biosciences); anti-CD3-PE, HIT3a (BD Biosciences); anti-CD15-PE, W6D3 (BD Biosciences); anti-CD19-PE, HIB19 (BD Biosciences); anti-CD20-PE, 2H7 (BD Biosciences); anti-CD56-PE, B159 (BD Biosciences); anti-NKp46-PE, 9-E2 (BD Biosciences); anti-HLADR-PerCP-Cy5.5, G46-6 (BD Biosciences); anti-CD20-PECy7, 2H7 (BD Biosciences); anti-CD14-PECy7, M5E2 (BD Biosciences); anti-IgM-APC, G20-127 (BD Biosciences); anti-CD123-APC, 7G3 (BD Biosciences); anti-CD45-Alexa Fluor 700, HI30 (BioLegend); anti-CD11b-APCCy7, ICRF44 (BD Biosciences); anti-CD3-BV421, UCHT1 (BioLegend); anti-CD11c-BV421, 3.9 (BioLegend). *Staining Strategies*: Streptavidin-Alexa Fluor 700, Streptavidin-Pacific blue or Streptavidin-Pacific orange (Invitrogen) were used to label biotinylated antibodies. Staining for intracellular cytokines was performed using BD Cytofix/Cytoperm Plus Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Intracytoplasmatic IgM staining was done as previously described (19).

Briefly, cells were stained for 30 min with a primary IgM antibody (Percep.Cy5.5 channel) in a high concentration (1:200) to ensure saturation of surface IgM together with additional surface antibodies in normal concentration (1:700). After cell membrane permeabilization using Cytofix/Cytoperm Plus Kit (BD Biosciences) intracytoplasmatic IgM was performed using the secondary IgM antibody (APC channel) in a lower concentration (1:350). Cells were defined as: (i) Monocytes (Ly6C^{high/low}CD115⁺CD11b⁺MHCII⁻CD11c⁻F4/80^{low/int}Lin1⁻ (mouse) or CD16^{high/low}CD14^{high/low}CD11b⁺CD11c⁻Lin1⁻ (human), (ii) neutrophils (Ly-6C^{int}CD11b⁺MHCII⁻CD11c⁻Lin1⁺), (iii) macrophages (F4/80⁺MHCII⁺CD11b^{int}CD90.2⁻CD19⁻), (iv) T cells (CD3⁺CD4/8⁺B220⁻MHCII⁻), (v) HSPC (ckit⁺Lin2⁻), (vi) HSC (ckit⁺Sca-1⁺Lin2⁻), (vii) CMP (ckit⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32^{low}Lin2⁻), (viii) MEP (ckit⁺Sca-1⁻CD34⁻CD16/32⁻Lin2⁻), (ix) GMP (ckit⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32^{high}CD115⁻Lin2⁻), (x) MDP (ckit⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32^{high}CD115⁺Lin2⁻), (xi) basophils (CD49b⁺FceR1⁺ckit⁻Lin3⁻), (xii) mast cells (FceR1⁺ckit⁺Lin3⁻) (xiii) Serosal B1a cells (CD45⁺CD19⁺IgM⁺CD5⁺CD43⁺), (xiv) Peritoneal macrophages (CD45⁺CD11b⁺F4/80^{high}). Lineages were defined as: Lin1: Ly6G, B220, CD19, CD49b, Ter119, CD90.2 (mouse) or CD2, CD3, CD15, CD19, CD20, CD56, NKp46 (human); Lin2: B220, CD19, CD49b, Ter119, CD90.2, CD11b, CD11c, IL-7R, Gr-1; Lin3: B220, CD19, Ter119, CD3, CD4, CD8, Gr1. Data were acquired on an LSRII (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo v8.8.6 (Tree Star, Inc.). Cells were sorted on a BD FACSARIA II (BD Biosciences).

Histology

Mouse: The lungs, livers and spleens from Balb/c control mice and *Il3*^{-/-} mice were harvested in steady state or 1 day after CLP and embedded in a 2-methylbutane bath (Sigma-Aldrich) on dry ice. The lungs were filled with a mixture of O.C.T. compound and PBS (1:1) through the tracheas prior to harvesting. Serial 6 µm thick fresh-frozen sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for overall histological analysis. For immunohistochemical staining, the sections were incubated with anti-CD115 (AF598, eBioscience) and anti-Ly-6G (1A8, BioLegend), followed by a

biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories, Inc.), and developed with 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Dako). All sections were counterstained with hematoxylin and coverslipped using an aqueous mounting medium. The images were captured using a digital slide scanner, NanoZoomer 2.0RS (Hamamatsu). For immunofluorescence staining, spleen sections were incubated with anti-IL-3 biotin (MP2-8F8, BioLegend), anti-IgM-FITC (II/41, BD Biosciences), anti-CD11b-FITC (M1/70, BD Biosciences), anti-CD19-FITC (1D3, BD Biosciences), anti-CD3e-FITC (145-2C11, BD Biosciences), anti-CD117-FITC (c-kit 2B8, BD Biosciences), anti-CD90.2-Alexa Four 488 (30-H12, BioLegend), anti-CD49b-Alexa Fluor (HMa2, BioLegend), anti-CD11b-APC (M1/70, BD Biosciences). A biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories, Inc.) and streptavidin-Alexa Fluor 594 (Invitrogen) were used to detect IL-3 positive cells. The slides were coverslipped using a mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Inc.) to identify the nuclei. Images were captured using a motorized fluorescence microscope, BX63 (Olympus). *Human*: IL-3 positive B-cells were visualized on frozen sections by immunofluorescence staining. Briefly, human spleen sections were embedded in O.C.T. compound and serial fresh- frozen sections (6 μ m) were prepared. The sections were fixed with ice cold acetone for 10 min at -20°C. After washing (PBS with 5% BSA and 0.2% Triton X-100) sections were blocked with 0.3% goat serum (in washing buffer) for 30 min at room temperature. Thereafter, spleen sections were incubated with anti-IgM-FITC (G20-127, BD Pharmingen, 1/50), anti-CD19-FITC (HIB19, BD Pharmingen, 1/50), anti-IL-3-PE (BVD3-1F9, BD Pharmingen, 1/25), or IgG1-PE isotype control (1/25) (R3-34, BD Pharmingen, 1/25) overnight at 4°C. After washing, counterstaining was performed with DAPI and slides were coverslipped (10min at RT). After mounting, spleen sections were imaged with Axiovert 200 Inverted Fluorescence Microscope and Axiovision image processing software (Zeiss, Germany). The enumeration of IL-3 producing IgM⁺ B cells in human spleens was conducted by blinded analysis of 6 field-of-views at 20 $\times$ magnification. The average amount of IL-3 producing IgM⁺ B cells per field-of-view is presented.

Molecular Biology

RT-PCR: Total RNA was isolated from whole tissue using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's instructions. cDNA was generated from 1 µg of total RNA per sample using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real time PCR was performed in triplicates using the TaqMan Gene Expression Assay System on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primers for IL-3 were used (Applied Biosystems). Mean normalized expression was calculated using the Q-Gene Application with GAPDH (Applied Biosystems) serving as endogenous control. At least three independent samples per group were analyzed.

Westerns: Total protein was extracted from an equal number of cells in RIPA Lysis buffer with proteinase inhibitor cocktails. The lysates were then subjected to electrophoresis using NuPAGE Novex Gel system (Life Technologies) and were blotted to nitrocellulose membrane using iBlot Gel Transfer system (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Anti-IL3 antibody (AF-403-NA, R&D Systems) and anti-GAPDH (Ab9483, Abcam) antibody were used. **ELISA:** IL-1β, IL-3, IL-6, and TNF-α ELISA was performed with R&D ELISA kits according to the manufacturer's instructions on peritoneal lavage fluid, serum and cell culture supernatants. **Protein assay:** Total protein from the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was measured using the Bio-Rad Protein Assay according to the manufacturer's instructions. **AST and ALT:** AST and ALT were measured in plasma with Sigma kits according to the manufacturer's instructions.

Bacteria

Whole blood and peritoneal lavage samples were diluted, plated on tryptic soy agar (BD Difco), and incubated at 37°C. The number of bacterial colonies was assessed 12-14 hours later. **Phagocytosis assay:** PHrodo™ labelled *Escherichia coli* particles (Invitrogen) were used following the manufacturer's instructions. Steady state peritoneal cells from control and *Il3*^{-/-} mice were seeded at 3×10^5 cells/well in a 96 well plate.

Cells were allowed to seed 1 h at 37°C, the medium was then removed and replaced by medium with or without *E. coli* particles (1 mg/mL) and cells were incubated at 37°C or 4°C (negative control) for 2h. Cells were then retrieved and stained for flow cytometry. Phagocytosis rate was determined by the percentage of PHrodo/PE⁺ peritoneal macrophages.

Statistics

Human: For analysis of human data, wherever appropriate, data were visualized using line charts, bar charts or Kaplan-Meier plots. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to check for normal distribution. Due to non-normally distributed data, non-parametric methods for evaluation were used (two-tailed non-parametric Wilcoxon matched pairs test or a two-tailed Mann Whitney U test). Multivariate logistic regression analyses were used to evaluate the input of IL-3 on the prediction of death at 28 days, and to adjust for potential confounders. *Mouse*: Results were expressed as identified in legends. For comparing 2 groups, statistical tests included unpaired, 2-tailed nonparametric Mann-Whitney tests (when Gaussian distribution was not assumed) or unpaired, 2-tailed parametric t tests with Welch's correction (when Gaussian distribution was assumed). For multiple comparisons, nonparametric multiple comparison's test (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison) comparing mean rank of each group (when Gaussian distribution was not assumed) or 1-way ANOVA followed by Tukey's or Newman-Keuls Multiple Comparison Test were performed. P values of 0.05 or less were considered to denote significance.

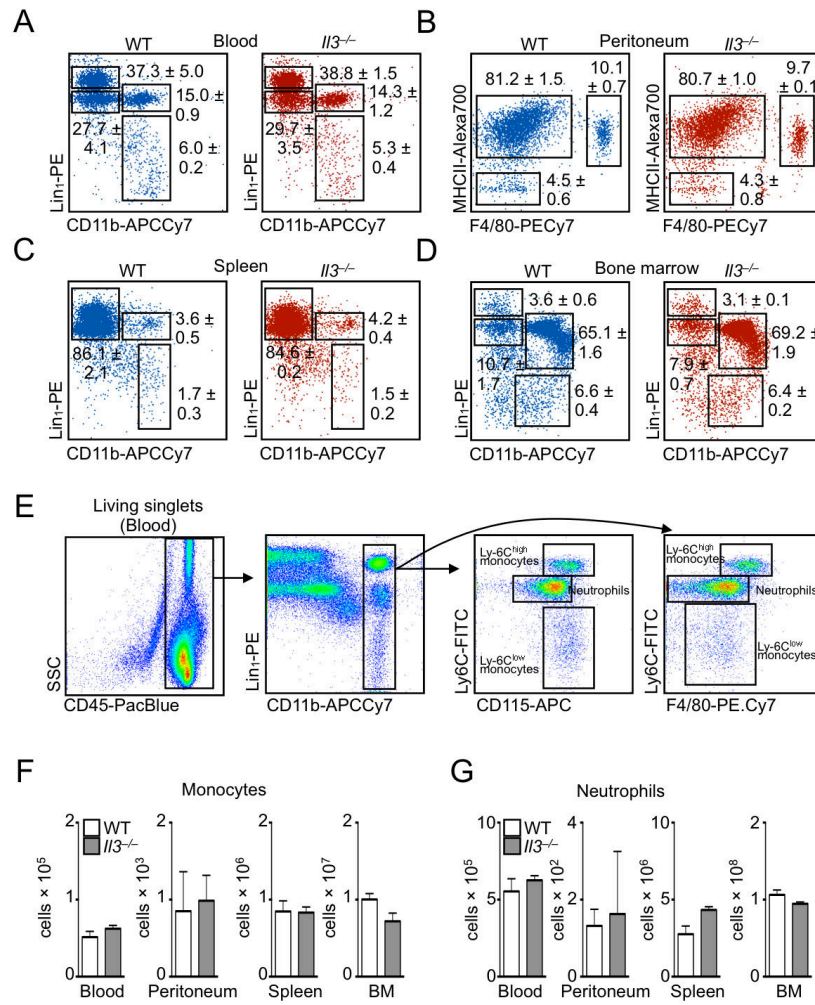


Fig. S1. Profiling Balb/c (WT) mice and *I/3*^{-/-} mice in steady state and after CLP. Steady state analysis of (A) Blood. (B) Peritoneum. (C) Spleen. (D) Bone marrow. Representative dot plots of $n > 5$ are shown. (E) Gating strategy identifying monocytes and neutrophils in the blood. (F) Analysis of monocytes during steady state in blood, peritoneum, spleen and bone marrow. (G) Analysis of neutrophils during steady state in blood, peritoneum, spleen and bone marrow ($n = 6$ for all shown experiments). Error bars indicate means $\pm$ SEM.

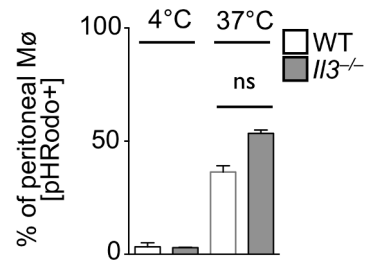
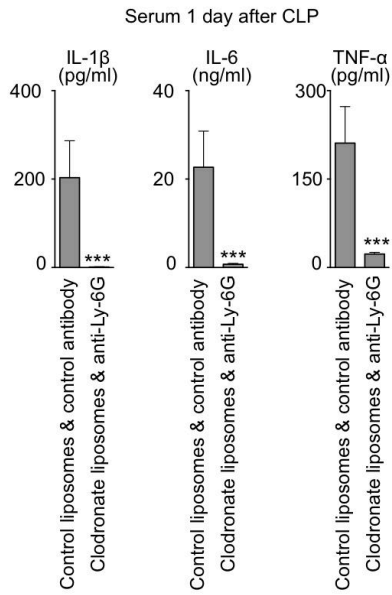


Fig. S2. IL-3 has no effect on phagocytosis. Phagocytic capacity in WT and *IL3*^{-/-} cells in the steady state and 1 d after CLP (n = 3). Error bars indicate means ± SEM. Significance was assessed by Mann-Whitney test.

A



B

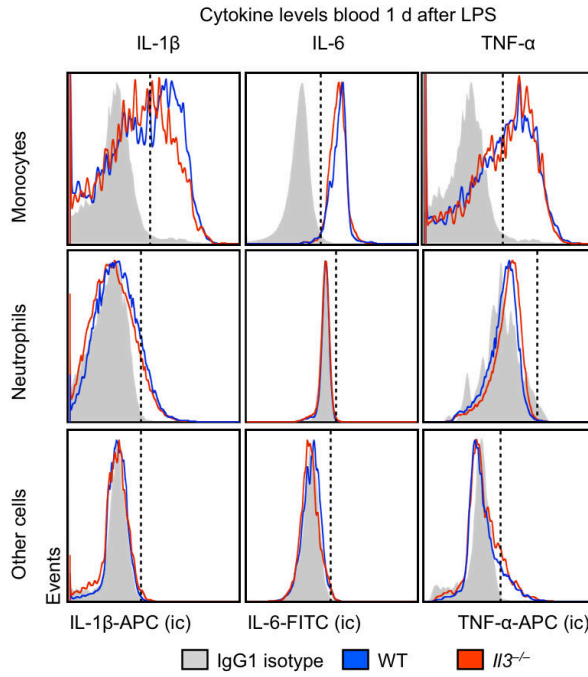


Fig. S3. IL-3 has no effects on myeloid production of inflammatory cytokines. (A) Serum IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in WT mice 1 day after CLP. Mice received either control liposomes with isotype antibodies or clodronate liposomes with anti-Ly-6G antibodies prior to CLP (n=4; ***P<0.001). **(B)** Intracellular IL-1 β , IL-6 and TNF- α staining gated on splenic monocytes, neutrophils, and other cells in WT and *Il3*^{-/-} mice 1 day after LPS. The grey histogram denotes isotype staining. Error bars indicate means $\pm$ SEM. Significance was assessed by Mann-Whitney test (A).

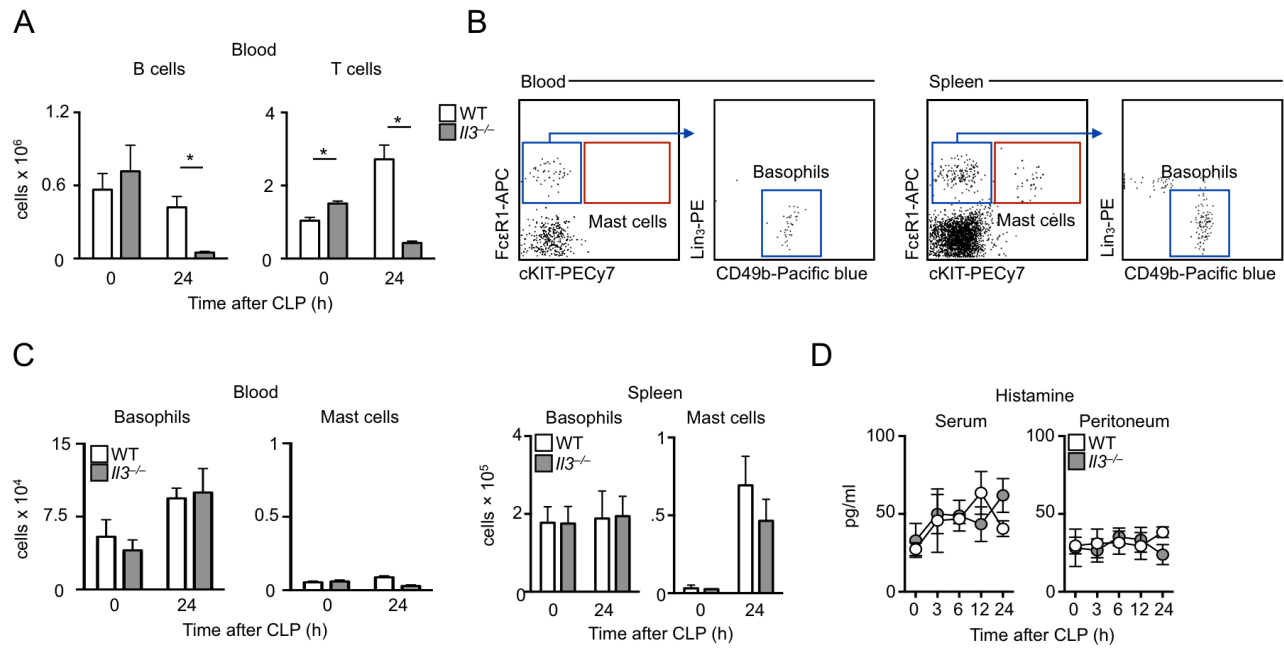


Fig. S4. Leukocyte flux after CLP. (A) Changes in T and B cell blood numbers in WT and $Il3^{-/-}$ mice 1 d after CLP (n=3). (B) Gating strategy for identifying basophils and mast cells. (C) Enumeration of basophils and mast cells in the blood and spleen at steady state and 1 d after CLP in WT and $Il3^{-/-}$ mice (means $\pm$ s.e.m.; n=3). (D) Histamine levels after CLP in the serum and peritoneum of WT and $Il3^{-/-}$ mice (n=3). Error bars indicate means $\pm$ SEM. Significance was assessed by Mann-Whitney test (A, C).

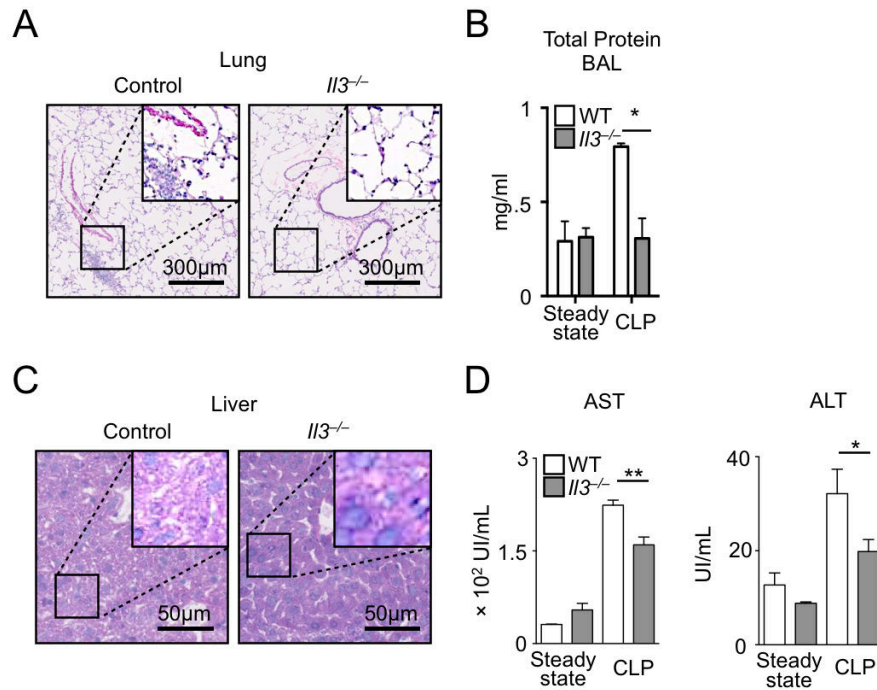


Fig. S5. IL-3 potentiates septic shock. (A) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of lung sections 1 d after CLP (representative images of $n = 5$ are shown). (B) Measurement of total protein in the BAL 12 h post-CLP ($n = 3$). (C) H&E staining of liver sections 1 d after CLP (representative images of $n = 5$ are shown). (D) Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in the serum in the steady state and 1 d after CLP in the two groups ($n = 3$ -5; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Error bars indicate means $\pm$ SEM. Significance was assessed by Mann-Whitney test (B, D).

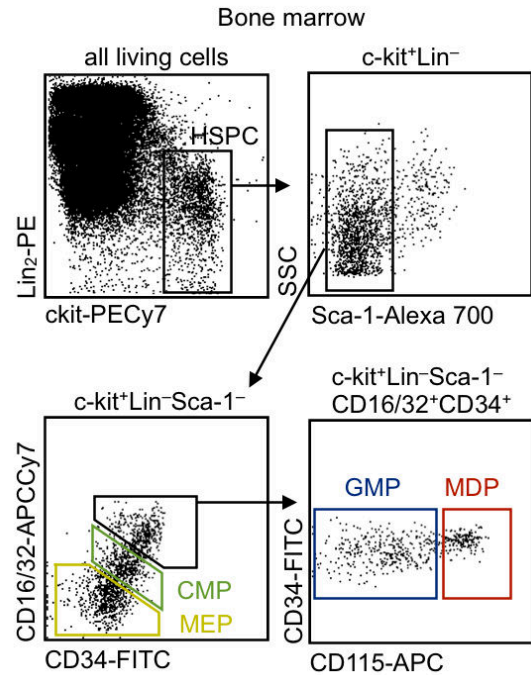


Fig. S6. HSPC gating strategy. Flow cytometry plots identifying Lin⁻c-kit⁺ hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC), common myeloid progenitors (CMP), megakaryocyte and erythrocyte progenitors (MEP), granulocyte and macrophage progenitors (GMP), and macrophage and dendritic cell progenitors (MDP) in the bone marrow.

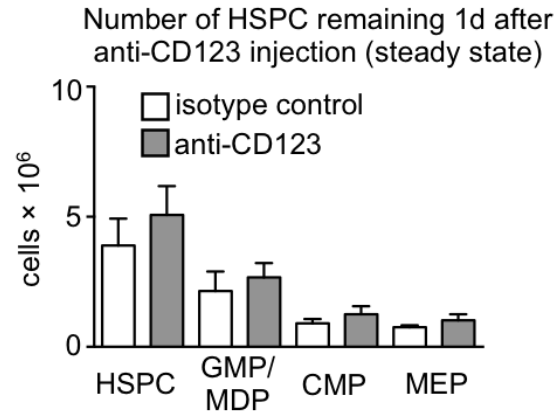


Fig. S7. Anti-CD123 antibody does not deplete HSPC. Enumeration of various HSPC in the bone marrow 1 d after injection of anti-CD123 or isotype to WT mice (n = 3; *P<0.05). Error bars indicate means $\pm$ SEM.

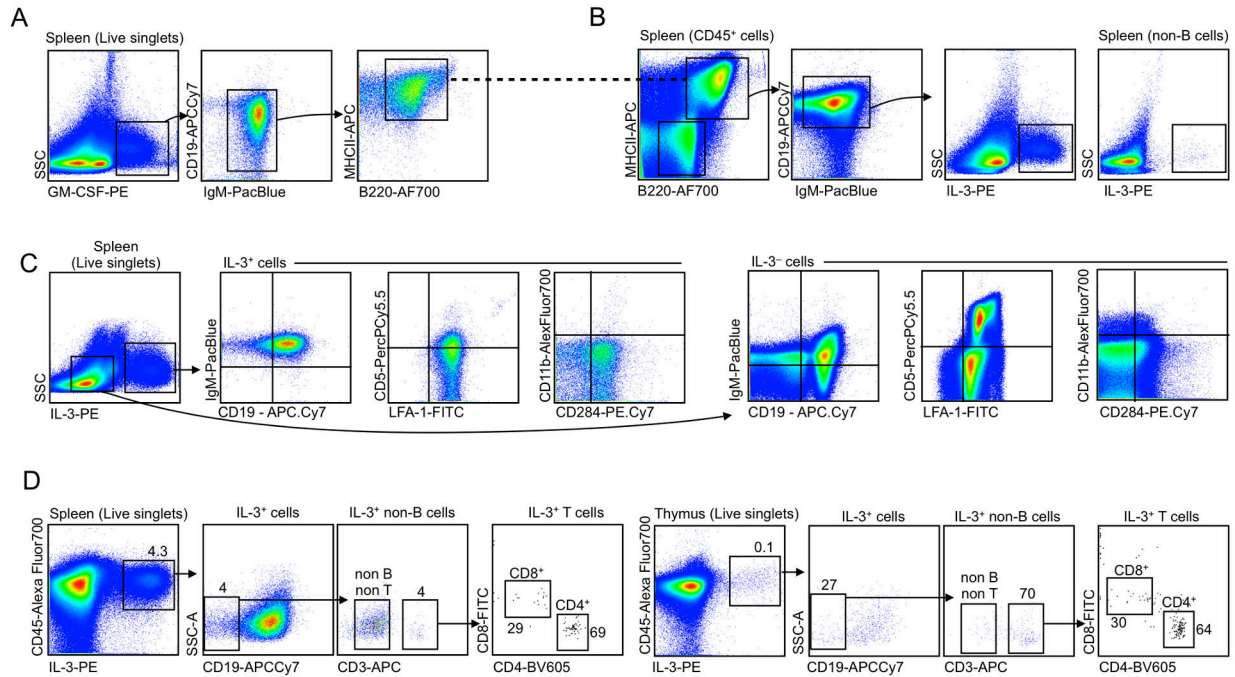


Fig. S8. IL-3-producing B cells are IRA B cells. (A) Identification of IRA B cells as GM-CSF-producing IgM⁺ CD19⁺ B220⁺ MHCII⁺ B cells. (B) IL-3-producing B cells are likewise IgM⁺ CD19⁺ B220⁺ MHCII⁺ B cells. Data were collected 4 d after CLP and representative plots of $n = 4$ are shown. (C) Detailed characterization of splenic IL-3-producing B cells as CD19⁺ IgM⁺ LFA-1^{int} CD5^{int} CD284⁺ CD11b^{low}. Data were collected 4 d after CLP and representative plots of $n = 4$ are shown. (D) A minor population of IL-3 producing cells in the spleen and thymus consists of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and non-T non-B cells. Representative plots of $n = 4$ are shown.

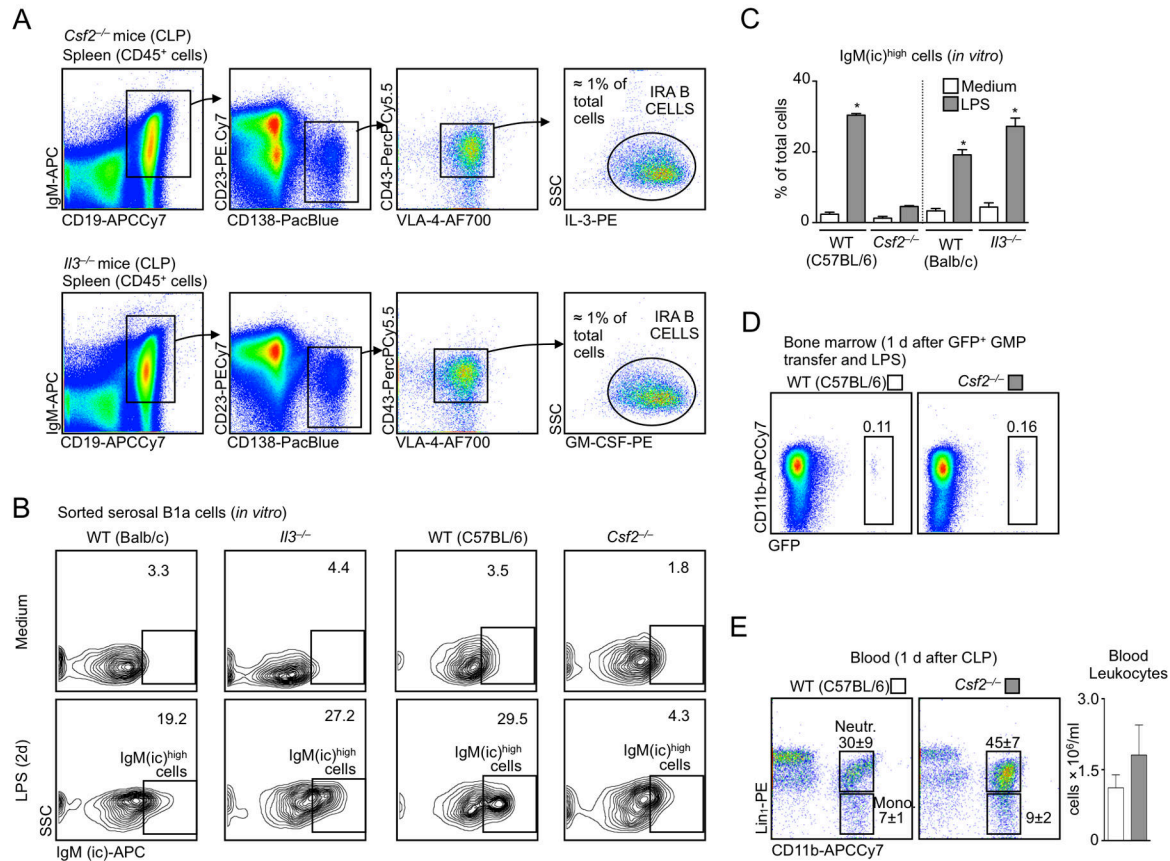


Fig. S9. IL-3 and GM-CSF produced by IRA B cells have distinct functions. (A) Identification of IL-3-producing IRA B cells in the spleen of GM-CSF-deficient (i.e., *Csf2*^{-/-}) mice 4 d after CLP and, conversely, identification of GM-CSF-producing IRA B cells in the spleen of IL-3-deficient (*Il3*^{-/-}) mice. Representative plots of *n* = 4 are shown. (B) Sorted B1a B cells from WT and *Il3*^{-/-} mice were placed into culture and stimulated with LPS for 2 d. The cells were then stained to detect intracellular IgM levels. Data show that *Il3*^{-/-} B1a cells augment intracellular IgM levels at similar levels compared to WT cells. Cells producing IgM at high levels are termed IgM(ic)^{high}. (C) Enumeration of IgM(ic)^{high} cells produced after *in vitro* culture with LPS. Data show that GM-CSF is required for IgM(ic)^{high} cell production whereas IL-3 is dispensable (*n* = 3; **P* < 0.05). (D) GFP⁺ GMP sorted from the bone marrow of WT mice were adoptively transferred to either WT or *Csf2*^{-/-} mice which then received LPS. 1 d after LPS, the bone marrow was analyzed. Data show GFP⁺ cells in recipients. The transferred cells differentiated to CD11b⁺ myeloid cells at similar frequencies. A representative of *n* = 3 plot is shown. (E) WT and *Csf2*^{-/-} mice were subjected to CLP. Blood was analyzed 1 d later. Data show heightened neutrophil concentrations and an overall higher trend in leukocyte number in the *Csf2*^{-/-} mice indicating GM-CSF is dispensable for myelopoiesis in response to CLP (*n* = 3). Error bars indicate means ± SEM. Significance was assessed by *t* test.

Spleen 1 d after CLP

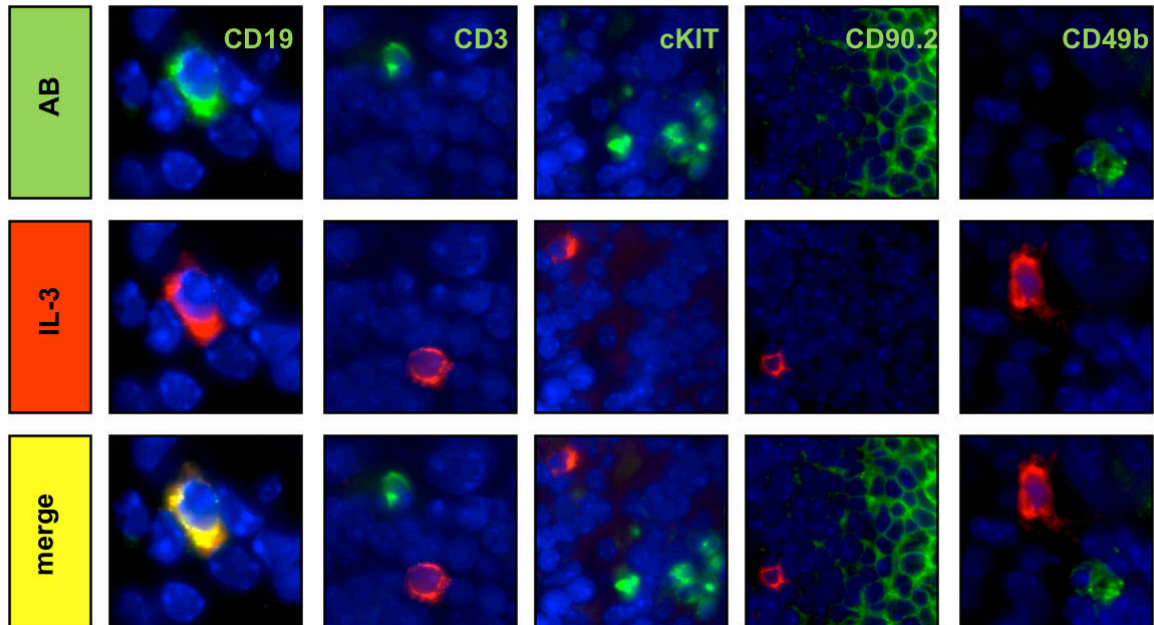


Fig. S10. Characterization of IL-3 producing cells after CLP. Immunofluorescence microscopy in the splenic red pulp identifies IL-3⁺ B cells as CD19⁺ and CD3⁻ c-kit⁻ CD90.2⁻ CD49b⁻. Representatives of >100 cells examined are shown.

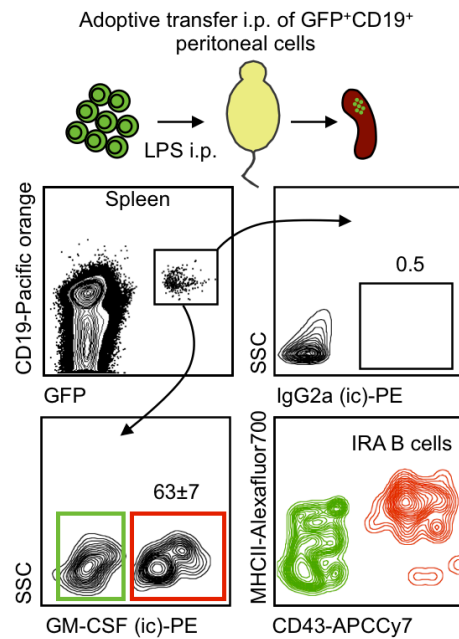


Fig. S11. Adoptive transfer of peritoneal B1a B cells yields GM-CSF⁺ cells. Cells from steady state GFP⁺ mice were transferred to WT mice that then received LPS for 2 days. Animals were analyzed 48 h after transfer. Representative plots from flow cytometric analysis of n = 3 are shown.

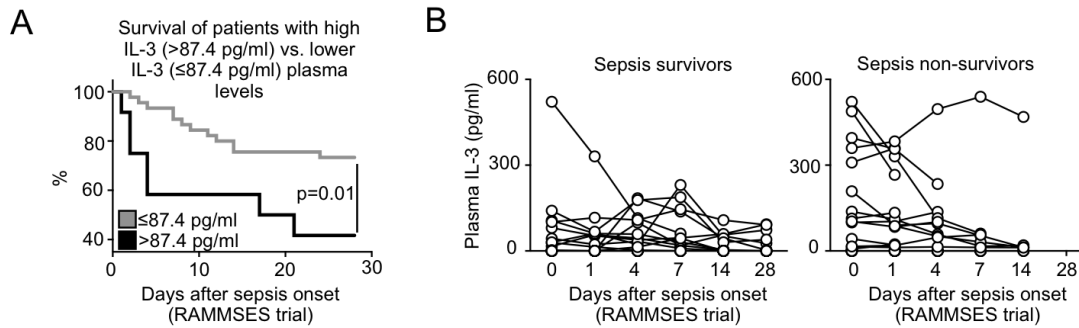


Fig. S12. Association of IL-3 plasma levels with survival in the RAMMSES cohort. (A) Kaplan-Meier analysis showing survival of patients in the RAMMSES cohort with IL-3 at >87.4 pg/ml (top quintile, measured 1 day after sepsis onset) vs. patients with IL-3 ≤ 87.4 pg/ml. (B) IL-3 plasma levels in patients with sepsis over 28 d after sepsis onset. Data show levels in sepsis survivors and sepsis non-survivors in the RAMMSES study. Significance was assessed by logrank (A).

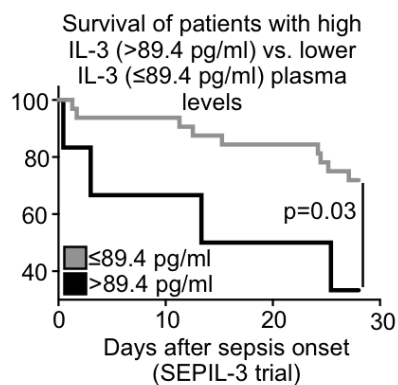


Fig. S13. Association of IL-3 plasma levels with survival in the SEPIL-3 cohort.
 Kaplan-Meier analysis showing survival of patients in the SEPIL-3 cohort with IL-3 at >89.4 pg/ml (top quintile, measured within 1 day after sepsis onset) vs. patients with IL-3 ≤ 87.4 pg/ml.

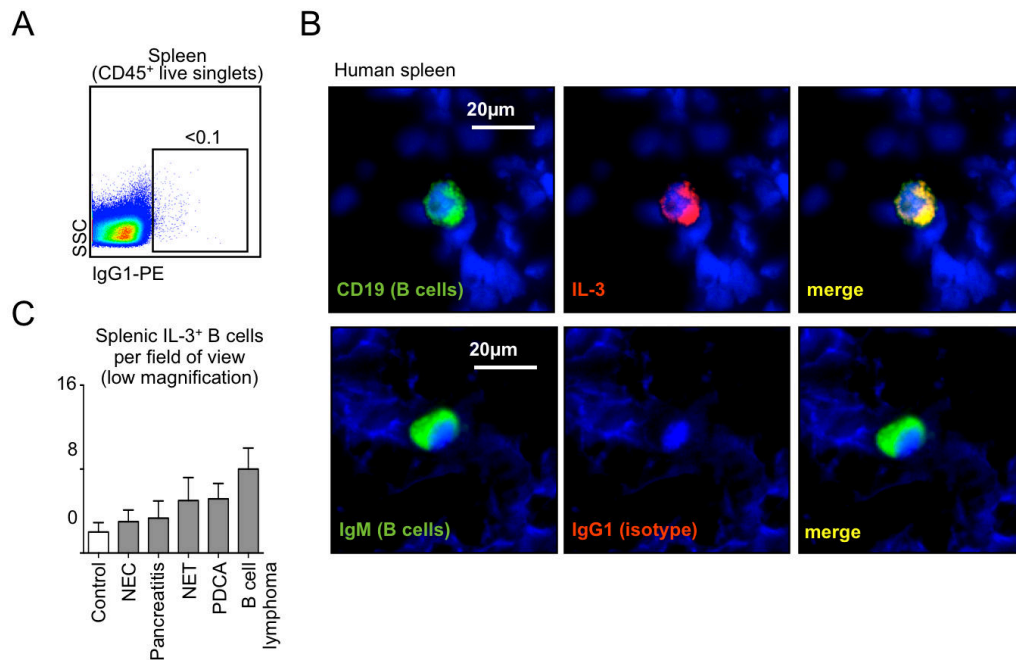


Fig. S14. B cells are sources of IL-3 in the human spleen. (A) Flow cytometry plot showing IgG1-PE isotype control in human splenocytes. (B) Immunofluorescence of human spleen showing co-staining of IgM-FITC, CD19-FITC, IL-3-PE, and IgG1-PE isotype control. One representative slide from $n = 6$ is shown. (C) Enumeration of IL-3 producing B cells in 6 different patients. (NET/C=neuroendocrine tumor/cancer of the pancreas; PDCA=pancreatic ductal cancer). Error bars indicate means $\pm$ SEM.

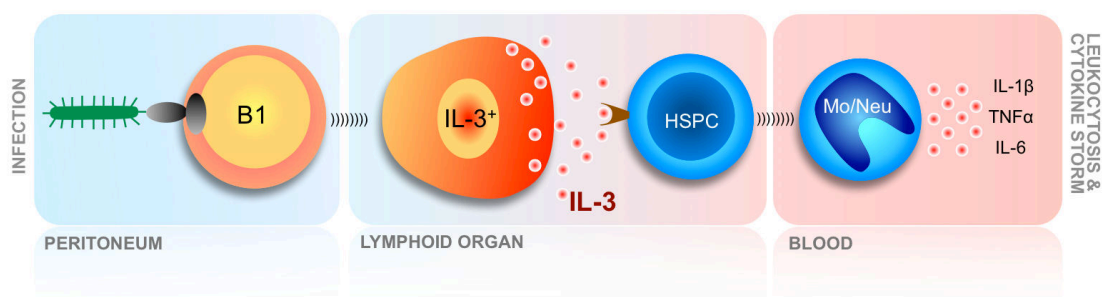


Fig. S15. Model. Peritoneal B1a cells are activated by microbial pathogens and give rise to IL-3⁺ B cells in the red pulp of the spleen. IL-3 acts on HSPC to promote the emergency generation of inflammatory leukocytes that are released into the circulation. This leads to an uncontrolled cytokine storm, multi-organ failure, septic shock, and death.

Table S1. Patients' characteristics (*RAMMSES-trial*).

Table S2: Patients' characteristics separated by IL-3 levels (*RAMMSES-trial*).

RAMMSES-trial - Patients with septic shock (n=60)	
Demographic data	
Age (y)	68.6 ±11.7
Male sex	46 (76.7%)
ASA-Status: I; II; III; IV; V	1(1.7%); 11(18.3%); 29(48.3%); 15(25.0%); 1(1.7%)
Sites of infection	
Gastrointestinal tract	32 (53.3%)
Surgical site	16 (26.7%)
Genitourinary tract	6 (10.0%)
Pulmonary site	12 (20.0%)
Others	2 (3.3%)
Septic organ failure	
ARF	35 (58.3%)
ARDS	49 (81.2%)
ALF	15 (25.0%)
Outcome	
Survivor 28d	38 (63.3%)
Disease Severity Scoring	
APACHE II	32 ± 19
SAPS	74 ± 18
SOFA	13 ± 3
Laboratory parameters	
Leukocyte count [1/nl]	16 ± 10
C-reactive protein [mg/l]	161 ± 51
Procalcitonine [µg/l]	17 ± 31
Lactate [mg/dl]	33 ± 34
Clinical data	
Norepinephrine [µg/kg/min]	0.21± 0.18
Max. HR [1/min]	115 ± 22
Min. MAP [mmHg]	58 ± 11
FiO2 [none]	0.67 ± 0.19
PaO2 [mmHg]	n.a.
BMI [kg/m ²]	n.a.
Max. body temperature [°C]	37.0 ± 1.0
Data presented by number (%) or by mean ± standard deviation.	
Abbreviations: ASA, American Society of Anesthesiologists; ARF, acute renal failure; ARDS, acute respiratory distress syndrome; ALF, acute liver failure; APACHE II, acute physiology and chronic health evaluation II; SAPS, simplified acute physiology score; SOFA, sequential organ failure assessment; HR, heart rate; MAP, middle arteriel pressure; min, minimal; max, maximal; FiO2, fraction of inspired oxygen; PaO2, partial oxygen pressure; BMI, body mass index	

Table S3. Patients' characteristics (*SEPIL-3-trial*).

RAMMSES-trial - Patients with septic shock at day 1 (n=56)			
	IL-3>87.4pg/ml (n=12)	IL-3≤87.4pg/ml (n=44)	p-value
Demographic data			
Age (y)	71.1±8.0	66.9±12.0	0.453
Male sex	8 (66.7%)	36 (81.8%)	0.257
ASA-Status			
ASA I	0 (0.0%)	1 (2.3%)	0.590
ASA II	4 (33.3%)	7 (15.9%)	0.206
ASA III	2 (16.7%)	23 (52.3%)	0.020*
ASA IV	6 (50.0%)	9 (20.5%)	0.051
ASA V	0 (0.0%)	1 (2.3%)	0.590
Sites of infection			
Gastrointestinal tract	8 (66.7%)	22 (50.0%)	0.424
Genitourinary tract	3 (25.0%)	2 (4.5%)	0.036*
Pulmonary site	1 (8.3%)	11 (25.0%)	0.178
Surgical site	5 (41.7%)	10 (22.7%)	0.243
Others	1 (8.3%)	1 (2.3%)	0.357
Septic organ failure			
ARF	8 (66.7%)	25 (56.8%)	0.594
ARDS	11 (91.7%)	36 (81.8%)	0.710
ALF	5 (41.7%)	10 (22.7%)	0.189
Outcome			
Survivor 28d	5 (41.7%)	35 (79.5%)	0.010*
Disease Severity Scoring			
APACHE II	31±7	33±9	0.309
SAPS	77±13	73±19	0.512
SOFA	14±3	13±3	0.276
Laboratory parameters			
Leukocyte count [1/nl]	17±8	16±11	0.523
C-reactive protein [mg/l]	140±41	171±50	0.027*
Procalcitonine [µg/l]	13±19	19±35	0.750
Lactate [mg/dl]	37±31	29±32	0.213
Clinical data			
Norepinephrine [µg/kg/min]	0.26±0.18	0.19±0.16	0.169
Max. HR [1/min]	112±21	117±22	0.361
Min. MAP [mmHg]	57±10	58±12	0.868
FiO2 [none]	0.64±0.22	0.67±0.19	0.387
PaO2 [mmHg]	n.a.	n.a.	n.a.
BMI [kg/m ²]	n.a.	n.a.	n.a.
Max. body temperature [°C]	36.6±1.4	37.2±0.9	0.117
Data presented by number (%) or by mean ± standard deviation.			

Table S4. Patients' characteristics separated by IL-3 levels (*SEPIL-3-trial*).

SEPIL-3-trial - Patients with septic shock (n=37)	
Demographic data	
Age (y)	65.8 ± 13.6
Male sex	37 (92.5%)
ASA-Status: I; II; III; IV; V	0(0%); 2(5%); 8(20%); 28(70%); 2(5%)
Sites of infection	
Gastrointestinal tract	29 (72.5%)
Surgical site	n.a.
Genitourinary tract	4 (10.0%)
Pulmonary site	12 (30.0%)
Others	5 (12.5%)
Septic organ failure	
ARF	9 (22.5%)
ARDS	14 (35.0%)
ALF	13 (32.5%)
Outcome	
Survivor 28d	25 (62.5%)
Disease Severity Scoring	
APACHE II	n.a.
SAPS	n.a.
SOFA	12 ± 4
Laboratory parameters	
Leukocyte count [1/nl]	17 ± 9
C-reactive protein [mg/l]	210 ± 109
Procalcitonine [µg/l]	19 ± 38
Lactate [mg/dl]	45 ± 38
Clinical data	
Norepinephrine [µg/kg/min]	0.22 ± 0.19
Max. HR [1/min]	n.a.
Min. MAP [mmHg]	64 ± 11
FiO2 [none]	0.53 ± 0.22
PaO2 [mmHg]	75 ± 15
BMI [kg/m ²]	28.3 ± 11.6
Max. body temperature [°C]	n.a.
Data presented by number (%) or by mean ± standard deviation.	
Abbreviations: ASA, American Society of Anesthesiologists; ARF, acute renal failure; ARDS, acute respiratory distress syndrome; ALF, acute liver failure; APACHE II, acute physiology and chronic health evaluation II; SAPS, simplified acute physiology score; SOFA, sequential organ failure assessment; HR, heart rate; MAP, middle arterial pressure; min, minimal; max, maximal; FiO2, fraction of inspired oxygen; partial oxygen pressure; BMI, body mass index	

Table S5. Multivariate logistic regression analyses of parameters associated with 28 d

SEPIIL-3-trial - Patients with septic shock at sepsis onset (n=37)			
	IL-3>89.4pg/ml (n=6)	IL-3≤89.4pg/ml (n=31)	p-value
Demographic data			
Age (y)	67.3±12.2	63.9±14.3	0.582
Male sex	6 (100.0%)	28 (90.3%)	0.441
ASA-Status			
ASA I	0 (0.0%)	0 (0.0%)	ø
ASA II	0 (0.0%)	2 (6.5%)	0.161
ASA III	0 (0.0%)	7 (22.6%)	0.006**
ASA IV	5 (83.3%)	22 (71.0%)	0.526
ASA V	1 (16.7%)	0 (0.0%)	0.363
Sites of infection			
Gastrointestinal tract	4 (66.7%)	25 (80.7%)	0.460
Genitourinary tract	0 (0.0%)	4 (12.9%)	0.365
Pulmonary site	3 (50.0%)	8 (25.8%)	0.247
Surgical site	n.a.	n.a.	n.a.
Others	1 (16.7%)	4 (12.9%)	0.812
Septic organ failure			
ARF	2 (33.3%)	6 (19.4%)	0.460
ARDS	3 (50.0%)	10 (32.3%)	0.419
ALF	1 (16.7%)	11 (35.5%)	0.382
Outcome			
Survivor 28d	2 (33.3%)	22 (71.0%)	0.031*
Disease Severity Scoring			
APACHE II	n.a.	n.a.	n.a.
SAPS	n.a.	n.a.	n.a.
SOFA	12±2	11±4	0.500
Laboratory parameters			
Leukocyte count [1/nl]	17±10	16±11	0.826
C-reactive protein [mg/l]	183±103	246±92	0.167
Procalcitonine [µg/l]	23±28	22±27	0.980
Lactate [mg/dl]	80±56	40±33	0.020*
Clinical data			
Norepinephrine [µg/kg/min]	0.28±0.18	0.21±0.20	0.419
Max. HR [1/min]	n.a.	n.a.	n.a.
Min. MAP [mmHg]	63±7	64±14	0.899
FiO2 [none]	0.59±0.22	0.53±0.23	0.572
PaO2 [mmHg]	76±14	75±15	0.807
BMI [kg/m ²]	29.3±1.1	28.1±12.0	0.730
Max. body temperature [°C]	n.a.	n.a.	n.a.
Data presented by number (%) or by mean ± standard deviation.			

mortality (*RAMMSES and SEPIL-3 cohorts*).

	model p-value	p-values associated with IL-3	OR association with IL-3 (95% CI)
IL-3 + ARF + age + cohort	0.019	0.006	4.9 [1.6-15.3]
IL-3 + ALF + age + cohort	0.04	0.004	5.1 [1.7-15.4]
IL-3 + age + cohort	0.022	0.004	5.1 [1.7-15.6]
IL-3 + ASA + age + cohort	0.002	0.041	3.8 [1.1-13.5]
IL-3 + gender + age + cohort	0.042	0.004	5.3 [1.7-16.3]
IL-3 + lactate + age + cohort	0.023	0.023	3.8 [1.2-12]
IL-3 + norepinephrine + age + cohort	0.034	0.004	5.2 [1.7-15.9]
IL-3 + SOFA + age + cohort	0.039	0.018	4 [1.3-12.3]
IL-3 + APACHE + age*	0.089	0.05	4.6 [1-21.8]
IL-3 + SAPS + age*	0.016	0.03	5.4 [1.1-25.8]

*performed only on the RAMMSES cohort. The effect of the center was measured as an independent variable (<<cohort>>) and added to each model.

OR: Odds Ratio

CI: Confidence interval

Table S6. Evolution of the pseudo-R-Squared (pseudo-R²) and Aikake Information Criterion (AIC) values (*RAMMSES and SEPIL-3 cohorts*).

	AIC		Pseudo-R2	
	Without IL-3	With IL-3	Without IL-3	With IL-3
ARF + age + cohort	128	113	0.03	0.10
ALF + age + cohort	129	115	0.01	0.09
age + cohort	129	114	0.01	0.08
ASA + age + cohort	120	107	0.13	0.20
gender + age + cohort	131	115	0.01	0.09
lactate + age + cohort	116	110	0.03	0.09
norepinephrine + age + cohort	115	109	0.02	0.10
SOFA + age + cohort	114	110	0.04	0.09
APACHE + age*	63	61	0.05	0.11
SAPS + age*	63	60	0.09	0.17

*performed only on the RAMMSES cohort. The effect of the center was measured as an independent variable (<<cohort>>) and added to each model.
AIC: Aikake Information Criteria.

REFERENCES AND NOTES

1. Y. C. Yang, A. B. Ciarletta, P. A. Temple, M. P. Chung, S. Kovacic, J. A. S. Witek-Giannotti, A. C. Leary, R. Kriz, R. E. Donahue, G. G. Wong, S. C. Clark, Human IL-3 (multi-CSF): Identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* **47**, 3–10 (1986). [Medline doi:10.1016/0092-8674\(86\)90360-0](#)
2. A. J. Hapel, J. C. Lee, W. L. Farrar, J. N. Ihle, Establishment of continuous cultures of thyl.2+, Lyl.1+, 2-T cells with purified interleukin 3. *Cell* **25**, 179–186 (1981). [Medline doi:10.1016/0092-8674\(81\)90242-7](#)
3. J. N. Ihle, L. Pepersack, L. Rebar, Regulation of T cell differentiation: In vitro induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. *J. Immunol.* **126**, 2184–2189 (1981). [Medline](#)
4. G. T. Williams, C. A. Smith, E. Spooncer, T. M. Dexter, D. R. Taylor, Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* **343**, 76–79 (1990). [Medline doi:10.1038/343076a0](#)
5. D. C. Angus, T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013). [Medline doi:10.1056/NEJMra1208623](#)
6. R. S. Hotchkiss, G. Monneret, D. Payen, Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–874 (2013). [Medline doi:10.1038/nri3552](#)
7. C. S. Deutschman, K. J. Tracey, Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity* **40**, 463–475 (2014). [Medline doi:10.1016/j.immuni.2014.04.001](#)
8. Materials and methods are available as supplementary materials on *Science* Online.
9. D. Rittirsch, M. S. Huber-Lang, M. A. Flierl, P. A. Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* **4**, 31–36 (2009). [Medline doi:10.1038/nprot.2008.214](#)
10. M. C. Jamur, C. Oliver, Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **S3**, 1390–1406 (2011). [Medline doi:10.2741/231](#)
11. D. Voehringer, Basophil modulation by cytokine instruction. *Eur. J. Immunol.* **42**, 2544–2550 (2012). [Medline doi:10.1002/eji.201142318](#)
12. E. Rönnberg, C. F. Johnzon, G. Calounova, G. Garcia Faroldi, M. Grujic, K. Hartmann, A. Roers, B. Guss, A. Lundquist, G. Pejler, Mast cells are activated by *Staphylococcus aureus* in vitro but do not influence the outcome of intraperitoneal *S. aureus* infection in vivo. *Immunology* **143**, 155–163 (2014). [Medline doi:10.1111/imm.12297](#)
13. D. Annane, E. Bellissant, J. M. Cavaillon, Septic shock. *Lancet* **365**, 63–78 (2005). [Medline doi:10.1016/S0140-6736\(04\)17667-8](#)
14. P. A. Ward, New approaches to the study of sepsis. *EMBO Mol. Med.* **4**, 1234–1243 (2012). [Medline doi:10.1002/emmm.201201375](#)
15. M. Kondo, A. J. Wagers, M. G. Manz, S. S. Prohaska, D. C. Scherer, G. F. Beilhack, J. A. Shizuru, I. L. Weissman, Biology of hematopoietic stem cells and progenitors:

- Implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 759–806 (2003). [Medline doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141007](#)
16. J. E. Groopman, J. M. Molina, D. T. Scadden, Hematopoietic growth factors. Biology and clinical applications. *N. Engl. J. Med.* **321**, 1449–1459 (1989). [Medline doi:10.1056/NEJM198911233212106](#)
 17. A. H. Dalloul, M. Arock, C. Fourcade, A. Hatzfeld, J. M. Bertho, P. Debré, M. D. Mossalayi, Human thymic epithelial cells produce interleukin-3. *Blood* **77**, 69–74 (1991). [Medline](#)
 18. P. J. Rauch, A. Chudnovskiy, C. S. Robbins, G. F. Weber, M. Etzrodt, I. Hilgendorf, E. Tiglaio, J. L. Figueiredo, Y. Iwamoto, I. Theurl, R. Gorbato, M. T. Waring, A. T. Chicoine, M. Mouded, M. J. Pittet, M. Nahrendorf, R. Weissleder, F. K. Swirski, Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* **335**, 597–601 (2012). [Medline doi:10.1126/science.1215173](#)
 19. G. F. Weber, B. G. Chousterman, I. Hilgendorf, C. S. Robbins, I. Theurl, L. M. Gerhardt, Y. Iwamoto, T. D. Quach, M. Ali, J. W. Chen, T. L. Rothstein, M. Nahrendorf, R. Weissleder, F. K. Swirski, Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis. *J. Exp. Med.* **211**, 1243–1256 (2014). [Medline doi:10.1084/jem.20131471](#)
 20. I. Hilgendorf, I. Theurl, L. M. Gerhardt, C. S. Robbins, G. F. Weber, A. Gonen, Y. Iwamoto, N. Degousee, T. A. Holderried, C. Winter, A. Zirlik, H. Y. Lin, G. K. Sukhova, J. Butany, B. B. Rubin, J. L. Witztum, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, F. K. Swirski, Innate response activator B cells aggravate atherosclerosis by stimulating T helper-1 adaptive immunity. *Circulation* **129**, 1677–1687 (2014). [Medline doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006381](#)
 21. S. A. Ha, M. Tsuji, K. Suzuki, B. Meek, N. Yasuda, T. Kaisho, S. Fagarasan, Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *J. Exp. Med.* **203**, 2541–2550 (2006). [Medline doi:10.1084/jem.20061041](#)
 22. J. Seok, H. S. Warren, A. G. Cuenca, M. N. Mindrinos, H. V. Baker, W. Xu, D. R. Richards, G. P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C. C. Finnerty, C. M. López, S. Honari, E. E. Moore, J. P. Minei, J. Cuschieri, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, M. G. Jeschke, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S. E. Calvano, P. H. Mason, J. P. Cobb, L. G. Rahme, S. F. Lowry, R. V. Maier, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, R. W. Davis, W. Xiao, R. G. Tompkins, A. Abouhamze, U. G. J. Balis, D. G. Camp, A. K. De, B. G. Harbrecht, D. L. Hayden, A. Kaushal, G. E. O’Keefe, K. T. Kotz, W. Qian, D. A. Schoenfeld, M. B. Shapiro, G. M. Silver, R. D. Smith, J. D. Storey, R. Tibshirani, M. Toner, J. Wilhelmy, B. Wispelwey, W. H. Wong; Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program, Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3507–3512 (2013). [Medline doi:10.1073/pnas.1222878110](#)
 23. K. Takao, T. Miyakawa, Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 1167–1172 (2015). [Medline](#)
 24. T. Brenner, T. Fleming, F. Uhle, S. Silaff, F. Schmitt, E. Salgado, A. Ulrich, S. Zimmermann, T. Bruckner, E. Martin, A. Bierhaus, P. P. Nawroth, M. A. Weigand, S.

- Hofer, Methylglyoxal as a new biomarker in patients with septic shock: An observational clinical study. *Crit. Care* **18**, 683 (2014). [Medline doi:10.1186/s13054-014-0683-x](#)
25. G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, M. Moss, The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546–1554 (2003). [Medline doi:10.1056/NEJMoa022139](#)
 26. K. A. Wood, D. C. Angus, Pharmacoeconomic implications of new therapies in sepsis. *Pharmacoeconomics* **22**, 895–906 (2004). [Medline doi:10.2165/00019053-200422140-00001](#)
 27. M. Bosmann, P. A. Ward, The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol.* **34**, 129–136 (2013). [Medline doi:10.1016/j.it.2012.09.004](#)
 28. C. M. Coopersmith, H. Wunsch, M. P. Fink, W. T. Linde-Zwirble, K. M. Olsen, M. S. Sommers, K. J. Anand, K. M. Tchorz, D. C. Angus, C. S. Deutschman, A comparison of critical care research funding and the financial burden of critical illness in the United States. *Crit. Care Med.* **40**, 1072–1079 (2012). [Medline doi:10.1097/CCM.0b013e31823c8d03](#)
 29. E. Dolgin, Trial failure prompts soul-searching for critical-care specialists. *Nat. Med.* **18**, 1000 (2012). [Medline doi:10.1038/nm0712-1000](#)
 30. S. M. Opal, C. J. Fisher Jr., J. F. Dhainaut, J. L. Vincent, R. Brase, S. F. Lowry, J. C. Sadoff, G. J. Slotman, H. Levy, R. A. Balk, M. P. Shelly, J. P. Pribble, J. F. LaBrecque, J. Lookabaugh, H. Donovan, H. Dubin, R. Baughman, J. Norman, E. DeMaria, K. Matzel, E. Abraham, M. Seneff, Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: A phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit. Care Med.* **25**, 1115–1124 (1997). [Medline doi:10.1097/00003246-199707000-00010](#)
 31. J. S. Boomer, K. To, K. C. Chang, O. Takasu, D. F. Osborne, A. H. Walton, T. L. Bricker, S. D. Jarman 2nd, D. Kreisel, A. S. Krupnick, A. Srivastava, P. E. Swanson, J. M. Green, R. S. Hotchkiss, Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* **306**, 2594–2605 (2011). [Medline doi:10.1001/jama.2011.1829](#)
 32. R. S. Hotchkiss, C. M. Coopersmith, J. E. McDunn, T. A. Ferguson, The sepsis seesaw: Tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* **15**, 496–497 (2009). [Medline doi:10.1038/nm0509-496](#)
 33. P. A. Ward, Immunosuppression in sepsis. *JAMA* **306**, 2618–2619 (2011). [Medline doi:10.1001/jama.2011.1831](#)
 34. M. M. Levy, M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, G. Ramsay; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* **31**, 1250–1256 (2003). [Medline doi:10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B](#)
 35. K. Ohmori, Y. Luo, Y. Jia, J. Nishida, Z. Wang, K. D. Bunting, D. Wang, H. Huang, IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen. *J. Immunol.* **182**, 2835–2841 (2009). [Medline doi:10.4049/jimmunol.0802870](#)

36. G. A. Colvin, J. F. Lambert, M. Abedi, C. C. Hsieh, J. E. Carlson, F. M. Stewart, P. J. Quesenberry, Murine marrow cellularity and the concept of stem cell competition: Geographic and quantitative determinants in stem cell biology. *Leukemia* **18**, 575–583 (2004). [Medline](#) [doi:10.1038/sj.leu.2403268](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403268)

Innate response activator B cells: origins and functions

Benjamin G. Chousterman and Filip K. Swirski

Center for Systems Biology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Simches Research Building, 185 Cambridge St., Boston, MA 02114, USA

Correspondence to: B. G. Chousterman; E-mail: bchouster@gmail.com

Received 23 February 2015, accepted 1 May 2015

Abstract

Innate response activator (IRA) B cells are a subset of B-1a derived B cells that produce the growth factors granulocyte macrophage colony stimulating factor and IL-3. In mouse models of sepsis and pneumonia, B-1a B cells residing in serosal sites recognize bacteria, migrate to the spleen or lung, and differentiate to IRA B cells that then contribute to the host response by amplifying inflammation and producing polyreactive IgM. In atherosclerosis, IRA B cells accumulate in the spleen, where they promote extramedullary hematopoiesis and activate classical dendritic cells. In this review, we focus on the ontogeny and function of IRA B cells in acute and chronic inflammation.

Keywords: B1a cells, GM-CSF, IgM, IL-3, innate immunity, IRA B cells

Introduction

When Cooper, Peterson, and Moore reported the discovery of B cells 50 years ago (1, 2), they not only settled a polarizing and heated debate on the nature of the immune system but also ushered in a new investigative era. Identifying an antibody-producing lymphocyte, distinct from T cells, that develops in a unique environment (chicken Bursa of Fabricius; human bone marrow), was the scaffold upon which the current knowledge of humoral and cellular immunity, as we know it today, was built. Over the years, landmark observations, ranging from deciphering B-cell ontogeny (3, 4) and organization within germinal centers of secondary lymphoid organs (5, 6) to characterizing immunoglobulin structure (7, 8), V(D)J recombination (9–11), and affinity maturation (12–14), have concretely revealed the importance of B lymphocytes within the ever-expanding immune cell family.

Over time, we have come to appreciate that B-cell heterogeneity is a function of both vertically integrated ontogenic hierarchy (pro-B cells give rise to T1 B cells, then to T2 B cells, etc.) and environmentally-elicited horizontal diversification (memory cells, plasmablasts, and plasma cells) (15). At the population level, arguably the most intriguing discovery was the Herzenberg laboratory's identification of a seemingly separate B-cell lineage, enriched in serosal spaces and dedicated to the production of natural antibodies (16). Years before we knew how Toll-like receptors (TLRs) bridge the gap between innate and adaptive immunity, and decades before we appreciated that natural killer cells belong to a large innate lymphoid cell (ILC) family, here were B cells that despite definitively being 'adaptive immune' cells were

apparently not connected to adaptive immunity. We refer to these cells as B-1 B cells. As opposed to the more familiar B-2 B cells that circulate and settle in B-cell follicles, B-1 B cells' spatiotemporal characteristics remain somewhat obscure. In this review, we will focus on innate response activator (IRA) B cells, a recently recognized member of the B-1 B-cell family.

IRA B cells' phenotype and ontogeny

What are they?

B cells may be exclusive antibody producers, but antibodies are not the only product of B cells. Over the last 15 years, a number of laboratories demonstrated that B cells can produce interleukin 10 (IL-10), a cytokine typically considered a T-cell product and most famous for regulating (or suppressing) inflammation (17–20). IL-10-producing B cells, termed B10 cells, are phenotypically heterogeneous and broadly present in health and disease (see review by Tedder *et al.* in this issue). B cells have also been shown to generate many other products *in vitro*, *in vivo*, or both. In addition to IL-10, B cells can produce IL-6 (21), Mip-1/Ccl2 (22, 23), Ccl3 (23, 24), Ccl4 (23), Ccl5/RANTES (23), Ccl7 (25), Ccl11 (23) and Ccl22 (26).

In exploring mechanisms that drive extramedullary hematopoiesis, which is the leukocyte production in locations outside the bone marrow, Rauch *et al.* (27) tested for the presence of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in the spleen after repeated LPS delivery to the peritoneum. GM-CSF was first observed in the 1960s, at the Walter and Eliza Hall Institute, as a product of kidney feeder cells that stimulated production of myelocytes and granulocytes, but not erythrocytes

(28). The factor was named and cloned, and the mouse knock-out was eventually generated in 1994 by two independent groups (29–31). The knockout was likely a bit of a disappointment: aside from progressive lung proteinosis, which was later shown to result from impaired surfactant clearance by alveolar macrophages, the mice were otherwise healthy, with a seemingly normal leukocyte diversity. In other words, GM-CSF was not as important to steady-state hematopoiesis as M-CSF, the closely related growth factor essential to monocytes and their descendants (32). Nevertheless, over the years many investigators have uncovered a variety of important functions by which GM-CSF influences the host response; in aggregate, GM-CSF functions are related to myeloid leukocyte activation, differentiation and proliferation (33). These myriad myeloid leukocyte functions impelled Rauch *et al.* (27) to determine the source of GM-CSF in the spleen. Using intracellular antibody staining and flow cytometry, the investigators detected a distinct population staining positive for GM-CSF comprising 1–4% of the B-cell population in the spleen 4 days after LPS administration. On their surfaces, these cells expressed CD19, B220, IgM, MHCII, CD5, CD43, CD93, CD138, VLA4, CD284 at relatively high levels. The cells were dimly positive for IgD, CD23, CD21 but

negative for CD11b, CD3, Ly-6G, Ly-6C, NK1.1, CD49b, Ter119, CD4, CD8, CD11c. They were, in short, B cells, identifiable by immunofluorescence and flow cytometry and capable of producing abundant quantities of IgM. Because they produced a growth factor known to activate innate leukocytes, they were named IRA B cells (Fig. 1).

How do they arise?

To investigate IRA B-cell origins, Rauch *et al.* considered the clues: IRA B cells appeared in the splenic red pulp after LPS injection and expressed markers that closely resembled B-1 B cells, immature cells or marginal zone B cells. After performing adoptive fate mapping and parabiosis experiments; using mice lacking B cells, TLR4, Myd88, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) or BAFF receptor (B-cell activating factor receptor); and blocking VLA4, the researchers concluded that IRA B cells derive from peritoneal B-1a B cells that relocate from the peritoneum to the spleen after recognizing LPS (the typical pathogen-associated molecular pattern) with TLR4, which signaled toward Myd88 but

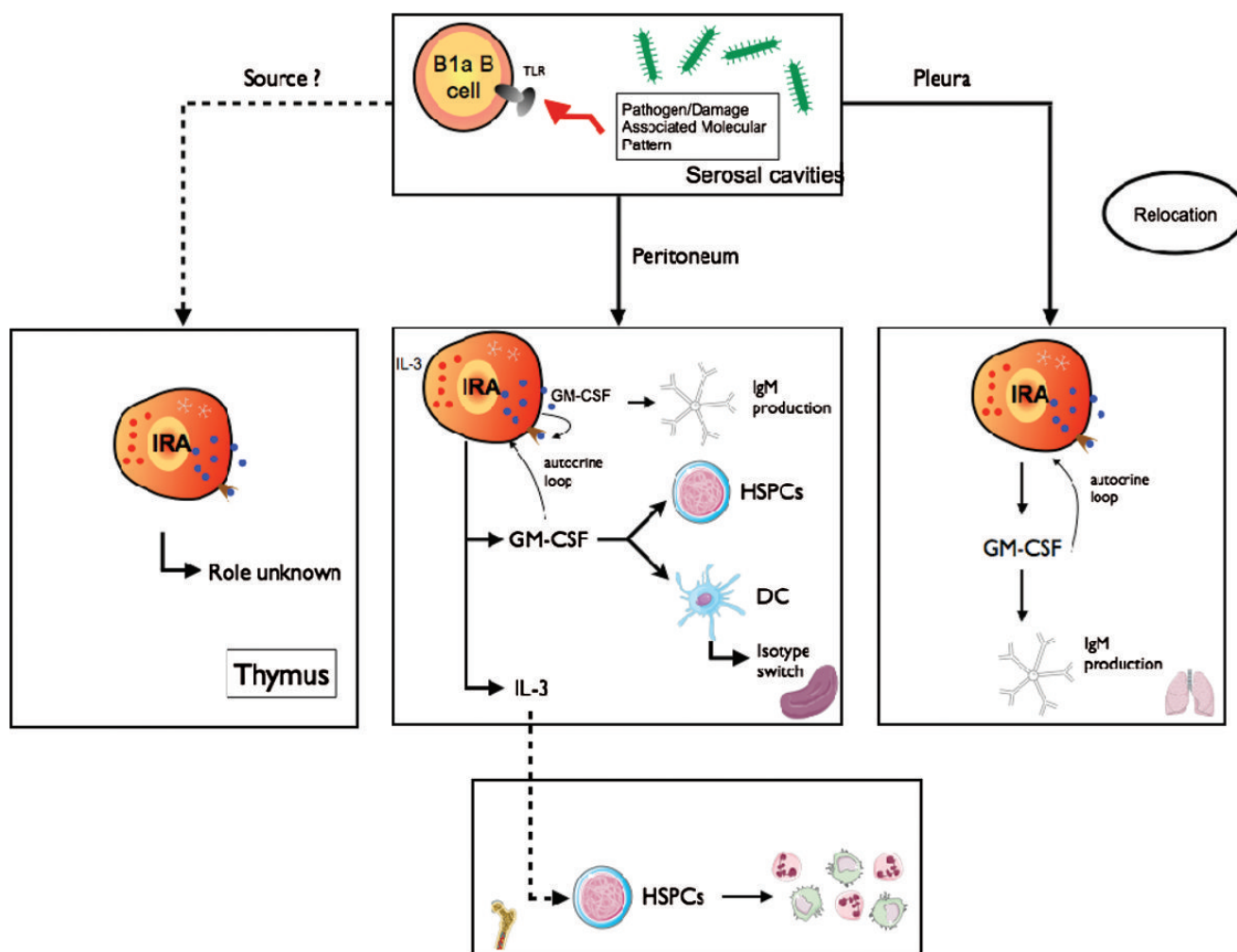


Fig. 1. The origin and function of IRA B cells. B1a B cells, following LPS–TLR4 interaction, relocate from the peritoneum or the pleural space to spleen or lung and develop into IRA B cells. IRA B cells produce GM-CSF that enhances IgM secretion, via an autocrine loop, activate DCs and boost proliferation of HSPCs. IRA B cells also produce IL-3 which promotes neutrophil and monocyte production.

not TRIF. In the absence of B cells or BAFF receptor, IRA B cells did not arise; after blocking VLA4, they failed to colonize the spleen. Transcriptome analysis of IRA B cells and comparison to other B cell subsets revealed that IRA B cells are unique, though most closely aligned with plasma cells. The similarity to plasma cells was not particularly surprising given IRA B cells' high expression of CD138, Xbp1, and IgM. Situating IRA B cells within the B-1 family provided valuable context: B-1 cells are enriched in serosal sites, can self-renew, and appear early during embryonic life (8.5 days in mice) (34) but rely on the spleen for renewal and seeding in body cavities (35, 36). B-1 cells also produce IgM antibodies but neither settle in germinal centers nor participate in somatic hypermutation—they are innate-like. As products of B-1 cells, IRA B cells can therefore be conceptualized both as innate responders (B cells belonging to the innate B-cell family) and response activators (producers of a factor known to activate innate myeloid cells).

IRA B cells' function

Are they important?

Identifying a GM-CSF-producing B cell that appears after LPS may be interesting *per se*, but evaluating that cell's importance to the host response is far more significant. Rauch *et al.* tested IRA B cells' function by generating mixed chimeric mice whose B cells lacked the capacity to produce GM-CSF and subjecting the animals to a model of polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP), a life-threatening condition. Sometimes referred to as 'blood poisoning', sepsis claims up to half a million lives in USA every year (37, 38). Its pathophysiology has confounded scientists and physicians, and several recent failed clinical trials have only underlined how incompletely we understand the condition (39). Rauch *et al.* discovered that mice with a B-cell-restricted GM-CSF deficiency died earlier and in larger numbers than controls, suggesting that IRA B cells are protective in sepsis. Specifically, in the absence of B-cell-derived GM-CSF, the animals developed pronounced inflammation, a cytokine storm, and more severe bacteremia, which led to septic shock, multi-organ failure and death. IRA B-cell-derived GM-CSF somehow staved off infection and curbed inflammation.

Following the identification of IRA B cells' effect on sepsis, Weber *et al.* (40) wished to elucidate how B-cell-derived GM-CSF might be protective. Noting that IRA B cells produce IgM and express the β common chain of the GM-CSF receptor (CD131) that is a part of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors, the investigators speculated that B-cell-derived GM-CSF controls IgM in an autocrine loop. Indeed, unlike GM-CSF-deficient and CD131-deficient B-1a B cells, wild-type B-1a B cells stimulated *in vitro* with LPS produced IgM and GM-CSF. Moreover, the addition of GM-CSF partially restored IgM production in GM-CSF-deficient cells. The data suggested that GM-CSF production by IRA B cells protects the host by generating polyreactive IgM that innately recognizes bacterial components and marks them for phagocyte-mediated elimination; without IgM, bacteria have more leeway to infect, proliferate, breach barriers and wreak inflammatory havoc.

If IRA B cells' GM-CSF crucially protects against polymicrobial sepsis or pneumonia, then strategies that increase

the number of these cells, prevent IRA B-cell loss, amplify GM-CSF secretion or boost the IgM response could represent novel axis of treatment.

Where else do they arise?

The observation that IRA B cells differentiate from B-1a B cells in the peritoneum, which is a serosal location, led to the hypothesis that IRA B cells might also develop in other serosal sites, such as the pleural space (41, 42). Using a model of airway infection, Weber *et al.* (40) showed that B-1a B cells residing in the pleural space mobilize to the lung where they produce IgM via autocrine GM-CSF signaling. Although the study did not prove that pleural B-1a B cells migrate directly across the mesothelium into the lung, cell tracking studies using intrapleural GFP⁺ B-cell transfer revealed cell accumulation in the pleural space and lungs, but not blood, a result that supports a direct route independent of blood vessels. The study concluded that a protective leukocyte population resides outside the lungs and rapidly mobilizes after lung infection. It is unknown whether IRA B cells can mobilize from other locations, such as the pericardial space.

Are IRA B cells exclusively involved in infection?

While exploring IRA B cellular function in contexts other than infection, Hilgendorf *et al.* (43) observed that IRA B cells accumulate in secondary lymphoid organs of mice with atherosclerosis, the chronic lipid-driven inflammatory disease characterized by the gradual accrual of lipoproteins and leukocytes in the vessel wall (44–46). As the underlying condition behind myocardial infarction and stroke, atherosclerosis remains by far the most lethal disease worldwide, despite the success of statins, ACE inhibitors and other drugs (47). It is unclear what triggers the appearance of IRA B cells in atherosclerosis—Hilgendorf *et al.* observed IRA B cells in atherosclerotic humans as well as *Ldlr*^{−/−} and *ApoE*^{−/−} mice (used as a model of atherosclerosis)—although it is likely that either scavenger receptors or the B-cell receptor (BCR) on B-1a B cells recognize oxidation-specific epitopes (48, 49) in ways similar to how bacterial components such as LPS trigger TLR4-mediated IRA B-cell differentiation. Once settled in the spleen, IRA B cells may promote extramedullary hematopoiesis (50), the process by which the bone marrow outsources leukocyte production to the spleen (51). Wang *et al.* reconstituted lethally irradiated mice lacking the LDL receptor (*Ldlr*^{−/−}) with ApoE knock-out (*ApoE*^{−/−}) or *ApoE*^{−/−}CD131^{−/−} bone marrow, and observed that mice lacking CD131 had reduced myelopoiesis and reduced proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) in the spleen. We have previously shown that the spleen is monocyte reservoir and a major site of extramedullary hematopoiesis during chronic inflammation (51, 52). Accordingly, *ApoE*^{−/−}CD131^{−/−} mice had reduced numbers of neutrophils and monocytes in the blood compared with *ApoE*^{−/−} mice because of reduced medullary and extramedullary hematopoiesis, resulting in fewer cells that infiltrated the plaque.

In early atherosclerosis, when extramedullary hematopoiesis is not yet dominant, IRA B cells generate and activate splenic classical dendritic cells (DCs), which then produce IL-12, thus favoring an atherosclerosis-aggravating IFN γ -dominant

T_H1 environment. Consequently, in the absence of GM-CSF-producing B cells, T_H1 -type immunity is diminished, antibodies recognizing oxidation-specific epitopes harbor T_H2 -associated Fc regions, and atherosclerotic lesions are smaller (43).

IRA B cells may therefore be targeted to treat atherosclerosis at an early phase to diminish T_H1 type immunity and both at the early and the later phases to decrease myeloid cell production in the bone marrow and spleen.

What else do IRA B cells produce?

The gene encoding GM-CSF, located on chromosome 11 in the mouse and chromosome 5 in the human, is adjacent to the gene encoding IL-3, a cytokine identified in mice in 1981 (53, 54) and in humans in 1986 (55). Because IL-3 is important to leukocyte production, proliferation, and survival (56), and because of its proximity on the genome to GM-CSF, Weber Chousterman, He *et al.* (57) asked whether IRA B cells likewise produce IL-3. The answer was yes: IRA B cells are major sources of IL-3 in humans and mice with sepsis. To determine whether IL-3 is important in the host response to bacterial infection, Weber, Chousterman, He *et al.* subjected *Il3*^{-/-} mice to CLP. Compared with wild-type mice, *Il3*^{-/-} mice were protected from sepsis, and the differences between the groups remained significant even when they were given antibiotics. Mechanistically, IL-3 promoted the production of inflammatory monocytes and neutrophils, which are the cell sources of the cytokine storm associated with severe sepsis and septic shock that causes organ damage and death. Thus, IRA B cells and their IL-3 product are upstream sentinels and amplifiers of acute inflammation. Significantly, a clinical trial on nearly 100 septic patients revealed that high IL-3 levels in plasma associated with high mortality even after investigators adjusted for various prognostic indicators. The data collectively show that IRA B cells can be both protective and detrimental in sepsis depending on the cytokine they produce. Although GM-CSF protects against sepsis by producing neutralizing antibodies with broad specificities, IL-3 can dangerously over-produce inflammatory cells. Thus, diminishing IL-3 production while conserving GM-CSF synthesis may be essential when dealing with treatments focused on the positive and detrimental contributions of IL-3 on the pathogenesis of this disease.

Conclusions and ongoing questions

As producers of potent growth factors, IRA B cells significantly contribute to immunity and inflammation. Moving forward, many questions remain. Why are B cells the major producers of GM-CSF and IL-3 in bacterial infection? For example, in the steady state, intestinal type 3 ILCs (58) and lung epithelial cells (59) produce GM-CSF. Clearly neither GM-CSF nor IL-3 are exclusive to B cells, yet, under some conditions, B cells become these growth factors' major sources. Could the BCR play a role in driving growth factor transcription, perhaps by integrating signals with those downstream of pattern recognition receptors? Moreover, what is the ultimate fate of IRA B cells? Are they nothing more than short-lived plasma-blasts, or do they have functions beyond those first several days, perhaps related to memory or trained immunity? Can

they eventually class-switch? Do they produce other growth factors? Do they have a role in autoimmune disease such as arthritis or multiple sclerosis? These and other questions will be critical over the next several years for anyone interested in deciphering the scope of this B-1 subset.

Acknowledgements

The authors declare they have no conflict of interest.

Funding

This work was supported by grants R01HL095612, R56AI104695, and Howard M. Goodman Fellowship (to F.K.S.); Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR), and Philippe Foundation (to B.G.C.).

References

- Cooper, M. D., Peterson, R. D. and Good, R. A. 1965. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature* 205:143.
- Cooper, M. D., Raymond, D. A., Peterson, R. D., South, M. A. and Good, R. A. 1966. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J. Exp. Med.* 123:75.
- Hardy, R. R., Kincade, P. W. and Dorshkind, K. 2007. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity*. 26:703.
- LeBien, T. W. 2000. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96:9.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. and Weiss, U. 1991. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354:389.
- Kelsoe, G. 1996. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity* 4:107.
- Edelman, G. M. and Gally, J. A. 1964. A model for the 7S antibody molecule. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 51:846.
- Porter, R. R. 1963. Chemical structure of gamma-globulin and antibodies. *Br. Med. Bull.* 19:197.
- Brack, C., Hiram, M., Lenhard-Schuller, R. and Tonegawa, S. 1978. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15:1.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. and Baltimore, D. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248:1517.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A. and Baltimore, D. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1 *Cell*. 59:1035.
- Fidler, J. M. 1979. The induction of hapten-specific immunological tolerance and immunity in B lymphocytes. VI. Differential tolerance susceptibility in adult spleen as a function of B-cell maturation level. *J. Exp. Med.* 150:491.
- Herzenberg, L. A., Black, S. J., Tokuhisa, T. and Herzenberg, L. A. 1980. Memory B cells at successive stages of differentiation. Affinity maturation and the role of IgD receptors. *J. Exp. Med.* 151:1071.
- Takemori, T. and Tada, T. 1974. Selective roles of thymus-derived lymphocytes in the antibody response. II. Preferential suppression of high-affinity antibody-forming cells by carrier-primed suppressor T cells. *J. Exp. Med.* 140:253.
- Baumgarth, N. 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11:34.
- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R. and Herzenberg, L. A. 1983. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J. Exp. Med.* 157:202.
- Fillatreau, S., Sweeney, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. and Anderton, S. M. 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3:944.
- Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. and Bhan, A. K. 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 16:219.

- 19 Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Preffer, F. I. and Bhan, A. K. 2000. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int. Immunol.* 12:597.
- 20 Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M. and Tedder, T. F. 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28:639.
- 21 Barr, T. A., Shen, P., Brown, S. *et al.* 2012. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J. Exp. Med.* 209:1001.
- 22 Flaishon, L., Becker-Herman, S., Hart, G., Levo, Y., Kuziel, W. A. and Shachar, I. 2004. Expression of the chemokine receptor CCR2 on immature B cells negatively regulates their cytoskeletal rearrangement and migration. *Blood* 104:933.
- 23 Honczarenko, M., Le, Y., Glodek, A. M. *et al.* 2002. CCR5-binding chemokines modulate CXCL12 (SDF-1)-induced responses of progenitor B cells in human bone marrow through heterologous desensitization of the CXCR4 chemokine receptor. *Blood* 100:2321.
- 24 Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T. and Busslinger, M. 2006. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 24:269.
- 25 Zouggar, Y., Ait-Oufella, H., Bonnin, P. *et al.* 2013. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat. Med.* 19:1273.
- 26 Schaniel, C., Pardali, E., Sallusto, F. *et al.* 1998. Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *J. Exp. Med.* 188:451.
- 27 Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Robbins, C. S. *et al.* 2012. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science* 335:597.
- 28 Bradley, T. R. and Metcalf, D. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:287.
- 29 Dranoff, G., Crawford, A. D., Sadelain, M. *et al.* 1994. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 91:5592.
- 30 Stanley, E., Lieschke, G. J., Grail, D. *et al.* 1994. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 91:5592.
- 31 Dranoff, G. and Mulligan, R. C. 1994. Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor revealed by gene transfer and gene knockout studies. *Stem Cells* 12(Suppl. 1):173.
- 32 Hamilton, J. A. 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8:533.
- 33 Hamilton, J. A. and Achuthan, A. 2012. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends. Immunol.* 34:81.
- 34 Godin, I. E., Garcia-Porrero, J. A., Coutinho, A., Dieterlen-Lièvre, F. and Marcos, M. A. 1993. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364:67.
- 35 Wardemann, H., Boehm, T., Dear, N. and Carsetti, R. 2002. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J. Exp. Med.* 195:771.
- 36 Ansel, K. M., Harris, R. B. and Cyster, J. G. 2002. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 16:67.
- 37 Angus, D. C. and van der Poll, T. 2013. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 369:2063.
- 38 Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. and Moss, M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348:1546.
- 39 Dolgin, E. 2012. Trial failure prompts soul-searching for critical-care specialists. *Nat. Med.* 18:1000.
- 40 Weber, G. F., Chousterman, B. G., Hilgendorf, I. *et al.* 2014. Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis. *J. Exp. Med.* 211:1243.
- 41 Jantz, M. A. and Antony, V. B. 2008. Pathophysiology of the pleura. *Respiration* 75:121.
- 42 Teng, R., Johkura, K., Ogiwara, N. *et al.* 2003. Morphological analysis of leucocyte transmigration in the pleural cavity. *J. Anat.* 203:391.
- 43 Hilgendorf, I., Theurl, I., Gerhard, L. M. *et al.* 2014. Innate response activator B cells aggravate atherosclerosis by stimulating T helper-1 adaptive immunity. *Circulation* 129:1677.
- 44 Libby, P., Ridker, P. M. and Hansson, G. K. 2009. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54:2129.
- 45 Weber, C. and Noels, H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* 17:1410.
- 46 Swirski, F. K. and Nahrendorf, M. 2013. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 339:161.
- 47 Bloom, D. E., Cafiero, E. T., Jane-Llopis, E. *et al.* 2012. *The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. Record no 90. Program on the Global Demography of Aging.* World Economic Forum, Geneva.
- 48 Binder, C. J. 2012. Naturally occurring IgM antibodies to oxidation-specific epitopes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 750:2.
- 49 Tsiantoulas, D., Gruber, S. and Binder, C. J. 2012. B-1 cell immunoglobulin directed against oxidation-specific epitopes. *Front. Immunol.* 3:415.
- 50 Wang, M., Subramanian, M., Abramowicz, S. *et al.* 2014. Interleukin-3/granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor promotes stem cell expansion, monocytosis, and atherosclerosis in mice with hematopoietic ApoE deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34:976.
- 51 Robbins, C. S., Chudnovskiy, A., Rauch, P. J. *et al.* 2012. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* 125:364.
- 52 Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M. *et al.* 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325:612.
- 53 Hapel, A. J., Lee, J. C., Farrar, W. L. and Ihle, J. N. 1981. Establishment of continuous cultures of thy1.2+, Lyt1+, 2-T cells with purified interleukin 3. *Cell* 25:179.
- 54 Ihle, J. N., Pepersack, L. and Rebar, L. 1981. Regulation of T cell differentiation: in vitro induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. *J. Immunol.* 126:2184.
- 55 Yang, Y. C., Ciarletta, A. B., Temple, P. A. *et al.* 1986. Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3. *Cell* 47:3.
- 56 Williams, G. T., Smith, C. A., Spooner, E., Dexter, T. M. and Taylor, D. R. 1990. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343:76.
- 57 Weber, G. F., Chousterman, B. G., He, S. *et al.* 2015. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* 347:1260.
- 58 Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D. *et al.* 2014. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* 343:1249288.
- 59 Huffman, J. A., Hull, W. M., Dranoff, G., Mulligan, R. C. and Whitsett, J. A. 1996. Pulmonary epithelial cell expression of GM-CSF corrects the alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 97:649.

Références

1. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest*. 1992;101(6):1481-3.
2. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *The New England journal of medicine*. 2015;372(17):1629-38.
3. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive care medicine*. 2003;29(4):530-8.
4. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet*. 2013;381(9868):774-5.
5. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *The Lancet Infectious diseases*. 2015;15(5):581-614.
6. Sweeney TE, Shidham A, Wong HR, Khatri P. A comprehensive time-course-based multicohort analysis of sepsis and sterile inflammation reveals a robust diagnostic gene set. *Science translational medicine*. 2015;7(287):287ra71.
7. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001;29(7):1303-10.
8. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine*. 2003;348(16):1546-54.
9. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Penuelas O, Lorente JA, Gordo F, et al. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Critical care medicine*. 2007;35(5):1284-9.
10. Kumar G, Kumar N, Taneja A, Kaleekal T, Tarima S, McGinley E, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest*. 2011;140(5):1223-31.
11. Bloom DE, Cafiero E, Jané-Llopis E, Abrahams-Gessel S, Bloom LR, Fathima S, et al. The global economic burden of noncommunicable diseases. Program on the Global Demography of Aging, 2012.
12. Adhikari NK, Fowler RA, Bhagwanjee S, Rubenfeld GD. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010;376(9749):1339-46.
13. Rhee C, Gohil S, Klompas M. Regulatory mandates for sepsis care--reasons for caution. *The New England journal of medicine*. 2014;370(18):1673-6.
14. Angele MK, Pratschke S, Hubbard WJ, Chaudry IH. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence*. 2014;5(1):12-9.
15. Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock*. 2001;16(5):340-3.

16. Zhang AQ, Yue CL, Gu W, Du J, Wang HY, Jiang J. Association between CD14 promoter -159C/T polymorphism and the risk of sepsis and mortality: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2013;8(8):e71237.
17. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(42):16645-50.
18. Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira JP. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41 Suppl 7:S408-15.
19. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun*. 2000;68(11):6398-401.
20. Toubiana J, Courtine E, Pene F, Viallon V, Asfar P, Daubin C, et al. IRAK1 functional genetic variant affects severity of septic shock. *Critical care medicine*. 2010;38(12):2287-94.
21. Teuffel O, Ethier MC, Beyene J, Sung L. Association between tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and sepsis mortality: a systematic review and meta-analysis. *Critical care medicine*. 2010;38(1):276-82.
22. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*. 1999;282(6):561-8.
23. Ouyang L, Lv YD, Hou C, Wu GB, He ZH. Quantitative analysis of the association between interleukin-10 1082A/G polymorphism and susceptibility to sepsis. *Molecular biology reports*. 2013;40(7):4327-32.
24. Lorente L, Martin MM, Borreguero-Leon JM, Barrios Y, Sole-Violan J, Ferreres J, et al. The 4G/4G Genotype of PAI-1 Polymorphism Is Associated with Higher Plasma PAI-1 Concentrations and Mortality in Patients with Severe Sepsis. *PloS one*. 2015;10(6):e0129565.
25. Madach K, Aladzsity I, Szilagyi A, Fust G, Gal J, Penzes I, et al. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study. *Critical care*. 2010;14(2):R79.
26. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):4-11.
27. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive care medicine*. 2002;28(2):108-21.
28. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical care medicine*. 2006;34(2):344-53.
29. Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*. 2014;311(13):1308-16.
30. Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, Francois B, Martin-Loeches I, Lipman J, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the

- intensive care over nations (ICON) audit. *The Lancet Respiratory medicine*. 2014;2(5):380-6.
31. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B, Network CU-R. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(2):165-72.
 32. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, Group ES. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive care medicine*. 2004;30(4):580-8.
 33. Netea MG. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *European journal of clinical investigation*. 2013;43(8):881-4.
 34. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe*. 2011;9(5):355-61.
 35. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(9):710-20.
 36. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature immunology*. 2005;6(6):551-7.
 37. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2004;75(1):39-48.
 38. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*. 2014;514(7521):187-92.
 39. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.
 40. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
 41. Cooper MD, Peterson RD, Good RA. Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature*. 1965;205:143-6.
 42. Cooper MD, Raymond DA, Peterson RD, South MA, Good RA. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *The Journal of experimental medicine*. 1966;123(1):75-102.
 43. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
 44. Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, et al. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood cells, molecules & diseases*. 1998;24(3):340-55.
 45. Gao H, Leaver SK, Burke-Gaffney A, Finney SJ. Severe sepsis and Toll-like receptors. *Seminars in immunopathology*. 2008;30(1):29-40.
 46. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
 47. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005;365(9453):63-78.
 48. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(7):499-511.
 49. Godowski PJ. A smooth operator for LPS responses. *Nature immunology*. 2005;6(6):544-6.

50. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest*. 1991;99(1):169-75.
51. Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock*. 2004;22(5):403-9.
52. Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, Uppington KM, Millar AB. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clinical and experimental immunology*. 2004;136(2):312-9.
53. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nature reviews Cardiology*. 2011;8(5):292-300.
54. Baker CC, Niven-Fairchild T, Caragnano C, Kupper TS. Outcome following femur fracture and subsequent cecal ligation and puncture in endotoxin-sensitive (C3H/HeN) and endotoxin-resistant (C3H/HeJ) mice. *The Journal of surgical research*. 1991;50(2):170-4.
55. Eisenstein TK, Deakins LW, Killar L, Saluk PH, Sultzner BM. Dissociation of innate susceptibility to Salmonella infection and endotoxin responsiveness in C3HeB/FeJ mice and other strains in the C3H lineage. *Infect Immun*. 1982;36(2):696-703.
56. Hagberg L, Hull R, Hull S, McGhee JR, Michalek SM, Svanborg Eden C. Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice. *Infect Immun*. 1984;46(3):839-44.
57. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
58. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. *J Immunol*. 2000;165(10):5392-6.
59. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature immunology*. 2004;5(10):975-9.
60. Corr SC, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptor signalling and the risk of inflammatory and immune diseases. *Journal of innate immunity*. 2009;1(4):350-7.
61. Pasterkamp G, Van Keulen JK, De Kleijn DP. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *European journal of clinical investigation*. 2004;34(5):328-34.
62. Satoh M, Ishikawa Y, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. Role of Toll like receptor signaling pathway in ischemic coronary artery disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:6708-15.
63. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1-5.
64. Ehrchen JM, Sunderkotter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):557-66.
65. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007;13(9):1042-9.
66. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(1):31-40.

67. Zamboni DS, Kobayashi KS, Kohlsdorf T, Ogura Y, Long EM, Vance RE, et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nature immunology*. 2006;7(3):318-25.
68. Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*. 2001;413(6851):36-7.
69. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(9):1119-24.
70. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(3):407-12.
71. Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, Brown GD. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *European journal of immunology*. 2011;41(2):276-81.
72. Gross O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*. 2006;442(7103):651-6.
73. Dennehy KM, Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82(2):253-8.
74. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(9):1107-17.
75. den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2009;58(7):1149-57.
76. Fitzgerald ME, Rawling DC, Vela A, Pyle AM. An evolving arsenal: viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Current opinion in microbiology*. 2014;20:76-81.
77. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
78. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2003;35(9):535-44.
79. Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circulatory shock*. 1992;38(2):145-52.
80. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(5):1747-54.
81. Munoz C, Misset B, Fitting C, Bleriot JP, Carlet J, Cavaillon JM. Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *European journal of immunology*. 1991;21(9):2177-84.
82. Jimenez R, Belcher E, Sriskandan S, Lucas R, McMaster S, Vojnovic I, et al. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in the induction of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(12):4637-42.
83. Laubach VE, Shesely EG, Smithies O, Sherman PA. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995;92(23):10688-92.

84. Annane D, Sanquer S, Seville V, Faye A, Djuranovic D, Raphael JC, et al. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet*. 2000;355(9210):1143-8.

85. Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet*. 2003;362(9398):1799-805.

86. Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, et al. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet*. 2004;363(9404):203-9.

87. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(10):791-800.

88. Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(19):11383-8.

89. Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2001;414(6866):920-4.

90. Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Molecular endocrinology*. 2007;21(6):1267-80.

91. Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, et al. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood*. 2002;99(9):3427-31.

92. Grainger JR, Wohlfert EA, Fuss IJ, Bouladoux N, Askenase MH, Legrand F, et al. Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nat Med*. 2013;19(6):713-21.

93. Brackett DJ, Hamburger SA, Lerner MR, Jones SB, Schaefer CF, Henry DP, et al. An assessment of plasma histamine concentrations during documented endotoxic shock. *Agents and actions*. 1990;31(3-4):263-74.

94. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(2):133-42.

95. Fischer MB, Prodeus AP, Nicholson-Weller A, Ma M, Murrow J, Reid RR, et al. Increased susceptibility to endotoxin shock in complement C3- and C4-deficient mice is corrected by C1 inhibitor replacement. *J Immunol*. 1997;159(2):976-82.

96. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. 2004;364(9433):545-8.

97. Annane D, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, et al. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):458-65.

98. Sappington PL, Yang R, Yang H, Tracey KJ, Delude RL, Fink MP. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology*. 2002;123(3):790-802.

99. Belaaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*. 1998;4(5):615-8.
100. Levi M, van der Poll T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends in cardiovascular medicine*. 2005;15(7):254-9.
101. Amaral A, Opal SM, Vincent JL. Coagulation in sepsis. *Intensive care medicine*. 2004;30(6):1032-40.
102. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *The Journal of pathology*. 2008;214(2):211-23.
103. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.
104. Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rodel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Critical care*. 2011;15(4):R183.
105. Cavassani KA, Carson WF, Moreira AP, Wen H, Schaller MA, Ishii M, et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. *Blood*. 2010;115(22):4403-11.
106. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(11):1475-82.
107. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, et al. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive care medicine*. 2009;35(4):678-86.
108. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS letters*. 2007;581(19):3723-33.
109. Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990;145(5):1430-4.
110. Severn A, Rapson NT, Hunter CA, Liew FY. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and beta-adrenergic agonists. *J Immunol*. 1992;148(11):3441-5.
111. van der Poll T, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(3):713-9.
112. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421(6921):384-8.
113. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(13):2581-90.
114. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):316-21.
115. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. *Annual review of pathology*. 2011;6:19-48.

116. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(12):862-74.
117. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011;306(23):2594-605.
118. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*. 1995;85(5):1341-7.
119. Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock*. 2003;19(2):113-6.
120. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet*. 1998;351(9107):950-3.
121. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(12):1287-93.
122. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nature immunology*. 2000;1(6):496-501.
123. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(11):813-22.
124. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical care medicine*. 1999;27(7):1230-51.
125. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol*. 2005;78(2):325-37.
126. Goodman R, Cummings C, Frevert C, Quan J, Martin T. Functional significance of CXCR2 downregulation on neutrophils from patients with severe sepsis. *Chest*. 1999;116(1 Suppl):111S-2S.
127. Strober S. Natural suppressor (NS) cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation: exploring obscure relationships. *Annu Rev Immunol*. 1984;2:219-37.
128. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(6):1463-74.
129. Trikha P, Carson WE, 3rd. Signaling pathways involved in MDSC regulation. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1846(1):55-65.
130. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *European journal of immunology*. 2010;40(1):22-35.
131. Movahedi K, Guillemins M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived

- suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008;111(8):4233-44.
132. Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current opinion in immunology*. 2010;22(2):238-44.
 133. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008;181(8):5791-802.
 134. Serafini P. Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. *Immunologic research*. 2013;57(1-3):172-84.
 135. Derive M, Bouazza Y, Alauzet C, Gibot S. Myeloid-derived suppressor cells control microbial sepsis. *Intensive care medicine*. 2012;38(6):1040-9.
 136. Qin H, Lerman B, Sakamaki I, Wei G, Cha SC, Rao SS, et al. Generation of a new therapeutic peptide that depletes myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Nat Med*. 2014;20(6):676-81.
 137. Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, et al. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science*. 2012;335(6068):597-601.
 138. Schumer W. Steroids in the treatment of clinical septic shock. *Annals of surgery*. 1976;184(3):333-41.
 139. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*. 2002;288(7):862-71.
 140. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *The New England journal of medicine*. 2008;358(2):111-24.
 141. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *The New England journal of medicine*. 2001;344(10):699-709.
 142. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *The New England journal of medicine*. 2012;366(22):2055-64.
 143. Payen DM, Guilhot J, Launey Y, Lukaszewicz AC, Kaaki M, Veber B, et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in patients with septic shock due to peritonitis: a multicenter randomized control trial. *Intensive care medicine*. 2015;41(6):975-84.
 144. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, Foltran F, Brienza N, Donati A, et al. Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301(23):2445-52.
 145. Antonelli M, Cutuli SL, Ronco C. Polymyxin B hemoperfusion in septic shock: just look at the evidence! *Intensive care medicine*. 2015.
 146. Antonelli M, Ronco C. Polymyxin B hemoperfusion in sepsis: growing body of evidence and occasional conflicting results. *Blood purification*. 2015;39(1-3):I-II.
 147. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA*. 2013;309(11):1154-62.

148. Opal SM, Dellinger RP, Vincent JL, Masur H, Angus DC. The next generation of sepsis clinical trial designs: what is next after the demise of recombinant human activated protein C?*. *Critical care medicine*. 2014;42(7):1714-21.
149. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(9):3507-12.
150. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(4):1167-72.
151. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.
152. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*. 2006;311(5757):83-7.
153. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
154. Oguro H, Ding L, Morrison SJ. SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell stem cell*. 2013;13(1):102-16.
155. Swirski FK, Hilgendorf I, Robbins CS. From proliferation to proliferation: monocyte lineage comes full circle. *Seminars in immunopathology*. 2014;36(2):137-48.
156. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, Hamanaka S, Onodera M, Rudolph KL, et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2013;154(5):1112-26.
157. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature*. 2015;518(7540):547-51.
158. Feinberg MW, Wara AK, Cao Z, Lebedeva MA, Rosenbauer F, Iwasaki H, et al. The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *The EMBO journal*. 2007;26(18):4138-48.
159. Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, et al. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood*. 2013;121(10):1839-49.
160. Alder JK, Georgantas RW, 3rd, Hildreth RL, Kaplan IM, Morisot S, Yu X, et al. Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *J Immunol*. 2008;180(8):5645-52.
161. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, et al. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nature immunology*. 2011;12(8):778-85.
162. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008;111(2):485-91.
163. Metcalf D, Nicola NA. The clonal proliferation of normal mouse hematopoietic cells: enhancement and suppression by colony-stimulating factor combinations. *Blood*. 1992;79(11):2861-6.

164. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelez LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 2013;495(7440):227-30.
165. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-88.
166. Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbato R, Robbins CS, et al. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*. 2012;487(7407):325-9.
167. Mendez-Ferrer S, Battista M, Frenette PS. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1192:139-44.
168. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74(7):2527-34.
169. Connor RI, Shen L, Fanger MW. Evaluation of the antibody-dependent cytotoxic capabilities of individual human monocytes. Role of Fc gamma RI and Fc gamma RII and the effects of cytokines at the single cell level. *J Immunol*. 1990;145(5):1483-9.
170. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(12):1701-7.
171. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168(7):3536-42.
172. Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma*. 1988;7(6):521-7.
173. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001;69(1):11-20.
174. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M, Bzowska M, Skrzeczynska J, Pryjma J. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology*. 2000;202(1):42-50.
175. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *European journal of immunology*. 2001;31(1):48-56.
176. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011;118(12):e50-61.
177. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(11):762-74.
178. Heine GH, Ortiz A, Massy ZA, Lindholm B, Wiecek A, Martinez-Castelao A, et al. Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nature reviews Nephrology*. 2012;8(6):362-9.
179. Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, Gorbato R, Marinelli B, Lee WW, et al. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(1):123-37.

180. Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, et al. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(9):1361-73.
181. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
182. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology*. 2006;7(3):311-7.
183. Wang Y, Cui L, Gonsiorek W, Min SH, Anilkumar G, Rosenblum S, et al. CCR2 and CXCR4 regulate peripheral blood monocyte pharmacodynamics and link to efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of inflammation*. 2009;6:32.
184. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.
185. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-70.
186. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. 2013;153(2):362-75.
187. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
188. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(10):1419-23.
189. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*. 2006;177(10):7303-11.
190. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:453-61.
191. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
192. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. 2014;41(1):21-35.
193. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-6.
194. Dutta P, Hoyer FF, Grigoryeva LS, Sager HB, Leuschner F, Courties G, et al. Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(4):497-512.
195. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1968;128(3):415-35.
196. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into

antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(5):1057-69.

197. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(12):3037-47.

198. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nature reviews Cardiology*. 2010;7(2):77-86.

199. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation*. 2003;107(7):1009-16.

200. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2008;117(13):1649-57.

201. Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodero M, Pezard A, et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(10):2920-8.

202. Sennlaub F, Auvynet C, Calippe B, Lavalette S, Poupel L, Hu SJ, et al. CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(11):1775-93.

203. Devevre EF, Renovato-Martins M, Clement K, Sautes-Fridman C, Cremer I, Poitou C. Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. *J Immunol*. 2015;194(8):3917-23.

204. Poitou C, Dalmas E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdenmour M, et al. CD14dimCD16+ and CD14+CD16+ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(10):2322-30.

205. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421-52.

206. Rodero MP, Poupel L, Loyher PL, Hamon P, Licata F, Pessel C, et al. Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *eLife*. 2015;4.

207. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(1):171-80.

208. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, et al. Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature*. 1999;401(6755):804-8.

209. Shi C, Hohl TM, Leiner I, Equinda MJ, Fan X, Pamer EG. Ly6G+ neutrophils are dispensable for defense against systemic *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2011;187(10):5293-8.

210. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. 2003;19(1):59-70.

211. Lerolle N, Nochy D, Guerot E, Bruneval P, Fagon JY, Diehl JL, et al. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive care medicine*. 2010;36(3):471-8.

212. Tsokos M. Immunohistochemical detection of sepsis-induced lung injury in human autopsy material. *Legal medicine*. 2003;5(2):73-86.
213. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:891-928.
214. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England journal of medicine*. 2006;354(6):610-21.
215. Sodhi A, Montaner S, Gutkind JS. Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(12):998-1012.
216. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659-702.
217. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2008;48:171-97.
218. Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunology letters*. 2012;145(1-2):30-8.
219. Zhang Y, Zheng J, Zhou Z, Zhou H, Wang Y, Gong Z, et al. Fractalkine promotes chemotaxis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards ischemic brain lesions through Jak2 signaling and cytoskeletal reorganization. *The FEBS journal*. 2015;282(5):891-903.
220. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology*. 2013;17(3):638-50.
221. Bestebroer J, De Haas CJ, Van Strijp JA. How microorganisms avoid phagocyte attraction. *FEMS microbiology reviews*. 2010;34(3):395-414.
222. Kuang Y, Wu Y, Jiang H, Wu D. Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors. *J Biol Chem*. 1996;271(8):3975-8.
223. Goldman DW, Chang FH, Gifford LA, Goetzl EJ, Bourne HR. Pertussis toxin inhibition of chemotactic factor-induced calcium mobilization and function in human polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1985;162(1):145-56.
224. Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*. 2000;287(5455):1046-9.
225. Liu Z, Jiang Y, Li Y, Wang J, Fan L, Scott MJ, et al. TLR4 Signaling augments monocyte chemotaxis by regulating G protein-coupled receptor kinase 2 translocation. *J Immunol*. 2013;191(2):857-64.
226. Hermand P, Pincet F, Carvalho S, Ansanay H, Trinquet E, Daoudi M, et al. Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain. *J Biol Chem*. 2008;283(44):30225-34.
227. Wilson S, Wilkinson G, Milligan G. The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J Biol Chem*. 2005;280(31):28663-74.

228. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Fernandez S, Martin de Ana A, Jones DR, et al. Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *The EMBO journal*. 2001;20(10):2497-507.
229. Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martinez AC, Mellado M. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(7):3628-33.
230. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:787-820.
231. Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cellular & molecular immunology*. 2004;1(2):95-104.
232. Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*. 2003;19(2):257-67.
233. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010;33(3):387-99.
234. Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, et al. A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol*. 2003;170(9):4649-55.
235. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nature immunology*. 2001;2(2):108-15.
236. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine*. 1998;338(7):436-45.
237. Lira SA, Zalamea P, Heinrich JN, Fuentes ME, Carrasco D, Lewin AC, et al. Expression of the chemokine N51/KC in the thymus and epidermis of transgenic mice results in marked infiltration of a single class of inflammatory cells. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(6):2039-48.
238. Tani M, Fuentes ME, Peterson JW, Trapp BD, Durham SK, Loy JK, et al. Neutrophil infiltration, glial reaction, and neurological disease in transgenic mice expressing the chemokine N51/KC in oligodendrocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(2):529-39.
239. Wiekowski MT, Chen SC, Zalamea P, Wilburn BP, Kinsley DJ, Sharif WW, et al. Disruption of neutrophil migration in a conditional transgenic model: evidence for CXCR2 desensitization in vivo. *J Immunol*. 2001;167(12):7102-10.
240. Cai S, Batra S, Lira SA, Kolls JK, Jeyaseelan S. CXCL1 regulates pulmonary host defense to *Klebsiella* Infection via CXCL2, CXCL5, NF-kappaB, and MAPKs. *J Immunol*. 2010;185(10):6214-25.
241. Mehrad B, Wiekowski M, Morrison BE, Chen SC, Coronel EC, Manfra DJ, et al. Transient lung-specific expression of the chemokine KC improves outcome in invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(9):1263-8.
242. Brown Z, Gerritsen ME, Carley WW, Strieter RM, Kunkel SL, Westwick J. Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma. *The American journal of pathology*. 1994;145(4):913-21.

243. Colotta F, Borre A, Wang JM, Tattaneli M, Maddalena F, Polentarutti N, et al. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol.* 1992;148(3):760-5.
244. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research.* 2009;29(6):313-26.
245. Poon M, Liu B, Taubman MB. Identification of a novel dexamethasone-sensitive RNA-destabilizing region on rat monocyte chemoattractant protein 1 mRNA. *Mol Cell Biol.* 1999;19(10):6471-8.
246. Rollins BJ, Pober JS. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *The American journal of pathology.* 1991;138(6):1315-9.
247. Struyf S, Van Collie E, Paemen L, Put W, Lenaerts JP, Proost P, et al. Synergistic induction of MCP-1 and -2 by IL-1beta and interferons in fibroblasts and epithelial cells. *J Leukoc Biol.* 1998;63(3):364-72.
248. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, et al. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol.* 2002;169(4):2026-33.
249. Green SR, Han KH, Chen Y, Almazan F, Charo IF, Miller YI, et al. The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK. *J Immunol.* 2006;176(12):7412-20.
250. Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, Nasorri F, Bianchi G, Traidl C, et al. Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol.* 2001;166(2):996-1002.
251. Traynor TR, Herring AC, Dorf ME, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemotactic protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity. *J Immunol.* 2002;168(9):4659-66.
252. Zhang N, Schroppel B, Lal G, Jakubzick C, Mao X, Chen D, et al. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity.* 2009;30(3):458-69.
253. Brenner D, Labreuche J, Touboul PJ, Schmidt-Petersen K, Poirier O, Perret C, et al. Cytokine polymorphisms associated with carotid intima-media thickness in stroke patients. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2006;37(7):1691-6.
254. Tucci M, Barnes EV, Sobel ES, Croker BP, Segal MS, Reeves WH, et al. Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism.* 2004;50(6):1842-9.
255. Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK, Montano M, et al. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *The Journal of experimental medicine.* 2005;202(12):1649-58.
256. Antinolo G, Fernandez RM, Noval JA, Molini JL, Borrego S. Analysis of the involvement of CCR5-Delta32 and CCR2-V64I variants in the development of endometriosis. *Molecular human reproduction.* 2004;10(3):155-7.

257. Banin-Hirata BK, Losi-Guembarovski R, Oda JM, de Oliveira CE, Campos CZ, Mazzuco TL, et al. CCR2-V64I genetic polymorphism: a possible involvement in HER2+ breast cancer. *Clinical and experimental medicine*. 2015.
258. Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Jinushi E, Ito A, Kawakami Y. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):2021-3.
259. Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *Aids*. 2004;18(5):729-38.
260. Li L, Huang L, Sung SS, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE, Jr., et al. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney international*. 2008;74(12):1526-37.
261. Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Seminars in immunology*. 2003;15(1):23-32.
262. Gong JH, Ratkay LG, Waterfield JD, Clark-Lewis I. An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(1):131-7.
263. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19(6):1518-25.
264. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(12):7265-70.
265. Robben PM, LaRegina M, Kuziel WA, Sibley LD. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(11):1761-9.
266. Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AE, Plachy J, et al. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol*. 2001;166(7):4697-704.
267. Traynor TR, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol*. 2000;164(4):2021-7.
268. Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2011;34(4):590-601.
269. Winter C, Herbold W, Maus R, Langer F, Briles DE, Paton JC, et al. Important role for CC chemokine ligand 2-dependent lung mononuclear phagocyte recruitment to inhibit sepsis in mice infected with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol*. 2009;182(8):4931-7.
270. Winter C, Taut K, Srivastava M, Langer F, Mack M, Briles DE, et al. Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol*. 2007;178(9):5828-38.
271. Zisman DA, Kunkel SL, Strieter RM, Tsai WC, Bucknell K, Wilkowski J, et al. MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(12):2832-6.

272. Slimani H, Zhai Y, Yousif NG, Ao L, Zeng Q, Fullerton DA, et al. Enhanced monocyte chemoattractant protein-1 production in aging mice exaggerates cardiac depression during endotoxemia. *Critical care*. 2014;18(5):527.
273. Munshi R, Johnson A, Siew ED, Ikizler TA, Ware LB, Wurfel MM, et al. MCP-1 gene activation marks acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(1):165-75.
274. Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(2):234-42.
275. Ngo LY, Kasahara S, Kumasaka DK, Knoblaugh SE, Jhingran A, Hohl TM. Inflammatory monocytes mediate early and organ-specific innate defense during systemic candidiasis. *The Journal of infectious diseases*. 2014;209(1):109-19.
276. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*. 1997;91(4):521-30.
277. Combadiere C, Ahuja SK, Murphy PM. Cloning, chromosomal localization, and RNA expression of a human beta chemokine receptor-like gene. *DNA and cell biology*. 1995;14(8):673-80.
278. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem*. 1998;273(37):23799-804.
279. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385(6617):640-4.
280. White GE, Greaves DR. Fractalkine: a survivor's guide: chemokines as antiapoptotic mediators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(3):589-94.
281. Kim KW, Vallon-Eberhard A, Zigmond E, Farache J, Shezen E, Shakhar G, et al. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood*. 2011;118(22):e156-67.
282. White GE, Greaves DR. Fractalkine: one chemokine, many functions. *Blood*. 2009;113(4):767-8.
283. Lyszkiewicz M, Witzlau K, Pommerencke J, Krueger A. Chemokine receptor CX3CR1 promotes dendritic cell development under steady-state conditions. *European journal of immunology*. 2011;41(5):1256-65.
284. Jacquelin S, Licata F, Dorgham K, Hermand P, Poupel L, Guyon E, et al. CX3CR1 reduces Ly6Chigh-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. *Blood*. 2013;122(5):674-83.
285. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009;113(4):963-72.
286. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience*. 2006;9(7):917-24.
287. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*. 2009;31(3):513-25.

288. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005;307(5707):254-8.
289. Poupel L, Boissonnas A, Hermand P, Dorgham K, Guyon E, Auvynet C, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(10):2297-305.
290. Pucci S, Mazzarelli P, Zonetti MJ, Fisco T, Bonanno E, Spagnoli LG, et al. CX3CR1 receptor polymorphisms, Th1 cell recruitment, and acute myocardial infarction outcome: looking for a link. *BioMed research international*. 2013;2013:451349.
291. Ramos MV, Fernandez GC, Patey N, Schierloh P, Exeni R, Grimoldi I, et al. Involvement of the fractalkine pathway in the pathogenesis of childhood hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2007;109(6):2438-45.
292. Karlmark KR, Zimmermann HW, Roderburg C, Gassler N, Wasmuth HE, Luedde T, et al. The fractalkine receptor CX(3)CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology*. 2010;52(5):1769-82.
293. Lavergne E, Combadiere B, Bonduelle O, Iga M, Gao JL, Maho M, et al. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer research*. 2003;63(21):7468-74.
294. Lee YS, Morinaga H, Kim JJ, Lagakos W, Taylor S, Keshwani M, et al. The fractalkine/CX3CR1 system regulates beta cell function and insulin secretion. *Cell*. 2013;153(2):413-25.
295. Bonduelle O, Duffy D, Verrier B, Combadiere C, Combadiere B. Cutting edge: Protective effect of CX3CR1+ dendritic cells in a vaccinia virus pulmonary infection model. *J Immunol*. 2012;188(3):952-6.
296. Lionakis MS, Swamydas M, Fischer BG, Plantinga TS, Johnson MD, Jaeger M, et al. CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes *Candida* control and host survival. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(12):5035-51.
297. Hochheiser K, Heuser C, Krause TA, Teteris S, Ilias A, Weisheit C, et al. Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(10):4242-54.
298. Ran L, Yu Q, Zhang S, Xiong F, Cheng J, Yang P, et al. Cx3cr1 deficiency in mice attenuates hepatic granuloma formation during acute schistosomiasis by enhancing the M2-type polarization of macrophages. *Disease models & mechanisms*. 2015;8(7):691-700.
299. Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, et al. Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol*. 2008;181(6):4208-18.
300. He M, Moolchala SM, Adhikari S, Bhatia M. Administration of exogenous fractalkine, a CX3C chemokine, is capable of modulating inflammatory response in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Shock*. 2009;31(1):33-9.
301. Raspe C, Hoehrl K, Rath S, Sauvart C, Bucher M. NF-kappaB-mediated inverse regulation of fractalkine and CX3CR1 during CLP-induced sepsis. *Cytokine*. 2013;61(1):97-103.
302. Pachot A, Cazalis MA, Venet F, Turrel F, Faudot C, Voirin N, et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating

- monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol.* 2008;180(9):6421-9.
303. Rodero M, Marie Y, Coudert M, Blondet E, Mokhtari K, Rousseau A, et al. Polymorphism in the microglial cell-mobilizing CX3CR1 gene is associated with survival in patients with glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(36):5957-64.
304. Daoudi M, Lavergne E, Garin A, Tarantino N, Debre P, Pincet F, et al. Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1. *J Biol Chem.* 2004;279(19):19649-57.
305. Wu J, Yin RX, Lin QZ, Guo T, Shi GY, Sun JQ, et al. Two polymorphisms in the Fractalkine receptor CX3CR1 gene influence the development of atherosclerosis: a meta-analysis. *Disease markers.* 2014;2014:913678.
306. Horuk R. Chemokine receptor antagonists: overcoming developmental hurdles. *Nature reviews Drug discovery.* 2009;8(1):23-33.
307. Haun JB, Castro CM, Wang R, Peterson VM, Marinelli BS, Lee H, et al. Micro-NMR for rapid molecular analysis of human tumor samples. *Science translational medicine.* 2011;3(71):71ra16.