



HAL
open science

Identification des mécanismes anti-inflammatoires de GILZ dans les monocytes/macrophages et de son potentiel thérapeutique dans le choc septique.

Mehdi Ellouze

► **To cite this version:**

Mehdi Ellouze. Identification des mécanismes anti-inflammatoires de GILZ dans les monocytes/macrophages et de son potentiel thérapeutique dans le choc septique.. Immunité innée. Université Paris-Saclay, 2015. Français. NNT : 2015SACLS239 . tel-01558257

HAL Id: tel-01558257

<https://theses.hal.science/tel-01558257>

Submitted on 7 Jul 2017

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.

NNT : 2015SACLS239

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N° 569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Immunologie

Par

M. Ellouze Mehdi

Identification des mécanismes anti-inflammatoires de GILZ dans
les monocytes/macrophages et de son potentiel thérapeutique
dans le choc septique

Thèse présentée et soutenue à Créteil, le 15 décembre 2015

Composition du Jury :

M Levy Yves	Professeur, Université paris-EST Créteil	Président
Mme Quesniaux Valérie	Directeur de Recherche, UMR7355	Rapporteur
Mme Jeannin Pascale	Professeur, UMR892	Rapporteur
M Launay Pierre	Directeur de Recherche, U1149	Examinateur
M Annane Djillali	Professeur, Hôpital Raymond Poincaré, Garches	Examinatrice
M Lambotte Olivier	Professeur, UMR 1184	Examinateur
Mme Godot Véronique	Professeur, Université paris-EST Créteil	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, et tout spécialement le Docteur Valérie Quesniaux et le Professeur Pascale Jeannin qui ont accepté d'être rapporteurs de mon mémoire de thèse.

Mes sincères remerciements vont également au Docteur Pierre Launay, au Professeur Djillali Annane, au Professeur Olivier Lambotte et au Professeur Yves Levy pour avoir accepté d'être examinateurs de mon travail de thèse.

Cher Professeur Véronique Godot, je vous remercie pour m'avoir accueilli, offert la possibilité de poursuivre ma thèse, pour votre encadrement, ainsi que pour votre aide lors des ultimes corrections.

Aux directeurs qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires,

Cher Docteur Françoise Bachelerie, je te remercie sincèrement, pour ton œil attentif, ton accueil et surtout d'avoir facilité ma migration vers l'unité INSERM de Créteil.

Cher Professeur Levy, sans même me rencontrer, vous avez accepté mon projet, mes souris, ma thèse et moi-même. J'ai été très sensible à la confiance que vous m'avez accordée, à vos encouragements et à votre accueil si ouvert au sein de votre laboratoire, je vous en remercie sincèrement.

Merci à vous chers Professeurs Jean-Daniel Lelièvre et Marc Pallardy pour avoir suivi mon projet.

Merci également à vous, collaborateurs médecins, pour votre contribution à ce travail.

Un merci très chaleureux, à mes professeurs de l'Université de Liège pour les si belles années passées en votre compagnie à apprendre l'Art Vétérinaire. Vous m'avez communiqué la passion de la recherche, de l'enseignement, de la clinique et des virus ... A tous mes très chers professeurs, Merci !

Une thèse, c'est également quatre années passées, en votre belle compagnie ,

Merci, mes très chers collègues et amis, pour ces inoubliables passages à Clamart, Créteil et Châtenay-Malabry. Je tiens particulièrement à te remercier Odile, au nom de tous les étudiants que tu as vu passer et que tu as soutenus. Merci pour ta gentillesse et ton aide permanente.

Merci également à tous les membres de l'INSERM U996 et U955 qui m'ont offert de si bonnes conditions de travail. Merci à vous, Bruno, Rachid, Cécile, Sylvie, Camille, Maïté, Abdouraman et tous les autres que je n'ai pas mentionnés, pardonnez-moi de ne pas tous vous nommer ...

Francis ! Toujours avec sourire et bonne humeur, tu m'as appris tant de chose sur les manips et leur réalisation... S'il y en a un qui m'a beaucoup aidé au quotidien c'est bien toi ! Alors très sincèrement merci pour toute ton aide.

Merci à toi Aurélie G. pour ces innombrables heures de tri, mais surtout, merci pour ton soutien infaillible et ta disponibilité.

Merci Hamad, nous nous sommes croisé seulement quelques fois, cependant, je tiens à te remercier pour tes conseils si spontanés, pour avoir partagé avec moi ton savoir et tes analyses. Merci aussi d'avoir cette si belle vision (et si rare aussi) de la recherche.

Merci à toi Ayrin, nous ne nous sommes pas croisés très longtemps, mais il m'a été facile de voir que tu es quelqu'un d'extraordinaire, et j'ai beaucoup apprécié faire ta connaissance.

Merci Aurélie W. pour ton aide précieuse et ton soutien indéfectible, notamment lors de mon installation à Créteil, de la mise en place du "labo souris", de tes relectures... Tu m'as tellement aidé !

Merci également à tous les étudiants et membres de l'unité U996 et U955eq16, notamment un grand merci à Christine, Mireille, Laurent, Christelle, Juliette, Lola... (la liste est si longue). Et aussi vous, Cyril, Thomas, Michele et Lylia merci pour ces petits instants cafés et toutes ces discussions. Chère Anna, merci pour ta bonne humeur et ton humour.

Aux habitants du bureau bleu du 1ier étage, U996 ,

Merci à vous Soumaya et Thi, merci pour votre gentillesse, votre aide et votre amitié. Merci d'avoir aidé à mes débuts...

Hugo, j'ai passé des moments inoubliables dans ce bureau bleu. Merci pour ton ouverture d'esprit, pour être si inventif, si curieux et si passionné. Merci pour ton soutien et ton aide qui fût toujours précieuse !

Olivier, un grand merci pour ta gentillesse et ton aide si spontanée.

Cher Joseph merci pour tout, tu as toujours été présent, au bon moment.

Et enfin à vous, vous qui m'êtes si chers,

Vous qui me connaissez suffisamment pour deviner et savoir tout ce que je ne prononce pas. A tous mes proches et très proches, sachez que tout ce chemin n'aurait pu être parcouru sans vous. Sachez qu'un merci perdu dans ces quelques pages n'est pas à la hauteur de votre soutien qui est réellement inestimable.

Table des matières

Introduction.....	1
Partie I Monocytes et macrophages à l'homéostasie et dans le contexte inflammatoire	5
1 Origine et diversité des monocytes sanguins	6
2 Répartition et origine des macrophages tissulaires.....	8
3 Hétérogénéité des macrophages résidents de la cavité péritonéale et de l'alvéole pulmonaire	10
4 Fonctions des macrophages : la phagocytose et l'activation de la réponse adaptative.....	12
5 Régulation de la réponse des macrophages	24
6 Synthèse de la première partie.....	30
Partie II Réponse inflammatoire locale et systémique, cas du choc septique et du SDRA	31
1 Inflammation locale	31
2 Généralisation systémique de l'inflammation et conséquences physiopathologiques	35
3 Entités pathologiques	39
4 Effet de l'inflammation systémique sur les cellules immunitaires	41
5 Modélisation du sepsis chez la souris	43
Partie III Rôle de GILZ sur l'immunité innée et la réaction inflammatoire	47
1 Gène de GILZ.....	47
2 Fonctions connues de GILZ	53
3 Effet de GILZ sur la réponse inflammatoire et tolérante des macrophages	59
Objectifs	65
Objectifs de l'étude.....	67
Résultats	69
Partie I Rôle d'une surexpression de GILZ restreinte aux macrophages sur l'inflammation systémique.....	71
Partie II Décryptage moléculaire du mode d'action de GILZ	101
1 Matériel et méthodes	103
2 Résultats	109
Discussion.....	127
1 Influence du niveau d'expression de GILZ sur la fonction des monocytes et des macrophages	129
2 Mécanismes d'action de GILZ : caractérisation de l'interactome de GILZ	134
3 Perspectives.....	142
Bibliographie.....	143
Bibliographie des légendes.....	164
Annexe.....	167
Glossaire	187
Résumés	191

Index des tableaux

Tableau 1 Marqueurs membranaires exprimés par les macrophages de la cavité péritonéale.....	11
Tableau 2 Principaux récepteurs de signaux de danger	17
Tableau 3 Avantages et inconvénients des modèles de sepsis murins	44
Tableau 4 : Intétractants directs de GILZ.....	111
Tableau 5 ségrégation cytosolique et nucléaire des extraits protéiques	114
Tableau 6 Fonction moléculaires des intétractants nucléaires et cytosoliques de GILZ.....	116
Tableau 7 Fonctions biologiques des intétractants de GILZ	123

Index des figures

Figure 1	Sous-population de monocytes sanguins chez l'homme et la souris.	6
Figure 2	Phagocytose bactérienne	13
Figure 3	Voies majeures dépendantes de la signalisation du TLR4.....	19
Figure 4	Classification conventionnelle de la réponse des macrophages humains	22
Figure 5	Représentation polychromatique de la plasticité des macrophages	24
Figure 6	Réponse des macrophages à une double stimulation.....	26
Figure 7	Régulation de l'expression des facteurs de transcription	27
Figure 8	Représentation schématique de l'inflammation locale	33
Figure 9	Présentation de l'alvéole pulmonaire à l'homéostasie et au cours de l'inflammation pulmonaire aiguë.	38
Figure 10	Taux de mortalité au cours de l'hospitalisation des patients en choc septique, sepsis sévère et sepsis.....	40
Figure 11	Conséquence du sepsis sur les cellules immunitaires	42
Figure 12	Sévérité des modèles de ligature et ponction du caecum chez la souris.	45
Figure 13	Organisation du gène de GILZ ou TSC22D3	48
Figure 14	Effet de GILZ sur la régulation de la signalisation du TLR4.....	56
Figure 15	Modèle du rôle de GILZ dans la réponse des macrophages.....	61
Figure 16	Mécanisme du double hybride.....	103
Figure 17	Purification d'affinité en tandem et validation technique.....	110
Figure 18	Validation du TAP-TAG	112
Figure 19	Ségrégation nucléaire et cytosolique des extraits protéiques.....	113
Figure 20	Réseau d'interactions entre les partenaires nucléaires de GILZ.....	118
Figure 21	Sous-réseau d'interactions entre les partenaires nucléaires de GILZ.....	119
Figure 22	Identification des partenaires potentiellement impliqués dans les réponses inflammatoires.....	121
Figure 23	Interaction entre GILZ et la voie signalisation du TLR4	125

Introduction

Partie I Monocytes et macrophages à l'homéostasie et dans le contexte inflammatoire

Partie II Réponse inflammatoire locale et systémique, cas du choc septique et du SDRA

Partie III Rôle de GILZ sur l'immunité innée et la réaction inflammatoire

Introduction

L'immunité peut se définir comme la réponse de l'organisme à une menace nuisible qui provient d'un agent pathogène, d'une lésion mécanique ou d'une dégénérescence cellulaire.

L'inflammation est décrite depuis l'Antiquité. Elle est la première réaction de l'organisme et occupe une part importante de la réponse immune innée. Elle est souvent nécessaire au développement de la future réponse adaptative¹. Elle a, pour *primum movens*, la présence d'un signal de danger et sa reconnaissance par des cellules spécialisées¹. Depuis plus de cent ans, l'inflammation est mise en étroite relation avec la présence de phagocytes².

Les phagocytes sont des cellules du système immunitaire ayant la capacité d'intégrer et de détruire toutes sortes de débris ou d'agents pathogènes². Certains phagocytes, comme les macrophages, patrouillent constamment dans les tissus³. D'autres, comme les neutrophiles seront recrutés ultérieurement et auront un rôle anti-infectieux essentiel⁴. Enfin, les cellules dendritiques participeront à l'élaboration de la réponse immune adaptative.

La réponse adaptative est tardive, elle a pour origine la reconnaissance et la mémorisation spécifique de l'agent pathogène ou de l'antigène qui en dérive⁵. Elle est l'apanage des lymphocytes T et B. Elle peut être très efficace pour lutter contre les infections répétitives par le même pathogène. Elle est à la base du processus de vaccination. En revanche, elle est théoriquement très peu appropriée dans la réponse précoce à une primo-infection et lors d'infections polymicrobiennes aiguës. Même si les lymphocytes T et B ont un rôle important dans la lutte anti-infectieuse, la réponse adaptative s'avère peu efficace dans ces contextes⁶.

C'est le cas dans l'inflammation systémique d'origine infectieuse, comme dans le sepsis. Le sepsis se caractérise par une signalisation de danger puissante et variée qui aboutit à une inflammation incontrôlée entreprenant tout l'organisme⁷. Cette immunopathologie extrême met en lumière l'importance de la maîtrise de la réponse inflammatoire induite par les macrophages. Cette réponse est étroitement contrôlée par une série de facteurs protéiques qui modulent la fonction des macrophages. Parmi ceux-ci, la protéine *Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper* ou GILZ est décrite pour inhiber la réponse inflammatoire des macrophages.

L'objectif de cette étude est de comprendre le rôle de GILZ dans la régulation de la réponse des macrophages au cours des maladies inflammatoires systémiques.

Partie I Monocytes et macrophages à l'homéostasie et dans le contexte inflammatoire

Les monocytes et les macrophages appartiennent à la famille de leucocytes phagocytaires mononucléés. Les monocytes sont présents dans le sang et les macrophages dans les tissus.

Historiquement, les monocytes sont décrits comme les précurseurs des macrophages tissulaires⁸. Dès le début de leur étude au XIXe siècle, les chercheurs ont été confrontés à la ressemblance des monocytes, alors appelés leucocytes mononucléaires sanguins, «avec certains éléments du tissu conjonctif [...] et des cellules de la pulpe splénique» (macrophages tissulaires). Les leçons de l'Institut Pasteur de l'époque évoquent alors un chercheur «souvent embarrassé lorsqu'on trouve ces leucocytes mononucléaires en dehors de vaisseaux, pour les distinguer des autres espèces de cellules mentionnées»². Le débat scientifique s'éclaircit lentement; il met en lumière la diversité des monocytes et macrophages et la nécessité de clarifier leurs fonctions.

Chez l'homme, les monocytes représentent environ 10% des leucocytes mononucléés circulants. Ils sont aisément accessibles donc largement étudiés, soit *ex vivo*, soit après une maturation en macrophages en présence de *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF).

En revanche chez la souris, ils représentent 2% des leucocytes mononucléés. On dénombre environ 250-500 000 monocytes circulants par souris⁹. La majorité des études murines porte donc sur des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM), différenciés en présence de M-CSF ou de macrophages tissulaires péritonéaux, spléniques ou alvéolaires. Chacune de ces populations cellulaires a une origine, un phénotype et un comportement qui lui est propre.

1 Origine et diversité des monocytes sanguins

Les monocytes sanguins proviennent des progéniteurs myéloïdes communs de la moelle osseuse. L'irradiation complète de l'organisme à l'exception des os longs, contenant la moelle osseuse, n'induit pas d'altération de leur recrutement périphérique⁸. La suppression par transgénèse ciblée de certains facteurs trophiques tels que l'interleukine IL3, le M-CSF et le GM-CSF, ou de facteurs de transcription comme PU1, IRF8, KLF4 altèrent leur différenciation¹⁰⁻¹². Chez les mammifères, trois populations de monocytes sanguins sont décrites : les monocytes classiques, intermédiaires et non-classiques (**Figure 1**).

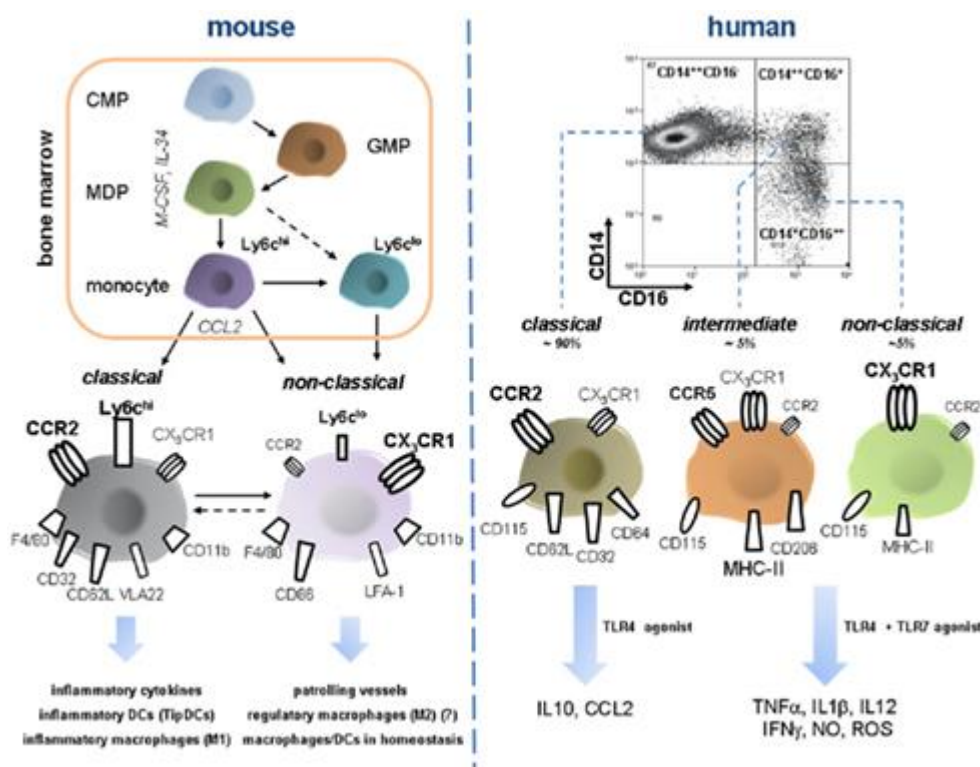


Figure 1 Sous-population de monocytes sanguins chez l'homme et la souris.

Chez la souris (à gauche), les monocytes sont identifiables par l'expression de CX3CR1 ou de CD115 (non présenté ici). Chez l'homme (à droite), ils expriment le marqueur CD14. Les monocytes se subdivisent en trois populations. Les monocytes classiques portent le récepteur CCR2 chez l'homme et la souris. Chez la souris, ils expriment également le marqueur Ly6C. Les monocytes non-classiques perdent l'expression de ces marqueurs et acquièrent chez l'homme l'expression du CD16. Une population intermédiaire est identifiée chez l'homme (CD14⁺CD16⁺) et la souris (Ly6C^{int}, non présentée ici). D'après Zimmermann et al., 2012.

Monocytes classiques

Les monocytes classiques portent chez la souris le récepteur au M-CSF (CD115). Ils expriment faiblement le récepteur à la fractalkine (CX3CR1). Ce dernier est fréquemment utilisé depuis la création d'une lignée murine CX3CR1-GFP dans laquelle les cellules CX3CR1 expriment la protéine fluorescente verte (GFP) et sont identifiables aisément en cytométrie de flux^{13,14}. Les monocytes classiques murins expriment également l'épitope Ly6C (GR-1), le récepteur à la chimiokine CCL2 (CCR2) et la L-selectin (CD62L)¹⁴. Ils représentent 40 à 50 % des monocytes totaux circulants¹⁴. Ils produisent de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tissulaire (TNF), en réponse au lipopolysaccharide bactérien (LPS)¹⁵. C'est pourquoi, ils étaient anciennement appelé monocytes inflammatoires. Lorsqu'ils sont injectés dans une souris réceptrice non stimulée, ils ont une durée de vie inférieure à un jour dans le sang¹⁴. Lors d'une inflammation tissulaire, ils sont rapidement recrutés par l'intermédiaire de la chimiokine CCL2 et de son récepteur CCR2 porté à leur surface^{14,16}.

A l'inverse, chez l'homme sain, ils représentent 85 à 90 % des monocytes totaux¹⁷. Ils sont identifiés chez les primates par une forte expression du co-récepteur aux endotoxines bactériennes (CD14), du récepteur (CCR2) mais ils n'expriment pas le récepteur de faible affinité aux immunoglobulines (CD16)^{18,19}. Chez l'homme, leur réactivité est plus controversée. Certaines études rapportent une plus forte réactivité au LPS²⁰, mais elle ne semble pas confirmée par des études récentes²¹. Leur capacité de phagocytose est supérieure à celle des monocytes «non-classiques»²¹.

Monocytes non-classiques et intermédiaires

Chez la souris, les monocytes «non classiques» perdent l'expression de CCR2 et augmentent celle de CX3CR1. Ils sont majoritairement identifiés par la perte du marqueur Ly6C. Ils ont une durée de vie allongée dans le sang et produiraient moins de cytokines pro-inflammatoires^{14,22}. Leur recrutement se fait spontanément dans certains tissus sains comme le foie ou le tissu interstitiel pulmonaire ce qui n'est pas le cas dans les organes lymphoïdes, le thymus, le péritoine et les alvéoles pulmonaires^{14,22}.

Les monocytes humains non-classiques ont une expression de CD14 diminuée et ils acquièrent les récepteurs CD16 et CCR5^{14,18,19}. Chez les primates, ils proviendraient de la différenciation des monocytes sanguins classiques CD14⁺CD16^{neg}. Ces derniers se différencient de manière continue en acquérant le marqueur CD16, puis en diminuant l'expression du CD14. De ce fait, une troisième population cellulaire apparaît, les monocytes « intermédiaires »^{21,23} (CD14⁺CD16⁺). En comparaison avec les monocytes classiques, les monocytes non-classiques produiraient davantage de cytokines pro-inflammatoires, contrairement à ce qui est observé chez la souris²¹.

La population intermédiaire est rare chez la souris (CX3CR1-GFP⁺Ly6C⁺). Elle peut également dériver des monocytes qui se différencieraient en monocytes non-classiques (CX3CR1-GFP^{high}Ly6C^{neg})^{24,25}.

En sortant des vaisseaux sanguins, les monocytes subissent un processus de maturation et se différencient en macrophages ou cellules dendritiques.

2 Répartition et origine des macrophages tissulaires

Les macrophages sont présents dans tous les tissus depuis la formation du sac vitellin et les premières différenciations hématopoïétiques du stade embryonnaire²⁶. Selon les tissus, ces cellules pléiomorphes portent différentes appellations. Par exemple, les macrophages portent le nom de « microglie » dans le système nerveux, de cellules de « Kupffer » dans le foie et « d'ostéoclastes » dans le tissu osseux³. Les macrophages sont dits « résidents » s'ils sont présents dans le tissu à l'homéostasie, alors qu'ils sont dits « recrutés » s'ils apparaissent temporairement au cours de l'inflammation.

Pour des raisons techniques et éthiques évidentes, il est très difficile de déterminer chez l'homme l'origine des macrophages à l'homéostasie. Les hypothèses scientifiques sont basées majoritairement par l'extrapolation des résultats obtenus sur l'animal. Selon la description historique, les macrophages tissulaires provenaient d'une différenciation des monocytes sanguins au sein des tissus⁸. Chez la souris, ce dogme est aujourd'hui mis à mal dans de nombreux cas.

Les modèles de parabionte murin permettent de suivre le repeuplement des macrophages tissulaires dans le tissu sain ou altéré²⁷. Ces modèles sont obtenus par une

anastomose des vaisseaux sanguins périphériques entre deux souris congéniques. La première souris est de fond génétique sauvage. Les cellules hématopoïétiques ou les macrophages de la seconde expriment la GFP (ou un autre traceur comme le CD45.2) qui permet de suivre la colonisation cellulaire dans la souris sauvage. Après anastomose, on retrouve dans la souris sauvage un mélange sanguin complet comprenant des cellules immunitaires GFP positives et négatives.

Dans ces expériences, si les macrophages tissulaires provenaient des monocytes sanguins, on retrouverait spontanément des macrophages tissulaires GFP+ dans les tissus de la souris sauvage. Bien qu'étant un cas particulier, la microglie des souris contrôles n'est pas colonisée par des cellules GFP+ en présence ou l'absence de stimulation inflammatoire. Ce résultat suggère une absence complète de différenciation des monocytes sanguins en cellules microgliales²⁷. D'autres études réalisées sur des greffes de moelle osseuse provenant de souris génétiquement modifiées renforcent ce résultat et confirment que l'auto-renouvellement est la seule source des cellules de la microglie^{28,29}. Cette caractéristique n'est pas spécifique aux cellules de la microglie.

Chez la souris, la majeure partie des macrophages résidents du péritoine ne provient pas des monocytes sanguins à l'homéostasie^{30,31}. Dans les souris non stimulées, l'incorporation *in vivo* de BrDU (Bromodésoxyuridine, un analogue traçable de la thymidine) ou le marquage de Ki67, deux marqueurs de réplication, attestent de la capacité d'auto-renouvellement de ces macrophages tissulaires³². C'est finalement très tardivement que l'on peut réinterpréter les travaux de Van Furth de 1968. Dès lors, il était démontré que 2,2% des macrophages tissulaires du péritoine incorporaient la thymidine tritiée (analogue radioactif de la thymidine et marqueur de prolifération) en l'absence d'inflammation⁸. Ils ont un potentiel d'auto-renouvellement complet de 40 jours (0,1% par heure), alors jugé très faible⁸.

D'autres types de cellules résidentes conservent ces propriétés d'auto-renouvellement. Chez la souris, des études similaires ont été réalisées sur la rate, la peau, le tissu hépatique ou les alvéoles pulmonaires, tissus dans lesquels les macrophages résidents ont une capacité d'auto-renouvellement importante^{24,31,32,33}. A l'inverse, dans l'intestin, le pancréas et le foie, ce sont les monocytes qui contribuent au renouvellement des macrophages résidents^{27,34}.

Dans le contexte spécifique de l'inflammation, tandis que les macrophages résidents persistent ou se multiplient, des monocytes classiques sanguins sont recrutés sous la dépendance de la chimiokine CCL2 et de l'expression de son récepteur CCR2. Ils deviendront les macrophages inflammatoires recrutés^{30,32}. Ces macrophages portent le marqueur Ly6C+ chez la souris. Les macrophages inflammatoires recrutés peuvent mourir par apoptose, migrer vers les ganglions lymphatiques ou se différencier en un sous-type proche des macrophages résidents¹⁶. Ils peuvent persister au moins 60 jours, mais conserveront des propriétés les différenciant des véritables macrophages résidents¹⁶.

L'origine et le phénotype des macrophages sont donc dépendants du tissu et du contexte. L'identification des macrophages doit donc prendre en compte toutes ces caractéristiques.

3 Hétérogénéité des macrophages résidents de la cavité péritonéale et de l'alvéole pulmonaire

La cavité péritonéale et le tractus respiratoire offrent un accès facile aux macrophages tissulaires chez la souris et sont, de ce fait, largement utilisés comme modèles. Ces tissus hébergent plusieurs types de macrophages qui ont des phénotypes et des origines différents (**Tableau 1**).

Dans la cavité péritonéale, les deux populations de macrophages résidents existent, les *Large Peritoneal Macrophages* (LPM) et les *Small Peritoneal Macrophages* (SPM)³⁵.

Les *Large Peritoneal Macrophages* (LPM) expriment fortement les marqueurs CD11b et F4/80 (CD45⁺ CD11b^{high} F4/80^{high}). Ils représentent 90 à 95% des macrophages dans une souris de souche C57bl/6J de 6 semaines élevée en condition SPF (*Specific Pathogen Free*)³⁵. Les LPM dérivent des précurseurs embryonnaires et s'autorenouvellent. Leur différenciation est dépendante des facteurs de transcription C/EBP- β et GATA-6. L'inactivation de ces gènes induit une diminution de la fréquence des LPM³⁰. De par leur abondance et leur plus forte expression du récepteur aux endotoxines bactériennes, le TLR4 (*Toll-like receptor 4*), les LPM détectent rapidement l'infection bactérienne^{30,36}. Ils contribuent à l'induction de la réponse inflammatoire très rapidement.

Les *Small Peritoneal Macrophages* (SPM, CD45⁺ CD11b^{high} F4/80^{low} Ly6C^{neg}) sont rares en l'absence d'inflammation (<10%). Ils proviennent des monocytes sanguins³⁰. Ces macrophages n'expriment pas ou peu le TLR4 et sont incapables d'induire *in vitro* la production de monoxyde d'azote (NO) en réponse au LPS^{35,37}. Dans le contexte inflammatoire, les monocytes « inflammatoires » sont recrutés et ils présentent un phénotype proche des SPM, mais se distinguent par l'expression du marqueur Ly6C. Ils se différencieront en SPM ou seront considérés comme des cellules dendritiques s'ils expriment également l'intégrine CD11c¹⁴.

Dans le lavage broncho-alvéolaire, à l'homéostasie, les macrophages alvéolaires résidents (AM) représentent 90% des cellules nucléées³⁸. On en dénombre environ 300 000 par souris³⁹. Les AM ont des propriétés très spécifiques liées à leur spécialisation tissulaire^{38,40}. Ils ont un taux de renouvellement très faible d'environ 40% sur un an⁴¹. On peut facilement les identifier par leur grande taille, leur forte autofluorescence, l'expression de l'intégrine membranaire CD11c, de Siglec-F, de F4/80 et du TLR4 (CD45⁺ CD11b^{neg} F4/80^{high} CD11c^{high} Siglec-F⁺)⁴². Ils n'expriment pas le marqueur CD11b à l'inverse des macrophages interstitiels du poumon (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ CD11c⁻ Siglec-F⁻) et des monocytes et macrophages recrutés lors de l'inflammation.

Tableau 1 Marqueurs membranaires exprimés par les macrophages de la cavité péritonéale

Surface molécule	LPMs	SPMs
F4/80	+++	+
CD11b	+++	+
CD11c	+	-
MHC-II	+	++
GR1	+	-
Ly6C	-	-
c-kit	-	-
CD62L	-	++
Dectin-1	+	++
DC-Sign	-	++
TLR4	++	+
CD80	++	+
CD86	+++	+
CD40	++	+
12/15-LOX	+	-
TIM4	+	-

Marqueurs phénotypiques des deux populations : Large Resident Peritoneal Macrophages (LPM) et Small peritoneal macrophages (SPM). D'après Cassado Ados et al.. 2015.

Dans les poumons et la cavité péritonéale, les seules populations représentées dans le tissu sain ou inflammé sont les LPM et les AM. Ce propos doit toutefois être nuancé pour la cavité péritonéale. En effet, au cours de la réaction inflammatoire, les LPM adhèrent fortement et certains rejoignent l'omentum^{43,44}. Plus difficile à récupérer par lavage de la cavité péritonéale, ils semblent disparaître temporairement. Ce phénomène est connu sous le nom de MDR (*macrophage disappearance reaction*)⁴³. Les autres populations apparaissent et disparaissent au fil de l'inflammation. Ils sont plus hétérogènes ce qui complique l'étude de leurs fonctions. Par ailleurs, il est très difficile d'interpréter une modification du phénotype des SPM avant et après inflammation car des cellules aux origines diverses sont alors comparées.

4 Fonctions des macrophages : la phagocytose et l'activation de la réponse adaptative

4.1 La phagocytose

Les macrophages ont été initialement décrits par Metchnikoff au 19ème siècle, comme des cellules mononuclées capables de diapédèse et de phagocytose². La phagocytose est l'internalisation et la dégradation dans le compartiment vésiculaire de la cellule d'un objet extra-cellulaire à éliminer⁴⁵, et ciblé par une série de récepteurs membranaires spécialisés⁴⁵.

Les bactéries sont reconnues par les récepteurs des protéines du complément (dont le CR3), des anticorps (dont le CD16) ou par exemple par le TLR4^{45,46}. La bactérie est ensuite internalisée dans une vésicule d'endocytose qui fusionnera avec le lysosome pour former le phagolysosome⁴⁷ (**Figure 2**).

Le phagolysosome a un pH acide. Il contient des enzymes lytiques et des dérivés oxygénés. Cette activité lytique exigeante en énergie dépend du complexe enzymatique NADPH oxydase. Ces trois composants permettent la digestion enzymatique et l'élimination de l'objet phagocyté. La phagocytose de l'agent pathogène et les perturbations causées à la cellule ont fait l'objet de deux publications récentes^{45,47}.

La phagocytose n'a pas un rôle immunitaire au sens strict. La phagocytose et la motilité sont des voies nécessaires à la nutrition des organismes dits inférieurs comme les amibes².

Chez les organismes pluricellulaires et organisés en tissus, les macrophages assurent un rôle de maintien de l'ordre tissulaire dès la genèse de l'organisme⁴⁸.

On retrouve des macrophages dans tous les tissus depuis la formation du sac vitellin où leurs précurseurs sont conçus²⁶. Or au stade embryonnaire et foetal, l'organisme se trouve dans un environnement stérile. Les macrophages ont pour fonctions principales : l'élimination des cellules apoptotiques et le remodelage tissulaire en agissant comme architecte tissulaire^{44,49}.

La formation osseuse est une illustration de cette fonction. Les ostéoclastes, macrophages multinucléés du tissu osseux situés en profondeur, donc éloignés des d'entrées naturelles des agents pathogènes sont hautement spécialisés dans l'élimination ciblée du tissu osseux⁵⁰⁻⁵². En creusant les travées, ils contribuent au renouvellement de l'os et participent à son architecture. Les souris ou les rats déficients en M-CSF (*Csf1*^{-/-}) sont incapables de générer les ostéoclastes^{53,54}. Leur absence induit un syndrome d'ostéopétrose qui comprend une altération de l'architecture osseuse, une diminution drastique de la cavité médullaire et un défaut de la croissance dentaire^{53,54,55}.

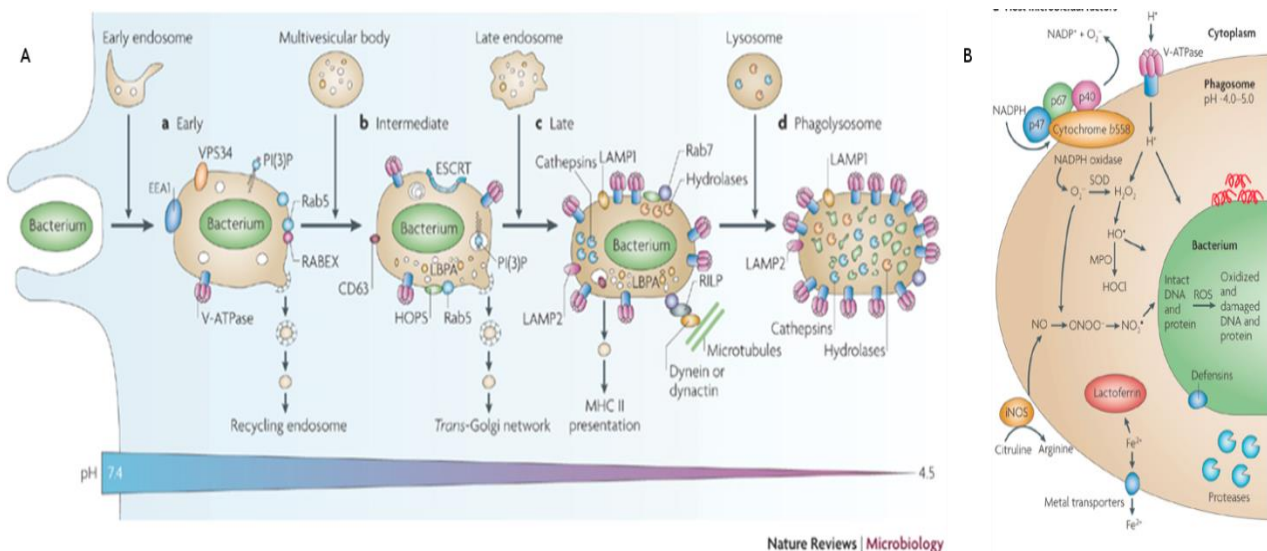


Figure 2 Phagocytose bactérienne

A) Très rapidement après la capture, le phagosome mature puis fusionne avec le lysosome pour former le phagolysosome. L'acidification progressive dépend de la production de protons par la V-ATPase. B) Les dérivés actifs de l'oxygène sont produits par le complexe de la NDAPH oxydase. L'acidification, les enzymes lytiques et les dérivés oxygénés vont détruire la bactérie. D'après Flannagan et al., 2012.

D'un point de vue immunitaire, la phagocytose est un processus important pour l'élimination des pathogènes, des débris, des cellules nécrotiques, mais également pour la dégradation des agents pathogènes et leur présentation aux lymphocytes T via les complexes majeurs d'histocompatibilité^{47,48,56}. Cette présentation antigénique est à la base de l'activation de la réponse adaptative et de l'interaction entre les macrophages et les lymphocytes T.

4.2 Activation de la réponse immunitaire T

Dans un environnement inflammé, les macrophages contribuent également à l'éducation de la réponse immunitaire adaptative. Très curieusement, ce rôle est estompé par les études sur la cellule dendritique généralement considérée comme la cellule présentatrice professionnelle, seule capable d'éduquer des lymphocytes T naïfs. Or, comme cette dernière, les macrophages sont compétents *in vivo* pour éduquer les lymphocytes T naïfs et sont dans de nombreux tissus plus abondants^{57,58}. Les macrophages arborent également un répertoire de molécules de costimulation très voisin de celui des cellules dendritiques, notamment l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, de CD40, de CD80/86 ou encore de PDL1 (**Tableau 1**). Mosser et ses collègues rapportent des différences dans l'activation des lymphocytes T suivant qu'ils soient activés par les cellules dendritiques ou les macrophages⁵⁹. Ces fonctions semblent dépendantes de leur type ou de leur localisation⁶⁰.

Quoiqu'il en soit, ils semblent également contribuer à l'amorçage et l'entretien de la réponse immunitaire adaptative⁶⁰. Cependant, ce n'est certainement pas la première fonction des macrophages puisque ceux-ci sont également présents dans les organismes dépourvus de réponse adaptative⁴⁸.

Aussi diversifiées que soient leurs fonctions, les macrophages sont présents dans tous les tissus, y compris le sang. Ils sont en mesure de détecter une agression nuisible et souvent de l'éliminer par la phagocytose. Ils initient la réaction inflammatoire qui englobe toutes les étapes jusqu'au retour à l'homéostasie.

4.3 Macrophages et génèse de l'inflammation

L'inflammation a longtemps fait l'objet d'une description clinique sans que l'on n'en comprenne les mécanismes sous-jacents. Si aujourd'hui, les manifestations de douleur, rougeur, chaleur et d'œdème sont assez bien expliquées, les mécanismes de sa régulation sont encore largement méconnus.

L'inflammation prend autant de formes qu'il existe de possibilités d'agression nuisibles à l'organisme ou de points de vue scientifiques pour l'étudier. Elle peut être suraiguë, aiguë ou chronique, locale ou systémique. Elle se trouve parfois impuissante face à un agent pathogène bien adapté comme par exemple la mycobactérie de la lèpre ou à l'inverse être la cause du processus morbide comme observé dans l'arthrite rhumatoïde^{61,62}.

Il est utile de rappeler que l'inflammation est un processus primitif non spécifiquement induit par les macrophages. De nombreux types cellulaires contribuent à sa mise en place ou à sa résolution. Ainsi, les ILCs (Cellules lymphoïdes de l'immunité innée), les fibroblastes d'origine mésenchymateuse et l'endothélium sont capables d'induire une inflammation⁶³. Les macrophages sont spécialisés dans l'orchestration de la réponse inflammatoire⁶⁴. Présents avant, pendant et après l'inflammation, leur absence en altère fortement la régulation^{64,65}.

Le point de départ de l'inflammation est aujourd'hui attribué à la détection moléculaire d'une agression et de son interprétation en signal de danger. Ces signaux de danger sont appelés PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) lorsqu'ils proviennent d'un organisme biologique ou DAMPs (*Dammage associated molecular pattern*) lorsqu'ils ont une origine endogène⁶⁶.

La famille des PAMPs est potentiellement composée de tous les fragments requis à l'organisme pathogène mais non présents dans l'organisme hôte. Il peut s'agir de fragments de la paroi bactérienne, comme le LipoPolySaccharide bactérien (LPS), de fragments de leur génome constitué d'acides nucléiques ou encore de protéines appartenant à des organes essentiels comme la flagelline.

La famille des DAMPs est composée de protéines et molécules appartenant ou produites par l'organisme hôte. Pour diverses raisons, elles peuvent se retrouver dans un

compartiment où elles n'ont pas lieu d'être. Chez l'homme et la souris, la protéine nucléaire HMGB1 peut être libérée lors de la lyse cellulaire, elle est alors perçue comme un signal de danger par une autre cellule saine^{67,68}.

Ces signaux sont identifiés par une batterie de récepteurs moléculaires spécialisés, appelés PRR (*Pathogen Recognition Receptor*). Le premier découvert est le récepteur Toll. Il intervient dans l'immunité anti-fongique de la drosophile⁶⁹. On reconnaît aux récepteurs de cette famille, une existence très ancienne remontant, au minimum, aux premiers organismes pluricellulaires organisés comme l'hydre^{70,71}. Medzhitov a découvert h-Toll, le premier récepteur humain de ce type, rebaptisé ensuite TLR4⁷². En synergie avec la protéine MD-2 sérique ou le CD14 membranaire, le TLR4 est le récepteur du LPS bactérien. Depuis, de nombreux récepteurs de signaux de danger ont été décrits (**Tableau 2**).

Ces senseurs cellulaires sont localisés à tous les endroits de la cellule où les PAMPs et DAMPs sont susceptibles de se trouver. Il n'est donc pas surprenant de retrouver les PRR responsables de la reconnaissance des ARN viraux comme RIG et MDA-5 dans le cytoplasme⁷³. A l'inverse, le TLR4 et TLR2 sont classiquement situés à la surface de la membrane cytoplasmique. Ils reconnaissent respectivement le LPS des bactéries Gram négatif et les peptidoglycans de la paroi des bactéries Gram positif dans l'environnement de la cellule. Les TLR 3, 7 et 9 sont les sentinelles reconnaissant les acides nucléiques de l'appareil vésiculaire et endosomal qui constitue une porte d'entrée courante de nombreux pathogènes et de débris extra-cellulaires.

Tableau 2 Principaux récepteurs de signaux de danger

PRRs	Localization	Ligand	Origin of the Ligand
TLR			
TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Bacteria
TLR2	Plasma membrane	Lipoprotein	Bacteria, viruses, parasites, self
TLR3	Endolysosome	dsRNA	Virus
TLR4	Plasma membrane	LPS	Bacteria, viruses, self
TLR5	Plasma membrane	Flagellin	Bacteria
TLR6	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	Bacteria, viruses
TLR7 (human TLR8)	Endolysosome	ssRNA	Virus, bacteria, self
TLR9	Endolysosome	CpG-DNA	Virus, bacteria, protozoa, self
TLR10	Endolysosome	Unknown	Unknown
TLR11	Plasma membrane	Profilin-like molecule	Protozoa
RLR			
RIG-I	Cytoplasm	Short dsRNA, 5'triphosphate dsRNA	RNA viruses, DNA virus
MDA5	Cytoplasm	Long dsRNA	RNA viruses (Picornaviridae)
LGP2	Cytoplasm	Unknown	RNA viruses
NLR			
NOD1	Cytoplasm	iE-DAP	Bacteria
NOD2	Cytoplasm	MDP	Bacteria
CLR			
Dectin-1	Plasma membrane	β -Glucan	Fungi
Dectin-2	Plasma membrane	β -Glucan	Fungi
MINCLE	Plasma membrane	SAP130	Self, fungi

Les récepteurs de signaux de danger sont regroupés par famille. Quatre sont illustrées ici, les Toll-like receptors (TLRs), les Rig like Receptors (RLRs), les Nod Like Receptors (NLRs) et les C-Lectine (CLR). Leur localisation et les différents ligands sont présentés dans le tableau. Reproduit de Takeuchi et al., 2010.

4.3.1 Signalisation des récepteurs Toll-like

Les récepteurs de la famille Toll-like reconnaissent leurs cibles par la répétition de domaines riches en leucine dans leur portion N-terminale. Le côté C-terminal est intracytoplasmique et comporte un domaine TIR (*Toll-IL1 receptor domain*). Ce domaine TIR, partagé avec le récepteur de la cytokine IL-1- β permet le recrutement des protéines de signalisation intracellulaires. La signalisation fait intervenir un grand nombre de protéines et d'adaptateurs. Ils sont regroupables en 4 voies de signalisation, dont deux majeures^{74,75,76,77} (**Figure 3**).

La première est dépendante de la protéine MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*). Les macrophages provenant de souris déficientes pour le gène MyD88 présentent une altération fonctionnelle majeure de tous les TLR à l'exception du TLR3⁷⁸. Cette protéine adaptatrice se fixe au complexe formé par le domaine TIR et la protéine TIRAP (*TIR associated protéin*). MyD88 s'associe alors aux deux kinases activatrices IRAK-1 et IRAK-4 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 and 4*)⁷⁸. Ces kinases activent la protéine TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*), puis la *TGF- β associated kinase 1* (TAK-1)⁷⁷. Cette dernière aura un rôle central dans la phosphorylation de la kinase IKK- β (*Inhibitor of nuclear factor Kappa- β Kinase subunit β*) et des *mitogen activating protein kinases* (MAPK) dont ERK, JNK et p38 (*Extracellular signal-regulated Kinases, c-Jun N-terminal Kinases et p38* respectivement)^{77,79}. L'activation d'IKK- β et des MAPKs activent le facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) par la voie classique, le facteur AP-1 composés des deux protéines c-jun et c-fos phosphorylées et le facteur CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*)^{77,80}.

La seconde voie de signalisation dépendante de TRIF (*Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN- β*) est spécifique aux TLR3 et 4⁷⁷. Le recrutement de TRIF peut soit contribuer à l'activation de NF- κ B par l'intermédiaire de TRAF-6 et RIP-1 (*Receptor Interacting Protein 1*), soit activer la voie TBK-1 (*TRAF family member associated NF- κ B activator Binding Kinase-1*) et IKKi (*I Kappa B kinase ϵ*). La phosphorylation de ces deux dernières kinases induit l'activation des facteurs de transcription IRF-3 et IRF-7 (*Interferon Regulatory Factor 3 and 7*), responsables de la réponse interféron de type 1 (IFN- α et IFN- β).

Ces deux voies ne sont ni indépendantes, ni mutuellement exclusives. Il est par exemple possible d'activer la réponse interféron de type 1 via MyD88. C'est le cas dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui produisent de grande quantité d'interféron en réponse à une infection virale. Elles expriment les TLR7 et 9 qui reconnaissent respectivement les ARN simple brin et l'ADN viral. Les cellules déficientes en TLR7 et 9 ne produisent pas ou peu d'interféron. Pourtant ces deux TLR ne recrutent pas TRIF, mais bien MyD88. Dans ce cas précis, le facteur de transcription IRF7 est activé par l'intermédiaire de IRAK-1 et de TRAF-3.

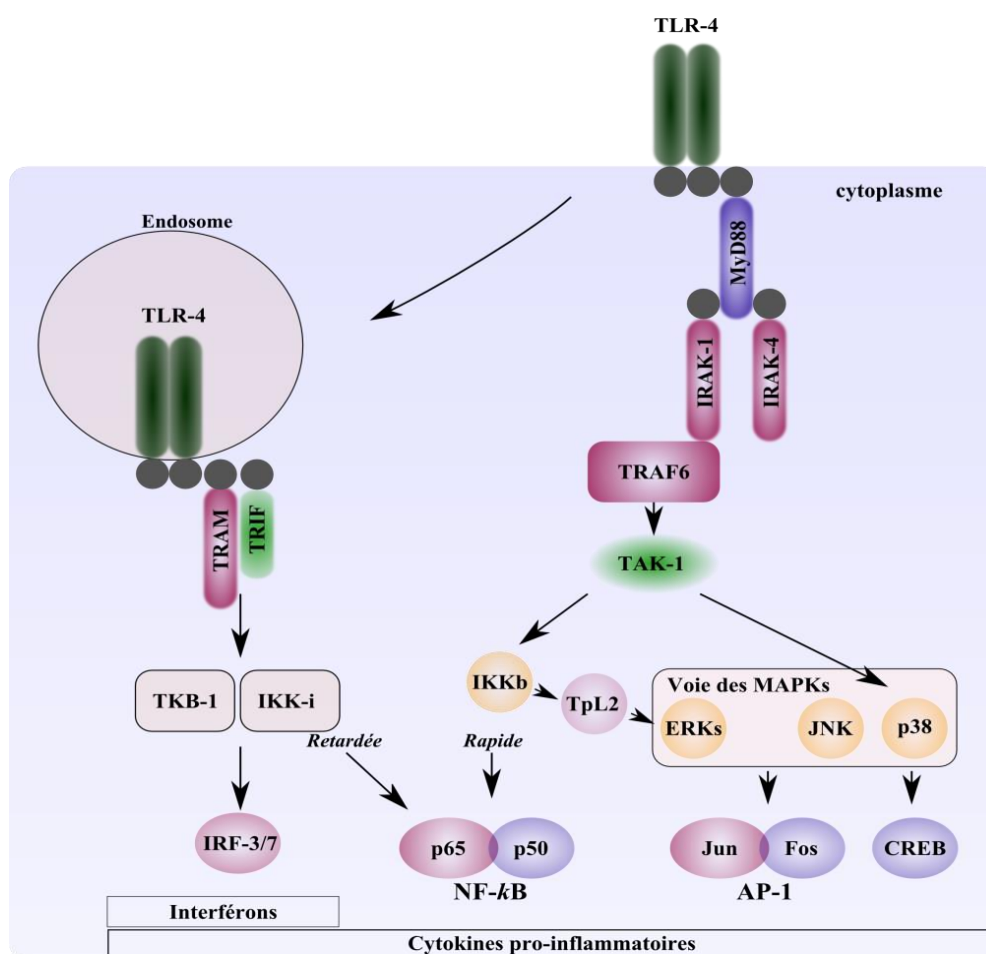


Figure 3 Voies majeures dépendantes de la signalisation du TLR4

Le Toll-like receptor 4 (TLR4) est le récepteur aux endotoxines. Il active principalement deux voies de signalisation. La première, MyD88 va induire l'activation rapide de NF- κ B (p50:p65) et la voie des MAPKs (Mitogen-Associated Protein Kinase) dont Jnk, p38 et ERK. La seconde voie est dépendante de TRIF/TRAF et aboutit à l'activation retardée de NF- κ B et des facteurs de transcription IRF-3/7 (Interferon response factor 3 and 7). Ces deux voies induisent la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF ou les interférons de type 1. Schéma produit à partir d'une synthèse bibliographique.

Le cas du TLR4 exprimé par les macrophages est également très informatif pour la compréhension de ces deux voies de signalisation. Comme indiqué précédemment, le TLR4 est exprimé à la surface membranaire de la cellule. Il y recrute effectivement MyD88 et permet l'activation rapide de NF- κ B (*Early NF- κ B activation pathway*). Ce récepteur est ensuite endocyté par le macrophage. A ce moment seulement, il recrute TRIF et induit la voie des interférons. Ces deux voies de signalisation sont indispensables à l'activation complète de la cellule⁷⁵.

La production de cytokines pro-inflammatoires qui découle de l'activation de ces voies de signalisation agit de manière paracrine mais également autocrine ce qui ajoute un degré de complexité à cette modélisation simplifiée. Dans la cellule normale, le TNF, une cytokine pro-inflammatoire majeure, est induite en quelques dizaines de minutes par l'activation de NF- κ B^{81,82}. En se fixant aux récepteurs de mort TNFR1 et 2 (*TNF Receptor 1 et 2*) le TNF active également les voies MAPK et NF- κ B⁸³.

Les cellules provenant de souris MyD88-KO, stimulées par le TLR4 sont toujours capables d'activer NF- κ B, mais avec un retard d'environ 30 à 60 minutes (*Late NF- κ B activation*)⁸⁴. Le recrutement tardif de TRIF pourrait expliquer ce résultat. Toutefois, cette activation tardive de NF- κ B est neutralisée par un traitement au cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique et par l'inhibition de l'activité du TNF via son récepteur soluble inhibiteur (TNFSR-II, *TNF Soluble receptor II*)⁸⁴. Le TNF a donc une action autocrine et entretient l'activation de NF- κ B. Cet effet est d'autant plus important *in vivo* que la communication inter-cellulaire y est intense⁸⁵.

Les signaux directement induits par la signalisation du TLR s'associent aux signaux indirectement perçus par le cocktail cytokinique environnant qui permet l'activation complète du macrophage et qui oriente sa réponse⁸⁴.

4.3.2 Réponse canonique des macrophages

L'orientation de la réponse des macrophages fait l'objet de débats et de controverses au sein de la communauté scientifique.

L'activation «classique» fait suite à la description de la réponse des macrophages péritonéaux de souris à la bactérie pathogène intracellulaire *Listeria monocytogenes*⁸⁶. Ces

expériences ont mis en évidence une résistance acquise des macrophages à l'infection. Cette résistance est due à l'activation des macrophages par l'IFN- γ produit par les lymphocytes T CD4 de type Th1⁸⁷. En induisant l'expression de iNOS (*Induced Nitric Oxide Synthase*), l'IFN- γ favorise la réponse oxydative des macrophages et *in fine* élimine le parasite intracellulaire. Le terme de macrophage M1 a donc été choisi pour faire le parallèle avec le lymphocyte T CD4 de type Th1.

Les macrophages M2, ou activés par la voie alternative apparaissent en parallèle de la réponse CD4 de type Th2 et de l'action des deux cytokines IL4 et IL13. Ces deux cytokines induisent d'une part, l'expression du récepteur au mannose qui favorise la capture de pathogènes présentant des résidus mannosylés, et d'autre part la production d'arginase qui métabolise l'arginine^{88,89}. De plus, elles limitent la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux agonistes de TLR⁸⁹.

La réponse lymphocytaire de type Th2 est associée à l'hypersensibilité de type I et à la réponse anti-parasitaire. Sachant que *Listeria* polarise la réponse des macrophages vers un type M1, il conviendrait de se demander si l'infection parasitaire peut favoriser le type M2? Le parasite pulmonaire *Nippostrongylus brasiliensis* de la famille des nématodes induit une augmentation d'IL4 et d'IL13 dans le lavage broncho-alvéolaire de souris 4 jours après l'infection⁹⁰. Cette production s'accompagne d'une inflammation pulmonaire et d'un profil de macrophage de type M2⁹⁰, ce qui semble confirmer cette dichotomie.

En réponse au LPS, les macrophages M1 synthétisent plus d'iNOS, de TNF et d'IL6 que les macrophages M2. Ces derniers produisent des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10 et participent à la reconstruction tissulaire. Sur seulement quelques critères, cette dichotomie permet le classement des macrophages.

Pourtant, comme décrit précédemment, il est attendu autant de réponses possibles que de types d'agressions nuisibles. Très rapidement des sous-classes M2a, M2b, M2c et M2d ont fait leur apparition dans la classification des macrophages humains stimulés *in vitro*^{91,92}. Chacune fait référence à un nouveau modèle de stimulation. L'activation «alternative» des macrophages dépendant de l'IL4 et l'IL13, et décrite à l'origine, correspondrait au sous-type M2a. L'IL10, une cytokine anti-inflammatoire puissante induirait le type M2c. Le type M2b, quant à lui, est induit par la reconnaissance conjointe de dépôts de complexes immuns et de

ligands de TLR. De surcroît des différences existent dans les profils de réponse des macrophages murins et humains vis-à-vis des mêmes stimuli^{93,94}. Par exemple, les macrophages murins sont plus prompts à exprimer iNOS en réponse au LPS, alors que les macrophages humains produisent davantage de chimiokines comme CCL20 ou CXCL13^{94,95}. Ceci peut s'expliquer par une divergence d'espèce. D'un autre coté, il est très difficile d'effectuer une comparaison directe car l'origine des macrophages utilisés diffère d'une espèce à l'autre. Chez l'homme, ils proviennent le plus souvent de la différenciation des monocytes. Chez la souris, ils sont soit d'origine tissulaire, soit différenciés à partir de cellules de la moelle osseuse. Finalement, le phénotypage de sous-types de macrophages est complexifié par l'absence de marqueurs spécifiques qui sont conservés chez l'homme et la souris (**Figure 4**).

Les outils d'analyse moderne du transcriptome permettent de mesurer l'expression de tous les gènes en même temps. Ce sont donc des alliés potentiels puissants pour décrire finement la réponse des macrophages. Derlindati et ses collaborateurs ont décrit le transcriptome des macrophages humains polarisés en M1 (IFN- γ +LPS), en M2a (IL4) et en M2c (IL10)⁹⁶.

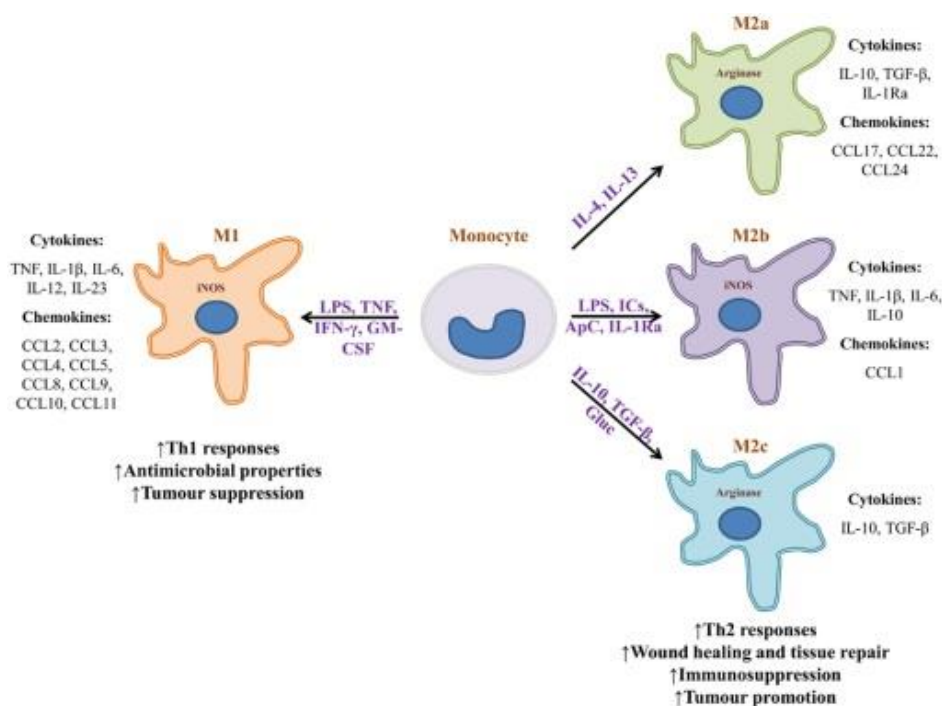


Figure 4 Classification conventionnelle de la réponse des macrophages humains

Les macrophages acquièrent un phénotype classifié en sous-types M1, M2a M2b et M2c en fonction des conditions de stimulation. ICs : Complexes immuns, ApC: Cellules apoptotiques; Gluc : Glucocorticoïdes. D'après Arango Duque et al., 2014.

La description première est ainsi complètement qualifiée, on peut y découvrir, par exemple, l'importance des voies Wnt et métaboliques dans la signature des macrophages M2.

En pratique, les scientifiques ont recherché des marqueurs simples et clairs permettant de classer les macrophages. De nombreuses revues traitent du sujet et omettent parfois de préciser les exceptions à la règle. Par exemple, l'IL-4 favorise la production de TNF et d'IL-6 par les macrophages lors de l'infection à *Neisseria meningitidis*, une bactérie Gram positif⁹⁷.

La classification proposée ci-dessus est-elle compatible avec la diversité des sous-populations de macrophages tissulaires résidents ? Dans le cas de la cavité péritonéale, nous avons évoqué deux types de macrophages résidents, les LPM et les SPM.

Les LPM ont une expression élevée des molécules de costimulation, du TLR4 et des MHC-II³⁷. En réponse au LPS *in vitro*, les SPM produiraient moins de NO, ce qui suggérerait un profil M2³⁷. Cependant, aucune différence n'est observée après une stimulation *in vivo*³⁷. De plus, les SPM sécrètent davantage de cytokines pro-inflammatoires³⁷. Enfin, l'analyse comparative de plusieurs souches de souris connues pour avoir un biais Th1 ou Th2, ne montre pas de modification de ratio entre les SPM et LPM. Cet exemple illustre qu'il faut rester prudent quant à la classification de « type M1 » ou de « type M2 » des macrophages tissulaires résidents.

Il est donc très peu aisé de classer simplement la réponse des monocytes et macrophages. Une bonne représentation schématique de cette réponse est la palette de couleur polychromatique, ou « color wheel »⁹⁸ (**Figure 5**). Chaque couleur représente un phénotype particulier, résultant de la diversité des macrophages, de l'intensité, de la nature et de la durée des stimulations.

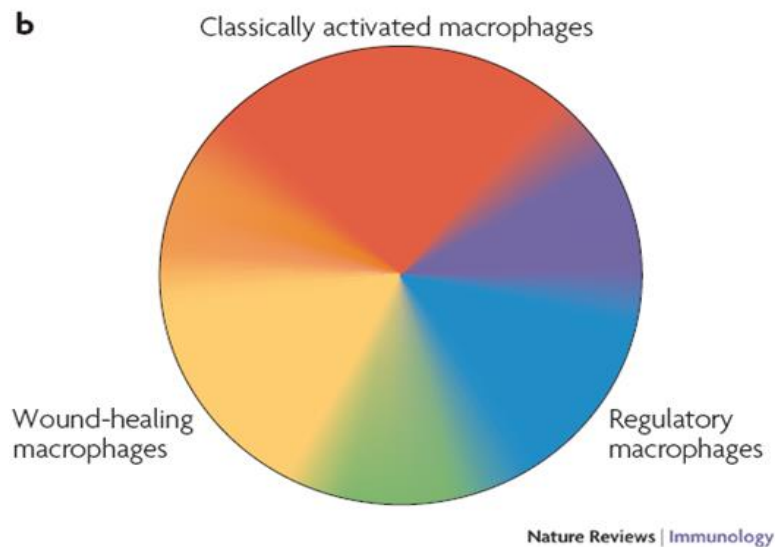


Figure 5 Représentation polychromatique de la plasticité des macrophages

Cette représentation expose trois fonctions des macrophages, les macrophages activés par la voie classique (M1), les macrophages régulateurs (plutôt M2), et ceux qui participent à la reconstruction tissulaire (Wound healing macrophages). Tous les intermédiaires existent et sont représentés par la diversité des couleurs. D'après Mosser et al., 2008.

5 Régulation de la réponse des macrophages

Pour tenter de clarifier la réponse, nous prendrons un modèle de stimulation de BMDM *in vitro* par un ligand de TLR4, le LPS d'*Escherichia coli*. Cette stimulation modélise ce que pourrait être la réponse d'un macrophage vis à vis d'une bactérie Gram négatif.

Comme décrit précédemment, cette stimulation active, par l'intermédiaire du TLR4, les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1, IRF3 et IRF7⁹⁹. Ceux-ci induisent, entre autres, la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF et l'IL6 et vont favoriser la synthèse d'iNOS. Ces facteurs suggèrent une polarisation M1 du macrophage.

Dans ce cas, une seconde stimulation du macrophage M1 par du LPS devrait de nouveau favoriser la production de iNOS et de TNF ; mais il n'en est rien. Lors d'une seconde stimulation effectuée 24 heures plus tard, le macrophage produit très peu de TNF et d'IL6^{100,101}. A l'inverse, il produit toujours d'autres marqueurs comme l'IL1-ra (récepteur inhibiteur de l'IL1), l'arginase 1 ou encore PTGES¹⁰¹.

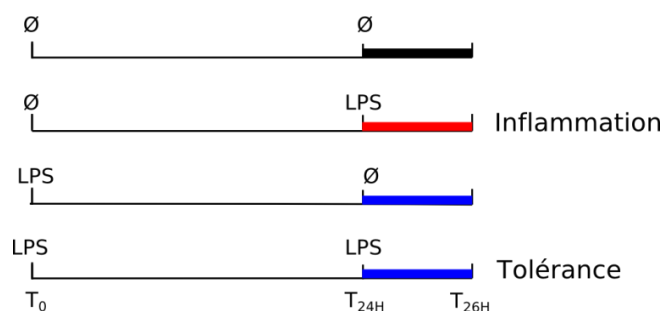
Ce phénomène est décrit sous le nom de tolérance aux endotoxines en référence aux premières expériences menées *in vivo*, qui seront détaillées ultérieurement. Sa modélisation *in vitro* est décrite dans l'encadré 1.

La stimulation répétée met clairement en évidence un mécanisme de régulation de la régulation de la réponse inflammatoire des macrophages et l'importance de la notion de temps.

Encadré 1 : Modélisation de la tolérance aux endotoxines

Décrit depuis 1894, la tolérance aux endotoxines est avant tout une observation *in vivo* (Centanni, 1894). Dans des modèles animaux, il est montré qu'une première stimulation à dose non létale par des pyrotoxines provenant de surnageants bactériens protège l'organisme contre une seconde stimulation à une dose considérée létale (Centanni, 1894). En 1914, la tolérance aux endotoxines est clairement établie *in vivo* chez le cobaye (Zinsser et al., 1914). Depuis, de nombreuses expérimentations ont été décrites dans plusieurs espèces dont l'homme et la souris.

In vitro, le modèle standard utilisé consiste en une double stimulation (Foster et al, 2007 ; Porta et al., 2009). Une unique stimulation courte induit une réponse inflammatoire des macrophages (rouge). Après une stimulation prolongée de 24 heures, le macrophage acquiert un phénotype tolérant aux endotoxines (bleu), et produira peu de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS.



5.1 Régulation transcriptionnelle

Des stimulations à forte et faible concentration de LPS n'ont pas le même effet. Il serait logique de penser qu'une forte stimulation induise une plus forte expression de TNF¹⁰². Cependant, après une stimulation à une dose admise comme étant modérément forte (100ng/ml), la transcription du TNF commence immédiatement et atteint son maximum deux heures après stimulation¹⁰³. Compte tenu du temps requis à la synthèse et à la sécrétion, le taux protéique de TNF dans le surnageant est maximal 6 heures après la stimulation¹⁰³. Bien que le TNF soit un très puissant activateur de NF- κ B et qu'il reste du LPS dans le surnageant, sa transcription s'effondre 6 à 12 heures après la stimulation, ce qui suggère une pression de régulation négative de NF- κ B¹⁰³ (Figure 6).

NF- κ B induit lui-même l'expression de trois facteurs qui régulent son activité positivement ou négativement : ikB- α , C/EBP- δ et ATF3 (Figure 7).

ikB- α exclut NF- κ B du noyau, ce qui peut en partie expliquer son inhibition précoce. C/EBP- δ est un facteur de transcription non exprimé par les BMDM de souris non stimulés. Il apparaît avec les gènes induits par NF- κ B entre 3 et 8 heures après stimulation¹⁰⁴. C/EBP- δ soutient l'expression de l'IL6, ce qui explique pourquoi l'IL-6 est induite avec un retard de 6 à 9 heures par rapport au TNF^{103,104}. En effet, les souris C/EBP- δ KO expriment peu ou pas d'IL6¹⁰⁴.

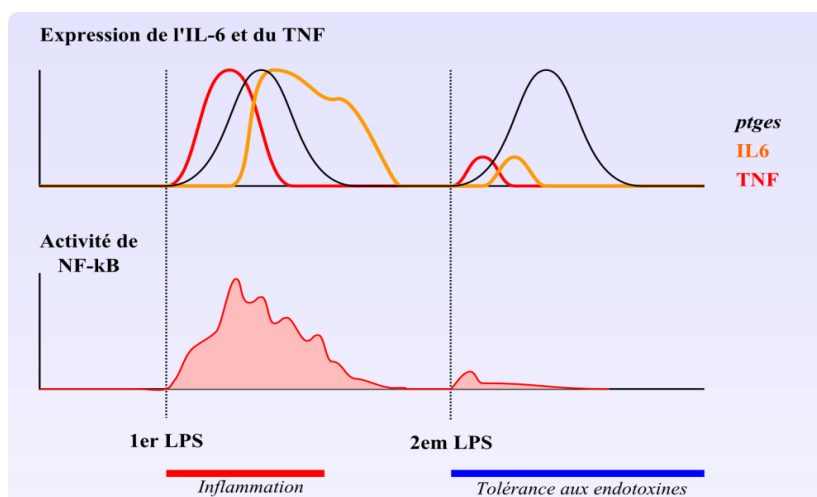
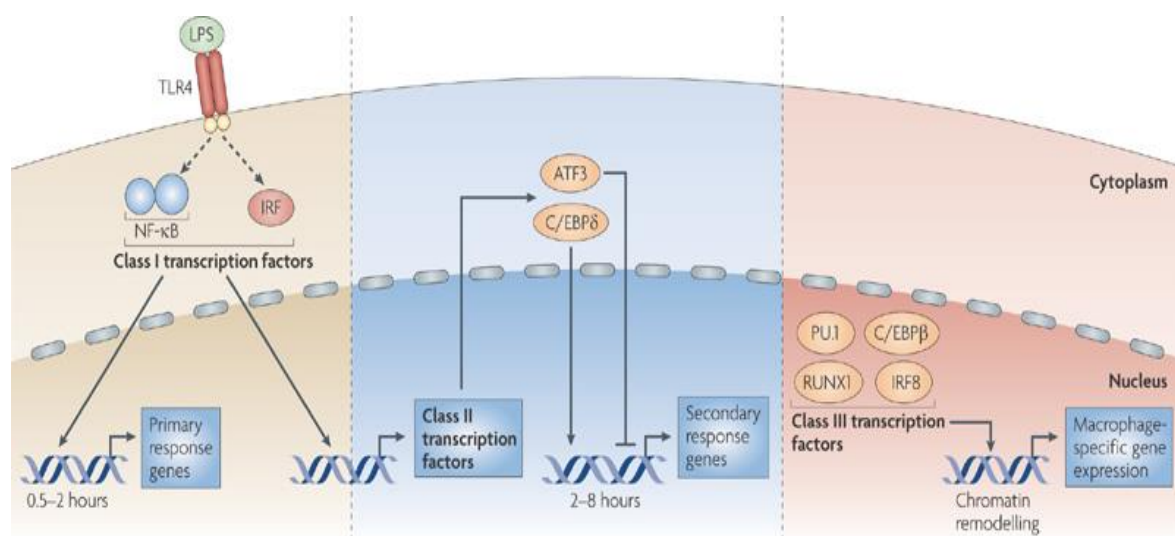


Figure 6 Réponse des macrophages à une double stimulation

La première stimulation d'un macrophage dérivé de moelle osseuse de souris par du LPS induit l'activation de NF- κ B et la production de TNF et d'IL-6. Progressivement, le macrophage va devenir tolérant. Une seconde stimulation ne réactive pas NF- κ B et le macrophage ne synthétise ni TNF ni IL6. Le gène Prostaglandin E Synthase (PTGES) est induit de façon équivalente lors de la première et de la seconde stimulation. Schéma théorique produit à partir des données de Foster et al., 2007, Porta et al., 2009 et de Hoffmann et al., 2010.

Parallèlement ATF3 est exprimé selon la même cinétique que C/EBP- δ . ATF3, facteur répresseur de la transcription, va inhiber C/EBP- δ et l'IL6^{104,105}. Puisque le TNF est induit avant par NF- κ B, les souris ATF3-KO en produisent autant que les souris sauvages, mais synthétisent davantage d'IL6. Les deux exemples de l'IL6 et du TNF attestent de l'incroyable complexité de la réponse des macrophages dans un modèle de stimulation d'apparence simple.

La stimulation des macrophages par un agoniste de PRRs active des facteurs de transcription déjà présents dans la cellule comme NF- κ B et IRF3 (**Figure 7**). Ces derniers déclenchent une seconde vague de facteurs de transcription secondaires (C/EBP- δ ; ATF3), lesquels vont à leur tour, induire une troisième vague de facteurs de transcription (C/EBP- β) et ainsi de suite. A chacune de ces vagues correspond un profil transcriptionnel particulier. Aujourd'hui, 11 profils distincts d'expression génique à la suite d'une stimulation de BMDM par du LPS ont été décrits¹⁰⁵. Parmi les gènes exprimés tardivement, on retrouve ceux qui régulent l'activation du TLR et des voies de signalisation.



Nature Reviews | Immunology

Figure 7 Régulation de l'expression des facteurs de transcription

La reconnaissance du LPS par le TLR4 active les facteurs de transcription déjà présents dans la cellule comme NF- κ B et IRF-3 qui vont induire rapidement la réponse primaire. Ensuite, ces mêmes facteurs vont déclencher l'expression des gènes de transcription comme C/EBP- δ et ATF-3, responsables de la réponse secondaire. Le macrophage s'active ainsi par une cascade d'expression de facteurs de transcription. D'après Medzhitov et al., 2009.

5.2 Régulation de la signalisation du TLR4

Comme décrit précédemment, la réponse des macrophages à une signalisation par le TLR4 est très finement régulée. Cette régulation est effectuée à différents niveaux. Le programme transcriptionnel change sous l'effet d'une modification de l'activation des facteurs de transcription, notamment NF- κ B¹⁰⁶. Il en résulte l'expression de protéines inhibitrices des voies de signalisation comme IRAK-M ou SHIP^{107,108}. Ces deux protéines inhibent directement la signalisation du TLR4, notamment par une inhibition en amont au niveau de la protéine IRAK-4¹⁰⁹.

D'autre part, le profil d'expression des microARN est très fortement modifié suite à une stimulation par du LPS¹¹⁰. Les microARN participent à la régulation post-transcriptionnelle des ARNm. Par exemple, miR146 altère l'expression de TRAF6 et IRAK1 et par conséquent limite l'activation du TLR4^{111,112}.

Un grand nombre de mécanismes d'inhibition existe, et fait l'objet de revues détaillées^{109,112,113,114}. Les deux exemples choisis illustrent l'inhibition de la signalisation dépendante du TLR4, de l'activation des facteurs de transcription clés de l'inflammation et, par conséquent, de la réponse pro-inflammatoire du macrophage¹⁰⁹.

5.3 Education immunitaire innée et régulation épigénétique des macrophages

Habituellement réservée au compartiment lymphocytaire, la mémoire immunitaire d'une activation des macrophages est une réalité, y compris chez des espèces ayant divergé avant l'apparition des poissons cartilagineux primitifs¹¹⁵⁻¹¹⁷. Ce titre aux termes antinomiques évoque la capacité du macrophage à intégrer son histoire; elle est très peu étudiée chez les mammifères^{118,119}.

La tolérance aux endotoxines est un bon exemple pour illustrer ce concept. Le phénomène de tolérance aux endotoxines, peut être la simple conséquence de la cinétique de la réponse des macrophages. En effet, en présence d'une stimulation continue, on observe un pic d'expression précoce d'IL6 ou de TNF. Après ce pic, avec ou sans restimulation le macrophage n'exprime plus ces cytokines¹⁰³. Ce constat réel mais simpliste fait abstraction d'un mécanisme fondamental de l'inhibition de ces cytokines. Si la seconde stimulation survient après plusieurs jours ou semaines, la production de cytokines par le

macrophage demeure faible¹²⁰. Ce phénomène est dû à un mécanisme complexe faisant intervenir une reprogrammation épigénétique qui maintient cette inhibition à long terme^{101,121}. Il ne s'agit plus de réponse à l'environnement présent mais bien d'une trace mnésique d'une activation antérieure. L'empreinte épigénétique laissée est régulée par des enzymes spécialisés ajoutant ou supprimant des groupements méthyle et acétyle aux histones¹⁰¹.

Ce processus d'intégration des signaux et des traces mnésiques laissées va au-delà du mécanisme de tolérance aux endotoxines. En effet, une combinaison de ces marquages épigénétiques pourraient intégrer les événements perçus par le macrophage, notamment les divers cocktails cytokiniques rencontrés et modifier sa réponse vis à vis d'autres pathogènes. L'hypothèse est étayée par des études menées dans les modèles de plantes ou d'insectes, ou plus récemment chez les mammifères^{117,118,122}.

Ainsi, la vaccination de souris SCID (*Severe combined immunodeficiency*) dépourvues de lymphocytes T et B par le bacille de Calmette Guerin (BCG) augmente leur survie après l'injection d'une dose létale de *Candida albicans*¹²³. Cet effet protecteur non spécifique du vaccin s'accompagne d'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages des souris vaccinées avant l'infection. Cette protection est également retrouvée dans les monocytes purifiés et stimulés *in vitro*¹²³. Trop peu de données scientifiques permettent de généraliser cette hypothèse, on peut cependant postuler que les différents statuts métaboliques, les infections, les inflammations ou toutes les autres formes de stress vécus par le macrophage puissent être mémorisés par des mécanismes épigénétiques qui influencent la diversité des macrophages.

C'est pourquoi il est supposé que l'étude des monocytes et macrophages s'effectue nécessairement sur des populations hétérogènes. Cette hétérogénéité proviendrait non seulement de la diversité des macrophages mais également de leur vécu qui est nécessairement différent d'une cellule à l'autre.

6 Synthèse de la première partie

Dans cette partie, ont été abordés les mécanismes de la reconnaissance des signaux de danger associés à l'infection bactérienne. Dans ce contexte, les macrophages jouent un rôle essentiel dans la détection rapide, la signalisation et l'élimination de l'infection.

Leur réponse dépend de la nature, de la durée et de l'intensité de l'exposition aux signaux de danger. Le macrophage dispose d'une réelle capacité d'intégration de ces signaux et de mémorisation. L'interprétation de tous les signaux dépend de son histoire, de son type et de sa localisation.

De plus, cette réponse est auto-régulée par divers mécanismes dont la synthèse *de novo* de protéines inhibitrices des voies de signalisation et l'inhibition active des protéines effectrices.

Le cocktail de cytokines, de chimiokines et de médiateurs de l'inflammation libérés par les macrophages va induire et orienter la réaction inflammatoire.

Le chapitre suivant va traiter de l'effet *in vivo* de l'inflammation et de ces conséquences lorsque les mécanismes de régulation sont défailants.

Partie II Réponse inflammatoire locale et systémique, cas du choc septique et du SDRA

L'inflammation locale est limitée à un tissu. Elle peut se propager par contiguïté et continuité de tissus, ou par la circulation sanguine. L'inflammation systémique est généralisée. Elle peut être soit systémique d'emblée, soit la conséquence de la généralisation d'une inflammation locale. Bien que leurs conséquences sur le système immunitaire diffèrent, les deux types d'inflammation reposent sur les mêmes mécanismes moléculaires.

1 Inflammation locale

1.1 Médiateurs solubles de l'inflammation

Les médiateurs moléculaires de l'inflammation proviennent d'une composante humorale et cellulaire. Le signal de danger, initiateur de l'inflammation, n'est pas exclusivement perçu par une cellule, mais aussi par des composantes solubles du système humoral. Le système du complément, des kinines et de la coagulation sont des exemples.

Le complément est un ensemble de protéines activées en cascade par plusieurs mécanismes¹²⁴. A titre d'exemple, les endotoxines peuvent activer le complément par la voie classique ou alternative¹²⁵⁻¹²⁸. Son activation permet la destruction directe ou indirecte des pathogènes¹²⁹. Son complexe d'attaque membranaire forme de véritables pores membranaires qui vont permettre la lyse de l'agent pathogène¹²⁹. En outre, le complément recouvre le pathogène par de petites protéines, comme la protéine C3b. Cette action d'opsonisation facilite la reconnaissance et l'élimination des pathogènes par les phagocytes¹³⁰.

L'activation du complément entraîne aussi la production des anaphylatoxines C5a et C3a¹³¹. Ces polypeptides sont respectivement reconnus par les récepteurs membranaires C5aR et C3aR^{132,133}. Ils induisent une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Dans les monocytes et les macrophages, ils favorisent la réponse oxydative (*oxydative burst*) et la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF ou l'IL6^{134,135}. Enfin, ils ont un fort pouvoir chimioattractant sur les macrophages¹³⁶.

A l'image du complément, le système des kinines (ou bradikines) joue un rôle dans l'inflammation par la régulation de la pression sanguine et l'augmentation de la perméabilité capillaire¹³⁷. Le système de la coagulation a une action essentielle sur la formation du caillot, l'hémostase et le confinement de l'agent pathogène.

Conjointement à la réponse humorale, les cellules immunitaires présentes dans le tissu produisent des médiateurs de l'inflammation, comme l'histamine, les cytokines, et les dérivés actifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS).

L'histamine est une molécule stockée dans les granules des basophiles et des mastocytes. Elle est libérée suite à leur activation, notamment par l'intermédiaire des anaphylatoxines C3a et C5a¹³⁸. L'histamine a de très nombreuses fonctions. Elle renforce notamment l'activité des kinines et des anaphylatoxines dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la contraction des muscles lisses^{139,140}.

Des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL6 et l'IL1- β sont produites. Le TNF tient un rôle central dans l'inflammation¹⁴¹. Dans différents types cellulaires, il renforce la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et favorise le recrutement des éléments figurés du sang, notamment les monocytes et les neutrophiles. Il induit la production du facteur d'agrégation plaquettaire (PAF)¹⁴². Le PAF, le TNF et l'IFN- γ agissent ensemble pour augmenter les propriétés microbicides des macrophages¹⁴³.

L'IL1- β est reconnu à la surface des cellules par un récepteur très voisin des TLRs. La signalisation est identique, et s'opère par la voie MyD88. L'IL1- β est de ce fait, un médiateur soluble important de la réaction inflammatoire.

L'IL6 produit au cours de l'inflammation de la cavité péritonéale induit l'expression des chimiokines CCL4, CCL5, CCL17 et CXCL10¹⁴⁴. Ces dernières sont requises au recrutement des lymphocytes T¹⁴⁴. Avec le TGF- β , l'IL6 induit la maturation de lymphocytes T CD4 qui produisent de l'IL17 (Th17)^{145,146}. Les Th17 orchestrent l'inflammation dans les muqueuses. Au niveau du foie, l'IL6 induit la production des protéines de la phase aiguë^{147,148}. La protéine C réactive ou CRP appartient cette famille. Elle favorise la phagocytose dépendante de l'opsonisation et contribue à l'activation du complément. Exprimée très rapidement lors de

l'inflammation, elle est éliminée à sa résolution. Elle constitue un marqueur type de l'inflammation active¹⁴⁹.

Il existe d'autres médiateurs de l'inflammation comme les prostaglandines, le thromboxane, les leukotriènes ainsi que les radicaux libres oxygénés et nitrés.

Leur action conjuguée active l'endothélium vasculaire et provoque une augmentation du débit sanguin, de la perméabilité capillaire et du flux de transsudat sanguin. L'augmentation de la sortie des fluides sanguins entraîne un œdème, une augmentation du drainage de l'espace extra-cellulaire vers les ganglions lymphatiques. L'activation de l'endothélium aboutit également à la production et la fixation des chimiokines sur la paroi du vaisseau, ce qui favorise l'extravasation des cellules immunitaires (**Figure 8**).

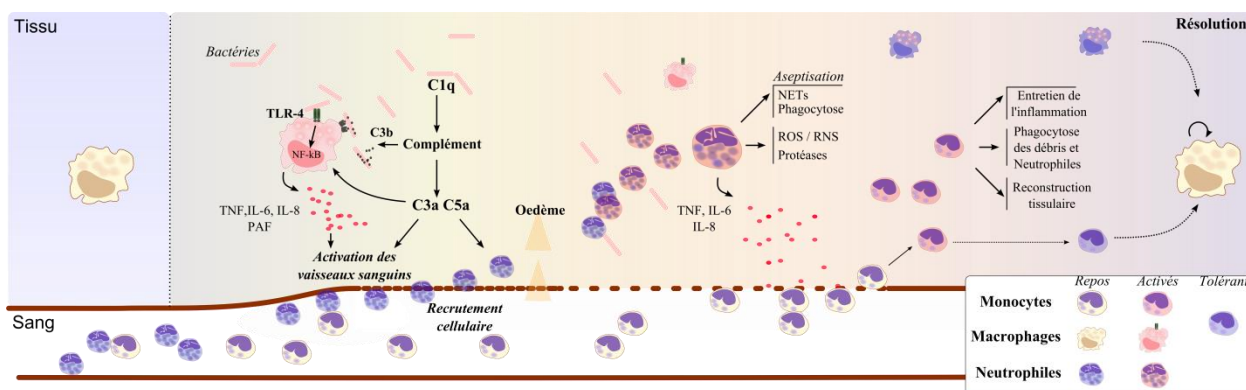


Figure 8 Représentation schématique de l'inflammation locale

Les senseurs solubles humoraux, comme le complément détectent l'entrée de la bactérie et l'opsonisent en la recouvrant de la protéine C3b. Parallèlement, les macrophages détectent la bactérie par le TLR4 et le récepteur de C3b. Ils s'activent et produisent des cytokines pro-inflammatoires. Les anaphylatoxines C5a et C3a générées par le complément favorisent cette activation. Les médiateurs de l'inflammation activent les vaisseaux sanguins, augmentent la perméabilité capillaire et favorisent le recrutement cellulaire. Les neutrophiles s'activent, produisent des cytokines, aseptisent le tissu et libère un cocktail lytique qui endommage le tissu. Les monocytes dits inflammatoires recrutés ultérieurement contribuent à l'inflammation et à sa résolution. Ils se différencient ensuite en macrophages qui prolifèrent pour coloniser le tissu. Schéma produit à partir d'une synthèse bibliographique.

1.2 Acteur cellulaire de l'inflammation et dynamique du recrutement cellulaire

En fonction des tissus, différents types de cellules immunitaires sont présents à l'homéostasie. Leur implication dans la réaction inflammatoire contribue à l'aseptisation du tissu et à la régulation de l'inflammation.

La phase cellulaire de l'inflammation est facilement modélisée chez la souris par une injection de LPS. L'inflammation reste ici aseptique, elle est spontanément résolutive avec la clairance du signal de danger. Pour rester locale, elle doit se faire à dose faible.

Après une injection de LPS, on observe le recrutement local des neutrophiles dès les premières heures ; il atteint son maximum après 48 heures¹⁵⁰. Les neutrophiles proviennent du compartiment sanguin et indirectement de la moelle osseuse¹⁵¹. Leur présence signe une inflammation active septique. Les neutrophiles, spécialisés dans l'aseptisation du tissu possèdent une forte capacité de phagocytose et d'élimination bactérienne⁴. Ils libèrent un cocktail d'enzymes lytiques, des dérivés oxygénés aux effets dévastateurs sur l'agent pathogène, mais également sur le tissu¹⁵². Les protéases, comme l'élastase ou les collagénases détruisent la matrice tissulaire.

Dans un modèle murin, les monocytes Ly6C+ circulants sont recrutés entre deux et quatre heures après l'induction de l'inflammation¹⁵³. Leur nombre reste très faible et augmente progressivement les jours suivants. Le recrutement massif des monocytes apparaît entre trois et six jours après l'injection¹⁵⁴. Ils sont associés à l'inflammation subaiguë. Ils contribuent à l'entretien et à la résolution de l'inflammation, ainsi qu'à la reconstruction tissulaire¹⁵⁵.

Après une à plusieurs semaines, les cellules lymphocytaires T et B sont recrutées en masse. L'inflammation devient chronique si elle est entretenue.

La capacité de recrutement local est dépendante de la réserve cellulaire du sang et de la moelle osseuse¹⁵⁶. Dans le sang, on observe une augmentation ou une diminution du taux de neutrophiles ou de monocytes circulants. Cette variation reflète l'équilibre entre la production dans la moelle et leur recrutement dans le tissu inflammé.

Après aseptisation du tissu, les macrophages phagocytent les neutrophiles et, deviennent mûres pour contribuer à la reconstruction tissulaire¹⁵⁵. Tous les mécanismes associés à l'inflammation aiguë locale sont conservés lors de l'inflammation systémique.

2 Généralisation systémique de l'inflammation et conséquences physiopathologiques

La généralisation de l'inflammation découle d'une boucle d'amplification ou d'une entrée massive de signaux de danger dans le sang^{7,157}.

La source primitive n'est pas toujours identifiable¹⁵⁷. L'inflammation et la souffrance tissulaire cellulaire générées créent de nouveaux signaux de dangers endogènes. L'amplification peut aboutir à une perméabilité des barrières naturelles, dont celle de la muqueuse intestinale. La translocation bactérienne du tube digestif vers le sang pourrait être une source supplémentaire de signaux de danger¹⁵⁸. Une fois la boucle activée, l'inflammation se généralise rapidement. A ce stade, elle n'est pas simplement induite par la source primitive mais par la perception de signaux de danger variés et abondants.

Il s'ensuit une activation cellulaire et production massive de médiateurs de l'inflammation connues sous le nom d'orage cytokinique (*cytokine storm*) à l'origine de multiples désordres⁷.

2.1 Conséquences cardio-circulatoires

2.1.1 Dérégulation de la pression sanguine

La première conséquence de l'inflammation systémique est une diminution de la perfusion périphérique et de la pression sanguine¹⁵⁹.

La pression sanguine résulte de l'adéquation entre le volume sanguin circulant, le débit cardiaque et la vasoconstriction périphérique¹⁶⁰. Ces paramètres sont altérés par l'inflammation systémique. L'activation des vaisseaux sanguins, notamment par l'histamine et les anaphylatoxines induit une perte de tonus vasculaire et une baisse de la pression sanguine. Elle limite le retour veineux et finalement le remplissage cardiaque. Par un effet réflexe, la fréquence cardiaque augmente et préserve temporairement le débit cardiaque. Dans les cas extrêmes, le cœur ne peut plus compenser; la fréquence et le débit s'effondrent¹⁶¹. On observe en parallèle, le collapsus des vaisseaux sanguins périphériques. C'est l'induction du «choc»¹⁶².

Le défaut de perfusion périphérique limite l'apport de nutriments dans les tissus et l'élimination des déchets métaboliques.

2.1.2 Hémostase et coagulation intravasculaire disséminée

La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est une conséquence grave de l'inflammation systémique. Ce syndrome est caractérisé par une activation systémique de la coagulation¹⁶³.

A l'image du complément, la coagulation est induite par l'activation en cascade de facteurs solubles. Le produit final est la fibrine qui polymérise pour former un caillot. En situation normale, la fibrine est dégradée par la fibrinolyse.

L'inflammation systémique peut activer la coagulation de manière diffuse dans le sang par différents intermédiaires dont les fibres de collagène présentées par les vaisseaux lésés, les bactéries, ou encore le facteur tissulaire¹⁶⁴. Ce phénomène est favorisé par la stase sanguine résultant de la vasodilatation périphérique. Des micro-thrombi ou des thrombi oblitèrent respectivement les vaisseaux sanguins de petites et moyennes tailles¹⁶³. Au niveau tissulaire, ce phénomène provoque des ischémies et aggrave le déficit de perfusion périphérique. Il s'accompagne également d'une consommation accrue des facteurs de coagulation.

En parallèle, l'inflammation systémique favorise activement la fibrinolyse. L'excès de fibrinolyse et la consommation des facteurs de coagulation lors de la CIVD dérèglent la formation du caillot¹⁶⁵. L'hémostase n'est plus assurée, ceci favorise les hémorragies.

2.2 Conséquences métaboliques

La seconde conséquence est métabolique. L'orage cytokinique active presque toutes les cellules de l'organisme et entraîne une surconsommation énergétique.

La principale source d'énergie rapidement délivrable est le glucose sanguin. Le glucose est converti en pyruvate par la glycolyse anaérobie. Le pyruvate est alors soit utilisé par le cycle de l'acide citrique, voie aérobie requérant de l'oxygène, soit transformé en lactate par la lactate deshydrogénase (LDH)¹⁶⁶.

Dans le contexte de l'inflammation systémique, la perfusion est altérée, l'apport en oxygène dans les tissus décroît. Les voies aérobies sont délaissées aux profits de la glycolyse anaérobie, le pyruvate est principalement transformé en lactate^{167,168}. Le foie n'étant plus alors en mesure d'assurer sa fonction d'élimination, le lactate s'accumule dans l'organe puis dans le sang^{169,170}. Il est un marqueur du défaut de perfusion périphérique associé ou non à une souffrance hépatique^{171,172}.

2.3 Défaillance viscérale multiple

La défaillance viscérale multiple est la conséquence de la souffrance tissulaire induite par la CIVD, le déficit métabolique et le stress causé par l'inflammation. L'incapacité des organes vitaux comme le foie, le cœur, les poumons ou les reins à exercer leurs fonctions génère des perturbations locales ou générales. Citons comme exemple, le dysfonctionnement pulmonaire sachant que les syndromes inflammatoires systémiques ont fréquemment une origine pulmonaire^{173,174}. Les poumons, organes d'échange entre l'air alvéolaire et le sang sont très vascularisés. Normalement, l'espace alvéolo-capillaire est minime. L'œdème induit par l'inflammation pulmonaire a deux conséquences présentées dans la figure 9^{175,176}. D'une part, il augmente l'espace interstitiel et donc la distance entre l'air et le sang. D'autre part, les alvéoles se remplissent de transsudat qui empêche l'échange gazeux. Le phénomène étant généralisé, une diminution nette de l'élimination du dioxyde de carbone et de l'oxygénation du sang se produit¹⁷⁷.

Les conséquences se généralisent à l'organisme en cas de forte diminution de l'oxygénation du sang.

2.4 Effet sur la température corporelle

La température corporelle est également altérée. Les pyrogènes circulants comme l'IL1- β favorisent l'hyperthermie. Cette hyperthermie est possible tant que le patient est stable. Dans le cas contraire, une hypothermie s'installe. Elle est associée à la défaillance cardiocirculatoire et métabolique ; elle constitue un facteur pronostic négatif de la survie¹⁷⁸.

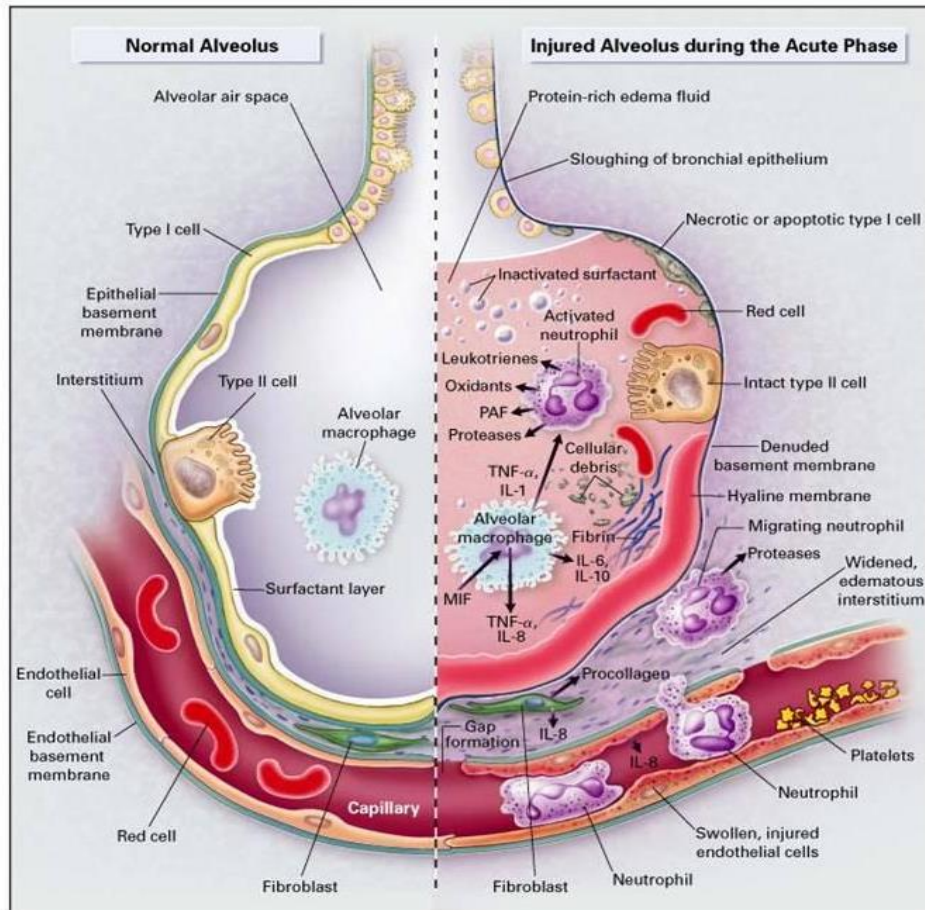


Figure 9 Présentation de l'alvéole pulmonaire à l'homéostasie et au cours de l'inflammation pulmonaire aiguë.

A l'homéostasie (à gauche sur le schéma), l'espace alvéolo-capillaire est mince pour permettre les échanges gazeux. L'alvéole ne contient que des macrophages alvéolaires, des cellules épithéliales de type I et de type II et une couche de surfactant. L'inflammation pulmonaire induit le recrutement des neutrophiles et des macrophages inflammatoires qui libèrent les médiateurs de l'inflammation comme le TNF, le PAF, l'IL-8 et les protéases lytiques. Ces dernières fragilisent l'organisation tissulaire. Un oedème interstitiel et alvéolaire se crée sous l'effet de l'augmentation de la perméabilité capillaire. Les échanges gazeux sont compromis. D'après Ware et al., 2000.

3 Entités pathologiques

L'inflammation systémique est observée dans divers syndromes. Leur diagnostic est formulé en fonction de critères cliniques, sans tenir compte de l'étiologie.

3.1 Sepsis et choc septique

Le Sepsis est un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) associé à cause évidente d'infection¹⁷⁹. Le SIRS est défini cliniquement par la présence d'au moins deux paramètres différents, parmi lesquels: une fréquence cardiaque supérieure à 90 battements par minute (bpm), une fréquence respiratoire supérieure à 20 cycles respiratoires par minute (rpm), une température corporelle inférieure à 36°C ou supérieure à 38°C, une leucocytose (>12000 leucocytes/ μ L) ou une leucopénie (<4000 leucocytes/ μ L)¹⁸⁰.

Cause majeure de mortalité dans les unités de soins intensifs, le sepsis provoque plus de 250 000 décès annuels aux Etats-Unis¹⁸¹. Lorsque le sepsis s'accompagne d'une pression artérielle inférieure à 90 mmHg et d'une lactatémie supérieure à 4 mmol/L, il est qualifié de sévère.

Si la fluidothérapie ne parvient pas à corriger l'hypotension, on parle de choc septique. Comme présenté dans la figure 10, la classification des patients a une conséquence pronostique et est associée à l'espérance de vie. Le choc septique est léthal dans environ 50% des cas¹⁸². La courbe de mortalité montre un taux de mortalité maximal dans les premiers jours, puis la courbe de mortalité forme un plateau vers 28-35 jours post-admission (**Figure 10**). La mortalité à 28 jours est un critère d'efficacité thérapeutique utilisé dans les essais cliniques¹⁸².

3.2 Syndrome de détresse respiratoire aiguë

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë est l'expression pathologique d'un œdème inflammatoire pulmonaire critique¹⁷⁶. Il est très souvent accompagné de défaillances viscérales multiples, d'un sepsis ou d'un choc septique. Sa définition clinique reste avant tout basée sur des paramètres respiratoires. Selon la définition de Berlin, il se caractérise par une diminution de l'échange gazeux, mesurée par le ratio entre pression artérielle en oxygène et la fraction en oxygène mesurée dans l'air inspiré (PaO_2/FiO_2). Dans le cas du SDRA, PaO_2/FiO_2 doit être inférieur à 300 mmHg et associé à une pression expiratoire positive supérieure à

5cm H₂O. Cette dernière est estimée par la pression mesurée en fin d'expiration. Un œdème pulmonaire bilatéral doit être constaté par radiographie et la symptomatologie clinique doit être aiguë. Un score de sévérité du SDRA est également proposé par la définition de Berlin en fonction du ratio PaO₂/FiO₂ et du nombre de quartiers pulmonaires atteints.

La sévérité de ces syndromes est estimée par des scores de gravité généraux et les paramètres intrinsèques au patient, comme la présence de maladies chroniques¹⁸³. Les divers scores de gravité permettent de stratifier les patients en fonction de leur pronostic. Citons comme autre exemple au score de Berlin, le score SOFA qui est un critère clinique associé à la défaillance des organes vitaux et de la coagulation^{184,185}. Certains de ces scores se basent sur des analyses statistiques objectives et d'autres sur des approches empiriques. Le score SOFA est utilisé dans les essais pour s'assurer de l'homogénéité de la sévérité des patients au sein des différents groupes cliniques. Ces scores font l'objet d'une revue détaillée publiée en 2002¹⁸³.

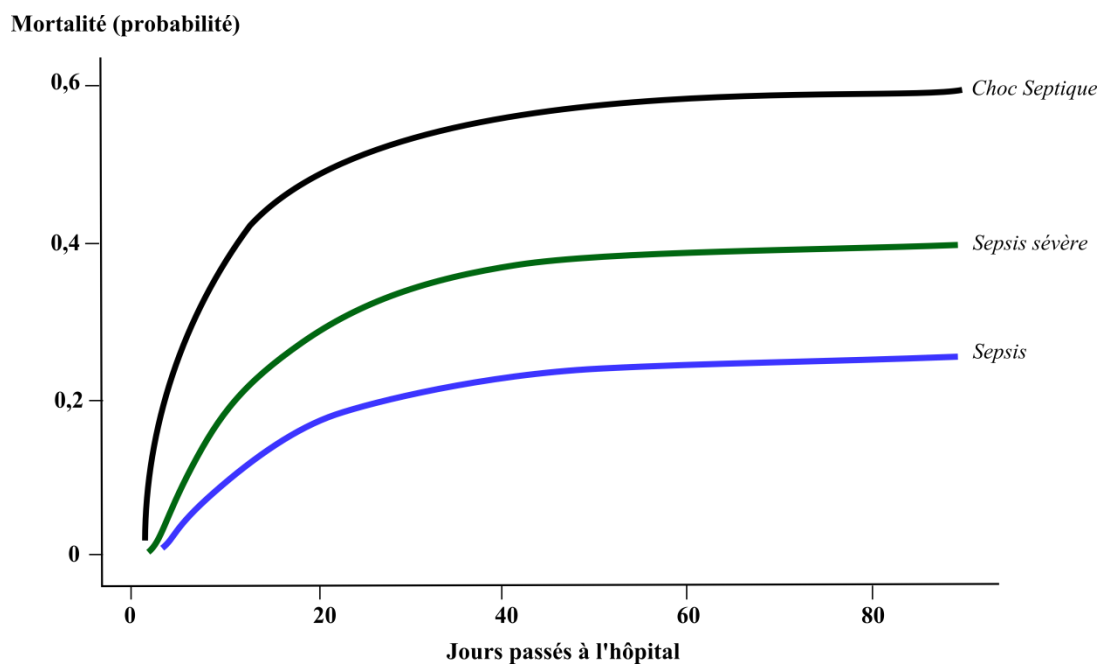


Figure 10 Taux de mortalité au cours de l'hospitalisation des patients en choc septique, sepsis sévère et sepsis.

Image adaptée de Alberti et al., 2003.

4 Effet de l'inflammation systémique sur les cellules immunitaires

La description de la réponse immunitaire au cours du sepsis ne fait pas consensus.

Les premières théories se fondent sur une inflammation extrême et non régulée. Les stratégies thérapeutiques ont donc consisté à limiter l'inflammation.

L'importance du TNF dans le développement du processus inflammatoire en a fait une cible largement étudiée¹⁸⁶. Les récepteurs inhibiteurs solubles, les anticorps anti-TNF et d'autres stratégies thérapeutiques ont été testées cliniquement. Une méta-analyse montre une amélioration de la survie à 28 jours par un traitement aux inhibiteurs du TNF, toutes catégories de patients confondues¹⁸⁷. Chez les patients en choc septique, cette efficacité semble corrélée à un taux d'IL6 supérieur à 1000 pg/mL¹⁸⁷. L'inflammation semble donc être une bonne cible thérapeutique.

Les corticoïdes sont connus pour limiter l'inflammation et l'agrégation plaquettaire^{188,189}. Ils reprogramment les monocytes et les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire¹⁹⁰. Les corticostéroïdes sont donc potentiellement intéressants pour limiter l'excès inflammatoire, mais leur utilisation thérapeutique n'est pas consensuelle. Ils présentent un effet bénéfique à faible dose, mais au contraire deviennent inefficaces voire néfastes à dose plus forte^{191,192,193}. Ces effets néfastes semblent liés à une immunosuppression sévère et à l'apparition de réinfections^{194,195}.

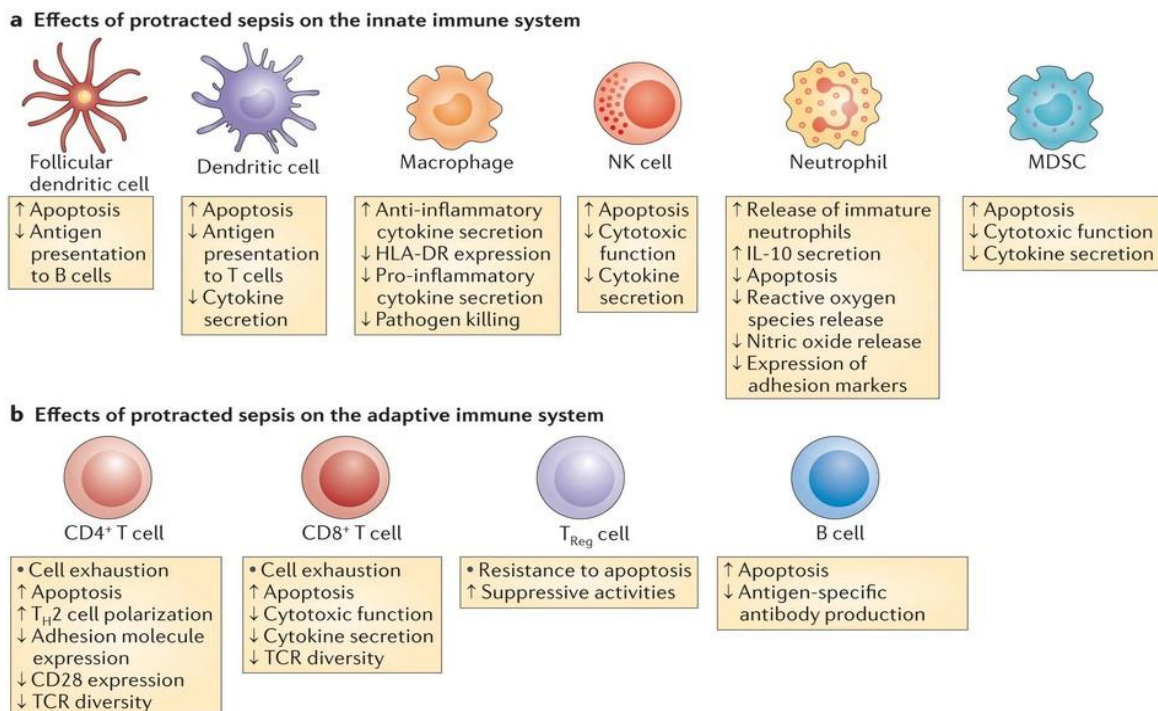
L'élimination seule de la cause inflammatoire n'est donc pas nécessairement suffisante pour améliorer la survie au cours du sepsis. Des données expérimentales permettent toutefois d'intégrer à la fois la nécessité de limiter l'inflammation dans le sepsis tout en évitant l'installation d'une immunosuppression sévère.

Dès le premier jour du sepsis, la stimulation *ex vivo* du sang complet de patient en sepsis induit une faible production de cytokines pro-inflammatoires par rapport au groupe contrôle¹⁹⁶. Ce résultat retrouvé après stimulation *in vitro* de monocytes provenant de patients en sepsis suggère que ce phénomène n'est pas lié à la variabilité des leucocytes présents dans le sang¹⁹⁷.

En revanche, l'hypothèse défendue est que les monocytes seraient simplement tolérants aux endotoxines. En effet, ils ont reçu un premier signal *in vivo*, et un second *in vitro*. Dans

cette étude, les monocytes ont été prélevés en cinétique. Chez les patients non-survivants, les monocytes restent tolérants aux endotoxines au moment du dernier prélèvement. A l'inverse, chez les patients survivants, les monocytes récupèrent une capacité pro-inflammatoire¹⁹⁷. La tolérance aux endotoxines est estimée chez les patients par une baisse d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité ou HLA-DR. Selon certaines études, la faible expression d'HLA-DR est un marqueur prédictif de la mortalité ; elle est associée à la présence d'infections nosocomiales^{198,199}. L'ensemble de ces études suggère que la survie soit liée à la restauration des capacités inflammatoires des monocytes.

Toutefois, le phénomène ne se restreint pas aux monocytes et macrophages. On retrouve dans le sérum des patients, des taux élevés d'IL10 et d'IL1-ra, deux protéines anti-inflammatoires. Les neutrophiles sont affectés au cours du sepsis et peuvent devenir tolérants^{200,201}. Les cellules dendritiques peuvent le devenir *in vitro*, mais au cours du sepsis on observe plutôt une apoptose massive de ces cellules^{6,202,203} (Figure 11).



Nature Reviews | Immunology

Figure 11 Conséquence du sepsis sur les cellules immunitaires

Le sepsis a des répercussions sévères sur la biologie des cellules immunitaires. Certaines entrent en apoptose et d'autres acquièrent un profil tolérogène. Les principales fonctions sont détaillées dans les encadrés. D'après Hotchkiss et al., 2013.

Face à cette altération massive du système immunitaire, on peut formuler une seconde hypothèse mettant en cause l'immunosuppression observée au cours du sepsis. Très schématiquement, le patient souffre cliniquement de l'inflammation systémique, et parallèlement, l'immunité innée et adaptative sont défailtantes.

5 Modélisation du sepsis chez la souris

Pour étudier le sepsis, de nombreux modèles murins sont disponibles. A la différence des autres espèces, les modèles murins présentent l'avantage d'être bien décrits, peu coûteux et applicables à des animaux génétiquement modifiés. Ils sont utiles pour comprendre la fonction d'un gène dans le contexte pathologique du sepsis.

En fonction de la question scientifique posée, trois catégories de modèles sont décrits chez la souris. Le premier est basé sur l'injection de toxines comme le LPS, le second sur l'administration d'agents infectieux vivants et le troisième par l'induction chirurgicale d'une infection. Ces trois modèles ont des caractéristiques qui leurs sont propres (**Tableau 3**).

5.1 Injection d'endotoxines en bolus ou en infusion

L'injection d'endotoxine est le modèle le plus simple et le plus reproductible. Il est basé sur le constat historique qu'une injection d'endotoxines induit un état clinique proche du sepsis. Ce modèle induit la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires par une signalisation dépendante du TLR4²⁰⁴. Les souris déficientes pour ce récepteur produisent peu ou pas de TNF et sont résistantes à une dose létale d'endotoxines^{205,206,207}.

Dans ce modèle d'injection aux endotoxines, l'augmentation de la production de cytokines est brutale et transitoire²⁰⁸. De plus, par rapport à l'homme, la souris est très résistante à l'endotoxémie. Pour obtenir une production d'IL6 de 1000pg/mL de plasma, la dose de LPS requise chez la souris est de 500ng/kg et chez l'homme de 2ng/kg, soit 250 fois plus²⁰⁹. A ces doses, les profils hémodynamiques et thermiques, ne sont pas concordants entre l'homme et la souris²⁰⁹. Pour pallier ces limitations, le LPS peut-être administré en perfusion continue²¹⁰. Ces modèles restent néanmoins non prédictifs d'un effet thérapeutique chez l'homme et se limitent à une modélisation du choc endotoxinique²⁰⁴.

5.2 Administration de bactéries vivantes

L'inoculation de bactéries vivantes peut modéliser l'interaction entre l'hôte et la bactérie concernée. Les doses sont importantes car la souris est résistante également à la plupart des infections. Dans les souris sauvages, les bactéries sont souvent rapidement lysées par le complément et se multiplient peu^{211,212}. L'injection d'un bolus bactérien dans le sang, induit une production rapide de cytokines pro-inflammatoire qui ressemble à la production induite par une injection de LPS^{213 214}. A l'inverse, une injection intra-péritonéale de bactéries seules induit une plus faible production de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma et donc une réponse systémique plus faible^{213,215}.

Tableau 3 Avantages et inconvénients des modèles de sepsis murins

Sepsis model	Advantages	Disadvantages
Endotoxemia model: systemic administration of LPS	Simple and reproducible	LPS-mediated signaling is strictly TLR4-dependent
	Induced response is acute	Does not reflect all complex physiological human responses
	Highly controlled and standardized model	High, rapid and transient increase in cytokines, which differs from human sepsis
		Rodents are endotoxin resistant, whereas humans are very sensitive
		Different hemodynamic response compared to human sepsis
		Variability in dose, toxin, and route of administration
Bacterial inoculum model	Presence of a bacterium allows insights into mechanisms of host response to pathogens	Growth and quantification of bacteria is needed before administration
		The single bacterium model does not reflect the diversity and combinations of infectious agents that are present in human sepsis
		Humans are normally not challenged with a massive bacterial load, but have a septic focus that intermittently and persistently challenges the body with bacteria
		High doses of bacteria induce an endotoxic instead of a septic shock, due to the presence of LPS after rapid lysis of the bacteria
		Variability in bacterial load, route of administration and bacterial strain
CLP model	Simple procedure	Abscess formation
	Presence of an infectious focus	Variability in severity due to differences in experimental procedures (Box 1)
	Polymicrobial sepsis model	
	using the complete spectrum of host enteric bacteria	
	Recreates human sepsis progression with similar hemodynamic and metabolic phases and the presence of both hyper- and hypoinflammatory phases	
		Prolonged and lower elevation of cytokine release, as in humans

La modélisation du sepsis chez la souris peut être réalisée avec trois types de modèles : l'injection d'endotoxines, de bactéries ou les péritonites septiques chirurgicales (CLP; Cecal ligation and puncture) Les caractéristiques de ces modèles sont brièvement exposés dans le tableau. D'après DeJager et al., 2011.

En pratique, l'inoculation de bactéries vivantes est un modèle de résistance à l'infection et permet de mesurer une immunosuppression d'origine génétique ou secondaire au sepsis. Ainsi, les souris C3H/HeJ sont déficientes pour le TLR4 et résistantes à l'endotoxémie²⁰⁷. En revanche, elles sont immunodéprimées et sensibles à l'infection bactérienne^{205,216-218}.

Ces deux modèles n'induisent pas ou peu de souffrances tissulaires et ne modélisent pas fidèlement les événements observés au cours du choc septique humain²⁰⁴.

5.3 Rupture d'organes et infections polymicrobiennes

A quelques exceptions, les patients en choc septique ne reçoivent pas un bolus bactérien, mais plutôt comme nous l'avons vu une accumulation en cascade de signaux de danger endogènes et exogènes. Deux modèles ont été développés pour se rapprocher de la physiopathologie humaine. Le premier modèle consiste à poser un stent chirurgicalement pour ouvrir le cæcum sur la cavité péritonéale et induire une péritonite progressivement²¹⁹. Le second consiste à ligaturer et perforer chirurgicalement une partie du cæcum. Dans ce cas, il y a libération de matière fécale, infection et nécrose de la portion tissulaire ligaturée²²⁰. Le niveau de la ligature, le diamètre de l'objet perforant et l'injection d'antibiotique permettent d'ajuster la sévérité du modèle²²⁰ (**Figure 12**). Ce modèle est très sensible à la présence ou non d'analgésie, à l'expérience du manipulateur et à l'âge des souris^{220,221}.

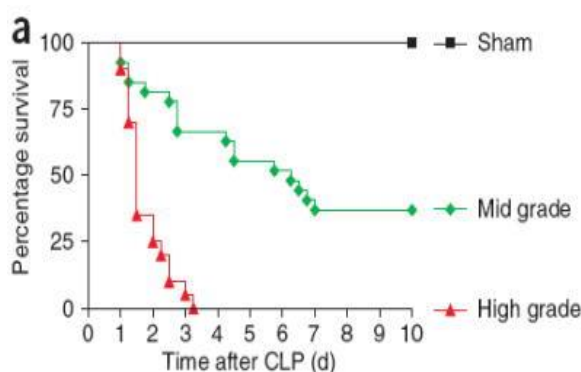


Figure 12 Sévérité des modèles de ligature et ponction du caecum chez la souris.
D'après Rittirsch et al.,2009.

La sévérité du modèle influence profondément la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Un modèle sévère est associé à une production de TNF dans le sérum plus précoce par rapport à un choc non léta²²². Dans la cavité péritonéale, un modèle doux ou modéré est associé à une très faible production d'IL6 contrastant avec le pic intense observé à 24 heures dans le modèle sévère^{222,223}. Dans ce dernier, la production d'IL10 est significativement plus faible et plus tardive²²².

Un sepsis modéré permet d'obtenir la phase d'immunotolérance observée au cours du choc septique⁷. Cette immunosuppression peut-être estimée par l'inoculation de bactéries vivantes et le suivi de leur prolifération^{224,225,226}. L'immunosuppression commence à apparaître 24 heures après la chirurgie et semble liée à la mortalité²²⁷.

A l'inverse, la mortalité dans les modèles sévères est inhibée par les anti-inflammatoires²²⁸. De plus, elle est concomitante avec des taux élevés d'IL6 et semble donc davantage associée à l'inflammation aiguë²²³. Si ce modèle sévère peut s'avérer utile pour modéliser le choc septique aigu et la mortalité inflammatoire, il n'est pas approprié aux essais pré-cliniques. Ces derniers sont conduits avec des modèles modérés, présentant une viabilité à 7 jours d'environ 40 à 60% avec ou sans l'ajout d'antibiotiques²²⁰.

Partie III Rôle de GILZ sur l'immunité innée et la réaction inflammatoire

La première identification de GILZ (DIP, *Delta sleep-inducing peptide Immunoreactor Protein*) remonte à la description de l'isoforme courte réalisée sur des extraits de cerveau de porc en 1993²²⁹. La protéine identifiée est immédiatement comparée à la protéine TSC-22 (TSC22D1, 143aa) préalablement connue pour son induction par le Transforming Growth Factor β (TGF- β) et la dexaméthasone (Dex) dans les ostéoblastes de souris²³⁰.

Le domaine leucine Zipper et la région riche en proline sont également décrits²²⁹. En 1996, GILZ (hDIP, human DIP) est identifiée chez l'homme et semble être exprimée dans la majorité des tissus²³¹. Quatre années plus tard, la protéine porcine est cristallisée²³². Il s'agit de la seule description cristallographique d'un transcrite de TSC22D3 qui servira de modèle à toutes les études bio-informatiques.

En 1997, GILZ est identifiée dans des thymocytes murins traités à la dexaméthasone ce qui sera à l'origine de son nom²³³. En 2001, l'ORF (*Open Reading Frame*) de GILZ est cloné. C'est le point de départ des études fonctionnelles^{234,235}.

En 2003, l'expression de GILZ est démontrée dans les macrophages humains et les premiers effets anti-inflammatoires sont décrits²³⁶.

En 2013, le gène codant pour GILZ est identifié comme un locus associé à la résistance à l'endotoxémie sévère des souris SPRET/Ei dérivant de l'espèce *Mus spretus*²³⁷.

1 Gène de GILZ

GILZ appartient à la famille TSC22D constituée de 4 gènes induits par le TGF- β (TSC22D1, TSC22D2, TSC22D3 et TSC22D4)^{230,233,238}. Cette famille ancienne et très conservée est présente chez les insectes (Bunched ou Bun) et les mammifères. Les protéines de la famille TSC22D sont généralement exprimées de manière ubiquitaire et leurs fonctions sont largement méconnues. Dans la plupart des cas, elles portent un domaine TSC22D et un domaine riche en proline (PER) en région C-terminale qui les caractérisent²³⁹. GILZ est codé par le gène TSC22D3 porté par le chromosome X chez l'homme (locus Xq22.3) et la souris. Il produit trois transcrits codant pour quatre isoformes connues chez la souris et trois chez l'homme (**Figure 13**).

Le promoteur de la forme canonique comporte six éléments de réponse aux récepteurs aux glucocorticoïdes (GR)^{240,241}. L'absence d'un seul n'a pas de conséquence sur l'expression de GILZ. En revanche, une absence complète ou l'absence des deux premiers altèrent fortement l'induction de GILZ par les GC^{241,242}. Ces mêmes études rapportent des sites putatifs pour les facteurs de transcription STAT6, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T Cell*), oct-1, myc, CREB (*Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*) et ER (*Estrogen Receptor*).

De plus, le facteur de transcription FoxO3 dispose de deux sites de liaison fonctionnelle et un putatif²⁴⁰. Par prédiction bio-informatique, (Algen, PROMO, dissimilarité 0%) on suspecte l'existence de sites de liaison supplémentaires pour les facteurs de transcription non décrits, comme STAT4(2), AP2- α (2), PAX5 6), IRF-2(2), P53(4), TCF4E(1) et FoxP3(2). En outre, 33 sites de fixation pour C/EBP- β et 19 sites de fixation pour YY1 ont également été retrouvés. Ces derniers étant plus petits, leur prédiction est plus hasardeuse.

Les transcrits codant pour chacune de ces isoformes portent une extrémité 5' propre qui provient d'un exon différent. Chacune des isoformes a un site d'initiation de la transcription et un promoteur différents. Elles devraient toutes disposer d'une régulation transcriptionnelle propre.

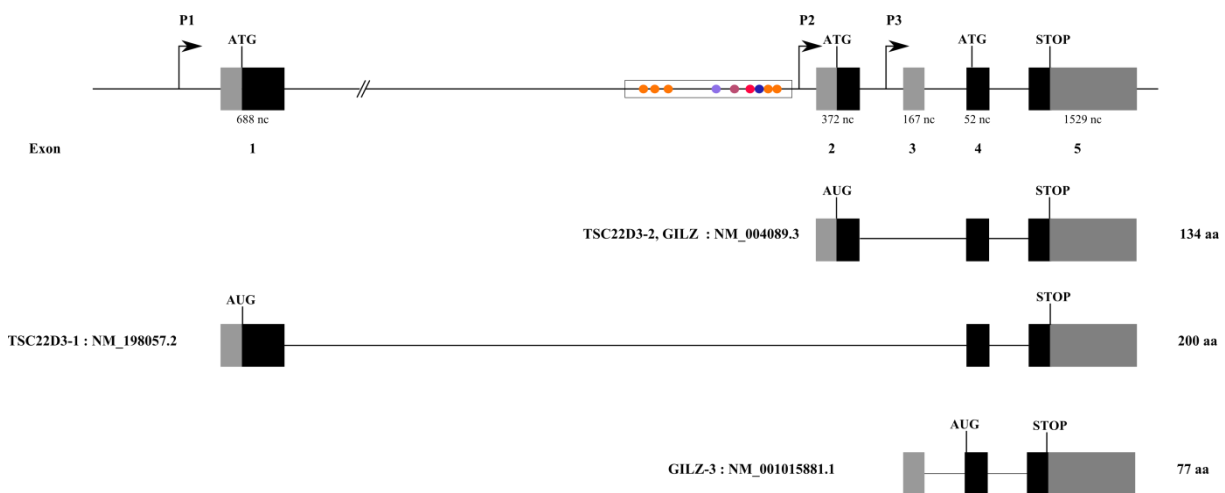


Figure 13 Organisation du gène de GILZ ou TSC22D3

Le gène de GILZ humain est situé sur le chromosome X. Il comprend 5 exons qui génèrent, selon NCBI, au minimum trois isoformes chez l'homme. L'isoforme canonique ou GILZ (TSC22D3-2) est constituée des exons 2, 4 et 5. L'isoforme TSC22D3-1 plus longue, diffère dans sa région N-terminale ; elle est constituée des exons 1,4 et 5. L'isoforme la plus courte dérive des exons 3, 4 et 5. Au niveau protéique, elle est intégralement incluse dans les deux premières. Ces isoformes ont trois promoteurs différents représentés par P1, P2 et P3 respectivement. Schéma produit à partir des informations provenant du NCBI.

A l'inverse, tous les transcrits décrits de GILZ partagent l'exon 4 et 5 chez l'homme et l'exon 6 chez la souris. Ils comportent la portion de l'extrémité 3' non codante des ARN messagers qui est donc commune à tous les transcrits.

La protéine GILZ canonique est composée de 134 acides aminés chez l'homme et 137 chez la souris, elle est traduite du transcrit 2 (TSC22D3-2, [NM_004089.3](#)). Il comprend en plus, l'exon 2 chez l'homme (4 chez la souris), codant pour les régions N-terminales.

L'isoforme TSC22D3-1 est plus longue et constituée de 200 acides aminés. Elle diffère de la précédente par son extrémité N-terminale (TSC22D3-1, [NM_198057.2](#)) et comprend l'exon 1, 4 et 5 chez l'homme. L'isoforme longue ou L-GILZ est décrite seulement chez la souris (234 acides aminés), elle provient d'un codon start non conventionnel, situé en amont.

Enfin, l'isoforme courte ou short-GILZ (NCBI, [NM_001015881.1](#)) est constituée d'acides aminés communs à GILZ et TSC22D3-1 soit 77 chez l'homme et 80 chez la souris. Une dernière isoforme de 43 acides aminés est rapportée chez la souris, c'est la seule isoforme qui ne porte pas de domaine TSC22D. Toutes les autres ont une structure comparable.

1.1 Structure de la protéine GILZ

La protéine GILZ est localisée dans le cytoplasme ou le noyau, comme décrit dans l'encadré 2. Elle est constituée de 3 régions.

La région N-terminale est variable selon les isoformes. Elle n'a jamais été cristallisée et ne présente pas de motif clairement identifié. Elle pourrait néanmoins comporter un domaine d'exportation nucléaire (NES)^{239,243}.

Le domaine TSC22D comporte un sous-domaine Leucine Zipper et TSC (*Transforming growth factor Stimulated Clone*). Le domaine leucine zipper forme une hélice α présentant une face hydrophobe arborant les leucines et une face hydrophile²³². Il est généralement positionné en amont des sites de fixation à l'ADN dans les facteurs de transcription de la famille B-Zip (Basic-region leucine zipper)²⁴⁴. Les faces hydrophobes des domaines LZ interviennent dans l'homo ou l'hétérodimérisation de nombreux facteurs de transcription comme C/EBP, c-jun ou c-fos^{232,245}. Les protéines de la famille TSC22D s'homo ou s'hétérodimérisent également par ce domaine²⁴⁵. GILZ interagit avec les autres membres de la famille TSC22D²⁴⁶. Notamment la protéine THG-1 codée par le gène TSC22D4²⁴⁶. En outre, l'homodimérisation de GILZ est dépendante de ce domaine²⁴⁷.

La structure du domaine TSC est mal décrite. Elle est le siège de l'interaction entre GILZ et la protéine Ras²⁴⁸.

La région riche en proline porte un domaine de liaison au motif SH3 (*Sarc Homology Domain 3*) présent sur de nombreux adaptateurs et protéines de signalisation. Elle est riche en acides aminés acides chargés négativement sur la protéine GILZ mais pas nécessairement sur les autres membres de la famille TSC22D. Les prolines induisent une angulation caractéristique de la chaîne polypeptidique, leur succession selon le motif (Pxx)₃ forme ainsi une hélice de polyproline de type II^{249,250}. Cette région comporterait également un domaine PDZ, mal caractérisé et une séquence PEST putative. Cette dernière région favoriserait la dégradation de la protéine par la voie du protéasome ou de la calpaïne²³⁷.

La masse moléculaire de GILZ pourrait faire débat. La masse théorique, mesurable en spectrométrie de masse est de 14,8 kDa (homme). Cette masse concorde avec le poids moléculaire observé en Western Blot par certains laboratoires ayant produit des anticorps anti-GILZ^{242,251}. D'autres rapportent une masse de 17 kDa²⁵². Il est difficile d'expliquer ces divergences. La spécificité des anticorps pourrait différer selon les études et deux protéines différentes ont pu être observées. En effet, certains anticorps reconnaissent le domaine TSC22D présent également sur les autres membres de la famille. Or, la protéine TSC-22 a une masse moléculaire de 17 kDa, elle est également induite par un traitement à la dexaméthasone²³⁰. Une autre hypothèse serait une modification de la masse moléculaire de GILZ induite par des modifications post-traductionnelles ou dépendantes de sa localisation. La localisation de GILZ est décrite dans l'encadré 2 et fait débat.

Encadré 2 : Localisation cellulaire de GILZ

A l'image de la protéine TSC22, GILZ semble présente à la fois dans le cytoplasme et le noyau (Shibanuma et al., 1992). L'absence d'anticorps hautement spécifiques complique l'étude de la protéine endogène en microscopie. La localisation de GILZ a donc été étudiée à l'aide de protéines natives ou mutantes souvent surexprimées. En immunofluorescence, GILZ est retrouvée dans le noyau ou le cytoplasme dans les lignées de cellules musculaires en fonction des conditions de culture (Bruscoli et al., 2010). Par fraction cellulaire et Western-Blot provenant d'une lignée lymphocytaire T (Cellules 3DO), GILZ apparaît majoritairement dans le noyau (Bruscoli et al., 2010). A l'inverse, GILZ est majoritairement cytoplasmique dans les cellules promonocytaires HL-60 non stimulées et surexprimant GILZ (D'Adamio et al., 1997).

Il est admis que l'expression majoritaire est cytoplasmique et qu'une translocation nucléaire soient possible par un signal méconnu (Latre de Late et al., 2010).

Il n'y a pas de description précise de la localisation de GILZ dans les macrophages et les cellules dendritiques.

Des données de spectrométrie de masse à haut débit permettent de décrire les sites de modification post-traductionnelle. De manière non exhaustive, les phosphorylations décrites sont portées par la lysine 53(m), les sérines 43(m), 46(m), 102(h,m), 122(h,m), 125(m) et la thréonine 99(m) (d'après une analyse à l'aide du site PhosphoSitePlus, www.phosphosite.org, données non publiées). Les positions sont données par rapport à la protéine humaine, m= souris, h=homme. Leur fonction demeure largement méconnue et n'a pas fait l'objet d'étude spécifique.

Par la recherche de motifs consensus conservés et de prédictions bio-informatiques, la CDC2 (*cyclin dependant kinase 1*) pourrait phosphoryler la thréonine 88 (NetPhosK server, données non publiées). La P38 MAPK pourrait phosphoryler la sérine 102 et 122. La GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) et la CDK5 (*Cyclin Dependent Kinase 5*) pourraient également phosphoryler la sérine 122 (NetPhosK server, données non publiées).

L'ubiquitination est également une modification post-traductionnelle qui intervient dans le contrôle de l'expression protéique en favorisant la dégradation par le protéasome. Théoriquement, l'ubiquitination de GILZ peut se faire sur les lysines 53(h), 62(h), 77(h,m), 86(h), 98(h) et 108(m) (d'après une analyse à l'aide du site PhosphoSitePlus, <http://www.phosphosite.org>, données non publiées). En outre, le motif -VKDL- présent dans la région N-terminale serait un site de sumoylation. La reconnaissance de ce site par SUMO-1 (*Small Ubiquitin-like Modifier*) préviendrait la dégradation de GILZ par le protéasome et modulerait ainsi son niveau d'expression²⁵².

1.2 Expression de GILZ

L'expression de GILZ est ubiquitaire chez l'homme et la souris²⁵³. Au niveau tissulaire, l'exploitation des bibliothèques de données transcriptomiques met en évidence une expression maximale dans le thymus, la moelle osseuse et le sang (d'après une analyse à l'aide de l'outil TIGER, <http://omictools.com>, données non publiées). Au niveau cellulaire, l'expression transcriptomique semble maximale dans les lymphocytes B, les neutrophiles et les éosinophiles (d'après une analyse à l'aide de l'outil NextBio, <http://www.nextbio.com>, données non publiées). Dans les neutrophiles cette expression élevée en ARNm n'est pas associée à une expression protéique.

Par hybridation *in situ*, son expression semble maximale dans les macrophages tissulaires du poumon, du foie et du colon par rapport aux autres cellules de ces tissus²³⁶. Les

expressions transcriptomiques et protéiques de GILZ sont corrélées, notamment dans les lymphocytes T²³⁴. Le niveau d'expression est très finement et rapidement régulé.

Dans tous les types cellulaires testés, GILZ est induite par les corticostéroïdes synthétiques ou endogènes^{233,236,254,255}. Le profil d'expression pulsatile du cortisol est bien décrit. L'expression de GILZ suit ce taux et un rythme circadien dans le tissu adipeux et probablement dans les autres tissus^{256,257}.

Dans la lignée pro-monocytaire THP-1, l'induction de l'ARN messager de GILZ est maximale 90 minutes après une stimulation par la dexaméthasone (Dex)²³⁶. Dans les macrophages murins, l'induction de GILZ par la Dex requiert l'expression de la protéine ANXA1, elle-même induite par les glucocorticoïdes²⁵⁸. Les autres hormones stéroïdiennes, comme l'aldostérone ou l'estradiol peuvent réguler l'expression de GILZ dans les cellules rénales par exemple^{259,260,261}.

A l'image des glucocorticoïdes, d'autres stimuli anti-inflammatoires ou pro-Th2 induisent l'expression de GILZ. L'IL10 induit GILZ dans les monocytes, les mastocytes, les cellules dendritiques^{236,254,262}. Le TGF- β , autre cytokine anti-inflammatoire, peut l'induire dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes²⁶². Les deux cytokines IL4 et l'IL13 l'induisent également dans les monocytes humains²³⁶. C'est pourquoi l'expression de GILZ est souvent associée à la réponse tolérogène de l'immunité innée ou adaptative.

A l'inverse, les signaux pro-inflammatoires ont tendance à limiter l'expression de GILZ, même si des exceptions existent en fonction du type cellulaire et de la cinétique. Le TNF et l'IL1- β limitent l'expression de GILZ dans les cellules endothéliales et pariétales de la muqueuse nasale^{251,263}. Ces mêmes études rapportent un effet divergent de l'IFN- γ qui réprime ou augmente l'expression de GILZ, respectivement dans ces deux types cellulaires.

Dans des cellules de myélome multiple (MM.1S), l'IL6 et IGF1 limitent l'expression de GILZ induite par la Dex²⁶⁴. La combinaison de la Dex et d'un inhibiteur des PI3Ks (LY2940002) ou des AKTs (*AKT inhibitor VIII*) augmente significativement l'expression de GILZ par rapport à la stimulation par la dex seule²⁶⁴.

Toutes ces cytokines et ces voies de signalisation sont impliquées dans la réponse des macrophages aux signaux de danger. Ils induisent l'expression des cytokines pro-

inflammatoires et ont un effet direct sur l'expression de GILZ. Dans les macrophages, l'activation des TLR1/2/4/5/7/8/9 altère rapidement l'expression de GILZ, à l'inverse d'une stimulation par l'intermédiaire du TLR3 qui n'en modifie pas l'expression²⁶⁵. Ce dernier est le seul TLR à ne pas requérir la voie MyD88.

De plus, l'inhibition de MyD88 par des siRNA restaure l'expression de GILZ ce qui suggère un mécanisme dépendant de la signalisation MyD88. Les auteurs suggèrent une déstabilisation de l'ARNm de GILZ par la protéine TTP (Tristetraprolin)²⁶⁵. Un second mécanisme proposé est une inhibition spécifique due à l'expression de microARNs comme miR-24²⁶⁶.

L'expression de GILZ est ubiquitaire et associée au phénotype anti-inflammatoire ou tolérant selon le type cellulaire.

2 Fonctions connues de GILZ

Notre laboratoire a préalablement étudié le rôle de la protéine GILZ sur la polarisation des cellules dendritiques vers un phénotype tolérant²⁶⁷. Nous avons notamment démontré que la surexpression de GILZ dans les cellules dendritiques de souris limitait la prolifération des lymphocytes T activés spécifiques d'antigène et favorisait l'expansion des lymphocytes T régulateurs *in vivo*²⁶⁷ (article disponible en annexe, publication en co-premier auteur).

Néanmoins, les fonctions de GILZ ne sont pas restreintes aux cellules dendritiques. Son expression étant ubiquitaire, ses fonctions ont été étudiées dans des contextes et des organes très variés. Aucune approche systématique n'a été utilisée pour comprendre l'impact de GILZ sur le transcriptome, le protéome et plus généralement sur la biologie cellulaire. Chacun des travaux propose un mécanisme moléculaire propre, il en résulte une multitude de mécanismes d'action. Les fonctions cellulaires pouvant avoir, de près ou de loin, un impact sur la réponse des macrophages dans le contexte de l'inflammation sont exposées ci-dessous.

GILZ interagit avec des voies de signalisation aux effets majeurs sur l'activation, la prolifération ou la survie des cellules immunitaires. Si chaque type cellulaire du système immunitaire porte son propre répertoire de récepteurs activateurs ou inhibiteurs, à l'inverse, les voies de signalisation sont généralement partagées d'un type cellulaire à l'autre. Dans le

système immunitaire, ces voies de signalisation aboutissent à l'activation des familles de facteurs de transcription spécifiques comme NF- κ B, AP-1, C/EBP.

2.1 Inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B

Les facteurs de transcription de la famille NF- κ B sont constitués de dimères de protéines. Les protéines RelA (p65), C-Rel, et RelB ont un domaine transactivateur alors que la p105, la p50, la p100 et la p52 n'en possèdent pas. Les dimères ainsi formés peuvent être soit activateurs, soit répresseurs de la transcription.

La signalisation par le TNFR, l'IL1-R et le TLR4 active majoritairement les hétérodimères portant une sous-unité p65 par l'inactivation de I κ B α .

Dans les lymphocytes T murins, GILZ limite l'activité transcriptionnelle du dimère p65:p52 de NF- κ B²³⁵. Cette inhibition est associée à une interaction physique entre GILZ et les deux sous-unités p65 et p52²³⁵. De plus, l'interaction GILZ:p65 semble indépendante de I κ B α , suggérant un mécanisme de régulation différent de la voie conventionnelle dépendante d'I κ B- α et I κ B- β ²³⁵. Il a par ailleurs été montré que, *in vivo*, dans des lymphocytes T provenant de souris sur-exprimant GILZ on observe une inhibition de la translocation nucléaire et de la fixation à l'ADN de NF- κ B²⁵².

L'effet répresseur de GILZ sur NF- κ B a été observé, *in vitro*, sur les cellules épithéliales humaines, les macrophages murins péritonéaux ou dérivés de la moelle osseuse, les MSCs (cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse), des cellules HUVEC et les THP-1^{236,251,258,268,269,270}.

Les THP-1 ont une activité constitutive de NF- κ B qui n'est pas altérée par GILZ²³⁶. Pourtant l'activité induite par une stimulation avec du LPS de NF- κ B est réprimée par GILZ²³⁶. L'interaction entre GILZ et la p65 a également été décrite dans ces cellules après une stimulation par la dex²³⁶.

En conclusion, l'inhibition de l'activité de NF- κ B est la fonction la plus consensuelle de GILZ. Les voies d'activation de NF- κ B sont en étroite relation avec d'autres voies comme celle des MAPKs (**Figure 14**).

2.2 Inhibition des voies dépendantes des MAPKs

Les lymphocytes T sont dépendants de l'IL2 pour leur survie et prolifération. L'expression de l'IL2 est contrôlée par le facteur de transcription AP-1, lui-même activé par la voie des MAPKs^{271,272}. Les MAPKs sont des familles de kinases activées en cascades et se divisent en trois groupes: les p38, ERK et JNK²⁷³.

Dans les lymphocytes T, la signalisation par le TCR active les MAPKs par l'intermédiaire de protéines appartenant à la famille des petites protéines G, comme Ras²⁷³. Ras et son partenaire Raf vont activer la MAPK ERK1/2 ce qui aboutit à la phosphorylation de c-jun et c-fos, les deux composants d'AP-1.

Dans les lymphocytes T, GILZ inhibe la synthèse d'IL2, en réduisant le niveau de phosphorylation de Raf, de ERK1/2 et finalement d'AP-1 après une activation par le TCR²⁷⁴ (Anti-CD3). L'inhibition de cette voie semble liée à une interaction directe de GILZ avec Ras et Raf-1 dans les thymocytes murins^{248,274}. De plus, la surexpression de GILZ diminue la prolifération cellulaire d'une lignée clonale de lymphocytes T (3D0)²⁴⁸.

Enfin, GILZ inhibe directement le facteur de transcription AP-1 par une interaction protéine-protéine avec c-jun et c-fos dans une lignée de lymphocytes T (Cellules de Jurkat)²⁷⁵. Cependant, l'interaction avec c-fos n'a pas pu être vérifiée dans une étude concomitante²³⁵.

La signalisation par le TLR4 induit également l'activation des MAPKs. Les protéines de la famille p38 et JNK sont activées par intermédiaire de TAK-1 et ERK l'est par la kinase Tpl2 (*Tumor progression locus 2*)^{276,277,278}.

Dans les macrophages, le défaut d'activation de ERK et p38 induit un déficit de production de l'IL12 et du TNF^{279,280}. Dans les macrophages de souris GILZ-KO, une stimulation par le LPS induit une activation supérieure de ERK1/2 et de la p38^{268,281}. Parallèlement, l'activité du facteur de transcription AP-1 est augmenté²⁶⁸. Ces mêmes macrophages ont une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1- β , le TNF et de l'IL6 par rapport aux souris contrôles^{268,281}.

La voie des MAPKs est donc également altérée par GILZ dans les macrophages (**Figure 14**). Il en résulte une diminution de la transcription dépendante d'AP-1.

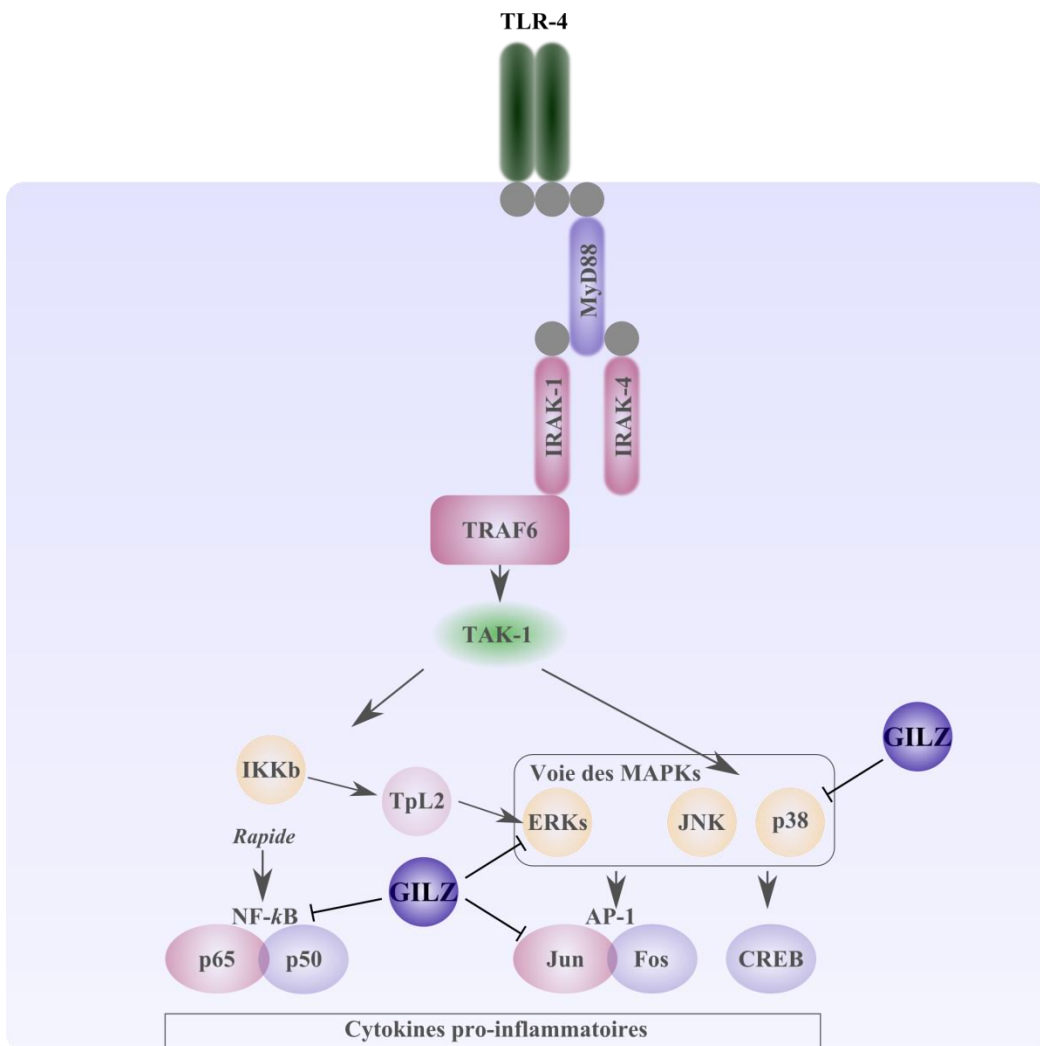


Figure 14 Effet de GILZ sur la régulation de la signalisation du TLR4

Le schéma présente les effets de GILZ sur la signalisation dépendante de la voie MyD88. GILZ inhibe la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB et son activité. GILZ interagit également avec la voie des MAPKs, principalement ERKs et p38. GILZ inhibe l'activité du facteur de transcription AP-1 dans les macrophages. Schéma produit à partir d'une synthèse bibliographique.

2.3 GILZ, un facteur inhibiteur de la transcription

Régulation de la différenciation mésenchymateuse et musculaire

C/EBP- δ , C/EBP- β et PPAR- γ sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du métabolisme, la production de cytokines et la polarisation des macrophages résidents^{282,283,284,285}. Ils contrôlent également la différenciation des adipocytes et du tissu osseux^{286,287}.

Dans une lignée de souris sur-exprimant GILZ dans tous les types cellulaires, GILZ favorise la construction osseuse²⁸⁸. *In vitro* GILZ favorise la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes au détriment de leur différenciation en adipocytes^{288,289}. La différenciation en adipocytes est sous le contrôle du récepteur PPAR- γ , lui-même induit par C/EBP- β dans ce type cellulaire. GILZ limite la fixation de C/EBP- β sur le promoteur de PPAR- γ , par une interaction protéine-protéine entre C/EBP- β et GILZ²⁸⁸.

Cette activité répressive sur la transcription est également retrouvée dans un autre contexte de différenciation de cellules d'origine mésenchymateuse. La maturation *in vitro* de lignées cellulaires d'origine myoblastique est dépendante du facteur de transcription MyoD1 et de l'histone déacétylase HDAC1 (C2C12)²⁹⁰. Cette différenciation est fortement altérée par les glucocorticoïdes qui induisent par ailleurs, l'expression de GILZ. L'inhibition de GILZ par des shRNA, restaure la capacité de différenciation des myoblastes par un mécanisme probablement dépendant du facteur de transcription MyoD1 et de l'interaction entre GILZ et HDAC1²⁹⁰.

Aucune association entre GILZ et ces facteurs de transcription n'est pour l'heure connue dans les macrophages. Toutefois, le rôle de GILZ en tant que modulateur de la transcription a également été proposé dans des cellules immunitaires.

Régulation de la différenciation des lymphocytes T

Une équipe a recherché les facteurs influençant la différenciation des lymphocytes Th17 par une approche bioinformatique systématique²⁹¹.

GILZ a été identifiée comme un des acteurs limitant la différenciation et les effets pro-inflammatoires des lymphocytes T CD4 Th17²⁹¹⁻²⁹³. En effet, l'inhibition de GILZ favorise la production de cytokines pro-Th17 comme l'IL21 et augmente l'expression des facteurs de transcription associés à leur différenciation comme ROR- γ t, Rboj ou Irf4²⁹¹.

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage à haut débit ont mis en évidence l'interaction entre la protéine GILZ et la chromatine dans ces lymphocytes Th17. La protéine GILZ se fixe sur le gène de l'IL21 et de l'Irf4. Son inhibition favorise la surexpression de ces deux gènes. GILZ posséderait donc une activité régulatrice de la transcription dans ce contexte²⁹¹.

L'ensemble de ces études démontrent le rôle de GILZ comme un facteur répresseur de la transcription dans les lymphocytes T différencié *in vitro* et dans les cellules mésenchymateuses. Un effet transcriptionnel de GILZ dans les cellules de l'immunité innée n'est pas décrit. On peut spéculer que GILZ conserve cette fonction dans les macrophages.

2.4 Inhibition de la voie PI3K-Akt et FoxO3

La protéine Ras intervient également dans l'activation de la voie dépendante de la protéine kinase B ou Akt²⁹⁴. Akt régule l'apoptose et la progression du cycle cellulaire^{294,295,296}. Elle phosphoryle les facteurs de transcription de la famille FoxO²⁹⁷.

Cette famille comporte quatre membres : FoxO1, FoxO2, FoxO3 et FoxO4. En l'absence de phosphorylation par Akt, FoxO3 est actif et migre dans le noyau²⁹⁷. Il induit notamment l'expression de GILZ dans les lymphocytes T par une activité transcriptionnelle directe, décrite précédemment²⁴¹.

En outre, dans les BMDMs, l'expression de GILZ est également sous la dépendance de l'activation d'Akt et de FoxO3²⁸¹. Enfin, GILZ limite l'activité de FoxO1, FoxO4 et FoxO3 dans les lignées pro-monocytaires (HL-60)²⁴³. La présence de GILZ au niveau cytoplasmique maintient inactive FoxO3 hors du noyau²⁴³.

Les fonctions de GILZ présentées ici ont un rôle potentiel sur l'activation du système immunitaire. Dans les macrophages, elles sont susceptibles de participer à la régulation de la production de cytokines ou de la réponse inflammatoire.

3 Effet de GILZ sur la réponse inflammatoire et tolérante des macrophages

3.1 Rôle de GILZ sur la réponse inflammatoire

Comme décrit dans les précédents chapitres, les macrophages ne sont pas les seules cellules impliquées dans la réponse inflammatoire. Les cellules des épithéliales, celles du tissu conjonctif et du système immunitaire participent à la genèse et l'entretien de l'inflammation. Le niveau d'expression de GILZ affecte profondément la production de cytokines par de multiples types cellulaires.

Dans les cellules promonocytaires THP-1, GILZ inhibe l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et la sécrétion des chimiokines CCL5 et CCL3 en réponse à l'IFN- γ ²³⁶. L'expression du TLR2 est également altérée dans les cellules surexprimant GILZ après une stimulation par l'IFN- γ ou le LPS²³⁶. Le domaine de GILZ contenant la région riche en proline semble suffisant pour limiter la production de cytokines pro-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*. En effet, le peptide dérivé de cette région limite drastiquement la production du TNF, de l'IL12 et de l'IL6 dans les cellules THP-1 en réponse au LPS²⁹⁸. A l'inverse, l'inhibition de GILZ dans les macrophages alvéolaires humains induit une sur-expression du TNF et de l'IL8²⁶⁵.

Dans les BMDMs de souris, l'inhibition de GILZ par des siRNA induit une synthèse plus élevée d'IL6 en réponse au LPS²³⁷. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé la lignée de souris SPRET/Ei réputée pour être plus résistante au LPS. Cet effet est annulé *in vitro* avec l'inhibition de GILZ²³⁷.

Afin de mieux comprendre les effets de GILZ, trois équipes ont créé en parallèle des souris transgéniques dont le gène de GILZ est flanqué de sites LoxP (GILZ-Floxed)^{299,300,301}. La position de ces sites est différente pour chacune de ces trois lignées. La recombinaison Cre excise la partie comprise entre ces deux sites LoxP. L'expression de la Cre peut être ubiquitaire ou spécifique d'un type cellulaire selon le promoteur placé en amont. En croisant les souris GILZ-Floxed avec des souris exprimant la Cre recombinaison dans tous les tissus, ces équipes ont généré des souris GILZ-KO.

Les trois types de souris GILZ-KO présentent une altération de l'expression des trois isoformes majeures de GILZ. Dans chacun de ces modèles, l'exon 6 est au minimum supprimé et par là même, les domaines TSC22 et PER C-terminaux.

Les BMDMs issus des souris GILZ-KO provenant de l'équipe du Pr. Rossier ne montrent que peu ou pas d'altération de la production de TNF, de CCL5, d'IL1- β et de MIP-2 en réponse à différents stimuli pro-inflammatoires dont le LPS²⁹⁹.

A l'inverse, les BMDMs issus de souris GILZ-KO de l'équipe du Pr. Riccardi, produisent plus de TNF et d'IL1- β en réponse à une courte stimulation par du LPS²⁶⁸.

Une augmentation significative de TNF et d'IL6 a été observée dans des fibroblastes de souris GILZ-KO provenant de l'équipe du Pr Morand²⁸¹. En revanche, la stimulation *in vitro* de macrophages péritonéaux recrutés après une injection de thioglycollate provenant de ces mêmes souris n'induit pas d'augmentation de la production de TNF, d'IL1- β et d'IL6³⁰¹ (données mentionnées dans l'article mais non publiées).

Si l'effet anti-inflammatoire de GILZ est bien décrit, il semble dépendant du type cellulaire et de facteurs externes, en particulier pour les macrophages. Tous ces effets sont pour l'heure attribués principalement à l'inhibition de NF-kb et de la voie des MAPK/ERK^{236,268}.

Dans les macrophages, l'expression de GILZ est presque nulle après une courte stimulation par du LPS^{265,268}. Cette altération est transitoire²⁶⁸. Vingt quatre heures après stimulation, l'expression de GILZ est restaurée²⁶⁸. C'est également le cas après une stimulation répétée des macrophages par du LPS. La restauration de l'expression de GILZ n'est pas due à l'activité du récepteur aux glucocorticoïdes²⁶⁸. Cette réexpression semble donc indépendante des glucocorticoïdes²⁶⁸.

3.2 Rôle de GILZ sur la tolérance aux endotoxines

Les stimulations répétées induisent un état de tolérance aux endotoxines *in vivo* ou *in vitro*. Cet état est associé à une inhibition de la voie NF-kB et à un remodelage de la chromatine sous la dépendance notamment d'HDAC1. Dans différents types cellulaires, ces deux voies semblent modulées par GILZ. De plus, GILZ est ré-exprimée par les macrophages

tolérants. L'hypothèse de son rôle sur la tolérance aux endotoxines est donc possible. Elle est illustrée par la figure 15.

Cette hypothèse a été testée par Hoppstader et ses collaborateurs. Cette équipe a exploité le modèle conventionnel de tolérance aux endotoxines sur des BMDMs provenant de souris GILZ-KO²⁶⁸. Par rapport aux macrophages provenant de souris contrôles, les macrophages GILZ-KO rendus tolérants par une préstimulation avec du LPS, ont une production augmentée de cytokines pro-inflammatoires en réponse à une seconde stimulation courte²⁶⁸. Toutefois, l'absence de GILZ dans les BMDMs induit une augmentation de l'expression de cytokines proinflammatoires en condition inflammatoire et tolérante de

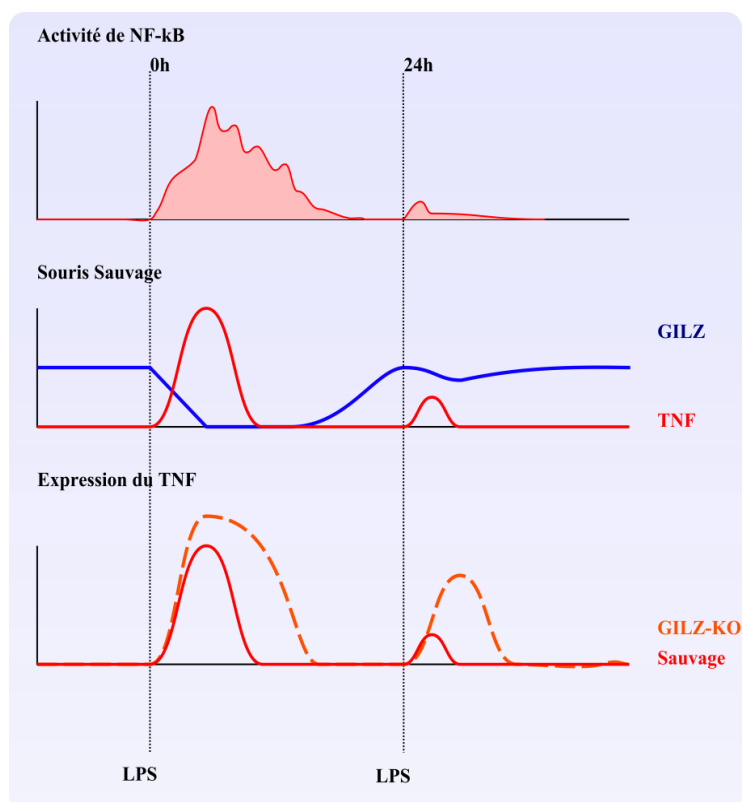


Figure 15 Modèle du rôle de GILZ dans la réponse des macrophages

Représentation schématique de l'effet de GILZ sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans le modèle de tolérance aux endotoxines sur des BMDM (Macrophages murins dérivés de la moelle osseuse in vitro). La première stimulation par du LPS induit la synthèse du TNF qui est liée à l'activité de NF-kB et à la diminution de l'expression de GILZ. Dans les souris GILZ-KO, cette production de TNF est soutenue. Dans les souris sauvages, le macrophage devient ensuite tolérant, NF-kB reste inhibé et l'expression de GILZ augmente. A ce stade, une seconde stimulation induit une plus forte expression du TNF dans les souris GILZ-KO par rapport aux souris contrôles. Schéma théorique produit à partir des données de Foster et al., 2007, Porta et al., 2009 et de Hoppstadter et al., 2015.

manière presque équivalente²⁶⁸. Il n'est donc pas évident de conclure sur ce constat car l'augmentation de l'expression du TNF et de l'IL1- β est également décrite, en condition inflammatoire. Les taux d'inhibition de l'expression du TNF et de l'IL1- β par le processus de tolérance aux endotoxines semblent très proches entre les souris KO et les contrôles lorsque la stimulation est effectuée *in vitro*.

Une stimulation répétée *in vivo* induit un état de tolérance aux endotoxines qui peut être testé par une dernière injection à forte dose. En croisant les souris GILZ-floxed (Riccardi) avec les souris LysM-cre, Hoppstadter et ses collaborateurs ont obtenu une souris dont le gène de GILZ est spécifiquement supprimé dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et quelques lymphocytes B²⁶⁸. Dans ces souris, l'effet de GILZ sur la tolérance aux endotoxines est beaucoup plus clair. En effet, il y a une altération complète de la régulation du TNF et de l'IL1- β dans les poumons, la rate, le foie et les reins²⁶⁸. Etant donné que d'autres types cellulaires sont également concernés par la tolérance aux endotoxines, il est impossible de conclure quant à un effet direct de GILZ sur les macrophages dans ce contexte.

3.3 Etudes *in vivo* confirmant le potentiel anti-inflammatoire de GILZ

Les premières études ont porté sur l'arthrite rhumatoïde. L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire systémique chronique. Elle touche spécifiquement les articulations en induisant une arthrite aseptique. Cette arthrite est notamment due à la production de cytokines pro-inflammatoires dans l'articulation. L'augmentation des cytokines est également confirmée dans le plasma. L'arthrite rhumatoïde est modélisée *in vivo* par une "vaccination" intradermique dirigée contre le collagène de type II³⁰². Cette "vaccination" induit une auto-immunité responsable de la maladie. Or l'inhibition de GILZ *in vivo* par des siRNA induit une augmentation significative de la sévérité de la maladie et de la production d'IL1- β et de TNF³⁰².

Les souris de fond génétique SPRET/Ei dérivent de l'espèce *Mus spretus*, une souris sauvage. Ces souris sont résistantes à l'endotoxémie sévère, induite par une injection létale de LPS. Pinheiro et ses collègues ont recherché une cause génétique en étudiant la résistance des souris obtenues par croisement de parents SPRET/Ei et de souris C57Bl/6

conventionnelles²³⁷. Dans cette étude, le locus du gène TSC22D3 a été identifié comme associé à la résistance des souris SPRET/Ei à l'endotoxémie sévère.

De plus, GILZ est quantitativement plus exprimée dans les souris portant l'allèle provenant des souris SPRET/Ei par rapport aux contrôles. Dans cette étude, les auteurs ont également montré que l'augmentation du niveau d'expression de GILZ non restreinte aux macrophages dans les souris C57Bl/6 favorise la survie dans un modèle de choc endotoxinique²³⁷. L'augmentation de l'expression de GILZ limite aussi la production de cytokines au niveau systémique.

GILZ semble donc avoir un rôle dans le contrôle de l'inflammation. Mais à ce jour, aucune étude n'a permis de démontrer formellement l'impact de l'expression de GILZ dans les macrophages sur l'inflammation systémique.

Objectifs

Objectifs de l'étude

Les maladies inflammatoires systémiques aiguës comme le choc septique, le SIRS ou le SDRA sont les premières causes de mortalité dans les unités de soins intensifs¹⁸¹. Les mécanismes disruptifs qui conduisent à la décompensation inflammatoire et au retour à l'homéostasie sont encore largement méconnus et font débat.

L'inflammation exubérante observée chez les patients atteints de choc septique est clairement établie. Avec elle, les cellules immunitaires et notamment des macrophages acquièrent un phénotype tolérant dont les conséquences, à moyen terme, sur le système immunitaire demeurent mal identifiées⁶. Ce phénomène pourrait être responsable d'une plus grande susceptibilité des patients atteints de sepsis aux infections secondaires et à la réactivation de virus latents, d'où un risque majoré d'aggravation de leur état¹⁰⁹. En ce qui concerne les monocytes et les macrophages, cet effet est connu sous le terme de tolérance aux endotoxines.

Les études systématiques portant sur le choc septique humain sont limitées par l'extrême variabilité de la maladie. Elles sont donc très coûteuses et portent sur un nombre élevé de patients. Par conséquent, le sepsis et le choc septique sont largement étudiés dans des modèles murins. GILZ y est identifiée comme un facteur de résistance à l'endotoxémie et un facteur requis au processus de tolérance aux endotoxines.

La première partie de ces travaux vise à qualifier le rôle de la protéine GILZ et notamment de sa surexpression au cours de l'inflammation systémique aiguë. Dans un premier temps, cette étude s'est appuyée sur l'évaluation de l'expression de GILZ dans les monocytes issus de patients atteints de maladies inflammatoires systémiques sévères et dans les macrophages tissulaires in vivo dans des modèles murins. Dans un second temps, l'étude du rôle fonctionnel de GILZ dans les macrophages au cours du choc septique et de l'endotoxémie a été réalisée avec un modèle de souris transgénique dans lequel l'expression de GILZ est maintenue à un niveau élevé, spécifiquement dans les macrophages.

La seconde partie du travail a consisté à étudier dans les macrophages humains, les mécanismes moléculaires qui gouvernent les fonctions de GILZ. Dans les autres types cellulaires, il a préalablement été démontré que GILZ exerce ses fonctions par des interactions protéine-protéine. Nous avons donc initié une étude complémentaire décrivant

l'interactome de GILZ dans une lignée pro-monocytaire THP-1 différenciée en macrophage et par double-hybride afin d'identifier les partenaires de GILZ associés à la régulation de la réponse inflammatoire.

Ces études permettent de renforcer la description du rôle de GILZ sur la polarisation des macrophages au cours du choc septique et de proposer un mécanisme fonctionnel.

Résultats

*Partie I : Rôle d'une surexpression de GILZ restreinte aux macrophages sur
l'inflammation systémique*

Partie II : Décryptage moléculaire du mode d'action de GILZ

Partie I Rôle d'une surexpression de GILZ restreinte aux macrophages sur l'inflammation systémique

Dans les modèles murins, GILZ a été identifiée comme un facteur de résistance à l'endotoxémie et un facteur requis à la tolérance des macrophages vis à vis des endotoxines^{237,268}. Dans les macrophages, l'expression de GILZ est réprimée à la suite d'une stimulation par du LPS²⁶⁵. L'impact de cette diminution ou d'une surexpression de GILZ dans les macrophages n'a pas été investigué in vivo, notamment sur les étapes précoces de l'inflammation systémique.

Cette partie du travail est centrée sur l'influence de GILZ sur la réponse des macrophages in vivo et dans les étapes précoces de l'inflammation systémique.

L'altération rapide de l'expression de GILZ a été confirmée in vitro et in vivo dans des monocytes et macrophages de souris ou provenant de patients en choc septique prélevés au moment du diagnostic. L'importance de cette diminution de l'expression de GILZ dans les macrophages a été investiguée dans un modèle de souris transgénique qui sur-exprime GILZ de manière stable et restreinte au macrophage (souris GILZ^{High}).

En exploitant des modèles in vitro d'endotoxémie et de choc septique chirurgical sévère, ces souris ont permis de décrire le rôle de GILZ dans les macrophages et sur les étapes précoces de l'inflammation systémique.

**Targeted overexpression of Glucocorticoid-induced leucine zipper in macrophages
is sufficient to limit the systemic inflammation during septic shock**

Mehdi Ellouze ^{1,2,3}, Aurélie Guguin ⁴, Olivier Robert ^{5,6}, Mathieu Surenaud ^{1,2,3}, Thi Tran ⁶, Joseph Calmette ^{5,6}, Thomas Barbin ^{1,2,3}, Lola Vigouroux ^{1,2,3}, Gabriel Perlemuter ^{5,6,7}, Anne-Marie Cassard-Doulcier ^{5,6}, Pierre Launay ^{8,9}, Virginie Maxime ¹⁰, Djillali Annane ¹⁰, Colas Tcherakian ¹¹, Françoise Bachelier ^{5,6}, Yves Levy ^{1,2,3} and Véronique Godot ^{1,2,3}.

¹ Faculté de Médecine, Université Paris Est Créteil, Créteil, 94 000, France;

² Vaccine Research Institute, Créteil, 94 000, France;

³ INSERM U955, Team 16, Créteil, 94000, France;

⁴ IMRB, Créteil, 94000, France;

⁵ Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, 94 275, France;

⁶ INSERM U996, Clamart, 92 140, France;

⁷ Service de Gastro-Entérologie, AP-HP, Clamart, 92 140, France;

⁸ INSERM U1149, Paris, France

⁹ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence INFLAMEX, Paris, France.

¹⁰ Hôpital Raymond-Poincaré, Garches, 92380; France

¹¹ Service de Pneumologie, Hôpital Foch, Suresnes, 92150, France.

Corresponding Author: Véronique Godot < veronique.godot@gmail.com >

Author contributions: ME, PL, VM, DA, CT, FB, YL and VG conceived the study. ME and VG designed the experiments. ME, AG, MS, TT, JC, TB, LV performed the experiments. ME, PL, DA, CT and VG analyzed the data. OR, GP, AMCD provided GILZ^{high} mice. ME, PL, DA, CT and VG wrote the paper with input of all authors.

Acknowledgments: ME was supported by INSERM (poste accueil INSERM) and VRI (Vaccine Research Institute) fellowship. We thank Didier Trono for providing us the plasmids psPAX2 and pMD2.G and Eric Campeau for the pLenti CMV/TO Puro DEST and pLenti CMV TetR Blast plasmids.

Running head: GILZ rules macrophages to limit systemic inflammation

Abstract (247/250 words)

1 Septic shock, a main cause of death in intensive care units, comes from an uncontrolled systemic
2 inflammation triggered by infection. Macrophages play a central role in this disease, as they are
3 involved in the initiation and resolution of inflammation. Fully understand their inflammatory
4 response and its modulation is a challenge in the field. Previous studies have highlighted the
5 immunosuppressive protein GILZ as a master regulator of macrophages able to limit their secretion
6 of TNF and IL-6 in response to LPS.

7 Objectives: This study sought to determine whether a deregulated expression of GILZ in
8 macrophages could be a key factor in the pathophysiology of septic shock.

9 Methods: GILZ expression was measured in the monocytes/macrophages (M/Ms) of patients with
10 septic shock and in macrophages from endotoxemic mice. The consequences of GILZ modulation
11 in macrophages were further evaluated on systemic inflammation and survival in septic shock
12 models using transgenic mice overexpressing GILZ in macrophages.

13 Measurements and main results: A significant lower expression of GILZ was observed in patients'
14 monocytes and macrophages from endotoxemic mice compared to cells extracted from their healthy
15 counterparts and was related to higher TNF production. We showed that an overexpression of GILZ
16 targeted in macrophages was sufficient to limit systemic inflammation, the frequency of
17 inflammatory monocytes and to improve significantly mice lifetime in septic shock models.

18 Conclusion: These results provided new evidences for a central role of GILZ in M/Ms on the
19 pathophysiology of septic shock, hence possible clue for modulation of inflammation in this severe
20 disease.

21 **Introduction (360/450 words)**

22 The septic shock remains the major cause of mortality in critical care units (1, 2). From a
23 pathophysiological point of view, septic shock is characterized by an excessive inflammatory
24 immune response. This initial burst of systemic inflammation more than the pathogen itself leads to
25 multiple organ failure and even death (3, 4). The intense supportive therapy could preserve vital
26 functions, but is unable to reverse the consequences of cytokine storm (2, 5). Monocytes and
27 macrophages (M/Ms) are key actors in this initial inflammatory burst. They recognized bacterial
28 compounds such as lipopolysaccharides (LPS) mainly through TLR-4. They differentiate to M1-like
29 polarized M/Ms and produce inflammatory cytokines including TNF notably via the activation of
30 the transcription factor NF- κ B (5, 6). TNF overproduction will, in turn, feed the systemic organ
31 failure. Hence, fully understand M/M response and its modulation remains a challenge in septic
32 shock.

33 Previous studies have identified the immunoregulatory protein GILZ (Glucocorticoid-
34 Induced Leucine Zipper) as a regulator of M/Ms (7, 8). GILZ is constitutively expressed in M/Ms
35 (7). When expressed in excess, GILZ limits the secretion of TNF and IL-6 in response to LPS
36 through an inhibition of NF- κ B and MAPK/ERK pathway (9-11). There is growing evidence that
37 the modulation of GILZ expression *in vivo* could influence the outcome of inflammatory disorders
38 (9, 12). Moreover, the resistance of Spret-Ei mouse strain to lethal LPS-induced endotoxemia was
39 associated with the presence of mutations in GILZ's gene which should raise the stability of the
40 mutant protein (9).

41 Despite a better understanding of M/M regulation by GILZ, no direct link has been demonstrated
42 yet between M/M excessive inflammatory response during septic shock and a defective expression
43 of GILZ.

44 We firstly monitor the expression of GILZ in M/Ms of patients with septic shock and from
45 mice with LPS-induced endotoxemia. Then after, using transgenic mice, we study *in vivo* the

46 consequences of a high and targeted expression of GILZ in M/Ms on systemic inflammation and
47 survival in experimental models of endotoxemia and septic shock.

48 The consistent results obtained in human and murine models confirm the direct interplay between
49 GILZ expression in M/Ms and the control of LPS-related systemic inflammation as well as its
50 subsequent consequence on mortality in mice.

51

52 **Material and methods (936/500 words)**

53 **Mice**

54 Mice were used between 8 and 14 weeks when they reached a body weight in the range of 25-30g.
55 The homozygous GILZ^{high} transgenic mice carry a transgene encoding mouse GILZ under the
56 direction of the CD68 promoter (13). Congenic control mice used as controlled have been obtained
57 by crossing the GILZ^{high} heterozygous mice. Experimentations were approved by the local Ethics
58 Committee for Animals (CEEA-16, Animal Care and Use Committee, Maison-Alfort, France) and
59 complied with French and European guidelines for the use of laboratory animals.

60

61 **Septic shock patients**

62 Septic shock patients were admitted into the intensive care unit in Raymond-Poincaré Hospital
63 (Garches, France). They presented at least one proven site of infection, a Sepsis-related Organ
64 Failure Assessment score (SOFA score) above six and required at least six consecutive hours of
65 catecholamine infusion to stabilize blood pressure over 65mmHg. Four milliliters of peripheral
66 venous blood were collected in tubes containing EDTA for purification of monocytes and
67 monitoring of GILZ expression by qRT-PCR. Plasma was clarified by two successive
68 centrifugations at 600g and 10 000g for 10 minutes and stored at -80°C until analysis. Protocols
69 were approved by the ethics committee of Saint-Germain-en-Laye (France). Healthy donors were
70 used as controls.

71

72 **Cell purification**

73 CD14⁺ blood monocytes were purified from buffy coat according to manufacturer's instructions
74 using CD14⁺ microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France). Untouched whole blood monocytes were
75 magnetically isolated by removing unwanted cells with a tetrameric cocktail obtained from
76 StemCell (Grenoble, France) (Human monocytes isolation kit without CD16 depletion) and
77 completed by a tetrameric complex against CD94, CD61, KIR3DL1 (do-it-yourself kit from
78 StemCell). The final purity reached an average of 93,77% +/- 3,1%.

79 Peritoneal and alveolar macrophages were purified by cell sorting (MoFlo, Beckman Coulter,
80 Fullerton, USA or FACS Aria, Becton Dickinson, San Jose, USA) as described in previous papers
81 (14-16). For *in vitro* experiments, macrophages were left overnight in complete medium before
82 stimulation. For mRNA quantification, cells were directly lysed in 300µL of lysis buffer (RLT+,
83 Qiagen, Venlo, Netherlands) and frozen at -80°C until RNA extraction.

84

85 **Cell culture and stimulation**

86 Culture media and procedure for the differentiation of BMDM are described in an online data
87 supplement. In *in vitro* stimulation assays, cells were incubated with 10⁻⁷M of Dexamethazone
88 (D4902, Sigma-Aldrich, Lyon, France) or 100ng/mL of LPS from *Escherichia coli* (*E. coli*) (L2880,
89 055:B5, Sigma-Aldrich) for indicated time.

90

91 **Phagocytosis assays**

92 In *in vitro* assays, macrophages were matured or not with LPS for 24 hours (100ng/mL) and
93 then incubated for two hours with the fluorescent pHrodo Green *E. Coli* BioParticles
94 (Lifetechnologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at indicated doses. Cells were then
95 washed once in PBS 1X and kept in 100µL of living cell imaging solution. Fluorescence analysis
96 was measured immediately with a Mithras LTD fluorimeter (Berthold, Thoiry, France).
97 Normalization was made over the fluorescence baseline.

98 In *in vivo* assay, 100µg of fluorescent pHrodo Green *E. coli* BioParticles (Lifetechnologies)
99 were injected intraperitoneally in mice in a total volume of 200µL. Cells were harvested from
100 peritoneal cavity 24 hours post-injection, washed, stained with CD115-Pe, F4/80-APC, Ly6G-APC-
101 eF780, Ly6C-Pe-Cy7, CD45-qdot605, CD11b-percp-cy5.5 and kept on ice in a living cell imaging
102 solution before analysis by flow cytometry (LSR fortessa, Becton Dickinson). pHodro fluorescence
103 level was acquired in 533/30 (Fitec) channel.

104

105 **Endotoxemia and septic shock assay**

106 Sublethal endotoxemia was obtained by intra-peritoneal (i.p.) injection of LPS (100µg /mouse, *E.*
107 *Coli* O55:B5, ALX-581-013-L002, ENZO Lifescience, Villeurbanne, France). Severe polymicrobial
108 septic shock was induced on anesthetized mice by surgical procedures of cecal ligation and
109 puncture (CLP). Detailed of CLP procedure and sample harvesting are provided in the online
110 supplement.

111

112 **Flow cytometry**

113 Staining procedure and the list of used antibodies (clones and suppliers) are detailed in the online
114 supplement. Acquisitions were performed on a LSRII flow cytometer or a LSRFortessa analyzer
115 (Becton Dickinson). Data were analyzed using FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, Oregon,
116 USA).

117

118 **Cytokine quantification**

119 Mouse cytokine and chemokine production was measured with 26-plex Luminex assay
120 (eBioscience, Paris France or San Diego, USA) on a bioplex 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules,
121 USA) according to the manufacturer's instructions. Human cytokines were quantified by ELISA
122 (Diacclone, Besançon, France).

123

124

125 **RNA extraction and quantitative RT-PCR**

126 RNA extraction was performed using RNeasy mini or micro kit Plus (Qiagen) according to the
127 manufacturer's instructions. cDNA was obtained by reverse transcription using first strand cDNA
128 synthesis Kit (Stratagene, Agilent, Garches, France). Quantitative PCR reactions were performed
129 using Brilliant II SYBR Green QPCR master Mix in a Mx3005P thermal cycler (Stratagene)
130 according to the manufacturer's instructions. Relative expression of target genes was calculated and
131 normalized to β -actin by standard curve method. All primers used for qPCR are listed in table E1 in
132 the online data supplement.

133

134 **Tandem affinity purification**

135 Tandem affinity purification (TAP-TAG) experiments were performed on THP-1 cell line with a
136 stable expression of GILZ flanked with two tags (FLAG and HA) in the C-terminal end (GILZ-
137 FHC) as previously described (17). The procedure and lentiviral vectors used to generate THP-1
138 and THP-1 NF- κ B SEAP Blue reporter cell lines expressing GILZ-FHC are detailed in an online
139 data supplement.

140

141 **Western-Blot analysis**

142 Western blotting was performed as previously described with the following antibodies: anti-GILZ
143 (G-5, SantaCruz Biotechnology, Dallas, USA), anti-Flag (M2, Sigma-Aldrich), anti-HA epitope
144 (Eurogentec, Seraing, Belgium), anti-p65 (Santa-cruz Biotechnology), anti-TSC22D4 (Abcam,
145 Cambridge, United-kingdom) and anti-GAPDH (eBiosciences, Paris, France) (16). Donkey anti-
146 mouse and mouse anti-rabbit HRP conjugated antibodies have been purchased from
147 Lifetechnologies (#PA1-28748 and #31464).

148

149 **Statistics**

150 Experiments with more than two groups were analyzed by one or two-way ANOVA followed by a
151 Bonferroni post-hoc test. Experiments with two groups were analyzed by Mann-and-Whitney

152 unpaired or Wilcoxon paired test depending on the experimental design. Log-rank tests were used in
153 survival assays. Each test has been considered statistically significant if p value was under 0.05 in
154 two-tailed tests. All analyses were performed on Prism software (GraphPad, San Diego, USA).

155

156 **Results**

157 **GILZ is downregulated in M/Ms during the first stage of endotoxemia and septic shock in** 158 **both mice and human**

159 We first evaluated the level of GILZ expression in macrophages during LPS-induced
160 endotoxemia in mice. Large resident peritoneal macrophages (LPM, CD45⁺F4/80^{high}CD11b^{high}) and
161 small peritoneal macrophages (SPM, CD45⁺F4/80^{int}CD11b^{int}) were cell sorted from the peritoneal
162 cavity of wild-type mice three hours after an i.p. injection of LPS (100µg/mice) or PBS and tested
163 for GILZ mRNA expression by qRT-PCR. The injection of LPS was associated with a significant
164 change in peritoneal macrophage proportions. The frequency of LPM decreased, while the
165 percentage of SPM increased compared to unstimulated mice (Figure 1A) as described in previous
166 study (18). A significant reduction in GILZ expression was observed in both LPM and SPM after *in*
167 *vivo* LPS exposure while TNF and IL6 expression was increased (Figure 1B). We took advantage of
168 this experimental model of endotoxemia known to induce SDRA through LPS translocation to also
169 monitor the expression of GILZ in alveolar macrophages (AMs) (19, 20). AMs
170 (CD45⁺F4/80^{int}CD11b^{neg}) sorted from bronchoalveolar lavages showed a significant lower
171 expression of GILZ in the endotoxemic mice. This suppression of GILZ expression was associated
172 in this particular population of macrophages with a mild increase of TNF secretion (1.83 fold +/-
173 0.26), confirming *in vivo* the results obtained by another group in *in vitro* assays (Figure 1C) (8).

174 To establish the direct effect of LPS on the regulation of GILZ expression, macrophages
175 were cultured *ex vivo* upon LPS exposure for up to eight hours. These experimental conditions were
176 initially used by Hoppstädter *et al.* to show the suppression of GILZ mRNA in AMs and BM-DMs
177 (8, 11). We thus focused on peritoneal macrophages and more specifically on LPM that can respond

178 to LPS either *in vivo* and *in vitro* in contrast to SPM (18). We also repeated the experiments with
 179 BM-DMs in order to validate our *in vitro* assay. In LPM, GILZ expression remained low from two
 180 up to eight hours after *in vitro* LPS stimulation (Figure 1D) as previously reported in AMs and BM-
 181 DM (11). We found, as well, a decrease of GILZ expression in LPS-exposed BM-DM at mRNA
 182 (Figure 1E) and protein (Figure 1F) levels.
 183 We used the same experimental conditions to determine whether LPS exposure could also suppress
 184 GILZ expression in human monocytes prior to starting further investigation in patients with LPS-

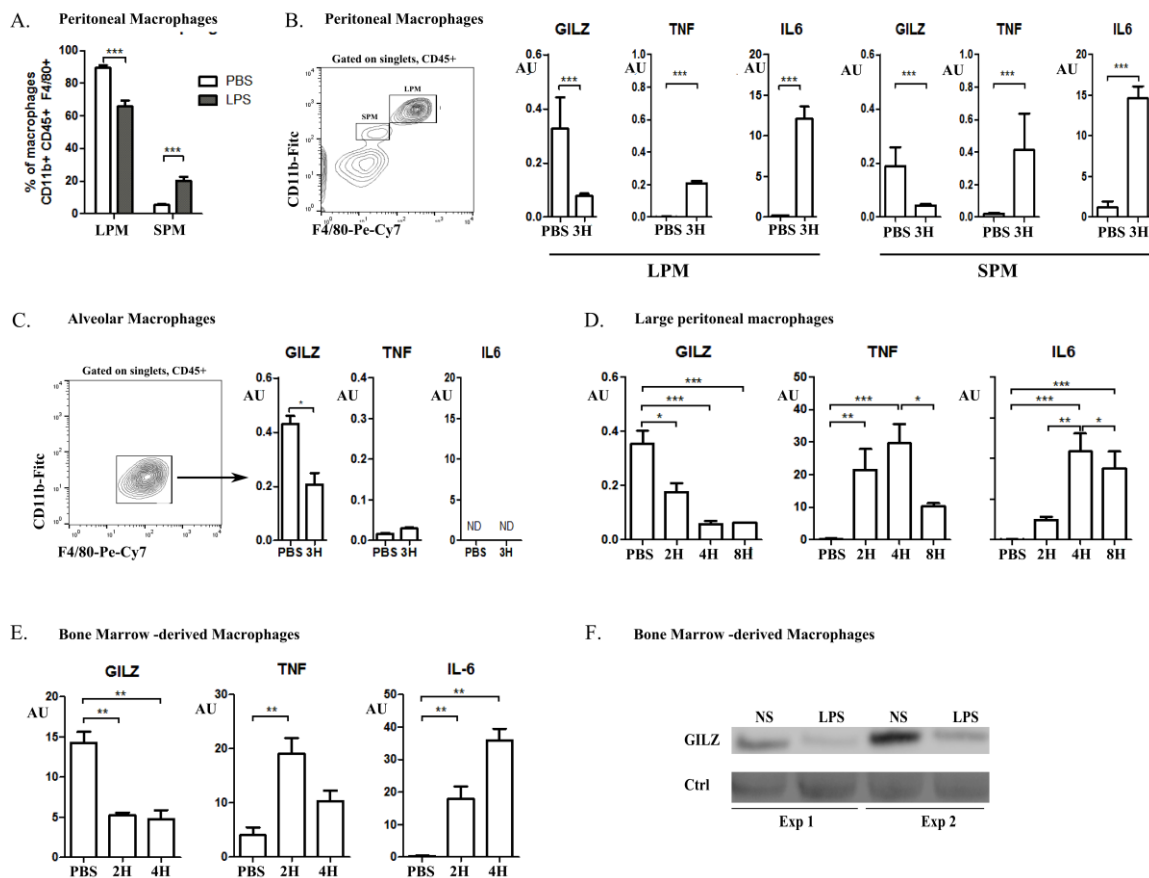


Figure 1 GILZ downregulation in mouse macrophages during endotoxemia

GILZ expression was quantified in cell-sorted macrophages from wild type mice three hours after an *i.p* injection of LPS to induce endotoxemia (LPS from *E. coli*, 100 μ g/mouse). Control mice received an *i.p* injection of PBS. (A) Frequency of LPM and SPM in the peritoneal cavity of mice before (white bars) and after injection (grey bars). *GILZ*, *TNF* and *IL6* mRNA expression was quantified by qRT-PCR in (B) LPM ($CD45^+CD11b^{high}F4/80^{high}$, $n=5$) and SPM ($CD45^+CD11b^{int}F4/80^+$) sorted from the peritoneal cavity of mice, (C) alveolar macrophages ($CD45^+CD11b^{neg}F4/80^{high}$) ($n=5$). (D) Cell sorted mouse LPM ($n=5$) and (E) BMDM ($n=4$) were stimulated *in vitro* with 100ng/mL of LPS for indicated time and tested for the expression of *GILZ*, *IL6* and *TNF* by qRT-PCR. (F) *GILZ* expression analyzed by Western-Blot in BMDM before and after LPS treatment (100ng/mL, two hours).

mRNA were normalized over β -actin expression. Two-tailed Student *t* test or One way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test were used to compare groups. Mean \pm SEM. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,005$, ns $p>0,05$.

185 induced inflammatory disorders. The decrease of GILZ expression was confirmed in CD14+
 186 monocytes isolated from healthy donors at mRNA (Figure 2A) and protein (Figure 2B) levels with a
 187 linear correlation between gene expression and the protein (Figure 2C). The suppression of GILZ
 188 expression in LPS-exposed human monocytes was associated with the induction of TNF secretion
 189 (Figure 2A) as described in murine macrophages.

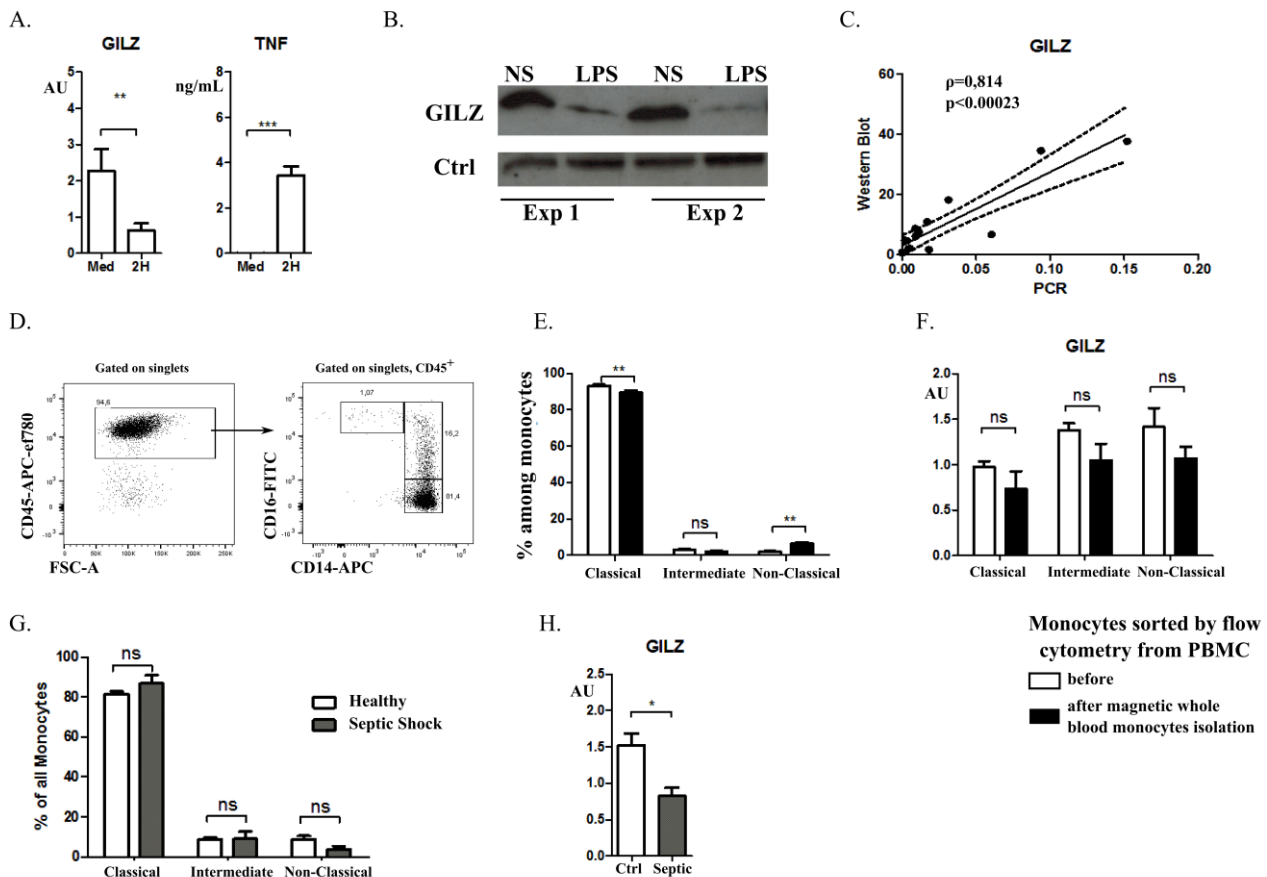


Figure 2 GILZ is downregulated in monocytes purified from septic shock patients

GILZ expression at mRNA (A) and protein (B) levels in CD14+ monocytes stimulated two hours with LPS (100ng/mL). (B) In WB analysis, non-specific band has been used as control (Ctrl). Two experiments (Exp1 and Exp2) from four are represented. (C) Correlation plot between *GILZ* mRNA and *GILZ* protein expression in human monocytes. (D) Flow cytometry analysis of blood monocyte subsets purified from healthy donors or septic shock patients. One representative experiment performed in the first included patient. Monocyte subset frequency (E) and *GILZ* expression (F) in monocyte subsets sorted from PBMCs by flow cytometry (white bars) or by two steps: whole monocytes were first isolated from PBMC by magnetic purification then monocyte subpopulations were sorted from whole monocytes by flow cytometry (black bars). (G) Frequency of classical (CD45+ CD14+ CD16^{neg}), intermediate (CD45+ CD14+ CD16⁺) and non-classical (CD45+ CD14^{low} CD16⁺) monocyte subsets in septic patients and healthy controls (n=4-7 per group). (H) *GILZ* expression in whole blood purified monocytes from patients with septic shock or healthy donors (n=4-6 per group) Two-way ANOVA followed by Bonferroni two-tailed post-hoc, two-tailed Student t, or Spearman correlation test have been used. Mean ± SEM. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005, ns p>0,05.

190 Next we monitored GILZ expression in monocytes purified from patients with septic shock as early
191 as diagnosis was confirmed. Their inflammatory condition was documented with an increase of
192 CRP (204 +/- 58 mg/L), procalcitonin (7,7 +/- 2,4 ng/mL) and IL-6 plasma level (745,7 pg/mL +/-
193 505,2 pg/mL). As repartition of monocyte subsets could be highly variable in septic patients (21,
194 22), we decided to isolate all subsets from PBMC by negative selection. We used a magnetic kit
195 optimized to preserve classical (CD45⁺CD14⁺CD16⁻), non-classical (CD45⁺CD14^{dim}CD16⁺) and
196 intermediate (CD45⁺CD14⁺CD16⁺) monocytes (Figure 2D). This purification method preserves the
197 proportion of monocyte subsets (Figure 2E). As it was not previously reported, we firstly showed
198 that the level of GILZ was similar in all monocyte subsets coming from healthy donors (Figure 2F)
199 and not affected by the technic used to isolate monocytes (Figure 2F).

200 The three monocyte subsets were equally represented in septic patients and healthy donors (Figure
201 2G). A significant lower expression of GILZ was found in monocytes from septic shock patients
202 compared to healthy donors (Figure 2H) emphasizing from a clinical perspective the need to more
203 fully understand the contribution of GILZ in M/M responses during endotoxin-induced
204 inflammation.

205

206 **GILZ expression level controls M/M responses exposed to LPS**

207 To find out whether the decrease of GILZ expression is a mandatory condition to elicit M/M
208 inflammatory responses in LPS-induced endotoxemia, we used a transgenic mouse strain with an
209 enforced expression of GILZ driven by the CD68 promoter (GILZ^{high}) leading to a targeted and
210 permanent overexpression of GILZ in M/Ms. As expected, GILZ was exclusively overexpressed at
211 mRNA and protein levels in macrophages from transgenic mice compared to non-transgenic control
212 mice and not in other tested lineage cells (Figures 3A-3B). No changes in the proportions of CD4
213 (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) and CD8 (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) T cells, NK cells (CD45⁺NK1.1⁺), B cells
214 (CD45⁺CD19⁺) and monocytes (CD45⁺CD115⁺) were observed in the blood of adult GILZ^{high} mice
215 (Figure 3C) as well as in the proportions of peritoneal and alveolar macrophages (Figure 3D).

216 We first characterized *in vitro* the cytokine secretion profiles of LPS-exposed transgenic
 217 LPM. LPM purified from GILZ^{high} mice that retained a higher expression of GILZ after LPS
 218 stimulation compared to non-transgenic LPM expressed significantly lower levels of TNF mRNA
 219 and significantly higher levels of IL10 mRNA after LPS treatment (Figures 3E-3F).

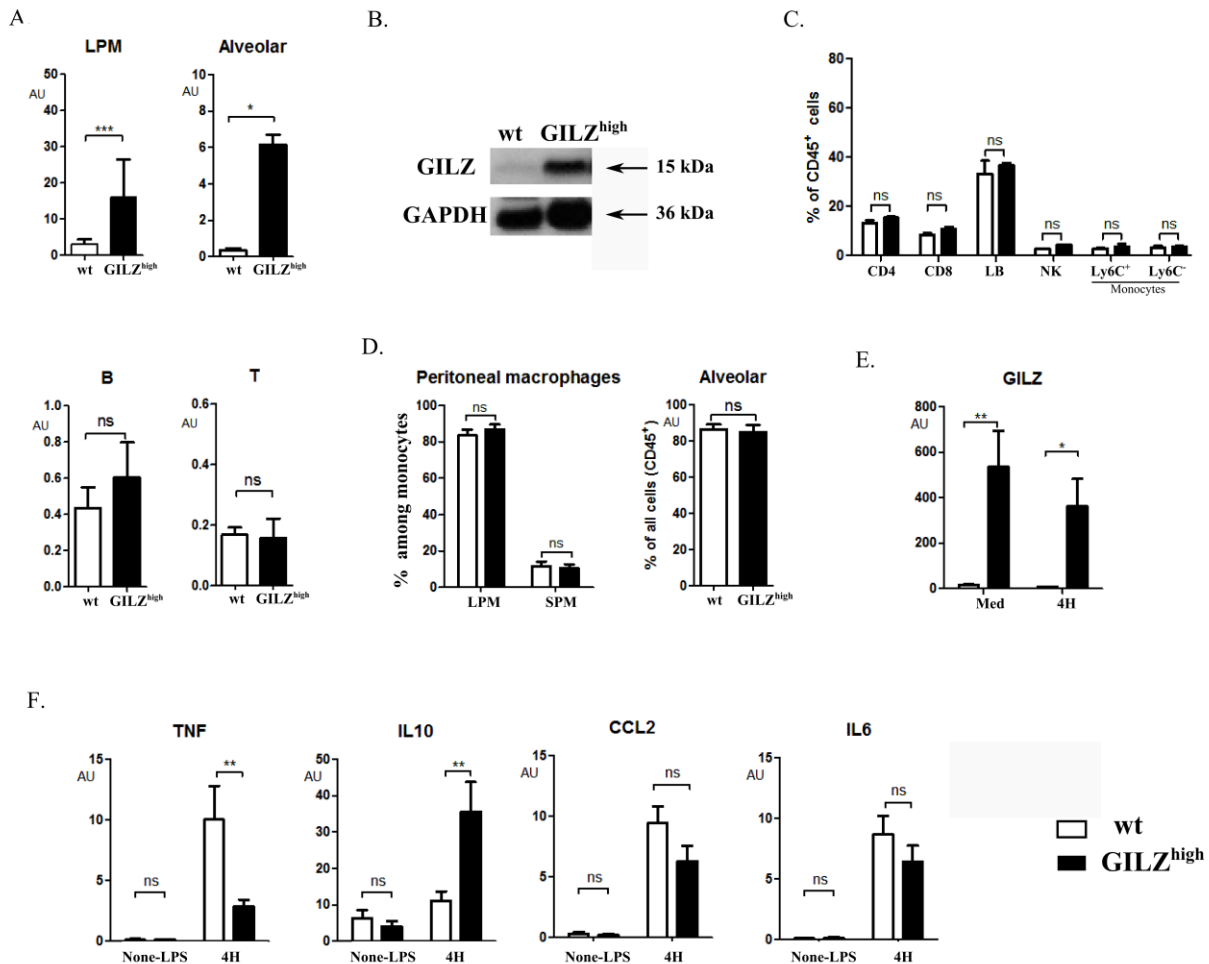


Figure 3 Features of GILZ^{high} mice with an overexpression of GILZ driven by the CD68 promoter

(A) GILZ mRNA expression in LPM (CD45⁺CD11b^{high}F4/80^{high}), alveolar macrophages (CD45⁺CD11c⁺F4/80⁺), B (CD19⁺) and T (CD3⁺) cells sorted from GILZ^{high} or control mice. (B) Western-Blot of GILZ protein in unstimulated peritoneal macrophages purified from GILZ^{high} or control mice. One representative experiment out of three is represented. GAPDH has been used as controls. (C) Frequency of CD4 (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) and CD8 (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) T cells, B lymphocytes (CD45⁺CD19⁺), NK cells (CD45⁺NK1.1⁺) and monocytes (CD45⁺CD115⁺) in unstimulated GILZ^{high} (black bars) or control (white bars) mice (n=3). (D) Frequency of peritoneal macrophage subsets and alveolar macrophages in GILZ^{high} (black bars) or control (white bars) mice (n=6). Expression of (E) GILZ, (F) TNF, IL10, CCL2 and IL6 mRNA in LPM sorted from GILZ^{high} (black bars) or control (white bars) mice and stimulated four hours with LPS (100ng/mL). mRNA have been quantified by qRT-PCR and normalized over β -actin expression. Student *t* test (A), two-way ANOVA followed by two-tailed Bonferonni corrected post-hoc test. Mean \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ns $p > 0,05$.

220 Macrophages contribute to the initiation of the systemic inflammatory response through the
221 release of proinflammatory cytokines. Therefore, the anti-inflammatory cytokine profile of
222 GILZ^{high}-LPM exposed *in vitro* to LPS prompts us to verify whether this could have an influence on
223 the LPS-induced systemic inflammation.

224

225 **Targeted overexpression of GILZ in M/Ms limits systemic inflammation and enhances lifetime** 226 **in a mouse septic shock model**

227 To address this question, we monitored the secretion of cytokines in the plasma of GILZ^{high}
228 mice and non-transgenic control mice six hours after an i.p injection of LPS -after having verified
229 that macrophages from GILZ^{high} mice kept a higher expression of GILZ upon *in vivo* LPS exposure
230 (Figure 4A). A significant lower plasma level of the pro-inflammatory cytokines and chemokines
231 TNF, IL-6, CCL2 and MIP-1 α (CCL3) was observed in GILZ^{high} transgenic mice (Figure 4B),
232 reflecting a decrease in systemic inflammatory response. The overexpression of GILZ in
233 macrophages did not affect plasma level of IL-1 β or CCL5 during endotoxemia (Figure 4B).

234

235 Infectious systemic inflammation is also associated with an alteration of neutrophil and
236 inflammatory monocyte count in blood (23, 24). So we followed their frequencies in the blood of
237 GILZ^{high} and non-transgenic control mice 3 hours, 24 hours and 96 hours after LPS-injection
238 (Figures 4C-4D). Neutrophil frequency was increased 24 hours post-injection in the same range in
239 transgenic and non-transgenic mice (Figure 4C). Twenty-four hours post-injection, a significant
240 decrease in the frequency of inflammatory monocyte (Ly6C⁺) was observed in GILZ^{high} mice
241 compared to the non-transgenic mice (Figure 4C).

242 We further evaluated whether the lower inflammatory response of GILZ^{high} mice exposed to
243 LPS could improve their clinical outcome during a septic shock. We purposely chose a severe
244 model of septic shock leading quickly and inevitably to a fatal issue to avoid the emergence of a late

245 endotoxin tolerance and its consequences on antibacterial responses. In this lethal model, $GILZ^{high}$
 246 mice had a significantly increased lifetime compared to the control mice (Figure 4E).

247

248 **$GILZ^{high}$ macrophages express normal levels of TLR2 and TLR4 but exhibit slightly impaired**
 249 **phagocytosis**

250 In experimental septic shock provoked by CLP, peritoneal macrophages are activated by
 251 both bacterial recognition through TLR2/4 and ingestion. As they play a major role in the initial
 252 inflammatory burst, which could lead to death in this model, we first questioned whether $GILZ$
 253 could decrease macrophage sensor function. Indeed, previous reports suggest that $GILZ$
 254 downregulates the expression of TLR-2 on human monocytic cell lines (9). We thus clarified the
 255 TLR2 and TLR4 expression profile in $GILZ$ -overexpressing LPM and show that the lower LPS-

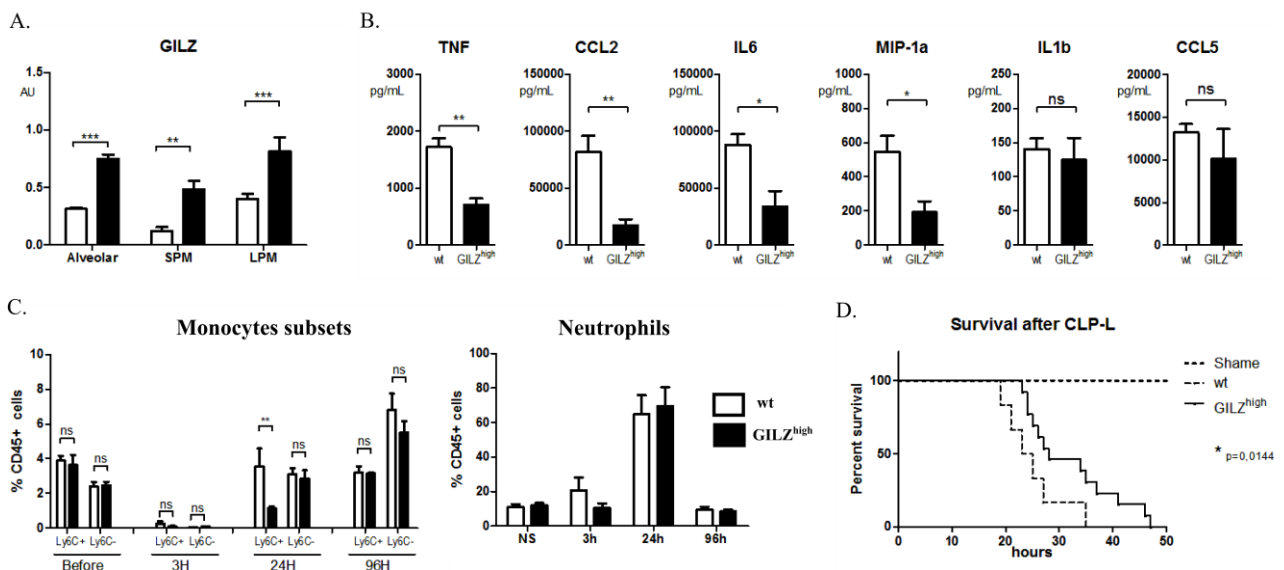


Figure 4 Alteration of systemic inflammatory responses in $GILZ^{high}$ mice

(A) Three hours after in-vivo LPS injection, $GILZ$ mRNA expression was quantified in alveolar ($CD45^+F4/80^+CD11b^{neg}$), small ($CD45^+F4/80^+CD11b^+$) and large peritoneal macrophages ($CD45^+F4/80^{high}CD11b^{high}$) cell-sorted from $GILZ^{high}$ (black bars) or control (white bars) mice ($n=3-4$). (B) Luminex quantification of plasma cytokine and chemokine levels six hours after LPS injection ($n=4$). Cytokines were not detectable in the plasma of untreated mice. (C) Frequency of neutrophils (right panel) and $Ly6C^+$ or $Ly6C^{neg}$ monocyte (left panel) subsets ($CD45^+CD115^+$) in LPS treated $GILZ^{high}$ (black bars) and control (white bars) mice for indicated time ($n=4$ per group). (D) Survival under severe and lethal polymicrobial septic shock induced by cecal ligation and puncture ($n=9-12$ per group). Two-way ANOVA followed by two-tailed Bonferroni post-hoc test or log-Rank test. Mean \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ns $p > 0,05$.

256 induced expression of TNF in GILZ^{high}-LPM could not be due to an altered expression of both
257 receptors (Figure 5A). We secondly studied *in vitro* and *in vivo* the capacities of GILZ^{high}-
258 macrophages to uptake *E. coli* bioparticles and to drive them into acid vesicles. To address this
259 issue, we used BMDM obtained from GILZ^{high} or control mice. Resting or BMDM activated with
260 LPS were incubated two hours with increasing doses of *E. coli* bioparticles coupled with pHrodo, a
261 pH-sensitive dye conjugate. Resting GILZ^{high}- and control-BMDM efficiently phagocytized *E. coli*
262 particles (Figure 5B). However, activated GILZ^{high}-BMDM exposed to high doses of *E. coli*
263 particles showed a lower level of fluorescence compared to control-BMDM (Figure 5B). We further
264 measured *in vivo* the bacterial clearance capacity and phagocytosis of GILZ^{high}-macrophages.
265 GILZ^{high} transgenic and non-transgenic mice received an i.p. injection of the pHrodo-*E. coli*
266 particles. Cells were harvested from the peritoneal cavity 24 hours post-injection and analyzed by
267 flow cytometry. Ly6C⁺ recruited SPM were the main harvested population of peritoneal
268 macrophages (Figure 5C). In GILZ^{high} mice they showed a much lower level of fluorescence
269 (Figure 5C). The pHrodo dye conjugate used to labeled *E. coli* bioparticles become fluorescent at
270 acidic pH. The lower level of fluorescence observed in GILZ^{high}-macrophages could thus be
271 attributed to a defect of *E. coli* bioparticle uptake, a defective phagolysosome acidification or a
272 faster clearance of *E. Coli* bioparticles.

273

274 **GILZ overexpression limits NF-κB activity in human macrophages without physically** 275 **interacting with p65**

276 It is commonly accepted that GILZ inhibits the activity of NF-κB in various cell types
277 including macrophages (11, 25). This inhibitory effect is associated in mice with a direct physical
278 interaction between GILZ and the p65 subunit of NF-κB (7, 26). This direct physical interaction has
279 been called into question in human HUVEC cells, suggesting that GILZ could inhibit NF-κB by
280 various processes in human and mice (27).

281 To clarify this point in human macrophages, we first controlled that the overexpression of
 282 GILZ inhibits NF- κ B activity using a SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) reporter
 283 assay. The THP1 Blue NF- κ B cell line with an NF- κ B-dependent SEAP gene has been stably
 284 transduced to overexpress GILZ or to express GILZ shRNA. The activation of NF- κ B was
 285 monitored by determining the activity of SEAP in culture supernatants with luminescent reagent.
 286 The activity of NF- κ B was significantly lower in THP1 Blue cell line expressing GILZ in excess
 287 (Figure 6A) and increased in cells genetically modified to ablate the expression of GILZ (Figure
 288 6B). These results confirmed that the level of GILZ in human monocytic cells controls NF- κ B
 289 activity.

290 The next step was to determine if GILZ does so in human through a direct physical
 291 interaction with p65 NF- κ B subunit as reported in mice (26, 28). To answer this question, we

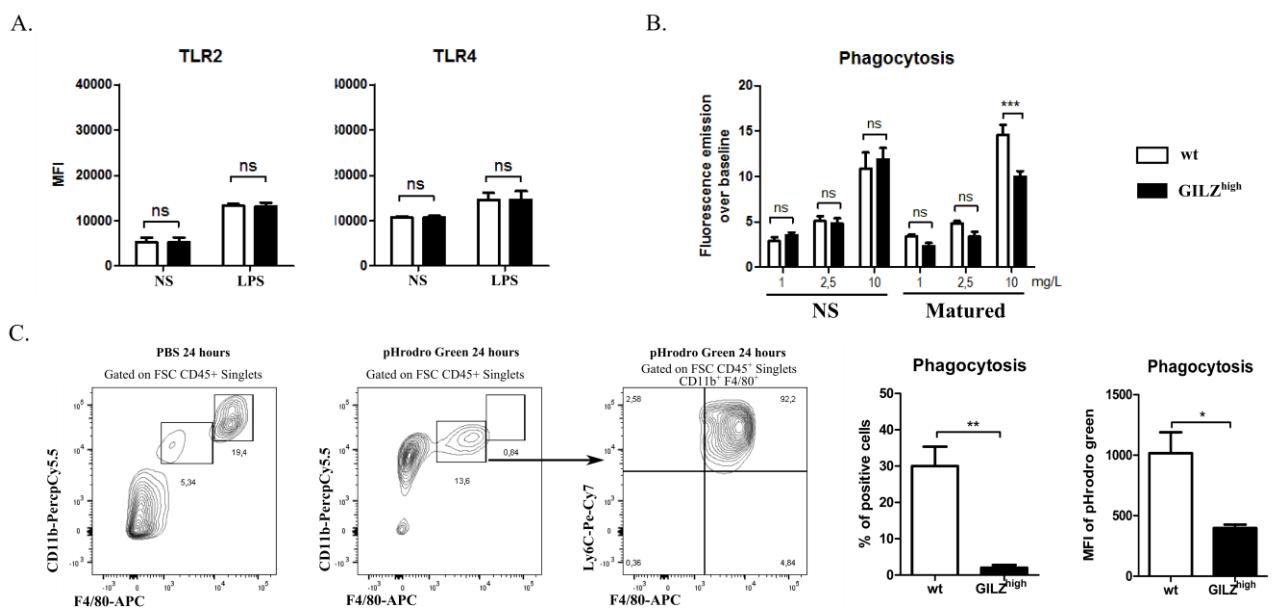


Figure 5 LPS detection and *E. coli* phagocytosis by GILZ^{high} macrophages

(A) LPM were harvested from GILZ^{high} (black bars) or control (white bars) mice four hours after an i.p. injection of PBS (NS) or LPS (100 μ g/mouse) and tested by flow cytometry for their expression of TLR2 and TLR4 (n=4). (B) In vitro phagocytosis assay. BMDM from GILZ^{high} or control mice were matured or not with LPS (24 h, 100ng/mL). After wash, cells were cultured for two additional hours with pHrodo Green *E. coli* particles at indicated dose (two mice per group, measurement done in triplicate). (C) In vivo phagocytosis assay. Fluorescent *E. coli* particles were injected i.p. and quantified on cytometer recruited SPM (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺Ly6C⁺) 24 h after injection (100 μ g per mouse) (n=3 per group). Pictures are representative of one mice. Two-way ANOVA followed by two-tailed Bonferonni corrected post-hoc test. Mean \pm SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005, ns p > 0,05.

292 generated stable THP-1 cells expressing GILZ tagged with both FLAG and HA epitopes at the C-
 293 terminal end (GILZ-FHC) (Figure 6C). Western-blot analysis showed that tagged GILZ-FHC was
 294 expressed at a level comparable to that of endogenous GILZ (Figure 6D). Importantly, GILZ-FHC
 295 kept its ability to control NF- κ B activity (Figure 6E). GILZ-FHC and its associated partners were
 296 purified from THP-1 cells using two successive immunoprecipitations against FLAG epitope first,
 297 and then against HA epitope.

298 WB analysis of GILZ purified material confirmed the interaction with TSC22D4 (Figure 6E)
 299 previously identified as a partner of GILZ (29). No interaction has been found between GILZ and
 300 p65 NF- κ B subunit (Figure 5E) indicating that GILZ does not control NF- κ B activity through a
 301 direct physical interaction with p65. Further analysis will be necessary to identify these mechanisms
 302 in human cells.

303
 304

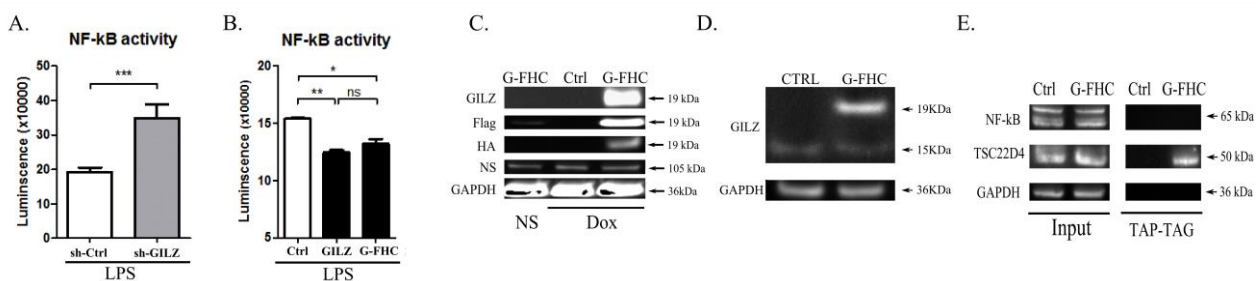


Figure 6 GILZ expression level influences NF- κ B activity

*NF- κ B activity has been quantified in monocytic THP-1 Blue NF- κ B cell line (Invivogen) modified to stably (A) express shRNA against GILZ (sh-GILZ) or (B) overexpress wild type GILZ (GILZ) or overexpress FLAG and HA tagged GILZ (G-FHC). Cells were treated for 24 h with LPS (100ng/mL). NF- κ B activity has been quantified by luminescence assay and standardized over baseline. (C) Western-Blot analysis of doxycycline dependent expression of G-FHC in modified THP-1 cells cultured with or without doxycycline (1 μ g/mL). One representative experiment out of three (D) Western-Blot analysis of endogenous GILZ and G-FHC expression in modified THP-1 cells treated with dexamethasone (10-7M) and LPS (100ng/mL). One representative experiment out of three (E) P65 NF- κ B subunit and GILZ Western-Blot on protein extract before (Input) or after tandem affinity purification against FLAG and HA (TAP-TAG). One representative experiment out of three. Two-way ANOVA followed by two-tailed Bonferroni corrected post-hoc test. Mean \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, ns $p > 0,05$.*

305 Discussion

306 In the last decade, GILZ was identified as a critical regulator of innate and adaptative
307 immune responses (30, 31). To mention just a few examples, GILZ polarizes M/Ms into anti-
308 inflammatory cells and dendritic cells into tolerant cells (7, 8, 11, 16). Besides, a defective
309 expression of GILZ has been related to chronic inflammatory diseases. The expression of GILZ is
310 reduced in dendritic cells from patients with respiratory allergic diseases and absent in M/Ms
311 located in the granuloma of patients with Crohn's diseases (7, 32). Hence, GILZ has become a
312 potential target in immunotherapies. Many therapeutic actions of glucocorticoids, which induce
313 GILZ in immune and non-immune cells, are mediated by GILZ (27, 33, 34). In addition, the
314 administration of GILZ fusion protein can be protective by itself in an experimental model of
315 encephalomyelitis (35).

316 In this study, we evaluated the involvement of GILZ in M/Ms during endotoxemia and septic shock.
317 We observed that GILZ was inhibited early in both populations of peritoneal macrophages and
318 alveolar macrophages in an experimental model of endotoxemia. GILZ expression was also
319 decreased in monocytes purified from septic shock patients with a severe inflammation. In *in vitro*
320 assays, we showed that LPS suppresses GILZ within two hours in mouse LPM and human
321 monocytes. These results reinforce previous observations demonstrating a downregulation of GILZ
322 *in vitro* in human and murine alveolar macrophages and BMDM exposed to LPS (9, 11).

323 To evaluate whether the defective expression of GILZ in M/Ms could participate to the
324 physiopathology of endotoxemia and septic shock we used transgenic mice overexpressing GILZ in
325 M/Ms. In these mice, GILZ overexpression limits TNF expression by macrophages while enhancing
326 IL-10 expression (Figure 3E). In a severe endotoxemia model, transgenic mice show a significant
327 reduction of proinflammatory cytokine and chemokine plasma levels, including TNF, IL-6 and
328 CCL2. In our GILZ^{high} transgenic mice, GILZ is expressed^{high} in excess in macrophages whereas its
329 expression remains untouched in all other tested lineage cells. Thus, we can conclude that the

330 targeted overexpression of GILZ in macrophages is sufficient to control systemic inflammation
331 during severe bacterial infection.

332 The control of inflammation is a good omen in septic shock. However a limited inflammation,
333 especially if it is associated with a defective phagocytosis (Figure 5C), could be deleterious leading
334 to recurrent infections and death due to uncontrolled infections. We have not observed infectious
335 oversensitivity in the GILZ^{high} transgenic mice and it has never been reported elsewhere. Moreover,
336 there is no overrating mortality in GILZ^{high} transgenic mice when housed for a longue period of
337 time in a septic environment with various strains of bacteria (e.g.: *Staphylococcus aureus*), (data not
338 shown). One explanation could be founded in the compensation of the impaired GILZ^{high}-
339 macrophage phagocytic function by neutrophil activity. Indeed, during an acute infection the
340 neutrophil mobilization begins in the first hours and is the key factor to control bacterial expansion
341 by phagocytizing pathogenic bacteria (36). It is followed one to four days later by the recruitment of
342 inflammatory monocytes in the blood. We observed a normal mobilization of neutrophil 24 hours
343 after the injection of LPS in the blood of GILZ^{high} mice compared to non-transgenic mice,
344 indicating that the mobilization of neutrophils was not altered in GILZ^{high} mice.

345

346 The resistance of GILZ^{high} mice was further evaluated in CLP model, a model more
347 representative of human septic shock disease (37, 38). Depending on the scientific requirement, this
348 model allows any kind of intensity modulation : mild and non-lethal, or strong and quickly lethal
349 (38). The first model leads to a milder pro-inflammatory response immediately followed by anti-
350 inflammatory rebound, as a consequence of the endotoxin tolerance (ET) phenomenon (37, 39-41).
351 Whereas this model is the gold-standard to reflect the long-time course of the disease in human it
352 exhibits limitation in understanding whether the cause of mortality is related to an early excessive
353 inflammation or to a secondary infection during tolerance phase. Here, we choose a model
354 representative of the first phase of human severe septic shock with a strong inflammation leading to
355 quick death. Attempting to demonstrate an effect is hard in this model as the inflammatory response

356 is intense and death constant. However a benefit on mice condition could only be related to GILZ
357 modulation during the early inflammatory burst and not to the late multiple modifications in
358 immunity. In this model, GILZ^{high} mice have a prolonged survival, indicating that GILZ's level of
359 expression in M/Ms during the first phase of septic shock is a key factor on survival. This
360 experimental data makes sense with clinical data from trials showing that a survival benefit was
361 only observed during earlier treatment of severe septic shock patients with low doses of
362 corticosteroids, the most powerful inducer of GILZ expression in M/Ms (42-44). Furthermore, one
363 of these study reported that the beneficial effect of earlier corticosteroid treatment on patients'
364 survival was associated with a reduction of the proinflammatory responses of monocytes (44).

365
366 The effect of GILZ on macrophage response is associated with an inhibition of key
367 transcription factors required for proinflammatory cytokine production, such as NF-kB. It has been
368 previously reported that mouse GILZ protein binds to p65 subunit of NF-kB (7, 10, 45). This direct
369 physical interaction is associated with the downregulation of NF-kB activity in various cell types
370 including immune cells (10, 11). In this work, we undoubtedly showed using TAP/TAG that human
371 GILZ protein inhibits NF-kB activity in M/Ms without physically interacting with p65. These
372 results are consistent with a previous study reporting in human endothelial cells that GILZ inhibits
373 NF-kB without binding p65 (27). Overall, these data point out divergent molecular functions
374 between human and mouse GILZ. At this time, the inhibitory effect of GILZ on NF-kB remains
375 unexplained in human macrophages and needs more investigations.

376
377 In summary, this study confirmed that the modulation of GILZ expression restricted to
378 macrophages is sufficient to alter systemic inflammatory response *in vivo*. Furthermore, a high
379 GILZ expression level lengthens survival time in severe polymicrobial septic shock mouse model.

380
381

382 **References**

- 383
384 1. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL,
385 Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell
386 RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent
387 JL, Moreno R, Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric S.
388 Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and
389 septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013; 39: 165-228.
- 390 2. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult
391 sepsis. *Crit Care Med* 2006; 34: 15-21.
- 392 3. Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas
393 O, Artigas A, Le Gall JR, European Sepsis G. Influence of systemic inflammatory response
394 syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care*
395 *Med* 2003; 168: 77-84.
- 396 4. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 2013;
397 381: 774-775.
- 398 5. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular
399 dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 862-874.
- 400 6. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis
401 of sepsis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 19-48.
- 402 7. Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L, Maillot MC, Portier
403 A, Couderc J, Galanaud P, Peuchmaur M, Riccardi C, Emilie D. Synthesis of glucocorticoid-
404 induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and
405 immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 2003; 101: 729-
406 738.
- 407 8. Hoppstadter J, Diesel B, Eifler LK, Schmid T, Brune B, Kiemer AK. Glucocorticoid-induced
408 leucine zipper is downregulated in human alveolar macrophages upon Toll-like receptor
409 activation. *Eur J Immunol* 2012; 42: 1282-1293.
- 410 9. Pinheiro I, Dejager L, Petta I, Vandevyver S, Puimege L, Mahieu T, Ballegeer M, Van
411 Hauwermeiren F, Riccardi C, Vuylsteke M, Libert C. LPS resistance of SPRET/Ei mice is
412 mediated by Gilz, encoded by the Tsc22d3 gene on the X chromosome. *EMBO Mol Med*
413 2013; 5: 456-470.
- 414 10. Yang YH, Aeberli D, Dacumos A, Xue JR, Morand EF. Annexin-1 regulates macrophage IL-6
415 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *J Immunol* 2009; 183: 1435-1445.
- 416 11. Hoppstadter J, Kessler SM, Bruscoli S, Huwer H, Riccardi C, Kiemer AK. Glucocorticoid-
417 induced leucine zipper: a critical factor in macrophage endotoxin tolerance. *J Immunol*
418 2015; 194: 6057-6067.
- 419 12. Beaulieu E, Ngo D, Santos L, Yang YH, Smith M, Jorgensen C, Escriou V, Scherman D,
420 Courties G, Apparailly F, Morand EF. Glucocorticoid-induced leucine zipper is an
421 endogenous antiinflammatory mediator in arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2651-2661.
- 422 13. Robert OB, Hédia; Bigorgne, Amélie; Ferrere, Gladys; Voican, Cosmin Sebastian; Vettorazzi,
423 Sabine; Tuckermann, Jan Peter; Bouchet-Delbos, Laurence; Tran, Thi; Hemon, Patrice;
424 Puchois, Virginie; Dagher, Ibrahim; Douard, Richard; Gaudin, Françoise; Gary-Gouy,
425 Hélène; Capel, Francis; Durand-Gasselín, Ingrid; Prévot, Sophie; Rousset, Sophie; Naveau
426, Sylvie; Godot, Véronique; Emilie, Dominique; Lombès, Marc; Perlemuter, Gabriel;
427 Cassard, Anne-Marie. Obesity is associated with a downregulation of the glucocorticoid
428 receptor-GILZ pathway in Kupffer cells which promotes liver inflammation in mice.
429 *Journal of Hepatology* 2015.
- 430 14. Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp* 2010.
- 431 15. Zaslona Z, Przybranowski S, Wilke C, van Rooijen N, Teitz-Tennenbaum S, Osterholzer JJ,
432 Wilkinson JE, Moore BB, Peters-Golden M. Resident alveolar macrophages suppress,

- 433 whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of
434 asthma. *J Immunol* 2014; 193: 4245-4253.
- 435 16. Calmette J, Ellouze M, Tran T, Karaki S, Ronin E, Capel F, Pallardy M, Bachelerie F, Krzysiek
436 R, Emilie D, Schlecht-Louf G, Godot V. Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced
437 expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion in vivo. *J*
438 *Immunol* 2014; 193: 5863-5872.
- 439 17. Yatim A, Benne C, Sobhian B, Laurent-Chabalier S, Deas O, Judde JG, Lelievre JD, Levy Y,
440 Benkirane M. NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional
441 activity and oncogenic function. *Mol Cell* 2012; 48: 445-458.
- 442 18. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida
443 SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally
444 distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2568-2573.
- 445 19. Kabir K, Gelinias JP, Chen M, Chen D, Zhang D, Luo X, Yang JH, Carter D, Rabinovici R.
446 Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock* 2002; 17:
447 300-303.
- 448 20. King BA, Kingma PS. Surfactant protein D deficiency increases lung injury during
449 endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44: 709-715.
- 450 21. Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients
451 with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 1998; 66: 2782-
452 2790.
- 453 22. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel
454 subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993; 82:
455 3170-3176.
- 456 23. Chignard M, Balloy V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung
457 injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:
458 L1083-1090.
- 459 24. O'Connell PA, Surette AP, Liwski RS, Svenningsson P, Waisman DM. S100A10 regulates
460 plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood* 2010; 116: 1136-1146.
- 461 25. Yang N, Zhang W, Shi XM. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates
462 glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression. *J Cell*
463 *Biochem* 2008; 103: 1760-1771.
- 464 26. Di Marco B, Masetti M, Bruscoli S, Macchiarulo A, Di Virgilio R, Velardi E, Donato V,
465 Migliorati G, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB
466 interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res*
467 2007; 35: 517-528.
- 468 27. Cheng Q, Fan H, Ngo D, Beaulieu E, Leung P, Lo CY, Burgess R, van der Zwan YG, White SJ,
469 Khachigian LM, Hickey MJ, Morand EF. GILZ overexpression inhibits endothelial cell
470 adhesive function through regulation of NF-kappaB and MAPK activity. *J Immunol* 2013;
471 191: 424-433.
- 472 28. Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, D'Adamio F, Riccardi C.
473 Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via
474 inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 2001; 98: 743-753.
- 475 29. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Colby G,
476 Baltier K, Dong R, Guarani V, Vaites LP, Ordureau A, Rad R, Erickson BK, Wuhr M, Chick
477 J, Zhai B, Kolippakkam D, Mintseris J, Obar RA, Harris T, Artavanis-Tsakonas S, Sowa
478 ME, De Camilli P, Paulo JA, Harper JW, Gygi SP. The BioPlex Network: A Systematic
479 Exploration of the Human Interactome. *Cell* 2015; 162: 425-440.
- 480 30. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator
481 of glucocorticoid action. *FASEB J* 2009; 23: 3649-3658.
- 482 31. Pepin A, Biola-Vidamment A, Latre de Late P, Espinasse MA, Godot V, Pallardy M. [TSC-22D
483 proteins: new regulators of cell homeostasis?]. *Med Sci (Paris)* 2015; 31: 75-83.
- 484 32. Karaki S. Effets immunorégulateurs de la protéine GILZ sur la fonction

- 485 des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire
486 allergique : étude clinique et expérimentale. 2011.
- 487 33. Karaki S, Garcia G, Tcherakian C, Capel F, Tran T, Pallardy M, Humbert M, Emilie D, Godot V.
488 Enhanced glucocorticoid-induced leucine zipper in dendritic cells induces allergen-specific
489 regulatory CD4(+) T-cells in respiratory allergies. *Allergy* 2014; 69: 624-631.
- 490 34. Ayroldi E, Macchiarulo A, Riccardi C. Targeting glucocorticoid side effects: selective
491 glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective.
492 *FASEB J* 2014; 28: 5055-5070.
- 493 35. Srinivasan M, Janardhanam S. Novel p65 binding glucocorticoid-induced leucine zipper peptide
494 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem* 2011; 286: 44799-
495 44810.
- 496 36. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe
497 sepsis. *Shock* 2008; 30 Suppl 1: 3-9.
- 498 37. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard
499 model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011; 19: 198-208.
- 500 38. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by
501 cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 2009; 4: 31-36.
- 502 39. Ayala A, Song GY, Chung CS, Redmond KM, Chaudry IH. Immune depression in
503 polymicrobial sepsis: the role of necrotic (injured) tissue and endotoxin. *Crit Care Med*
504 2000; 28: 2949-2955.
- 505 40. Murphey ED. Cecal ligation and puncture-induced impairment of innate immune function does
506 not occur in the absence of caspase-1. *J Immunol* 2011; 187: 905-910.
- 507 41. Murphey ED. CLP-induced impairment of innate immune function is caused by exposure to the
508 cecal luminal contents and not the tissue trauma or tissue ischemia/necrosis components.
509 *Microbes Infect* 2012; 14: 35-42.
- 510 42. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y,
511 Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaud P, Bellissant E. Effect of treatment with low doses
512 of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*
513 2002; 288: 862-871.
- 514 43. Park HY, Suh GY, Song JU, Yoo H, Jo IJ, Shin TG, Lim SY, Woo S, Jeon K. Early initiation of
515 low-dose corticosteroid therapy in the management of septic shock: a retrospective
516 observational study. *Crit Care* 2012; 16: R3.
- 517 44. Katsenos CS, Antonopoulou AN, Apostolidou EN, Ioakeimidou A, Kalpakou GT, Papanikolaou
518 MN, Pistiki AC, Mpalla MC, Paraschos MD, Patrani MA, Pratikaki ME, Retsas TA, Savva
519 AA, Vassiliagkou SD, Lekkou AA, Dimopoulou I, Routsis C, Mandragos KE, Hellenic
520 Sepsis Study G. Early administration of hydrocortisone replacement after the advent of
521 septic shock: impact on survival and immune response*. *Crit Care Med* 2014; 42: 1651-
522 1657.
- 523 45. Srinivasan M, Blackburn C, Lahiri DK. Functional characterization of a competitive peptide
524 antagonist of p65 in human macrophage-like cells suggests therapeutic potential for chronic
525 inflammation. *Drug Des Devel Ther* 2014; 8: 2409-2421.

Targeted overexpression of Glucocorticoid-induced leucine zipper in macrophages is sufficient to limit the systemic inflammation during septic shock

Mehdi Ellouze ^{1,2,3}, Aurélie Guguin ⁴, Olivier Robert ^{5,6}, Mathieu Surenaud ^{1,2,3}, Thi Tran ⁶, Joseph Calmette ^{5,6}, Thomas Barbin ^{1,2,3}, Lola Vigouroux ^{1,2,3}, Gabriel Perlemuter ^{5,6,7}, Anne-Marie Cassard-Doulcier ^{5,6}, Pierre Launay ^{8,9}, Virginie Maxime ¹⁰, Djillali Annane ¹⁰, Colas Tcherakian ¹¹, Françoise Bachelier ^{5,6}, Yves Levy ^{1,2,3} and Véronique Godot ^{1,2,3}.

Online Data Supplement

Supplementary Materials

Cell cultures

526 Human monocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific,
527 Waltham, USA) complemented with 10% human AB serum (PAA, GE healthcare, Vélizy
528 Villacoublay, France), 25mM HEPES (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Mouse
529 macrophages and THP-1 cell line were cultured in RPMI 1640 medium complemented with 10%
530 fetal calf serum (GE Healthcare), HEPES 25mM (Gibco), 1% non-essential amino acids (Gibco), and
531 1% penicillin/streptomycin (Gibco). The differentiation of THP-1 cells in macrophage-like cells
532 was obtained after an incubation of 48hrs with 50nM of 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate
533 (PMA, P1585, Sigma-Aldrich). Differentiated THP-1 cells were washed in culture medium and left
534 at rest two additional days without PMA before their use in *in vitro* stimulation assays.

535 BMDM were differentiated from bone marrow stem cells in 10% L-CSF complemented culture
536 medium during 7 days. Recovered BMDM were washed twice in phosphate buffered saline (PBS)
537 1X and seeded overnight at a density of 1×10^6 cells/mL in complete medium before their use in *in*
538 *vitro* stimulation assays.

539

540 **Expression vectors and THP-1 cell line transduction**

541 THP-1 and THP-1 NF- κ B SEAP Blue reporter cell lines were obtained respectively from the
542 ECACC (European Collection of Cell Cultures, Sigma-Aldrich) and Invivogen.

543 Lentiviral vectors have been produced according to the standard protocol described by Addgene
544 (pl.KO protocol) using the packaging plasmid psPAX2 (#12260, Addgene, Cambridge, USA), the
545 envelope plasmid pMD2.G (#12259, Addgene), the viral vector pLenti CMV/TO Puro DEST or the
546 regulatory plasmid pLenti CMV TetR Blast (#17293 and #17492, Addgene) (1). The encoding
547 sequence of the human gene TSC22D3-2 flanked (GILZ-FHC) or not (GILZ) with two tags (FLAG
548 and HA) in the C-terminal end were *de novo* synthesized and cloned by Gateway cloning
549 technology in the tetracycline-regulated expression system (pLenti CMV/TO Puro DEST plasmid)
550 according to the manufacturer's instructions (Lifetechnologies). All constructs were verified by
551 sequencing.

552 A standard protocol was used to first transduce the THP-1 cell lines with lentivirus encoding the
553 tetracycline repressor protein tetR using the vector pLenti CMV tetR Blast. TetR limits the activity
554 of CMV/TO promoter controlling GILZ and GILZ-FHC expression in the inducible expression
555 vector used. The addition of doxyxyclyline in culture medium unfreezes the CMV/TO promoter and
556 induces transcription of GILZ or GILZ-FHC (1). THP-1 tetR cell lines stabilized in medium
557 containing Blastacin (15 μ g/mL) were then transduced with the doxycycline-dependent expression
558 vector encoding GILZ or GILZ-FHC and selected by puromycin (1 μ g/mL) treatment. Doxycycline
559 (0,25 μ g/mL, Sigma-Aldrich) was added to the culture medium two days prior to the start of
560 experiments.

561

562 **CLP procedure and sample harvesting**

563 Severe polymicrobial septic shock was induced on anesthetized mice by surgical procedures of CLP
564 using 20G needle as previously described (2). Immediately after surgery, 1ml of pre-warmed PBS
565 was injected i.p. to prevent excessive loss of fluid and dehydration. Mice received a subcutaneous

566 injection of buprenorphine (0.1mg/Kg, Buprecare, Axience, Pantin, France) every six hours and
567 were observed every two hours for two days or until death.

568 Blood samples were collected in tubes containing EDTA at termination by intra-cardiac puncture or
569 from retromandibular vein of anesthetized mice. Plasma was clarified by two successive
570 centrifugations at 600g and 10 000g for ten minutes and stored at -80°C until their use.

571 Anesthesia was performed by intra-muscular or i.p injection of Xylazine (10mg/Kg, Rompun 2%,
572 Bayer, Lyon, France) and Ketamine (100mg/mL, Imalgen 1000, Merial, Gerland, France).

573

574 **Flow cytometry**

575 After a blocking step using anti-CD16/CD32 antibodies, staining procedure was performed during
576 30 minutes at 4°C in PBS 2% FCS. Anti-mouse F4/80 (BM8), CD11b (M1/70), CD45 (30-F11),
577 Ly6C (HK1.4), Ly6G (RB6-8C5), NK1.1 (PK136) and anti-human CD14 (61D3), CD45 (2D1),
578 CD16 (3G8) antibodies were purchased from eBioscience (San Diego, USA). Anti-mouse CD4
579 (4SM95), CD3 (17A2), CD8 (SK1), CD11c (N418), CD19 (HIB19), CD115 (AFS98) were
580 purchased from Becton Dickinson. After acquisition on a LSRII flow cytometer or a LSRFortessa
581 analyzer (Becton Dickinson), data were analyzed using FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland,
582 Oregon, USA).

Supplementary Table

Table E1: Primers and qPCR condition

Genes	targets	Primers	Annealing T°	Elongation Time
Human primers				
Actin	NM_001101.3	GGGTCAGAAAGGATTTCCTATG GGTCTCAAACATGATCTGGG	60°C	20s
GILZ	NM_004089.3	TCTGCTTGGAGGGGATGFGG ACTTGTGGGATTGGGAGC	65°C	30s
TNF- α	NM_000594.3	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC	64°C	20s
IL1ra	NM_173842.2, NM_173843.2, NM_173841.2, NM_000577.4	ATGGAGGGAAGATGTGCCTGTC GTCCTGCTTCTGTTCTCGCTC	64°C	20s
Mouse primers				
Actin	NM_007393.4	CGGACGATTTCCCTCTCAGC GACCTTCAACACCCCAGCCA	61°C	20s
GILZ	NM_010286.4	TCTCTGCTTGGAGGGGATGFG CGTCTTCAGGAGGTTGTC	60°C	30s
TNF- α	NM_013693.3	ATAGCAAATCGGCTGACGGT ACGTCGTAGCAAACCAACAA	60°C	30s
IL10	NM_010548.2	TTTGAAATCCCTGGGTGAGAA ACAGGGGAGAAATCGATGACA	60°C	10s
IL6	NM_031168.1	CAAAGCAGAGTCTTCAAGAGA GGTCTTGGTCTTAGCCACTC	60°C	20s
IL1ra	NM_031167.5, NM_001039701.3, NM_001159562.1	TCTCCGGTGTGTGGTGAG GTCCAGGATGGTCTCTGTC	60°C	20s
Mouse genotyping primers				
Actin	C57BL/6J chromosome 5, GRCm38.p3 C57BL/6J	GGCTGGTGATAAGTGGCCTT ATGTCACGACGATTTCCCT	62°C	15s
GILZ ^{igh}	CD68-GILZ insert	GAGCCGTTCACTAGAAATA TCGGTGTTCATGGTTCGGT	62°C	15s

All primers used for SybrGreen qPCR experiments. PCR were made according manufacturer's instructions with for each one, specific annealing temperature and time require for elongation.

583 Supplementary references

- 584 1. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, Fuss JO, Campisi J, Yaswen P,
585 Cooper PK, Kaufman PD. A versatile viral system for expression and depletion of proteins
586 in mammalian cells. *PLoS One* 2009; 4: e6529.
587
- 588 2. Serafini N, Dahdah A, Barbet G, Demion M, Attout T, Gautier G, Arcos-Fajardo M, Souchet
589 H, Jouvin MH, Vrtovsni F, Kinet JP, Benhamou M, Monteiro RC, Launay P. The TRPM4
590 channel controls monocyte and macrophage, but not neutrophil, function for survival in
591 sepsis. *J Immunol* 2012; 189: 3689-3699

Partie II Décryptage moléculaire du mode d'action de GILZ

L'inflammation est contrôlée par les cellules du système immunitaire inné. Les macrophages peuvent l'induire ou la réguler en fonction de leur polarisation et de leur interprétation des signaux perçus dans l'environnement.

Comme décrit précédemment, GILZ contrôle la réponse du macrophage et sa sur-expression est suffisante pour limiter la réponse inflammatoire systémique *in vivo*. Cet effet est conservé dans les macrophages humains^{265,268}. Le mécanisme de cette régulation des macrophages n'est pas complètement élucidé. Dans les cellules THP-1 d'origine humaine, GILZ régule l'activité de NF- κ B, mais l'interaction avec la sous-unité p65 de ce facteur de transcription n'a pu être confirmée^{236,270}.

La polarisation du macrophage et, d'une manière générale, sa réponse résulte d'une modification profonde de la cellule. Une reprogrammation épigénétique favorise ou réprime la transcription de pans entiers de gènes en fonction de l'histoire vécue par la cellule¹⁰¹. Les voies de signalisation sont affectées par la présence ou l'absence de protéines régulatrices qui modifient l'interprétation du signal et régulent l'activation de facteurs de transcription clés comme NF- κ B¹⁰⁹. In fine, la transformation des profils transcriptomique et protéomique affecte les voies métaboliques, les voies de signalisation, l'empreinte épigénétique et la structure même de la cellule³⁰³. Il semble donc difficile d'anticiper quelle pourrait être l'activité moléculaire de GILZ dans ce contexte.

L'objectif de cette deuxième partie de notre étude est de dégager des pistes moléculaires pour comprendre à terme, les mécanismes majeurs responsables des effets anti-inflammatoires de GILZ. Pour ce faire, l'interactome de la protéine GILZ a été déterminé par deux approches complémentaires, le double-hybride dans des levures et par purification d'affinité en tandem couplée à la spectrométrie de masse dans des cellules THP-1 différenciées en macrophages.

1 Matériel et méthodes

1.1 Criblage sur banque de levure

La méthode du criblage sur banque de levure a été réalisée par la société Hybrigenics à Paris. Comme décrit dans la figure 16, la méthode du double-hybride consiste à fusionner la protéine GILZ (l'appât, *bait* en anglais) au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (facteur de transcription bien décrit chez la levure). La banque pangénomique criblée est d'origine placentaire. Elle est constituée de domaines protéiques fusionnés à la région activatrice du facteur de transcription de GAL4. Une interaction entre GILZ et une cible de la banque est observée par la reconstitution de GAL4 et l'activation de la transcription d'un gène de sélection HIS3 (Imidazoleglycerol-Phosphate Dehydratase). Ce gène intervient dans la biosynthèse de l'histidine, un acide aminé, nécessaire à la croissance des levures utilisées pour le criblage. Cette méthode permet de trouver les interactions protéine-protéine de faible avidité. Chaque colonie a été ensuite amplifiée et l'insert présent dans la banque a été identifié par clonage et séquençage bidirectionnel. L'alignement des séquences obtenues permet d'identifier la protéine interagissant avec GILZ. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un score identifié par une lettre A-D. Pour une protéine donnée, le score est dépendant de la redondance de l'observation et de la fréquence d'identification de la protéine dans les autres criblages. Les modalités du calcul propriétés de la société Hybrigenics n'ont pas été communiquées.

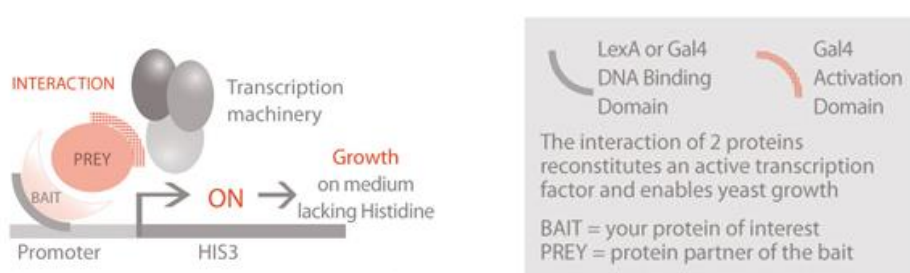


Figure 16 Mécanisme du double hybride

La protéine appât (BAIT), dans notre cas GILZ est fusionnée au motif de reconnaissance à l'ADN du facteur de transcription GAL4. Les protéines de la banque pan-génomique sont fusionnées au motif d'activation de la transcription du facteur GAL4 (PREY). S'il y a une interaction entre la protéine appât et une protéine de la banque, le facteur de transcription GAL4 est reconstitué et induit l'expression d'un gène de sélection, ici HIS3. Avec l'aimable autorisation de Hybrigenics™, <http://www.hybrigenics-services.com>.

1.2 Purification d'affinité en tandem et spectrométrie de masse

La purification d'affinité en tandem (TAP-TAG) couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée pour identifier les protéines qui interagissent avec GILZ dans le noyau et le cytoplasme de macrophages dérivés de THP-1.

1.3 Culture des lignées cellulaires

Les lignées THP-1 ont été cultivées dans un milieu RPMI contenant 10% de sérum veau foetal, de la pénicilline/streptomycine à 1%, des acides aminés non essentiels à 1% et de la L-Glutamine.

1.4 Génération des vecteurs et lignées cellulaires

La purification par affinité requiert la fusion de la protéine GILZ avec un tag FLAG et un tag HA (GILZ-FHC). Cette construction a été faite par synthèse directe et clonée dans le vecteur pLenti CMV/TO Puro DEST par la méthode Gateway, selon les recommandations du fabricant (Lifetechnologies). Le vecteur codant uniquement les tags FLAG et HA n'induit pas leur expression. Par conséquent, le même vecteur codant la protéine fluorescente jaune venus (vYFP) sans les Tags a été utilisé comme contrôle.

Le vecteur permet une expression contrôlée du transgène et à un niveau physiologique. En effet, dans ce vecteur le promoteur CMV/TO est inhibé par la protéine TetR en l'absence de tétracycline³⁰⁴. L'adjonction de tétracycline lève cette inhibition et permet d'ajuster le niveau d'expression du transgène selon la concentration de tétracycline présente dans le milieu. La protéine tetR est spontanément exprimée dans les cellules transduites par le vecteur pLenti CMV TetR Blast. Ces deux vecteurs lentiviraux ont été produits dans la souche bactérienne Stbl3 pour limiter la possibilité de recombinaison (Lifetechnologies, Waltham, USA). Ils ont été aimablement fournis par le Docteur Campeau Eric³⁰⁴ (#17293 et #17492, Addgene).

Les particules pseudo-virales ont été produites par des cellules de la lignée HEK 293 T selon un protocole préalablement décrit³⁰⁵. Les plasmides pMD2.G codant pour l'enveloppe du virus de la Stomatite Vésiculeuse VSV-G et le plasmide pPAX2 codant pour les protéines de capsid du virus ont été aimablement fournis par le Professeur Didier Trono (#12259 et #12259, Addgene).

Les vecteurs pLenti CMV/TO Dest Puro et pLenti CMV TetR Blast expriment respectivement des gènes de résistance à la puromycine et la blasticidine permettant la stabilisation des lignées cellulaires transduites. La transduction des THP-1 a suivi un protocole de spinoculation standard en présence de polybrène (5 µg/mL, SantaCruz Biotechnologies). La lignée THP-1 tetR a été générée par la transduction du vecteur codant pour la protéine TetR. Une sélection a été effectuée durant huit jours en présence de blasticidine (10µg/mL, #15205, Sigma-Aldrich). Cette lignée a été ensuite transduite pour exprimer la protéine GILZ-FHC ou la protéine de contrôle vYFP. Les lignées THP-1 TetR GILZ-FHC et THP-1 TetR vYFP ont été sélectionnées en présence de puromycine (1µg/mL, A11138-03, Lifetechnologies).

1.5 Culture et extraction des protéines

Les cellules THP-1 tetR GILZ-FHC et vYFP ont été cultivées à grande échelle soit environ 9 litres par lignée pour obtenir une quantité d'extrait protéique suffisante pour l'analyse en spectrométrie de masse. Elles ont été différenciées en macrophages en présence de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, #P1595, Sigma-Aldrich) à 50µg/mL pendant 24 heures et laissées au repos une journée.

Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 4 à 6 heures en présence de dexaméthasone (10⁻⁷ M, sigma) et de LPS (100ng/mL, Alexis, Enzo Lifesciences). Le LPS a été utilisé pour activer le macrophage par l'intermédiaire du TLR4. La dex est un anti-inflammatoire puissant, un inducteur de GILZ et potentiellement de ces partenaires.

Les extraits cytosoliques et nucléaires ont été récupérés suivant un protocole préalablement décrit en suivant quelques adaptations décrites ci-après³⁰⁵. L'expérimentation a été menée en continu sans étape de surgélation des lysats. Les extraits ont été dialysés dans des colonnes de porosité de 6 000 MWCO (Pur-A-Lyzer, Sigma-Aldrich). Les grosses particules et les agrégats membranaires ont été supprimés par filtration au travers d'une colonne de cellulose ayant des pores de 30µm de diamètre. Les extraits nucléaires et cytosoliques dialysés ont ensuite été centrifugés à 17 000G pendant 30 minutes à 4°C. Les protéines ont été dosées par fluorescence en utilisant le kit Qubit Protein assay et selon le protocole du fabricant (Lifetechnologies).

1.6 Purification d'affinité en tandem et identification par spectrométrie de masse

L'immunoprécipitation en tandem a été effectuée sur les extraits nucléaires et cytosoliques en chambre froide selon une procédure préalablement décrite³⁰⁵. Cent milligrammes de protéines nucléaires et 200mg de protéines cytosoliques ont été utilisés pour l'immunoprécipitation dans des volumes de 20 et 45 mL respectivement.

La qualité de l'immunoprécipitation a été contrôlée sur 2% d'extraits cytoplasmiques et nucléaires. Ceux-ci ont été déposés dans un gel de polyacrylamide de 4-12% (NuPage, 4-12% Bis-tris, Lifetechnologies) et séparés par électrophorèse en condition dénaturante selon les recommandations du fabricant. Le gel a été coloré aux sels d'argent pour révéler la présence de protéines selon les recommandations du fabricant (SilverQuest Silver Staining kit, LC6070, Lifetechnologies).

Pour l'identification en spectrométrie de masse, 40% des extraits nucléaires et cytosoliques ont été déposés dans un gel de polyacrylamide 10% (NuPage 10% Bis-Tris, Lifetechnologies) et séparés par électrophorèse 10 minutes en condition dénaturante. Pour supprimer le sodium dodecyl sulfate et les agents anti-oxydants, le gel a été lavé trois fois 5 minutes dans de l'eau ultrapure (Rnase and Dnase Free distilled water, #10977023, Lifetechnologies). Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie pendant une heure et lavé deux fois 30 minutes dans de l'eau ultrapure (SimpleBlue Staining, Lifetechnologies).

Chacune des colonnes de migration a été découpée en quatre fragments de gel qui ont été envoyés à la plateforme de spectrométrie de masse Taplin Mass Spectrometry Facility de la Harvard Medical School. Sur place, les protéines du gel ont été digérées par la trypsine, selon une méthode standard. Après dessalage, les peptides générés ont été séparés par une nano-chromatographie en phase liquide et injectés par electrospray dans un spectromètre de masse à trappe orbitale (QExactive, Thermofisher).

Les protéines ont été identifiées par une approche bottom-up c'est à dire en partant de l'identification des peptides pour reconstituer les protéines entières présentes dans l'échantillon.

L'abondance en spectrométrie de masse n'est pas une mesure quantitative sur des échantillons indépendants. Il n'est donc pas possible d'effectuer une quantification absolue

des protéines avec cette procédure expérimentale. En revanche, pour une protéine donnée, le nombre de peptides identifiés peut être comparé entre deux conditions expérimentales d'une même expérience. Pour limiter le nombre de faux négatifs, la fréquence des peptides identifiés après l'immunoprécipitation de GILZ-FHC et vYFP ont été comparés. Les protéines identifiées par un nombre de peptides dont la représentation est 5 fois supérieure dans la condition GILZ-FHC par rapport à la condition vYFP ont été considérés comme des interactants potentiels de GILZ. Ces interactants potentiels présents dans l'échantillon contrôle et GILZ-FHC représentent seulement 6 protéines. Cette condition est peu stringente mais à ce stade de l'étude il ne s'agit pas d'étudier isolément une ou deux protéines, mais plutôt un ensemble de protéines pour dégager les voies de signalisation potentiellement impactées par GILZ. Toutes les protéines représentées par moins de deux ou trois peptides selon que les protéines aient été identifiées dans le noyau ou le cytosol ont été respectivement exclues de l'étude. Ce point de choix est argumenté en discussion.

1.7 Analyse globale de l'interactome de GILZ

L'analyse a été effectuée à partir des gènes codant pour les protéines interagissantes et non directement sur les protéines identifiées. En effet, chaque gène code pour une ou plusieurs isoformes, chacune des isoformes n'est pas nécessairement connue et décrite. D'autre part, les analyses pan-génomiques sont le plus souvent effectuées au niveau génique et non au niveau des isoformes.

La confiance accordée à une interaction avec GILZ est estimée par un score. Une interaction identifiée en double-hybride est affectée d'une valeur arbitraire de 3, en TAP-TAG d'une valeur de 2, qu'elle soit retrouvée dans le noyau ou dans le cytoplasme. Le score total résulte du produit de tous les scores individuels. Ainsi, le score maximal est de 12, lorsque l'interaction est observée dans le noyau, le cytoplasme en TAP-TAG et en double hybride. Le score minimal est de 2.

Les protéines différentiellement retrouvées entre la condition contrôle et GILZ-FHC ont été regroupées selon leur fonction décrite (Go_Terms) par le Gene Ontology Consortium (GOC), en exploitant les bases de données *Molecular Functions*, *Biological Process* et *Cell Component* à l'aide de l'application en ligne DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Selon la description du GOC, la base de données *Molecular Functions*

est définie dans les termes suivants : « The functions of a gene product are the jobs that it does or the "abilities" that it has ». Selon la définition du GOC ceci inclut le transport, la fixation, la rétention et la modification d'éléments. Les taux d'enrichissement en Go_Terms fournis dans ce document ont été calculés en rapport avec la distribution de toutes les protéines du génome humain par l'application DAVID. Le test statistique de Benjamini a été utilisé pour corriger la multiplicité des tests.

Les groupes de gènes associés à la biologie fonctionnelle de la cellule comme la synthèse, la dégradation des protéines ont été exclus de l'étude pour trois raisons. Premièrement, ils ont un effet commun à toutes les protéines. Deuxièmement, GILZ a une demi-vie courte, elle est synthétisée et dégradée continuellement²⁶⁸. Il est donc cohérent de retrouver associée à GILZ, la machinerie de synthèse et de dégradation des protéines. Troisièmement, ce sont des contaminants usuels observés en TAP-TAG³⁰⁶. Il ne s'agit pas nécessairement de faux positifs, seulement de gènes impliqués dans des processus généraux. Ces protéines ont donc été exclues dans une première analyse centrée sur l'inflammation.

1.8 Recherche des interactants régulant la réponse inflammatoire des macrophages

Cette partie de l'étude est centrée sur la recherche des partenaires de GILZ susceptibles d'être impliqués dans l'inhibition de NF-kB, dans la production de cytokines ou dans la polarisation des macrophages.

Nous avons opté pour une première approche théorique en nous basant sur une analyse de données préalablement publiées. Les études systématiques dont l'objectif était de tester la fonction de chaque gène sur l'inhibition de NF-kB et la production de cytokines pro-inflammatoires ont été utilisées.

Quatre études portant sur 20 000 gènes environ répondent à ces critères. Elles décrivent l'effet de chaque gène testé sur l'activité de NF-kB, sur la production d'IL8 et la production du TNF en réponse à une stimulation par un PAMPs ou par une protéine virale^{307,308,309,310}. Les deux valeurs retenues sont : significatif (1) et non significatif (0). A partir des valeurs attribuées à chaque gène dans chaque étude, un score moyen a été calculé pour les

intéreactants de GILZ. Ce score correspond à la moyenne arithmétique des scores obtenus pour un gène dans les 4 études retenues.

Le calcul des scores, le regroupement des intéreactants ont été déterminés par programmation bio-informatique Shell (Linux) et VisualBasic (Microsoft). Les modélisations ont été effectuées sur logiciel Cytoscape^{311,312}.

2 Résultats

A ce jour, le mécanisme moléculaire par lequel GILZ régule la polarisation des macrophages humains n'est pas connu. Les fonctions d'une protéine sont gouvernées par son interaction avec une autre protéine ou avec un autre constituant cellulaire, c'est à dire généralement par l'intégration dans un complexe multiprotéique ou par une activité enzymatique. Aucune homologie ou information structurale ne laisse supposer une quelconque activité enzymatique de GILZ (données non montrées). La compréhension de ses fonctions régulatrices nécessite de caractériser les autres protéines auxquelles elle est associée.

Ses partenaires protéiques ont été déterminés par deux approches complémentaires : par un criblage en double-hybride et par TAP-TAG.

2.1 Description et validation des données de l'interactome de GILZ

Le criblage en double hybride sur banque de levure est sensible et n'est efficient que pour identifier des interactions directes. Les interactions dépendantes de modifications post-traductionnelles ne sont généralement pas visibles par cette technique.

L'approche par TAP-TAG consiste en deux immunoprécipitations successives et une analyse des protéines co-précipitées par spectrométrie de masse. Elle est intégralement menée dans des cellules humaines différenciées en macrophages (THP-1). Les cellules ont été stimulées par la dexaméthasone pour permettre l'expression des éventuels partenaires co-induits avec GILZ. Une stimulation par du LPS a permis l'activation cellulaire par le TLR4. Pour limiter le bruit de fond technique, l'expression de la protéine appât doit idéalement être proche d'une expression physiologique. Par Western Blot, on observe une légère surexpression de la protéine appât par rapport à l'expression physiologique de GILZ permettant l'utilisation de ce modèle (**Figure 17**).

A La différence du double hybride, cette méthode permet d'identifier des complexes protéiques entiers et des interactions directes et indirectes. Au total, 23 protéines ont été identifiées en double-hybride. En TAP-TAG, 230 protéines ont été identifiées dans le cytoplasme et 145 dans le noyau.

La confiance accordée à une interaction entre GILZ et un partenaire est estimée par un score moyen. Les protéines identifiées à la fois par double-hybride et TAP-TAG ont les scores les plus élevés (≥ 6) ; elles sont considérées directes et robustes (**Tableau 4**).

Ces deux techniques ont démontré une interaction avec les trois protéines codées par les gènes TSC22D1, TSC22D2 et TSC22D4 appartenant à la famille TSC22D. Elles sont considérées comme les interagantes directes et validées de GILZ, car elles ont toutes été retrouvées dans les extraits nucléaires et cytosoliques par TAP-TAG, ainsi qu'en double-hybride (**Tableau 4**) et en Western Blot (**Figure 18**). De plus, elles ont déjà été décrites dans la littérature (**Tableau 4**). Elles valident à la fois le modèle expérimental du TAP-TAG et celui du double-hybride.

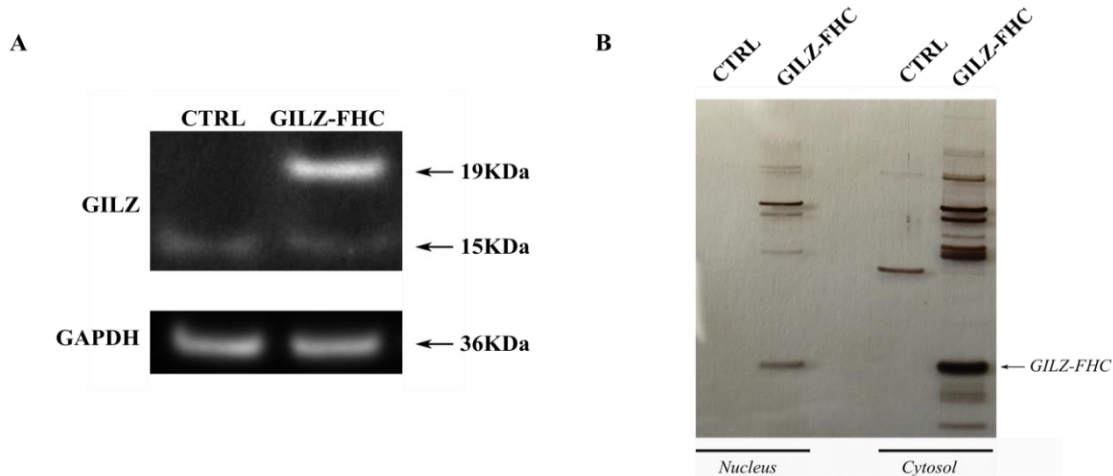


Figure 17 Purification d'affinité en tandem et validation technique

Cellules THP-1 provenant de la lignée contrôle (Ctrl) ou GILZ taggée en région C-terminale par les tags Flag et Ha (GILZ-FHC). Les cellules ont été différenciées et stimulées par du LPS 100ng/mL et par de la Dex 10^{-7} M. A) Expression de la protéine GILZ endogène et GILZ-FHC mesurée par Western Blot. La GAPDH est utilisée comme témoin de charge. B) Electrophorèse et coloration à l'argent des complexes protéiques isolés par purification d'affinité en tandem sur les tags Flag et Ha à partir de l'extrait nucléaire et cytosolique.

La protéine GILZ est connue pour s'homodimériser²⁴⁷. L'interaction n'a pas été retrouvée en double-hybride et n'est pas interprétable en TAP-TAG/MS car en spectrométrie de masse, on identifie sans distinction la protéine GILZ-FHC qui a servi d'appât et la protéine GILZ native. En revanche, la région N-terminale de l'isoforme 1 de GILZ a été retrouvée dans l'interactome par TAP-TAG. Ceci suggère que l'isoforme canonique de GILZ peut s'hétérodimétiser avec l'isoforme longue de GILZ.

Tableau 4 : Intéreactants directs de GILZ

Gène	ID	Score	Cytosol	Noyau	Y2H	GO_MF	Pubmed ID
TSC22D1	8848	12	OUI	OUI	OUI	DNA binding, transcription factor activity, transcription regulator activity,	26186194
TSC22D4	81628	12	OUI	OUI	OUI	DNA binding, transcription factor activity, transcription repressor activity, transcription regulator activity	26186194
TSC22D2	9819	12	OUI	OUI	OUI	DNA binding, transcription factor activity, transcription regulator activity,	26186194
KDM1A (LSD1)	23028	6		OUI	OUI	nucleotide binding, nucleoside binding, purine nucleoside binding, DNA binding, transcription factor activity, transcription factor binding, electron carrier activity, promoter binding, transcription repressor activity, purine nucleotide binding, transcription regulator activity, adenyly nucleotide binding, demethylase activity, histone demethylase activity, sequence-specific DNA binding, cofactor binding, FAD binding, coenzyme binding,	
TCF12	6938	6		OUI	OUI	DNA binding, transcription factor activity, RNA polymerase II transcription factor activity, promoter binding, transcription activator activity, transcription regulator activity, sequence-specific DNA binding	
PFKL	5211	6	OUI		OUI	nucleotide binding, magnesium ion binding, nucleoside binding, purine nucleoside binding, 6-phosphofructokinase activity, ATP binding, sugar binding, phosphofructokinase activity, purine nucleotide binding, carbohydrate kinase activity, enzyme binding, kinase binding, carbohydrate binding, adenyly nucleotide binding, ribonucleotide binding, purine ribonucleotide binding, adenyly ribonucleotide binding, identical protein binding, ion binding, cation binding, metal ion binding, monosaccharide binding, fructose binding, fructose-6-phosphate binding	
ELAVL1	1994	4	OUI	OUI		nucleotide binding, RNA binding, mRNA binding, identical protein binding	19322201
HDAC1	3065	4	OUI	OUI		DNA binding, transcription factor activity, histone deacetylase activity, transcription factor binding, transcription activator activity, hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amides, deacetylase activity, enzyme binding, transcription regulator activity, protein deacetylase activity, identical protein binding, histone deacetylase binding, NF-kappaB binding,	20124407
mTOR	2475	4	OUI	OUI		nucleotide binding, nucleoside binding, purine nucleoside binding, protein kinase activity, protein serine/threonine kinase activity, ATP binding, drug binding, purine nucleotide binding, adenyly nucleotide binding, ribonucleotide binding, purine ribonucleotide binding, adenyly ribonucleotide binding, phosphoprotein binding,	21804606
RAF1	5894	2	OUI			nucleotide binding, nucleoside binding, purine nucleoside binding, protein kinase activity, protein serine/threonine kinase activity, ATP binding, zinc ion binding, lipid binding, purine nucleotide binding, diacylglycerol binding, adenyly nucleotide binding, ribonucleotide binding, purine ribonucleotide binding, adenyly ribonucleotide binding, ion binding, cation binding, metal ion binding, transition metal ion binding,	12391160, 19380724
ALDH3B1	221	2	OUI			3-chloroalyl aldehyde dehydrogenase activity, aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] activity, oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	26186194

Les intéreactants retrouvés à la fois en double-hybride (Y2H) et en TAP-TAG (cytosol ou noyau) sont considérés directs et robustes (score ≥6). Sont décrites dans le tableau, les trois autres protéines de la famille TSC22D, trois protéines régulatrices de la transcription KDM1A, TCF12 et HDAC1, ainsi que la phosphofructokinase hépatique (PFKL), mTOR et ELAVL1. Les fonctions moléculaires référencées par le Gene Ontology Consortium sont décrites dans la colonne GO_MF. La référence Pubmed de chacune des interactions connues figure à la colonne Pubmed ID. A titre d'exemple, les interactions entre GILZ et les deux protéines ALDH3B1 et RAF1 ont déjà été décrites et sont présentées dans le tableau bien qu'elles aient un score de confiance d'interaction de 2. Analyse effectuée à l'aide de l'outil en ligne DAVID.

Trois protéines au score de confiance élevé sont associées à la régulation de la transcription. Il s'agit de HDAC1, KDM1A (LSD1) et du facteur de transcription TCF-12. La Phosphofructokinase hépatique ou PFKL a un score de confiance élevé (score = 6), elle est une enzyme clé du métabolisme des carbohydrates. Avec son hétérologue la Phosphofructokinase, elle contrôle l'entrée du glucose dans la glycolyse anaérobie.

Les protéines Raf-1 et mTOR ont été identifiées par TAP-TAG dans le cytoplasme. Ces deux protéines sont des interactants déjà décrits de GILZ ce qui confortent la validité du modèle et de l'analyse.

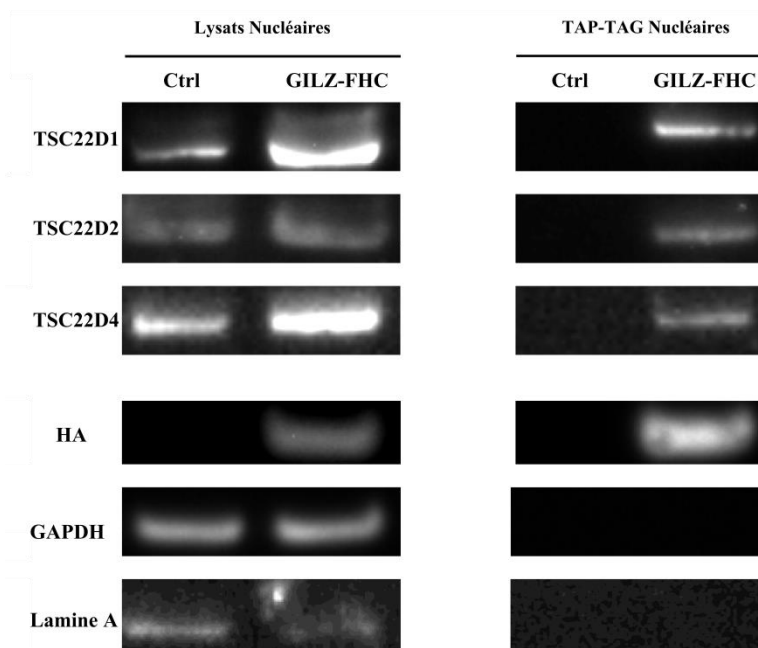


Figure 18 Validation du TAP-TAG

Expression protéique mesurée en Western Blot de GILZ-FHC (HA), de TSC22D1, TSC22D2 et TSC22D4 dans les lysats nucléaires avant et après purification d'affinité en Tandem dans les THP-1 contrôle ou exprimant la GILZ-FHC. Les cellules ont été différenciées et stimulées par la dexaméthasone ($10^{-7}M$) et du LPS (100ng/mL). La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la Lamine A ont été utilisées comme contrôle de spécificité et de charge de l'immunoprécipitation.

2.2 Validation de l'extraction nucléaire et cytoplasmique utilisée pour l'analyse en TAP- TAP/ MS

En première approche, la ségrégation expérimentale entre le noyau et le cytoplasme a été vérifiée par Western Blot à partir des extraits nucléaires et cytosoliques (**Figure 19**). La lamine A et la GAPDH ont été respectivement utilisées comme marqueurs d'origine nucléaire et cytoplasmique. La Lamine A a été exclusivement identifiée dans l'extrait nucléaire, elle est absente de l'extrait cytoplasmique. A l'inverse, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été identifiée à la fois dans l'extrait cytoplasmique et nucléaire (**Figure 19**). Après une stimulation par la Dex ou par stress oxydatif, la GAPDH peut transloquer dans le noyau y compris dans les cellules immunitaires activées³¹³⁻³¹⁵.

La localisation de chacune des protéines interagissantes identifiées par TAP-TAG/MS dans le noyau ou le cytoplasme ont été qualifiées à l'aide de la base de données de compartiment cellulaire (*Cellular Compartment, GOC, CC_5*). Les extraits nucléaires et cytosoliques montrent un enrichissement respectif élevé en protéines nucléaires (p value corrigée $< 10^{-21}$) et cytoplasmiques (p value corrigée $< 10^{-16}$), confirmant la bonne séparation entre les deux extraits protéiques (**Tableau 5**).

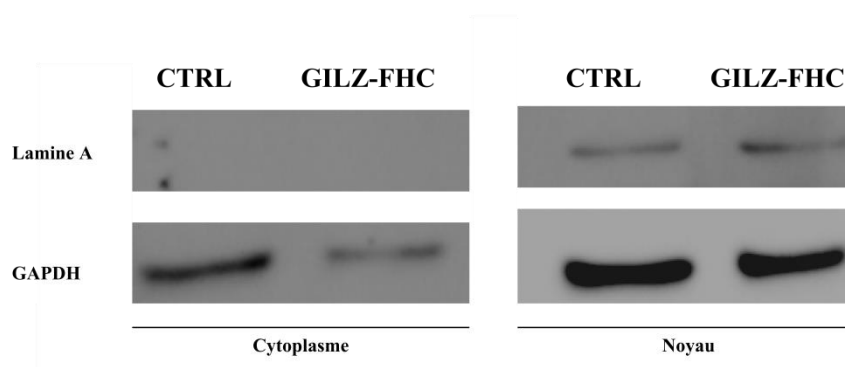


Figure 19 Ségrégation nucléaire et cytosolique des extraits protéiques

Expression de la Lamine A et de la GAPDH dans les lignées THP-1 GILZ-FHC et Contrôles (Ctrl) mesurées en Western Blot dans les extraits nucléaires et cytosoliques avant purification d'affinité en tandem.

Tableau 5 ségrégation cytosolique et nucléaire des extraits protéiques

Cytoplasme	nombre	%	pvalue	benjamini
cytoplasm	154	70,6	1,20E-018	2,50E-016
cytosol	59	27,1	2,80E-017	3,00E-015
cytoplasmic part	109	50	2,70E-011	1,90E-009
chaperonin-containing T-complex	7	3,2	3,10E-011	1,70E-009
intracellular organelle lumen	54	24,8	3,40E-009	1,50E-007
cytosolic part	14	6,4	9,30E-008	3,30E-006
pigment granule	11	5	2,30E-007	7,10E-006
intracellular organelle part	89	40,8	2,50E-007	6,60E-006
nucleoplasm	32	14,7	3,80E-007	9,10E-006
nuclear lumen	42	19,3	1,30E-006	2,80E-005
intracellular organelle	146	67	8,20E-006	1,60E-004
nuclear part	44	20,2	6,60E-005	1,20E-003
microtubule cytoskeleton	20	9,2	1,00E-004	1,70E-003
intracellular non-membrane-bounded organelle	55	25,2	1,90E-004	2,90E-003
cytoplasmic membrane-bounded vesicle	19	8,7	3,10E-004	4,40E-003
intracellular membrane-bounded organelle	127	58,3	6,60E-004	8,80E-003
cytoplasmic vesicle	20	9,2	7,30E-004	9,10E-003
microtubule	11	5	3,20E-003	3,70E-002
cytoskeleton	31	14,2	3,60E-003	4,00E-002
endoplasmic reticulum lumen	6	2,8	3,90E-003	4,10E-002
DNA-directed RNA polymerase II, holoenzyme	6	2,8	4,10E-003	4,10E-002

Noyau	nombre	%	pvalue	benjamini
nuclear part	65	44,2	2,6E-23	4,7E-21
nuclear lumen	57	38,8	6,6E-22	5,8E-20
intracellular organelle lumen	59	40,1	3,5E-19	2,0E-17
nucleus	98	66,7	2,6E-18	1,1E-16
nucleoplasm	41	27,9	1,2E-17	4,4E-16
intracellular organelle part	82	55,8	9,7E-14	2,9E-12
intracellular organelle	123	83,7	9,9E-14	2,5E-12
intracellular non-membrane-bounded organelle	60	40,8	3,4E-12	7,6E-11
intracellular membrane-bounded organelle	108	73,5	4,5E-9	8,8E-8
nucleoplasm part	21	14,3	2,2E-7	3,9E-6
chromosome	19	12,9	2,8E-7	4,5E-6
ribonucleoprotein complex	20	13,6	3,2E-7	4,7E-6
nucleolus	23	15,6	5,1E-7	6,9E-6
nuclear matrix	8	5,4	8,5E-7	1,1E-5
cytosol	32	21,8	1,4E-6	1,7E-5

Le compartiment cellulaire associé aux protéines retrouvées dans l'interactome de GILZ est présenté dans les deux tableaux. Le tableau du haut présente les résultats obtenus à partir de l'extrait cytosolique et celui du bas à partir des extraits nucléaires. Taux d'enrichissement en GO_Terms selon la description du Gene Ontology Consortium sur la base de données Cellular compartment_5. Analyse effectuée à l'aide de l'outil en ligne DAVID, <https://david.ncifcrf.gov>. Le test de Benjamini a été utilisé pour corriger statistiquement la multiplicité des tests.

2.3 Regroupement fonctionnel des interactants de GILZ identifiés dans l'étude

Les fonctions des partenaires de GILZ ont été recherchées dans la base de données (Biological process, GOC, BP_5).

Dans le cytoplasme, les fonctions des partenaires de GILZ sont dispersées et aucune tendance claire n'a pu être dégagée pour les interactants de GILZ (**Tableau 6**). Néanmoins, 27 interactants de GILZ sont relatifs à la signalisation cellulaire (Enrichissement non significatif). Certains peuvent être impliqués dans la réponse des macrophages comme il sera discuté ultérieurement. Dans ce compartiment, GILZ semble interagir avec différents groupes de protéines aux fonctions variées, comme le métabolisme des protéines ou des ARNm, le cycle cellulaire, la signalisation, le stress oxydatif, le métabolisme des carbohydrates et des lipides. Cette variété est à l'image de l'expression ubiquitaire de GILZ et de ses multiples fonctions décrites ou étudiées. Dans le cytoplasme, les fonctions des partenaires de GILZ doivent donc être étudiées de manière individualisée.

A l'inverse, dans le noyau, les fonctions des interactants de GILZ sont associées aux modifications de la chromatine (p value corrigée $< 10^{-6}$), à la transcription (p value corrigée $< 10^{-6}$) et à l'épissage des ARNm (p value corrigée $< 10^{-4}$). Dans ce compartiment cellulaire, les fonctions de GILZ et de ses partenaires doivent être considérées de manière individualisée et par complexe macromoléculaire.

2.4 Réseau d'interactions des partenaires nucléaires de GILZ

D'une manière générale, les protéines peuvent exercer leur fonction de manière isolée ou sous la forme d'un complexe macromoléculaire. Les complexes multiprotéiques sont définis comme un réseau d'interactions entre plusieurs protéines. L'approche bottom-up, utilisée pour l'identification en MS des protéines ne permet pas de différencier les complexes macromoléculaires.

A défaut de disposer de ces données expérimentales, il est possible de prédire les complexes macromoléculaires à partir de bases de données publiques d'interactions protéine-protéine et grâce à une analyse bio-informatique. Cette analyse a permis de tisser un maillage d'environ 250 interactions entre tous les partenaires nucléaires de GILZ (**Figure 20**). La robustesse de chacune de ces interactions est estimée dans ce cas par le nombre de publications associées. Dans le noyau, les partenaires de GILZ n'ont pas seulement une proximité de fonction, ils présentent un réel réseau d'interactions physiques.

Tableau 6 Fonction moléculaires des interactants nucléaires et cytosoliques de GILZ

Intéactants cytosoliques	Nb	%	pvalue	benjamini
regulation of protein modification process	11	6,1	2,00E-003	3,10E-001
phosphate metabolic process	25	14	2,60E-004	3,10E-001
phosphorus metabolic process	25	14	2,60E-004	3,10E-001
cellular amino acid biosynthetic process	5	2,8	2,70E-003	3,20E-001
carboxylic acid biosynthetic process	8	4,5	2,00E-003	3,30E-001
organic acid biosynthetic process	8	4,5	2,00E-003	3,30E-001
oxidation reduction	17	9,5	2,50E-003	3,30E-001
DNA repair	11	6,1	1,50E-003	3,60E-001
response to unfolded protein	6	3,4	1,30E-003	3,70E-001
nucleotide-excision repair	5	2,8	3,50E-003	3,70E-001
intracellular signaling cascade	27	15,1	2,00E-003	3,70E-001
phosphorylation	19	10,6	4,30E-003	4,10E-001
cellular response to stress	17	9,5	7,30E-004	4,10E-001
(Liste non exhaustive)				

Intéactants nucléaires	Nb	%	pvalue	benjamini
chromosome organization	23	17,8	1,00E-010	7,20E-008
regulation of transcription	52	40,3	6,00E-010	2,10E-007
chromatin modification	17	13,2	1,30E-009	3,10E-007
transcription	45	34,9	2,40E-009	4,30E-007
chromatin organization	18	14	1,90E-008	2,80E-006
RNA processing	21	16,3	3,10E-008	3,70E-006
RNA splicing	15	11,6	1,30E-007	9,90E-006
negative regulation of transcription	17	13,2	1,60E-006	9,60E-005
nuclear mRNA splicing, via spliceosome	10	7,8	6,10E-006	3,10E-004
negative regulation of nitrogen compound metabolic process	17	13,2	7,80E-006	3,10E-004

Classification des scores d'enrichissement en GO_Terms décrivant les fonctions des partenaires de GILZ identifiés dans le cytoplasme (haut, seules les catégories ayant les plus faibles p values ont été représentées) ou le noyau (bas). Analyse effectuée à l'aide de l'outil en ligne DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) sur base des GO_Terms décrits dans la base de données Biological Process 5 par le Gene Ontology Consortium.

Ce réseau peut-être subdivisé en sous-complexes protéiques à l'aide l'algorithme MCL³¹⁶ (*Markov Cluster Algorithm*). Par une méthode itérative, il définit la cohérence d'un ensemble de liaisons et associe les protéines par proximité et redondance des interactions. De cette manière, trois sous-complexes théoriques ont été identifiés (**Figure 21**). Les groupes comprenant moins de 8 protéines ont été exclus car l'enrichissement en terme fonctionnel (GO_TERM) d'un petit nombre de protéines est difficilement exploitable.

Le premier sous-complexe est significativement enrichi en protéines associées à l'organisation de la chromatine (p value corrigée $<10^{-10}$) et à la régulation de la transcription (p value corrigée $<10^{-10}$). Il comprend des interactants ayant un score de confiance élevé de GILZ comme HDAC1, KDM1A(LSD1) et le facteur de transcription TCF12. LSD1 est une enzyme clé de la régulation transcriptionnelle³¹⁷. Elle interagit directement avec GILZ. KDM1A déméthyle les lysines 4 et 9 de l'histone 3. L'histone déacétylase HDAC1 supprime sélectivement l'acétylation de la lysine 4 de l'histone 3³¹⁷. Ces deux modifications épigénétiques sont souvent associées à une activation de la transcription¹⁰¹.

Le second sous-complexe est associé à la biosynthèse des ARNm (p value corrigée $< 10^{-10}$). Ce groupe comporte le spliceosome (KEGG, p value corrigée $< 10^{-8}$), un complexe macromoléculaire responsable de l'épissage alternatif. Aucun interactant direct de GILZ n'est retrouvé dans ce groupe. Or, ce second groupe est en étroite relation avec le premier (Figure 21). Ce constat suggère que GILZ interagit directement avec le premier groupe et indirectement avec le second.

Le troisième groupe comporte les protéines de la famille TSC22D, interactantes directes de GILZ.

En ce qui concerne les fonctions nucléaires de GILZ, cette approche prédictive laisse supposer que GILZ est un facteur régulant la transcription, en s'intégrant aux complexes qui régulent l'accessibilité de la chromatine.

Ce travail est centré sur la définition des voies impliquées dans la réponse du macrophage aux endotoxines et plus généralement dans l'inflammation. Nous avons donc choisi d'extraire de l'interactome de GILZ, les partenaires ou les complexes protéiques potentiellement impliqués dans la réponse inflammatoire.

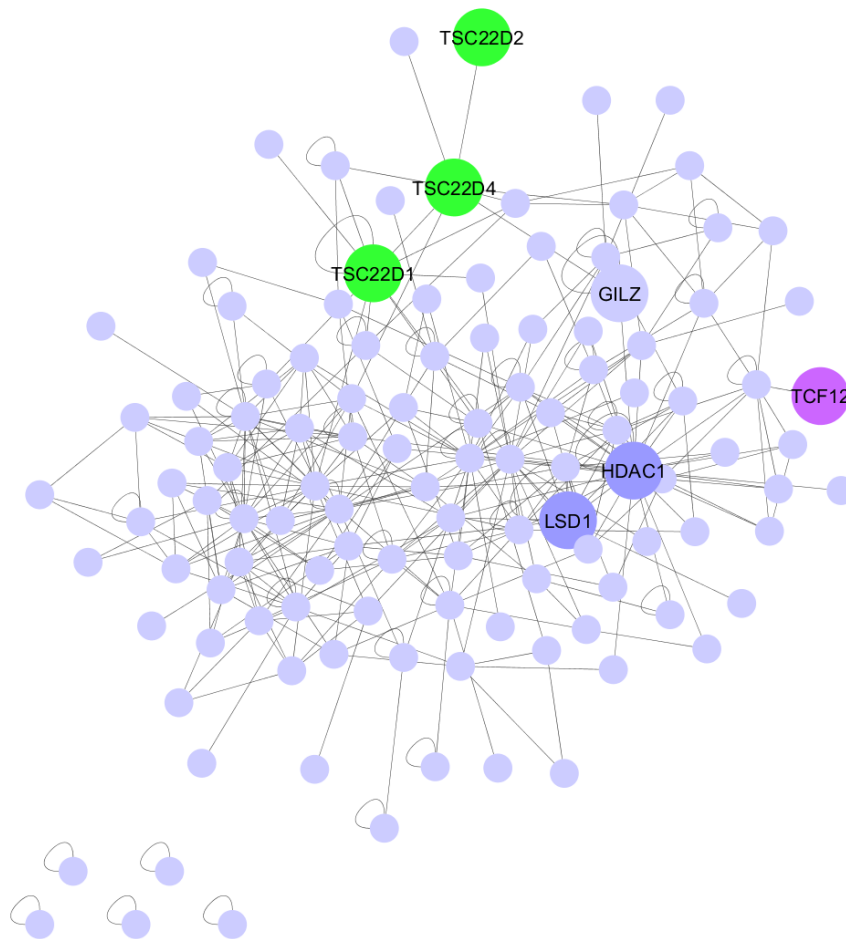


Figure 20 Réseau d'interactions entre les partenaires nucléaires de GILZ

Les interactions connues entre les partenaires nucléaires de GILZ ont été recherchées dans la littérature. Les interactions sont représentées par les traits noirs et les interactants de GILZ par les pastilles colorées. Les trois protéines de la famille TSC22D sont représentées en vert, LSD1 et HDAC en bleu et le facteur de transcription TCF12 en mauve. Schéma réalisé à l'aide du logiciel cytoscape.

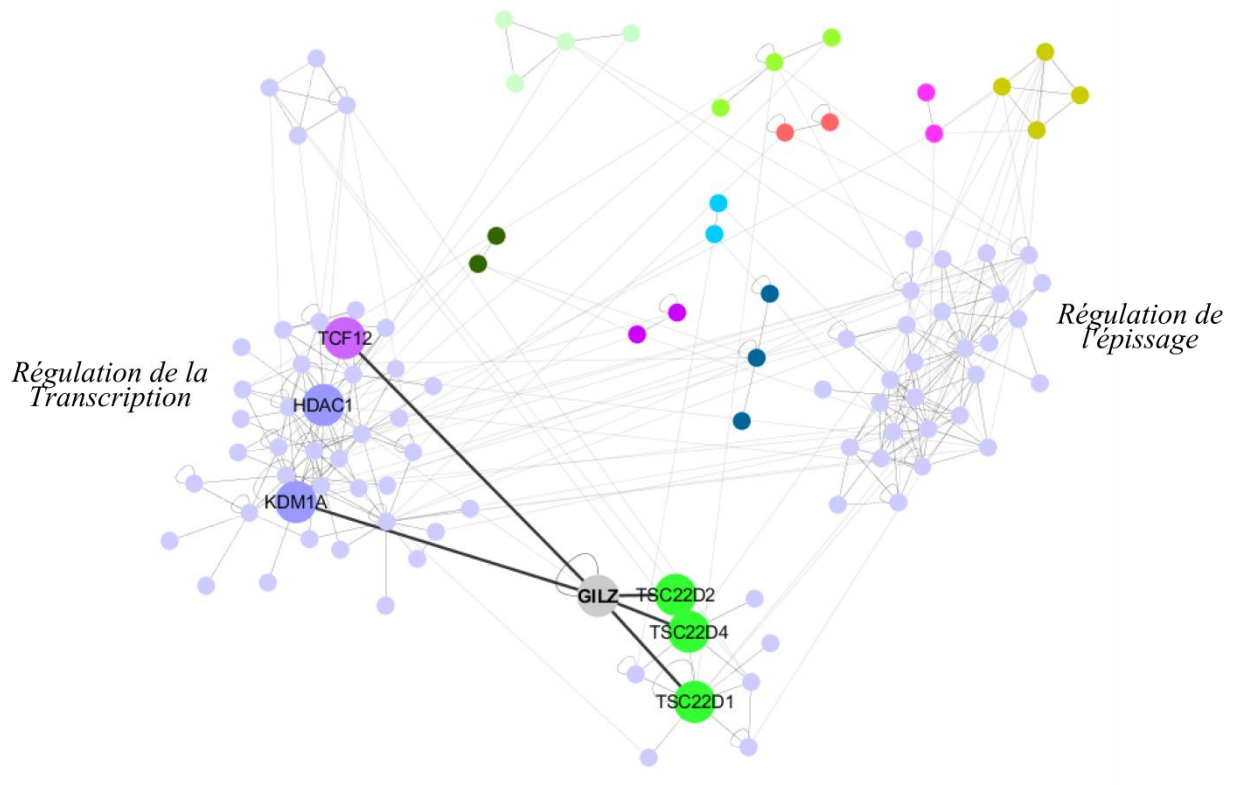


Figure 21 Sous-réseau d'interactions entre les partenaires nucléaires de GILZ

Le réseau d'interactions entre les partenaires nucléaires de GILZ a été décomposé par l'algorithme Markov Cluster Algorithm (MCL). Les interactions provenant de bases de données publiques sont représentées par des traits fins et les interactions considérées directes avec GILZ par des traits épais. Les groupes comprenant moins de 7 partenaires nucléaires de GILZ ont été représentés en couleur pour faciliter la lisibilité. Les trois protéines de la famille TSC22D sont représentées en vert, LSD1 et HDAC en bleu et le facteur de transcription TCF12 en mauve. Schéma réalisé à l'aide du logiciel cytoscape.

2.5 Identification des partenaires de GILZ impliqués dans les effets anti-inflammatoires

Deux approches complémentaires ont été utilisées. La première a consisté en l'étude des partenaires protéiques de GILZ impliqués dans l'activation de NF-kB ou la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans la seconde approche, seules les protéines connues pour être impliquées dans la signalisation du TLR4 ont été recherchées parmi les interactants de GILZ.

2.5.1 Première approche: Etude prédictive systématique

Attribution du score d'effet

Pour chaque interactant de GILZ un score d'effet a été attribué. Comme décrit au point matériel et méthodes, ce score est calculé par le recoupement des données publiques de criblages pan-génomiques systématiques (**Figure 22**).

Seules quatre études de ce type ont été publiées. Chacune d'elles décrit l'effet d'environ 20 000 gènes sur NF-kB (étude 1 et 4), sur la production de TNF (étude 3) ou de l'IL-8 (étude 2)^{307,308,309,310}.

Les études 1 et 2 ont été réalisées dans des THP-1 stimulées par un ligand de NOD2 (Muramyl dipeptide)^{307,308}. Elles décrivent l'effet de chaque gène sur la production d'IL8 ou l'activation de NF-kB, en prenant en compte un effet sur la viabilité cellulaire. Dans la troisième étude, l'effet de chaque gène sur la production de TNF a été recherché dans des cellules dendritiques murines stimulées par du LPS³¹⁰. La quatrième étude cible l'activité de NF-kB dépendante d'une activation par la protéine LMP1 (Latent membrane protein 1) du virus EBV³⁰⁹ (Epstein-Barr Virus, virus de la mononucléose).

Les modèles expérimentaux étant très différents, il a été préférable d'exploiter des données discrètes par rapport aux données quantitatives publiées. Ainsi, selon les critères de chacune des études considérées, nous avons donc retenu l'effet d'un gène sur l'activation de NF-kB ou sur la production de cytokines pro-inflammatoires.

Ainsi, il a été attribué pour chaque interactant de GILZ

1 point si le gène a un effet positif ou négatif selon les critères de l'étude
0 point si son effet n'est pas significatif

Le score total d'un interactant de GILZ, appelé abusivement « score d'inflammation », est la moyenne arithmétique de tous les points obtenus (**Figure 22**). Le score théorique maximal de 1 signifie que le gène a un effet positif ou négatif sur l'activité de NF-kB ou la production de cytokines pro-inflammatoires dans les quatre études utilisées. Le sens de l'effet sur l'inflammation n'a pas été pris en considération. La méthodologie employée ici pour la définition de l'interactome ne mesure pas si GILZ contribue positivement ou négativement à la fonction de chacun des interactants. Cet aspect analytique sera abordé ultérieurement à l'aide de tests fonctionnels.

La figure 22 représente schématiquement le score d'inflammation attribué à chacun des partenaires de GILZ.

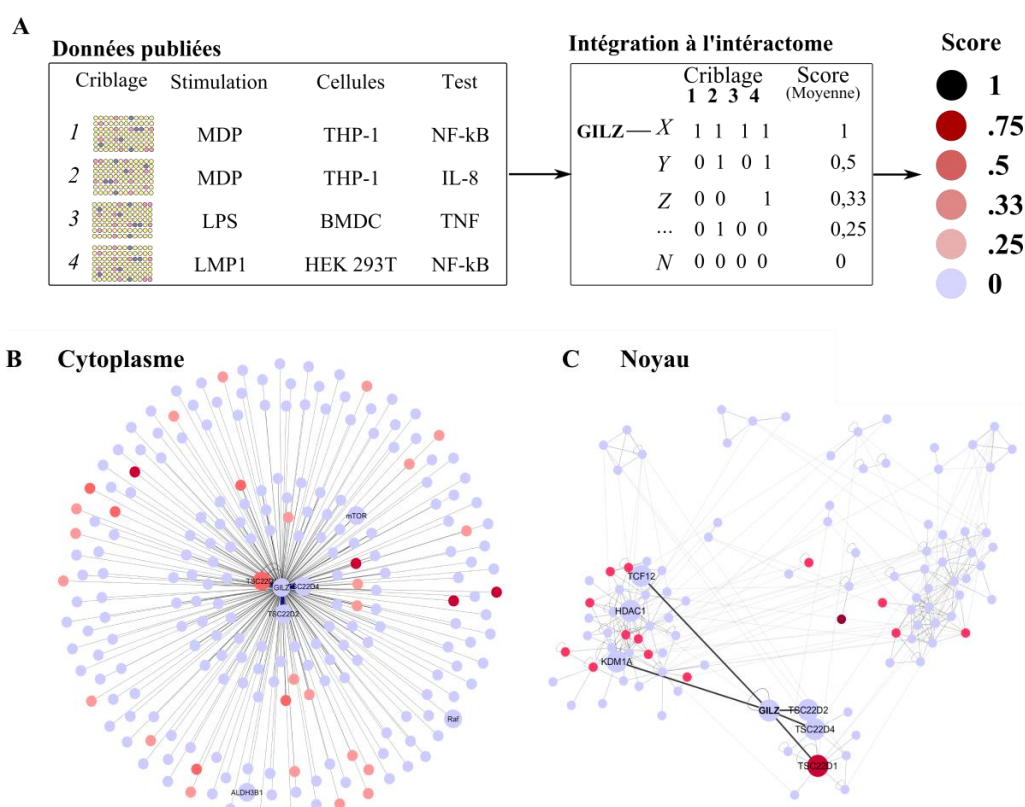


Figure 22 Identification des partenaires potentiellement impliqués dans les réponses inflammatoires

(A) Méthodologie pour le calcul du score d'effet sur l'inflammation de chaque partenaire de GILZ. Les résultats de quatre études publiées ont été synthétisés pour former un score. Pour chaque partenaire de GILZ, ce score reflète la robustesse de l'effet sur l'activité de NF-kB ou la production de cytokines. (B-C) Représentation schématique des interactants cytoplasmiques et nucléaires de GILZ de manière individualisés ou en réseau respectivement. Chaque point représente un partenaire de GILZ. GILZ est en position centrale, la longueur des liaisons est inversement proportionnelle au score de confiance accordé à chaque interaction. Les couleurs représentent le score d'effet sur l'inflammation qui est compris entre 0 (bleu) et 0,75 (rouge foncé). Aucun interactant n'a obtenu le score d'effet sur l'inflammation de 1 qui aurait été représenté en noir.

Identification des partenaires de GILZ potentiellement impliqués dans l'inflammation

Les protéines dont le score d'inflammation est supérieur ou égal à 0,25 et dont l'interaction avec GILZ a été identifiée par TAP-TAG dans le cytoplasme ou le noyau ont été sélectionnées pour une étude bibliographique individualisée. Parmi celles-ci, 23 et 33 interactants de GILZ proviennent respectivement de l'extrait nucléaire et cytosolique.

Dans le cytoplasme, les fonctions moléculaires des interactants dont le score d'inflammation est supérieur ou égal à 0,25 sont très dispersées ; il n'a pas été possible de les regrouper. Deux interactants cytosoliques de GILZ présentant un effet robuste sur l'inflammation ont été identifiés dans au moins trois études sur quatre (score $\geq 0,75$). HOIP est décrit comme un régulateur de la signalisation du récepteur au TNF (TNFR-1) et de l'activité de NF- κ B en réponse au TNF³¹⁸. Le second est COPZ1 qui est très peu étudié. Il interviendrait dans la localisation des protéines, dans l'autophagie et le transport protéique et vésiculaire.

Dans le noyau, les 23 interactants ont des fonctions moléculaires associées à la liaison aux acides nucléiques (p value corrigée $2,9.10^{-2}$) et à la répression de la transcription (p value corrigée $2,8.10^{-2}$) (**Tableau 7**). Ils appartiennent majoritairement au groupe de gènes associés à la régulation de la transcription (Figure 2).

Certains interactants ayant un effet sur NF- κ B et l'inflammation ont été identifiés au moins deux fois (score d'interaction supérieure à 4). Ces 11 interactants de GILZ sont à la fois nucléaires et cytosoliques. Ils ne sont pas regroupables en une voie de signalisation en particulier (p value non significative) et n'ont généralement pas de description bibliographique décrivant le mécanisme de leur effet pro ou anti-inflammatoire.

Néanmoins, on retrouve parmi ces 11 gènes, TSC22D1 connu comme régulateur de la signalisation dépendante du TGF- β par une interaction avec les protéines SMAD3 et SMAD4³¹⁹. La protéine CAD également représentée dans ce groupe est connue pour interagir avec SMAD3. Cette protéine intervient dans le métabolisme des acides aminés. Elle est décrite pour réguler l'inflammation, mais ce mécanisme n'est pas clairement établi. La sérine thréonine kinase 38 est connue pour inhiber la signalisation du TLR9 par l'ubiquitination de MAP3K2³²⁰. La délétion de cette protéine est suffisante pour prolonger la durée de vie des

souris dans un modèle de CLP³²⁰. Enfin, la protéine TRIM28 limite la production de TNF par les macrophages en réponse au LPS par l'intermédiaire de l'inhibition du facteur de transcription IRF5³²¹.

Toutes les cibles d'intérêts déterminées par cette approche peuvent expliquer les effets anti-inflammatoires de GILZ, mais devront impérativement être vérifiées expérimentalement.

2.5.2 Deuxième approche: Identification des protéines impliquées dans la signalisation du TLR4

GILZ a été identifiée comme un facteur pouvant réguler la fonction du macrophage. D'un point de vue moléculaire, GILZ limite fonctionnellement les MAPKs et AP-1, ainsi que NF-κB qui sont des effecteurs majeurs des voies signalisations dépendantes des TLR^{75,268}. Cette régulation est très rapide puisque cette même étude rapporte une inhibition de la phosphorylation de ERK quinze minutes après la stimulation par du LPS²⁶⁸.

Aussi, il est légitime de postuler qu'un mode d'action possible de GILZ soit une inhibition directe des complexes macromoléculaires impliqués dans la signalisation du TLR4, notamment de la voie commune dépendante de MyD88 qu'elle active très rapidement⁷⁵. Autrement dit, GILZ pourrait inhiber directement toutes les protéines requises à la

Tableau 7 Fonctions biologiques des interagants de GILZ

Fonction moléculaire	Nb	%	pvalue	Benjamini
nucleic acid binding	13	56,5	1,30E-04	3,10E-03
transcription repressor activity	5	21,7	6,10E-04	7,00E-03
protein binding	18	78,3	1,50E-03	1,20E-02
transcription cofactor activity	4	17,4	1,10E-02	5,90E-02
ligase activity	4	17,4	1,30E-02	5,80E-02
transcription activator activity	4	17,4	1,50E-02	5,50E-02
chromatin binding	3	13	1,60E-02	5,00E-02
nucleoside binding	6	26,1	4,80E-02	1,30E-01

Classification des fonctions des partenaires biologiques de GILZ identifiés dans le noyau pour avoir un effet sur l'inflammation (score d'inflammation supérieur à 0,25). Enrichissement en GO_Terms obtenues selon le Gene Ontology Consortium sur la base de données Molecular functions 2. Analyse effectuée à l'aide de l'outil en ligne DAVID. Statistique corrigée de Benjamini.

signalisation entre le TLR4 lui-même et le complexe formé par TRAF6-TAB1/2-TAK1. L'inhibition de cette voie commune impacterait nécessairement toutes les voies de signalisation en aval, à savoir les MAPKs et NF- κ B.

Le consortium KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) décrit les voies de signalisations directes, notamment celle du TLR4 (#hsa04620, KEGG). Dans cette voie de référence, toutes les protéines identifiées dans l'interactome de GILZ au niveau cytosolique ont été recherchées. Les protéines TAB1 et TAK-1 sont des interactants de GILZ impliqués dans la voie de signalisation du TLR4 (**Figure 23**).

Par ailleurs, l'activation du macrophage est entretenue par les cytokines sécrétées. Il est donc également cohérent de rechercher les interactants impliqués dans les voies de signalisation de ces cytokines. Quelques protéines impliquées dans les voies de signalisation des cytokines ont été identifiées dans l'interactome de GILZ. Les protéines de la famille de Raf et Ras, la PI3K, la MAP2K7 et la protéine JAK2 sont toutes des protéines qui interviennent dans l'activation du macrophage en étant essentielles à la signalisation des récepteurs membranaires. Par exemple, JAK2 intervient notamment dans la signalisation du récepteur à l'IFN- γ ³²². Elle contribue à la polarisation des macrophages et son inhibition limite l'inflammation systémique dans les modèles murins³²³.

Même si les protéines de ces voies de signalisation ne sont pas spécifiquement enrichies dans l'interactome, l'inhibition d'une seule pourrait-être suffisante pour limiter la réponse inflammatoire des macrophages humains.

En conclusion, les deux approches utilisées ont permis d'identifier les interactants susceptibles d'expliquer les fonctions anti-inflammatoires de GILZ. Des études complémentaires seront nécessaires pour vérifier expérimentalement leurs fonctions.

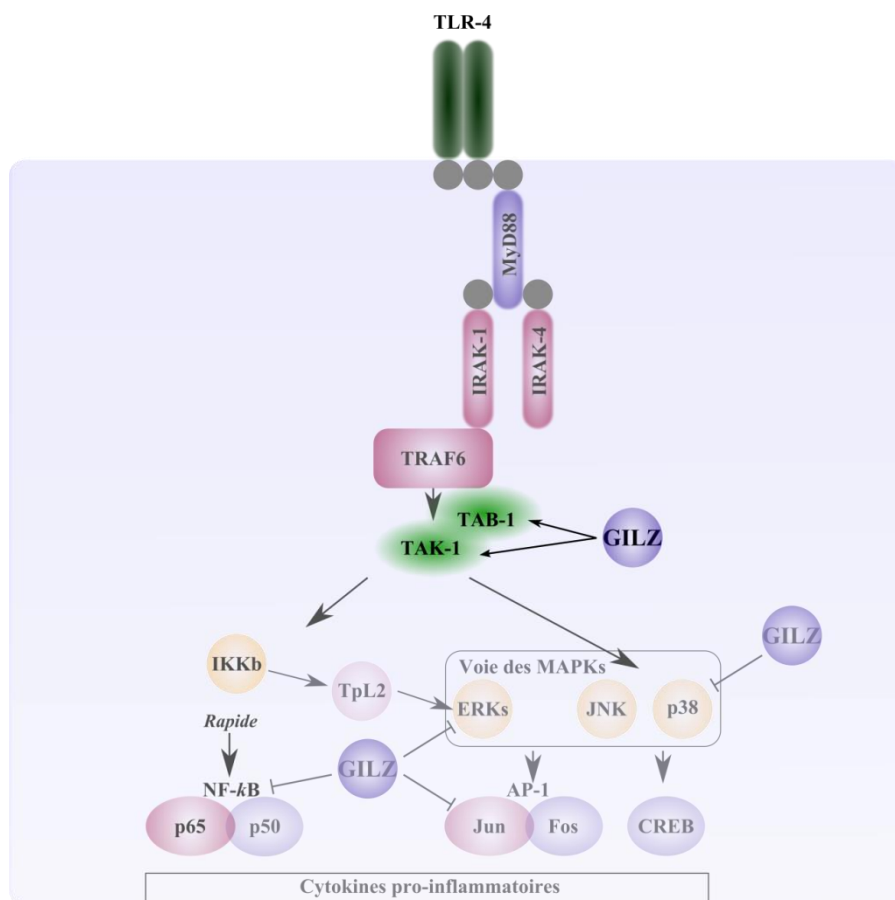


Figure 23 Interaction entre GILZ et la voie signalisation du TLR4

Parmi les partenaires cytoplasmiques de GILZ, les protéines TAB1 et TAK1 interviennent dans la signalisation du TLR4. L'inhibition de la voie des MAPKs et de NF-κB par GILZ décrites dans la littérature sont matérialisées sur le schéma.

Discussion

Influence du niveau d'expression de GILZ sur la fonction des monocytes et des macrophages

Mécanismes d'action de GILZ : caractérisation de l'interactome de GILZ

Discussion

L'inflammation débute par la reconnaissance d'un danger par les systèmes immunitaires inné et humoral.

Dans le cas d'une infection bactérienne, les macrophages reconnaissent le LPS de la paroi bactérienne par intermédiaire du TLR4. La signalisation du TLR4 induit l'activation du macrophage laquelle entraîne ensuite une cascade d'événements susceptibles d'aboutir à une inflammation locale ou systémique. Une inflammation systémique exagérée est responsable du sepsis et du choc septique.

Le gène de GILZ a été identifié comme un facteur de résistance à l'endotoxémie létale²³⁷. L'objectif de cette étude a été de déterminer 1) si le taux d'expression de GILZ dans les macrophages est altérée au cours du choc septique, 2) si une modulation de l'expression de GILZ dans les macrophages suffit à contrôler l'inflammation systémique, 3) le mode d'action de GILZ dans les monocytes/macrophages.

1 Influence du niveau d'expression de GILZ sur la fonction des monocytes et des macrophages

La première partie de ce travail est consacrée à l'étude fonctionnelle de GILZ sur la réponse des macrophages dans les premières heures qui suivent un contact avec du LPS. La production de cytokines pro et anti-inflammatoires en réponse au LPS est bien décrite dans les différents types de macrophages humains et murins. Une stimulation courte induit une très forte production de TNF dont le pic d'expression en ARNm se situe après une heure environ¹⁰³. Dans le même temps, il a été démontré dans les macrophages alvéolaires humains et dans les BMDM que l'expression de GILZ décroît significativement^{265,268}. Cette diminution est due à une régulation post-transcriptionnelle de GILZ par la protéine tristetraproline (TTP) et par le miR-24 qui cible la portion 3' non codante de l'ARNm de GILZ²⁶⁵. Dans un premier temps, nous avons confirmé ces résultats *in vitro* dans les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse et étendu cette observation *in vivo* aux macrophages murins alvéolaires et péritonéaux, ainsi qu'aux monocytes humains stimulés *in vitro*.

Pour comprendre si cette diminution de l'expression de GILZ est une étape nécessaire afin que le macrophage acquiert un profil de réponse inflammatoire, nous avons utilisé une souris transgénique qui sur-exprime GILZ sous le contrôle d'un promoteur CD68 actif

spécifiquement dans les macrophages (souris transgénique GILZ^{high}). Le transgène introduit dans ces souris ne porte pas la portion 3'-UTR de l'ARNm de GILZ. GILZ n'est donc théoriquement plus régulable par la signalisation du TLR4 et la TTP, ce qui participe à la stabilisation de son expression. Ainsi, les macrophages alvéolaires, péritonéaux ou dérivés de la moelle osseuse de ces souris conservent, même après stimulation par du LPS, *in vitro* ou *in vivo* une expression élevée de GILZ.

Nous avons choisi de travailler principalement à partir de macrophages primaires résidents provenant de la cavité péritonéale. Deux populations aux caractéristiques très différentes existent : les SPM et les LPM³⁵. Les SPM sont faiblement représentés en l'absence de stimulation³²⁴. Il s'agit d'une population hétérogène qui provient de la différenciation des monocytes sanguins³⁷. Après une stimulation *in vivo*, les monocytes recrutés se différencient sur plusieurs jours en SPM³⁷. Il en résulte une population hétérogène difficile à suivre en cinétique^{37,324}. Les LPMs expriment fortement le TLR4³⁷. Ils sont présents à l'homéostasie et se renouvellent de manière indépendante des monocytes sanguins³²⁴. Les LPM présents à l'homéostasie survivent à l'inflammation et se multiplient lors de sa résolution³²⁴. Facilement identifiables en cytométrie de flux, ils constituent un modèle de choix pour les études transversales sur les réponses précoces aux endotoxines *in vitro* et *in vivo* en cinétique. Pour cette raison, les LPM ont été choisis comme modèle d'étude pour comprendre l'effet de GILZ sur les macrophages résidents.

1.1 Effet de GILZ sur la production de cytokines et conséquence sur l'inflammation systémique

En l'absence de stimulation, la production de cytokines proinflammatoires par les LPM provenant de souris sauvages ou de souris GILZ^{high} est indétectable. Après une stimulation courte par du LPS, la surexpression stable de GILZ dans les macrophages provenant des souris GILZ^{high} limite la production de TNF et augmente celle de l'IL10. Ces résultats sont renforcés par les données obtenues pour les souris GILZ-KO. Ils confortent également les données de la littérature dont l'essentiel porte sur des BMDMs provenant de souris KO²⁶⁸. Hoppstadter et ses collègues rapportent que cette même exposition au LPS augmente et prolonge l'expression du TNF par les macrophages de souris GILZ-KO par rapport aux souris sauvages, ce qui corrobore nos résultats et démontre le rôle anti-inflammatoire de GILZ²⁶⁸.

Toutefois, il n'y a pas d'altération de l'expression de l'IL10 dans les BMDMs provenant de souris GILZ-KO²⁶⁸. Dans les macrophages murins, l'expression de cette cytokine est sous le contrôle d'AP-1, NF-κB et CREB, notamment activés par la voie des MAPKs³²⁵. L'absence de GILZ dans les souris GILZ-KO augmente le niveau d'activation des MAPKs, l'activité d'AP1 et NF-κB²⁶⁸. A l'inverse, la surexpression de GILZ inhibe NF-κB^{236,298}. L'observation d'une augmentation de l'IL10 n'est donc théoriquement pas attendue dans les macrophages GILZ^{high}.

Notre équipe a préalablement démontré dans les cellules dendritiques une induction plus marquée de l'IL10 par la surexpression de GILZ qui a été confirmée dans d'autres types cellulaires^{252,262,267}. Théoriquement, un effet positif direct de GILZ sur la production de l'IL10 peut expliquer ce résultat. Dans les souris GILZ-KO, un éventuel effet positif de GILZ sur l'expression de l'IL10 ne serait pas observable puisque le niveau de GILZ est nul et très voisin de celui des souris sauvages^{265,268}. Cependant, il n'y a pas de mécanismes moléculaires décrits à ce jour ni dans les macrophages ni dans les cellules dendritiques qui puissent justifier cet effet activateur de GILZ sur l'IL10. L'effet anti-inflammatoire de GILZ dans les macrophages a été confirmé par cette étude *in vitro* et investigué *in vivo*.

Dans les souris sauvages stimulées *in vivo* la diminution de l'expression de GILZ est associée à une production précoce de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages résidents. Dans les souris sauvages non stimulées, l'expression de ces cytokines est indétectable dans le plasma (données non montrées). Une stimulation *in vivo* par du LPS induit une très forte production de TNF et d'IL6. Le TNF montre un pic d'expression 2 heures post-injection²⁰⁸. L'expression de l'IL6 est maximale entre 3 et 6 heures post injection²⁰⁸.

Les macrophages provenant de souris GILZ^{high} conservent une surexpression de GILZ même après une injection de LPS. Cette injection de LPS modélise une réponse inflammatoire systémique associée à une endotoxémie. Dans les souris GILZ^{high}, l'expression plasmatique de nombreuses cytokines pro-inflammatoires est très fortement altérée six heures après injection. La surexpression de GILZ restreinte aux macrophages limite l'inflammation systémique induite par le LPS.

Bien qu'un effet anti-inflammatoire de GILZ soit décrit, l'inhibition de l'inflammation systémique dans les souris GILZ^{high} n'était pas attendue. En effet, l'expression des cytokines pro-inflammatoires n'est pas due à la seule production des macrophages.

Les souris déficientes pour le TLR4 sont résistantes à l'endotoxémie induite par une injection de LPS, mais sont très sensibles à l'infection^{205,206,207,216,218}. L'introduction de macrophages provenant de souris congéniques qui expriment naturellement le TLR4, restaure l'immunité anti-bactérienne et l'inflammation pulmonaire³²⁶. La déplétion des macrophages est également suffisante pour modifier la mortalité au cours du sepsis³²⁷. Ce résultat suggère que l'activation des macrophages est suffisante pour orienter la cascade activatrice de l'inflammation systémique.

Comme décrit en introduction, la production de chaque cytokine a une cinétique et des conséquences qui lui sont propres. Ainsi, l'IL10 inhibe la production systémique de TNF et d'IL6 et protège les souris contre une dose létale d'endotoxines³²⁸. A l'inverse, l'inhibition du TNF, limite la production d'IL6 en réponse à l'injection de LPS³²⁹. De plus, le TNF injecté seul induit également un état physiologique proche de celui de l'endotoxémie^{330,331}. Ces deux exemples montrent le rôle clé du TNF et de l'IL10 dans la cascade d'induction de l'inflammation systémique. *In vitro*, les LPM provenant de souris GILZ^{high} montrent une altération de l'expression du TNF et une augmentation de l'expression de l'IL10. Dans la cavité péritonéale au repos, les LPMs sont majoritaires³⁷. Immédiatement après l'injection de LPS dans cette cavité, il est attendu que les LPM des souris GILZ^{high} présentent ce même profil de réponse. Par une production altérée de TNF et augmentée d'IL10, ils pourraient ainsi limiter l'initiation de la cascade activatrice de l'inflammation systémique.

Ce mécanisme indirect proposé demeure non démontré. Il pourrait néanmoins expliquer la diminution de la production systémique de cytokines pro-inflammatoires par une surexpression de GILZ restreinte aux monocytes et macrophages.

Le modèle d'endotoxémie permet d'estimer l'effet d'un gène sur la réponse inflammatoire, mais n'est pas prédictif d'un effet clinique ou thérapeutique. Ces questions ont été abordées dans un modèle de péritonite septique chirurgicale.

1.2 Effet d'une sur-expression de GILZ sur un modèle de choc septique

Le modèle CLP induit une péritonite qui modélise le choc septique humain^{204,220}. Le choc septique est une entité pathologique complexe qui fait intervenir en parallèle une inflammation systémique exagérée et une immunosuppression^{6,332}. Dans les modèles CLP murin, ces statuts sont encore mal définis. Au niveau cellulaire, les macrophages péritonéaux murins acquièrent un profil tolérant après 26 heures de stimulation *in vivo*³³³. C'est pourquoi, il a été choisi d'ajuster la sévérité du modèle CLP pour se rapprocher au maximum du pic de synthèse de l'IL6 qui apparaît dans ce modèle environ 24 heures après la chirurgie^{222,223}. La médiane de survie observée est de 28 heures pour les souris contrôles. Ces modèles considérés très sévères sont létaux²²⁰.

Dans ce modèle, les souris GILZ^{high} ont un allongement significatif de leur durée de vie. De prime abord, cette augmentation peut sembler modérée. Il faut cependant rappeler la sévérité du modèle et la sur-expression de GILZ qui est restreinte aux macrophages.

Cette seule sur-expression est donc suffisante pour prolonger la durée de vie des souris GILZ^{high} dans un modèle de choc septique sévère.

1.3 Expression de GILZ dans les monocytes de patients en choc septique

Les modèles murins, précliniques ou non, ne modélisent toujours qu'une partie de la pathologie humaine²⁰⁴. Aussi, pour évaluer la pertinence de nos observations dans les modèles murins, l'expression de GILZ a été mesurée dans les monocytes de patients atteints de choc septique sévère.

Dans ce syndrome, il est décrit une réponse biphasique pro- ou anti-inflammatoire^{6,7,332}. Les caractéristiques de ces réponses sont certainement dépendantes du patient et de la cinétique. L'inflammation observée par des paramètres cliniques comme la fièvre, les conséquences hémodynamiques ou le taux de CRP plasmatiques montrent un statut inflammatoire du patient. Il est corroboré par la présence d'IL6 et de TNF dans le plasma^{332,334}. Dans le même temps, des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL1-ra ou l'IL10 sont retrouvées dans le plasma des patients³³⁵. La réponse est donc ambiguë. D'un point de vue théorique, la réponse tolérante provient d'un mécanisme de régulation de la réponse inflammatoire¹⁰⁹. Elle devrait donc être antérieure. C'est pourquoi, en première

approche, l'expression de GILZ a été évaluée chez les patients en choc septique au moment du diagnostic présentant un état inflammatoire documenté par un taux de CRP et de procalcitonine élevé.

Chez les patients en choc septique sévère inclus dans cette étude, on observe une diminution significative de l'expression de GILZ dans les monocytes sanguins. Le taux de mortalité à 7 jours des patients inclus dans cette étude est de 100%. Même si la sévérité du choc septique chez ces patients est extrême et que le nombre de patient est faible pour pouvoir tirer des conclusions générales. Toutefois, ils corroborent les observations effectuées chez la souris.

2 Mécanismes d'action de GILZ : caractérisation de l'interactome de GILZ

Pour qualifier le rôle de GILZ dans l'inflammation et dans la polarisation du macrophage, il est nécessaire de comprendre son mode d'action moléculaire.

Chez la souris l'inhibition de NF- κ B est attribuée à une interaction protéine protéine directe avec la sous-unité p65. L'inhibition de NF- κ B par GILZ a également été confirmée dans des lignées humaines THP-1 qui rapportent l'activité de NF- κ B par la production de phosphatase alcaline sécrétée. L'inhibition de GILZ par shRNA ou son augmentation par un vecteur lentiviral, augmente ou diminue respectivement l'activité de NF- κ B. L'interaction de GILZ avec la p65 n'a pas été observée dans les THP-1, ce qui suggère un mécanisme différent entre la souris et l'homme.

GILZ inhibe NF- κ B et la voie des MAPKs mais le mécanisme de cette inhibition est inconnu. Il ne semble donc pas évident d'anticiper le mécanisme moléculaire d'action de GILZ chez l'homme.

Dans cette étude, il a été choisi d'identifier les partenaires protéiques de GILZ dans la lignée THP-1 pour dégager les pistes moléculaires responsables des effets anti-inflammatoires ou plus généralement des fonctions moléculaires de GILZ.

2.1 Choix et limites méthodologiques

Les partenaires nucléaires et cytosoliques de GILZ ont été définis par TAP-TAG et double-hybride. Ces deux techniques sont complémentaires.

Le double-hybride est une méthode binaire d'identification d'interactions entre deux protéines. De ce fait, elle identifie des interactions directes entre deux protéines y compris lorsqu'elles sont de faible affinité. En revanche, les interactions dépendantes de modifications post-traductionnelles ne sont pas identifiables.

La seconde méthode choisie repose sur l'immunoprécipitation de GILZ et l'identification des partenaires protéiques associés par spectrométrie de masse en tandem. L'immunoprécipitation unique est la technique la plus simple ; elle permet une identification maximale des vrais positifs. Ces vrais interactants représentent seulement 10% des protéines identifiées³³⁶.

A la différence de la simple immunoprécipitation, le TAP-TAG offre une plus grande spécificité. Il s'appuie sur deux immunoprécipitations successives sur des épitopes différents ajoutés spécifiquement à la protéine d'intérêt, dans notre cas les tags FLAG et HA³³⁷. Cette méthode limite considérablement le taux de faux positifs. Les faux positifs résiduels sont inhérents à la spécificité des anticorps utilisés pour le TAP-TAG et à la méthode d'identification des peptides en spectrométrie de masse³³⁸. Par l'approche bottom-up utilisée ici, les protéines sont digérées et identifiées par spectrométrie de masse. Cette identification se fait sur la base de la masse du peptide ionisé lors de la première MS ou de ses fragments lors de la seconde (MS/MS). Or, une même combinaison de masse peut correspondre à plusieurs peptides. C'est pourquoi, seules les protéines identifiées par au moins deux peptides ont été considérées. Les protéines hautement abondantes, comme les protéines chaperonnes, les sous-unités ribosomales ou les protéines connues pour être « collantes » restent des contaminants classiques observés en TAP-TAG³³⁹. Il ne s'agit pas nécessairement de faux positifs, cela signifie seulement que la méthodologie n'est pas appropriée pour étudier ces éventuels partenaires.

L'identification en TAP-TAG n'est pas sensible et il n'est pas souhaitable de compenser ce défaut de sensibilité par une sur-expression de la protéine appât. Ceci favoriserait la fixation non spécifique et le taux de faux positifs. C'est pourquoi, nous avons choisi un système

d'expression inductible pour ajuster à un niveau physiologique l'expression de la protéine GILZ-FHC. Pour obtenir une quantité suffisante de protéines, c'est le volume de culture et le nombre de cellules utilisées qui est ajusté³³⁷.

Le nombre élevé de cellules requises est incompatible avec l'utilisation de cellules primaires, aussi, l'expérimentation a-t-elle été conduite dans des cellules pro-monocytaires THP-1 différenciées en macrophages. Ces cellules différenciées répondent aux endotoxines en activant NF- κ B et en produisant des cytokines pro-inflammatoires³⁴⁰. L'activation de NF- κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires y est régulée par GILZ²³⁶. Ces cellules couramment étudiées pour disséquer les mécanismes moléculaires de la signalisation du TLR4 constituent donc un modèle de choix pour notre étude³⁴⁰. Elles ont de plus déjà fait l'objet d'une purification de complexes protéiques par TAP-TAG³⁴¹.

Le TAP-TAG permet d'identifier les complexes macromoléculaires directement dans des cellules d'intérêt. Les protéines y sont entières, naturellement repliées et modifiées. En revanche, il est très difficile d'identifier parmi tous les interactants ceux qui interagissent directement avec la protéine appât.

C'est pourquoi, le recouvrement entre le double-hybride et le TAP-TAG est important. Il est attendu seulement pour les partenaires directs de GILZ présents dans la banque du double-hybride et exprimés par les THP-1. Il dépend en outre, de la taille des complexes macromoléculaires purifiés en TAP-TAG. Dans notre cas, le recouvrement est de 18% des protéines identifiées en double-hybride. Les interactants identifiés par les deux techniques ont donc été considérés robustes et directs.

2.2 Identification des partenaires potentiellement responsables de l'effet anti-inflammatoire de GILZ

Un autre objectif de l'étude est de proposer des pistes moléculaires pour comprendre l'effet anti-inflammatoire de GILZ dans les cellules humaines. Deux approches ont été utilisées pour extraire de l'interactome de GILZ, les partenaires susceptibles de contribuer à ses effets anti-inflammatoires : une approche dite « conventionnelle » et une dite « systématique ».

2.2.1 Approche conventionnelle

Spontanément, la première approche consiste à rechercher dans l'intéactome, les protéines impliquées dans les voies de signalisation du TLR4 ou des cytokines produites en réponse au LPS, le TNF notamment.

Cette approche présuppose que la signalisation soit maîtrisée et qu'il soit possible d'établir la liste des gènes impliqués dans l'inflammation. Les signalisations du TLR4 et du TNF sont abondamment décrites; elles permettent théoriquement ce genre d'approche^{78,342}.

Cette méthodologie est rapidement limitée par notre capacité à intégrer toutes les voies de signalisation de l'ensemble des cytokines produites par un macrophage. Il existe donc un biais probable dépendant des connaissances publiées ou connues.

2.2.2 Approche systématique

La seconde approche consiste à définir pour chaque intéactant un score qui estime son activité pro ou anti inflammatoire. Ce score est basé sur quatre études systématiques qui ont analysées l'effet de 20 000 gènes environ sur la production de cytokines ou sur l'activité de NF-κB. Ce score permet d'identifier au sein des partenaires de GILZ ceux qui pourraient en expliquer l'effet anti-inflammatoire. Le classement des intéactants sur la base d'un score présuppose que les études utilisées en support pour la définition de ce score soient représentatives du mécanisme de l'inflammation induite dans les macrophages.

Par exemple, il n'est pas évident que GILZ dispose de ses partenaires requis pour exercer ses effets anti-inflammatoires. En effet, ces études ne visaient pas directement la compréhension des fonctions de GILZ. Il est donc cohérent que les modèles ne soient pas nécessairement adaptés pour constater ses effets anti-inflammatoires. C'est certainement pourquoi dans ces quatre études, GILZ n'a pas été systématiquement identifiée comme une protéine régulatrice de l'inflammation^{307,308,309,310}. La première des quatre études consiste à définir les gènes qui influencent l'activité de NF-κB induite par un ligand du récepteur NOD2 dans des THP-1³⁰⁷. Dans cette étude, GILZ inhibe significativement l'activité de NF-κB sans influencer la viabilité cellulaire ce qui corrobore nos résultats. La seconde étude est basée sur le même modèle mais mesure la production d'IL-8³⁰⁸. Les données publiées montrent une inhibition de la production d'IL8 par GILZ (non significatif). Dans la troisième étude, GILZ

ne limite pas la production de TNF en réponse au LPS dans des BMDCs murines³¹⁰. Le gène de GILZ n'a pas été inclus dans la quatrième étude³⁰⁹.

Sur un seul critère, la cinétique et la diversité des modèles expérimentaux peut justifier que l'effet de GILZ soit présent ou non. Il reste donc envisageable que les partenaires essentiels à la fonction de GILZ ne soient pas activés dans toutes ces études. Il persiste donc un risque de laisser de côté un bon partenaire candidat. C'est pourquoi, il est utile d'inclure un maximum d'études pour lisser ces effets, mais à ma connaissance seules quatre sont disponibles à ce jour.

L'approche systématique a pour avantage d'être plus objective sur l'effet pro- ou anti-inflammatoire de chaque interactant. Elle se justifie d'autant plus que les fonctions de certaines protéines sont largement méconnues ou inattendues.

Ces deux approches conventionnelle et systématique sont très complémentaires et ne s'opposent pas. Elles ont été exploitées pour définir les interactants cytosoliques et nucléaires de GILZ qui pourraient expliquer ses fonctions anti-inflammatoires. Il est bien entendu que toutes ces cibles identifiées devront faire l'objet d'une confirmation fonctionnelle expérimentale.

2.3 Rôle putatif de GILZ sur la signalisation du TLR4

Par l'approche conventionnelle, les deux protéines TAK-1 et TAB1 ont été identifiées dans l'interactome de GILZ. Ces deux protéines participent à la régulation de la signalisation du TLR4.

Selon la description canonique, TAK-1 et TAB1 sont recrutées par TRAF6, seulement lorsque celle-ci est polyubiquitinilée^{74,75,276}. La formation du complexe TAK-1/TAB1/TAB2/TRAF6 va activer la TAK-1. Une fois la TAK-1 activée, elle phosphoryle IKKs et active NF- κ B.

TAK-1 est décrite comme la dernière kinase de la voie commune MyD88 qui va activer NF- κ B et la voie des MAPKs. Ces deux voies sont inhibées par GILZ dans les macrophages par un mécanisme encore inconnu²⁶⁵. Dans le complexe purifié avec GILZ ni TRAF6 ni TAB2/3 n'ont été identifiés. TAB2 et TAB3 sont des protéines adaptatrices qui permettent le recrutement de la TAK-1 sur les chaînes de polyubiquitine^{343,344}. Ceci laisse donc supposer

que GILZ soit associée à un complexe «libre», donc non activé par le TLR4. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de séquestration et d'inhibition du complexe, mais qui n'a pas été démontré expérimentalement.

Le rôle de TAK-1 et TAB1 est cependant très complexe à interpréter. TAB1 et TAK1 sont impliquées dans la réponse au stress osmotique, l'inflammation, l'hypoxie ou encore la signalisation par le TGF- β ³⁴⁵. Dans le système immunitaire, leurs fonctions sont également variées. TAK-1 est une enzyme clé dans la voie de signalisation du TLR4 dans les fibroblastes murins³⁴⁶. Son absence inhibe complètement l'activation de NF- κ B dans ce type cellulaire. Dans les neutrophiles, la TAK-1 produit un effet inverse et inhibe l'activation de NF- κ B³⁴⁷. Dans les BMDCs, elle ne semble pas avoir d'effet sur la production du TNF en réponse au LPS³¹⁰ alors que dans les BMDMs, la délétion de la TAK1 induit une apoptose spontanée³⁴⁸. Cependant, aucun effet sur la survie n'est observé dans les THP-1³⁴⁹.

L'effet de la TAK-1 est donc très dépendant du contexte et du type cellulaire³⁵⁰ ce qui n'est pas sans rappeler la bibliographie de GILZ. TAK-1 et TAB1 restent néanmoins deux cibles très crédibles susceptibles d'expliquer les effets anti-inflammatoires GILZ.

2.4 Rôle cytoplasmique sur la signalisation dépendante des cytokines

Comme décrit précédemment, la signalisation par le TLR4 n'est qu'un élément déclencheur et le rôle autocrine des cytokines produites est considérable. Au moins 9 partenaires de GILZ sont impliqués dans la signalisation des cytokines, il s'agit de RAF-1, une protéine de la famille de Ras, JAK2, MAP2K7 et la PI3K, STK38, TSC22D1 et HOIP.

HOIP est une polyubiquitine ligase qui intervient dans le complexe LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*). LUBAC comprend les trois ubiquitines ligases HOIP, HOIL-1L et SHARPIN³⁵¹⁻³⁵³. Seule HOIP a été identifiée dans l'interactome. La délétion de la région catalytique de HOIP limite l'activation de NF- κ B dans les lymphocytes B en réponse au CD40L³⁵⁴. Elle s'accompagne d'une altération de Tpl-2 et finalement de ERK³⁵⁴. Dans les BMDMs, LUBAC(HOIL-1L) est requise à l'activation de l'inflammasome, à la synthèse d'IL-1 β et sa délétion rend les souris résistantes à l'endotoxémie³⁵⁵. Dans les macrophages humains, HOIP participe à la signalisation des récepteurs du TNF en formant un complexe avec TRAF2, HOIL-1 et le TNF-R1³¹⁸. Elle polyubiquitine NEMO, le complexe inhibiteur de la

voie NF-kB et ainsi, elle est nécessaire à une activation de NF-kB³¹⁸. Finalement, l'inhibition de HOIP abolit presque complètement la production de TNF et d'IL8³¹⁸. Cette inhibition de l'IL8 et de NF-kB est rapportée dans deux études systématiques portant sur les THP-1 stimulés par le MDP^{307,308}.

HOIP est le partenaire qui présente le score d'inflammation le plus élevé et de ce fait, devra faire l'objet d'une étude fonctionnelle expérimentale.

2.5 GILZ une protéine régulatrice de la transcription ?

Les interactants nucléaires de GILZ sont très organisés autour de la fonction transcriptionnelle. Dans l'extrait nucléaire, les interactants identifiés pour leur fonction sur NF-kB ou sur l'inflammation sont répartis également autour de la régulation de la transcription. On ne peut donc exclure qu'une activité anti-inflammatoire de GILZ ait pour origine la régulation de la transcription.

Le rôle de GILZ comme un facteur de transcription a été déjà étudié dans la littérature²⁹¹. Très peu d'expérimentations ont recherché une fixation de GILZ à l'ADN et par conséquent il est difficile d'anticiper les sites de fixation de GILZ dans les macrophages. Dans les lymphocytes T, GILZ limite la production d'IL21 et se fixe sur son gène²⁹¹. Il entrerait en compétition avec d'autres facteurs de différenciation des lymphocytes T comme Batf, irf4 et ROR- γ T²⁹¹.

Dans cette étude, GILZ interagit directement avec l'histone déméthylase LSD1. Une interaction a également été retrouvée avec HDAC1 et l'histone déméthylase KDM5a. LSD1 et KDM5a effacent la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3. La triméthylation d'H3K4 est associée à une transcription active^{317,356,357}. LSD1 et KDM5a sont donc plutôt répressives de la transcription. De plus, HDAC1 participe à la répression de la transcription en retirant le groupement acétyle de H3K4. L'interaction entre GILZ et HDAC1 a déjà été décrite dans les cellules mésenchymateuses²⁹⁰. Dans ce type cellulaire, il est proposé que GILZ limite l'activité du facteur de transcription MyoD1 qui est requise à la maturation de ces cellules en myoblastes²⁹⁰. Aucune description de ce type n'a encore été faite dans les macrophages, mais pourrait expliquer les effets anti-inflammatoires de GILZ. Cette hypothèse est étayée par le contrôle de la tolérance aux endotoxines par GILZ²⁶⁸. Ce processus requiert l'activité

de HDAC1 qui régule négativement l'expression des gènes pro-inflammatoires¹⁰¹. L'interaction entre GILZ et HDAC1 pourrait donc potentiellement orienter la maturation des macrophages vers un phénotype « anti-inflammatoire » particulier.

Même s'il est difficile de tirer des conclusions fonctionnelles, on peut supposer que GILZ intervienne dans un complexe formé par lui-même et un autre membre de la famille TSC22D. Les membres de cette famille de taille et de structures variées sont tous des interactants robustes et directs de GILZ. Ils ont de plus déjà été décrits dans la littérature²⁴⁶. Dans ces complexes, LSD1 pourrait directement être apportée par GILZ. Il est impossible d'anticiper le rôle de ces complexes, d'une manière générale ou spécifiquement dans le contexte inflammatoire. Il est par exemple démontré que le gène TSC22D1 code pour plusieurs isoformes et que les dimères formés par ces isoformes ont des fonctions transcriptionnelles variées³⁵⁸. De plus, l'effet biologique serait dépendant des gènes réprimés ou favorisés.

Pour confirmer et comprendre le rôle transcriptionnel de GILZ, il est nécessaire de pousser davantage les expérimentations, notamment par la localisation des marques épigénétiques, des complexes régulateurs de la transcription et de GILZ. En comparant ces résultats au profil transcriptomique obtenus dans les cellules surexprimant ou sous-exprimant GILZ, il serait possible de déterminer pour chaque gène, ceux régulés par GILZ et par quels mécanismes.

2.6 Confirmation du(es) mécanisme(s) anti-inflammatoire(s) de GILZ

Comme nous l'avons esquissé, de nombreux mécanismes peuvent expliquer les fonctions anti-inflammatoires de GILZ. Ils ne sont pas forcément indépendants ni nécessairement exclusifs et chacun d'entre eux contribue probablement au changement phénotypique observé dans le macrophage.

Pour affiner au maximum les mécanismes responsables de l'effet anti-inflammatoire de GILZ, l'idéal serait de sur-exprimer ou de neutraliser un à un les partenaires de GILZ afin d'identifier ceux qui réversent l'effet anti-inflammatoire d'une sur-expression de GILZ, ou à l'inverse, ceux qui réversent l'effet pro-inflammatoire d'une délétion de GILZ.

Il serait ainsi possible de distinguer les interactants de GILZ qui ont un effet sur l'inflammation de ceux qui participent aux effets anti-inflammatoires de GILZ. Par extrapolation, il sera possible de mieux cerner comment GILZ a un effet sur l'inflammation *in vivo* et l'inflammation systémique.

3 Perspectives

GILZ est virtuellement exprimée dans tous les types cellulaires et très conservée au cours de l'évolution. Ceci suggère un rôle clé commun dans la biologie cellulaire et à titre d'exemple, pourrait expliquer à la fois l'effet sur l'inflammation et sur la stérilité des souris KO mâles. Les modifications cellulaires profondes peuvent conduire la cellule immunitaire à diverger vers un phénotype tolérant.

L'étude de l'interactome nous a permis d'identifier les systèmes concernés par la protéine GILZ. Il met également en évidence la différence entre deux notions "l'effet de GILZ sur l'inflammation" et "le rôle de GILZ dans la cellule et ses conséquences sur l'inflammation". Si l'effet de GILZ sur l'inflammation semble établi, et renforcé par notre étude, son rôle dans une cellule ne l'est pas.

Dans le noyau, GILZ semble jouer un rôle dans le contrôle moléculaire de la transcription. Cette hypothèse devra être confirmée par une localisation de son éventuelle fixation à l'ADN dans les macrophages et par une analyse transcriptomique comparative. Dans le cytosol, les fonctions sont plus éparpillées et difficilement organisables autour d'un seul faisceau cohérent de fonctions.

D'un point de vue général, et pour aller plus loin dans la compréhension de GILZ, il semble donc essentiel de connaître les modifications induites par cette protéine au niveau cellulaire notamment en termes métaboliques et transcriptomiques. En combinaison avec les données de l'interactome et de la littérature, ces informations pourraient expliquer son rôle d'un point de vue global pour permettre une éventuelle application thérapeutique.

Bibliographie

- 1 Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428-435, doi:10.1038/nature07201 (2008).
- 2 Elie, M. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. *Masson* (1892).
- 3 Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723-737, doi:10.1038/nri3073 (2011).
- 4 Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**, 173-182, doi:10.1038/nri1785 (2006).
- 5 Litman, G. W., Rast, J. P. & Fugmann, S. D. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **10**, 543-553, doi:10.1038/nri2807 (2010).
- 6 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **13**, 862-874, doi:10.1038/nri3552 (2013).
- 7 Bosmann, M. & Ward, P. A. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* **34**, 129-136, doi:10.1016/j.it.2012.09.004 (2013).
- 8 van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* **128**, 415-435 (1968).
- 9 Breslin, W. L., Strohacker, K., Carpenter, K. C., Haviland, D. L. & McFarlin, B. K. Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115. *J Immunol Methods* **390**, 1-8, doi:10.1016/j.jim.2011.03.005 (2013).
- 10 Alder, J. K. *et al.* Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *J Immunol* **180**, 5645-5652 (2008).
- 11 Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. & Singh, H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573-1577 (1994).
- 12 Tsujimura, H., Nagamura-Inoue, T., Tamura, T. & Ozato, K. IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor-8 guides bone marrow progenitor cells toward the macrophage lineage. *J Immunol* **169**, 1261-1269 (2002).
- 13 Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* **20**, 4106-4114 (2000).
- 14 Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82 (2003).
- 15 O'Dea, K. P., Dokpesi, J. O., Tatham, K. C., Wilson, M. R. & Takata, M. Regulation of monocyte subset proinflammatory responses within the lung microvasculature by the p38 MAPK/MK2 pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **301**, L812-821, doi:10.1152/ajplung.00092.2011 (2011).
- 16 Newson, J. *et al.* Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood* **124**, 1748-1764, doi:10.1182/blood-2014-03-562710 (2014).
- 17 Ziegler-Heitbrock, H. W. *et al.* Small (CD14+/CD16+) monocytes and regular monocytes in human blood. *Pathobiology* **59**, 127-130 (1991).

- 18 Ziegler-Heitbrock, H. W., Passlick, B. & Flieger, D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma* **7**, 521-527 (1988).
- 19 Weber, C. *et al.* Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* **67**, 699-704 (2000).
- 20 Ziegler-Heitbrock, H. W. *et al.* Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* **79**, 503-511 (1992).
- 21 Mukherjee, R. *et al.* Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* **5**, 13886, doi:10.1038/srep13886 (2015).
- 22 Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666-670, doi:10.1126/science.1142883 (2007).
- 23 Sugimoto, C. *et al.* Differentiation Kinetics of Blood Monocytes and Dendritic Cells in Macaques: Insights to Understanding Human Myeloid Cell Development. *J Immunol*, doi:10.4049/jimmunol.1500522 (2015).
- 24 Yona, S. *et al.* Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79-91, doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001 (2013).
- 25 Varol, C., Yona, S. & Jung, S. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol* **87**, 30-38, doi:10.1038/icb.2008.90 (2009).
- 26 El-Nefiawy, N., Abdel-Hakim, K., Yamashita, A. & Kanayama, N. Embryonic macrophages of early rat yolk sac: Immunohistochemistry and ultrastructure with reference to endodermal cell layer. *Immunol Cell Biol* **80**, 441-447, doi:10.1046/j.1440-1711.2002.01109.x (2002).
- 27 Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F. M. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* **10**, 1538-1543, doi:10.1038/nn2014 (2007).
- 28 Ginhoux, F. & Prinz, M. Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, doi:10.1101/cshperspect.a020537 (2015).
- 29 Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841-845, doi:10.1126/science.1194637 (2010).
- 30 Cain, D. W. *et al.* Identification of a tissue-specific, C/EBPbeta-dependent pathway of differentiation for murine peritoneal macrophages. *J Immunol* **191**, 4665-4675, doi:10.4049/jimmunol.1300581 (2013).
- 31 Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792-804, doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004 (2013).
- 32 Jenkins, S. J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* **332**, 1284-1288, doi:10.1126/science.1204351 (2011).
- 33 Merad, M. *et al.* Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* **3**, 1135-1141, doi:10.1038/ni852 (2002).
- 34 Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol* **15**, 929-937, doi:10.1038/ni.2967 (2014).

- 35 Cassado Ados, A., D'Imperio Lima, M. R. & Bortoluci, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol* **6**, 225, doi:10.3389/fimmu.2015.00225 (2015).
- 36 Rosas, M., Thomas, B., Stacey, M., Gordon, S. & Taylor, P. R. The myeloid 7/4-antigen defines recently generated inflammatory macrophages and is synonymous with Ly-6B. *J Leukoc Biol* **88**, 169-180, doi:10.1189/jlb.0809548 (2010).
- 37 Ghosn, E. E. *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2568-2573, doi:10.1073/pnas.0915000107 (2010).
- 38 Kopf, M., Schneider, C. & Nobs, S. P. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat Immunol* **16**, 36-44, doi:10.1038/ni.3052 (2015).
- 39 Zhang, X., Goncalves, R. & Mosser, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 14**, Unit 14 11, doi:10.1002/0471142735.im1401s83 (2008).
- 40 Hussell, T. & Bell, T. J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* **14**, 81-93, doi:10.1038/nri3600 (2014).
- 41 Maus, U. A. *et al.* Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**, 227-235, doi:10.1165/rcmb.2005-0241OC (2006).
- 42 Joh, E. H., Gu, W. & Kim, D. H. Echinocystic acid ameliorates lung inflammation in mice and alveolar macrophages by inhibiting the binding of LPS to TLR4 in NF-kappaB and MAPK pathways. *Biochem Pharmacol* **84**, 331-340, doi:10.1016/j.bcp.2012.04.020 (2012).
- 43 Barth, M. W., Hendrzak, J. A., Melnicoff, M. J. & Morahan, P. S. Review of the macrophage disappearance reaction. *J Leukoc Biol* **57**, 361-367 (1995).
- 44 Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* **14**, 986-995, doi:10.1038/ni.2705 (2013).
- 45 Underhill, D. M. & Goodridge, H. S. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol* **12**, 492-502, doi:10.1038/nri3244 (2012).
- 46 Jain, V. *et al.* Phagocytosis and intracellular killing of MD-2 opsonized gram-negative bacteria depend on TLR4 signaling. *Blood* **111**, 4637-4645, doi:10.1182/blood-2007-11-126862 (2008).
- 47 Flannagan, R. S., Cosio, G. & Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**, 355-366, doi:10.1038/nrmicro2128 (2009).
- 48 Stuart, L. M. & Ezekowitz, R. A. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol* **8**, 131-141, doi:10.1038/nri2240 (2008).
- 49 Balic, A. *et al.* Visualisation of chicken macrophages using transgenic reporter genes: insights into the development of the avian macrophage lineage. *Development* **141**, 3255-3265, doi:10.1242/dev.105593 (2014).
- 50 Manolagas, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**, 115-137, doi:10.1210/edrv.21.2.0395 (2000).
- 51 Manolagas, S. C., O'Brien, C. A. & Almeida, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **9**, 699-712, doi:10.1038/nrendo.2013.179 (2013).

- 52 Murthy, R. K., Morrow, P. K. & Theriault, R. L. Bone biology and the role of the RANK ligand pathway. *Oncology (Williston Park)* **23**, 9-15 (2009).
- 53 Yoshida, H. *et al.* The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* **345**, 442-444, doi:10.1038/345442a0 (1990).
- 54 Van Wesenbeeck, L. *et al.* The osteopetrotic mutation toothless (tl) is a loss-of-function frameshift mutation in the rat *Csf1* gene: Evidence of a crucial role for CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14303-14308, doi:10.1073/pnas.202332999 (2002).
- 55 Pollard, J. W. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 259-270, doi:10.1038/nri2528 (2009).
- 56 Aderem, A. Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis* **187 Suppl 2**, S340-S345, doi:10.1086/374747 (2003).
- 57 Bernhard, C. A., Ried, C., Kochanek, S. & Brocker, T. CD169+ macrophages are sufficient for priming of CTLs with specificities left out by cross-priming dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5461-5466, doi:10.1073/pnas.1423356112 (2015).
- 58 Pozzi, L. A., Maciaszek, J. W. & Rock, K. L. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J Immunol* **175**, 2071-2081 (2005).
- 59 Moser, M. Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells in vivo. *Immunobiology* **204**, 551-557, doi:10.1078/0171-2985-00092 (2001).
- 60 Hume, D. A. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* **181**, 5829-5835 (2008).
- 61 Sasindran, S. J. & Torrelles, J. B. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Front Microbiol* **2**, 2, doi:10.3389/fmicb.2011.00002 (2011).
- 62 Lubberts, E. & van den Berg, W. B. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *Adv Exp Med Biol* **520**, 194-202 (2003).
- 63 Sonnenberg, G. F. & Artis, D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med* **21**, 698-708, doi:10.1038/nm.3892 (2015).
- 64 Freudenberg, M. A. & Galanos, C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect Immun* **56**, 1352-1357 (1988).
- 65 Lee, B., Qiao, L., Kinney, B., Feng, G. S. & Shao, J. Macrophage depletion disrupts immune balance and energy homeostasis. *PLoS One* **9**, e99575, doi:10.1371/journal.pone.0099575 (2014).
- 66 Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**, 1-5, doi:10.1189/jlb.0306164 (2007).
- 67 Klune, J. R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T. R. & Tsung, A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* **14**, 476-484, doi:10.2119/2008-00034.Klune (2008).
- 68 Tsung, A. *et al.* HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med* **204**, 2913-2923, doi:10.1084/jem.20070247 (2007).
- 69 Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).

- 70 Wenger, Y., Buzgariu, W., Reiter, S. & Galliot, B. Injury-induced immune responses in Hydra. *Semin Immunol* **26**, 277-294, doi:10.1016/j.smim.2014.06.004 (2014).
- 71 Wenger, Y. & Galliot, B. RNAseq versus genome-predicted transcriptomes: a large population of novel transcripts identified in an Illumina-454 Hydra transcriptome. *BMC Genomics* **14**, 204, doi:10.1186/1471-2164-14-204 (2013).
- 72 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397, doi:10.1038/41131 (1997).
- 73 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
- 74 Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* **5**, 461, doi:10.3389/fimmu.2014.00461 (2014).
- 75 Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511, doi:10.1038/nri1391 (2004).
- 76 Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M. & Bryant, C. E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* **14**, 546-558, doi:10.1038/nri3713 (2014).
- 77 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384, doi:10.1038/ni.1863 (2010).
- 78 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801, doi:10.1016/j.cell.2006.02.015 (2006).
- 79 Morrison, D. K. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a011254 (2012).
- 80 Wen, A. Y., Sakamoto, K. M. & Miller, L. S. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* **185**, 6413-6419, doi:10.4049/jimmunol.1001829 (2010).
- 81 Myers, M. J., Ghildyal, N. & Schook, L. B. Endotoxin and interferon-gamma differentially regulate the transcriptional levels of proto-oncogenes and cytokine genes during the differentiation of colony-stimulating factor type-1-derived macrophages. *Immunology* **85**, 318-324 (1995).
- 82 Akira, S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* **278**, 38105-38108, doi:10.1074/jbc.R300028200 (2003).
- 83 McFarlane, S. M. *et al.* Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett* **515**, 119-126 (2002).
- 84 Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E. & Baltimore, D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* **309**, 1854-1857, doi:10.1126/science.1112304 (2005).
- 85 Han, S. J. *et al.* Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Biol Chem* **277**, 44715-44721, doi:10.1074/jbc.M202524200 (2002).
- 86 Mackaness, G. B. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* **116**, 381-406 (1962).
- 87 Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E. & Rubin, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* **158**, 670-689 (1983).
- 88 Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* **176**, 287-292 (1992).

- 89 Doyle, A. G. *et al.* Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol* **24**, 1441-1445, doi:10.1002/eji.1830240630 (1994).
- 90 Chen, F. *et al.* An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat Med* **18**, 260-266, doi:10.1038/nm.2628 (2012).
- 91 Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* **5**, 491, doi:10.3389/fimmu.2014.00491 (2014).
- 92 Roszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* **2015**, 816460, doi:10.1155/2015/816460 (2015).
- 93 Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14-20, doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008 (2014).
- 94 Schroder, K. *et al.* Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E944-953, doi:10.1073/pnas.1110156109 (2012).
- 95 Reynolds, G. & Haniffa, M. Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species? *Front Immunol* **6**, 330, doi:10.3389/fimmu.2015.00330 (2015).
- 96 Derlindati, E. *et al.* Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation? *PLoS One* **10**, e0119751, doi:10.1371/journal.pone.0119751 (2015).
- 97 Varin, A., Mukhopadhyay, S., Herbein, G. & Gordon, S. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. *Blood* **115**, 353-362, doi:10.1182/blood-2009-08-236711 (2010).
- 98 Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-969, doi:10.1038/nri2448 (2008).
- 99 Fitzgerald, K. A. *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**, 1043-1055, doi:10.1084/jem.20031023 (2003).
- 100 Park, S. H., Park-Min, K. H., Chen, J., Hu, X. & Ivashkiv, L. B. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nat Immunol* **12**, 607-615, doi:10.1038/ni.2043 (2011).
- 101 Foster, S. L., Hargreaves, D. C. & Medzhitov, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* **447**, 972-978, doi:10.1038/nature05836 (2007).
- 102 Borzecka, K., Plociennikowska, A., Bjorkelund, H., Sobota, A. & Kwiatkowska, K. CD14 mediates binding of high doses of LPS but is dispensable for TNF-alpha production. *Mediators Inflamm* **2013**, 824919, doi:10.1155/2013/824919 (2013).
- 103 Zhang, Z. *et al.* Ferroportin1 deficiency in mouse macrophages impairs iron homeostasis and inflammatory responses. *Blood* **118**, 1912-1922, doi:10.1182/blood-2011-01-330324 (2011).
- 104 Litvak, V. *et al.* Function of C/EBPdelta in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. *Nat Immunol* **10**, 437-443, doi:10.1038/ni.1721 (2009).

- 105 Gilchrist, M. *et al.* Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator
of Toll-like receptor 4. *Nature* **441**, 173-178, doi:10.1038/nature04768 (2006).
- 106 Porta, C. *et al.* Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related
processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**,
14978-14983, doi:10.1073/pnas.0809784106 (2009).
- 107 Kobayashi, K. *et al.* IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*
110, 191-202 (2002).
- 108 Rauh, M. J. *et al.* SHIP represses the generation of alternatively activated
macrophages. *Immunity* **23**, 361-374, doi:10.1016/j.immuni.2005.09.003 (2005).
- 109 Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules
and clinical significance. *Trends Immunol* **30**, 475-487, doi:10.1016/j.it.2009.07.009
(2009).
- 110 Nahid, M. A., Satoh, M. & Chan, E. K. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin
tolerance. *Cell Mol Immunol* **8**, 388-403, doi:10.1038/cmi.2011.26 (2011).
- 111 Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. & Baltimore, D. NF-kappaB-dependent
induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate
immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12481-12486,
doi:10.1073/pnas.0605298103 (2006).
- 112 Nahid, M. A., Pauley, K. M., Satoh, M. & Chan, E. K. miR-146a is critical for endotoxin-
induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem* **284**, 34590-
34599, doi:10.1074/jbc.M109.056317 (2009).
- 113 Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O'Neill, L. A. Negative regulation of toll-like receptor-
mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* **5**, 446-458, doi:10.1038/nri1630
(2005).
- 114 Ruland, J. Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses. *Nat*
Immunol **12**, 709-714, doi:10.1038/ni.2055 (2011).
- 115 Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M. & Schneider, D. S. A specific primed
immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog* **3**, e26,
doi:10.1371/journal.ppat.0030026 (2007).
- 116 Durrant, W. E. & Dong, X. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**,
185-209, doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421 (2004).
- 117 Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R. & Barillas-Mury, C. Hemocyte
differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes.
Science **329**, 1353-1355, doi:10.1126/science.1190689 (2010).
- 118 Saeed, S. *et al.* Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation
and trained innate immunity. *Science* **345**, 1251086, doi:10.1126/science.1251086
(2014).
- 119 Blok, B. A., Arts, R. J., van Crevel, R., Benn, C. S. & Netea, M. G. Trained innate
immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines.
J Leukoc Biol **98**, 347-356, doi:10.1189/jlb.5RI0315-096R (2015).
- 120 Kox, M. *et al.* Differential ex vivo and in vivo endotoxin tolerance kinetics following
human endotoxemia. *Crit Care Med* **39**, 1866-1870,
doi:10.1097/CCM.0b013e3182190d5d (2011).
- 121 Quintin, J. *et al.* *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via
functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* **12**, 223-232,
doi:10.1016/j.chom.2012.06.006 (2012).

- 122 Dangl, J. L. & Jones, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833, doi:10.1038/35081161 (2001).
- 123 Kleinnijenhuis, J. *et al.* Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 17537-17542, doi:10.1073/pnas.1202870109 (2012).
- 124 Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* **11**, 785-797, doi:10.1038/ni.1923 (2010).
- 125 Sarma, J. V. & Ward, P. A. The complement system. *Cell Tissue Res* **343**, 227-235, doi:10.1007/s00441-010-1034-0 (2011).
- 126 Bohlon, S. S., O'Conner, S. D., Hulsebus, H. J., Ho, M. M. & Fraser, D. A. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol* **5**, 402, doi:10.3389/fimmu.2014.00402 (2014).
- 127 Reid, R. R. *et al.* Endotoxin shock in antibody-deficient mice: unraveling the role of natural antibody and complement in the clearance of lipopolysaccharide. *J Immunol* **159**, 970-975 (1997).
- 128 Fischer, M. B. *et al.* Increased susceptibility to endotoxin shock in complement C3- and C4-deficient mice is corrected by C1 inhibitor replacement. *J Immunol* **159**, 976-982 (1997).
- 129 Lambris, J. D., Ricklin, D. & Geisbrecht, B. V. Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**, 132-142, doi:10.1038/nrmicro1824 (2008).
- 130 van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C. & Brown, E. J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* **9**, 2095-2102, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00981.x (2007).
- 131 Klos, A. *et al.* The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* **46**, 2753-2766, doi:10.1016/j.molimm.2009.04.027 (2009).
- 132 Wilken, H. C., Rogge, S., Gotze, O., Werfel, T. & Zwirner, J. Specific detection by flow cytometry of histidine-tagged ligands bound to their receptors using a tag-specific monoclonal antibody. *J Immunol Methods* **226**, 139-145 (1999).
- 133 Crass, T. *et al.* Expression cloning of the human C3a anaphylatoxin receptor (C3aR) from differentiated U-937 cells. *Eur J Immunol* **26**, 1944-1950, doi:10.1002/eji.1830260840 (1996).
- 134 Elsner, J., Oppermann, M., Czech, W. & Kapp, A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. *Blood* **83**, 3324-3331 (1994).
- 135 Fischer, W. H., Jagels, M. A. & Hugli, T. E. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J Immunol* **162**, 453-459 (1999).
- 136 Aksamit, R. R., Falk, W. & Leonard, E. J. Chemotaxis by mouse macrophage cell lines. *J Immunol* **126**, 2194-2199 (1981).
- 137 Golias, C., Charalabopoulos, A., Stagikas, D., Charalabopoulos, K. & Batistatou, A. The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. *Hippokratia* **11**, 124-128 (2007).
- 138 el-Lati, S. G., Dahinden, C. A. & Church, M. K. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol* **102**, 803-806 (1994).

- 139 Ebeigbe, A. B. & Talabi, O. O. Vascular Effects of Histamine. *Niger J Physiol Sci* **29**, 7-10 (2014).
- 140 Majno, G. & Palade, G. E. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* **11**, 571-605 (1961).
- 141 Clark, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 335-343, doi:10.1016/j.cytogfr.2007.04.002 (2007).
- 142 Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* **10**, 411-452, doi:10.1146/annurev.iy.10.040192.002211 (1992).
- 143 Howard, A. D. & Erickson, K. L. The induction and augmentation of macrophage tumoricidal responses by platelet-activating factor. *Cell Immunol* **164**, 105-112, doi:10.1006/cimm.1995.1148 (1995).
- 144 McLoughlin, R. M. *et al.* IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9589-9594, doi:10.1073/pnas.0501794102 (2005).
- 145 Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-234, doi:10.1038/nature04754 (2006).
- 146 Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238, doi:10.1038/nature04753 (2006).
- 147 Bode, J. G., Albrecht, U., Haussinger, D., Heinrich, P. C. & Schaper, F. Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol* **91**, 496-505, doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.008 (2012).
- 148 Castell, J. V. *et al.* Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* **242**, 237-239 (1989).
- 149 Pepys, M. B. & Hirschfield, G. M. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* **111**, 1805-1812, doi:10.1172/JCI18921 (2003).
- 150 Chignard, M. & Balloy, V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1083-1090 (2000).
- 151 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 152 Nathan, C. F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* **80**, 1550-1560, doi:10.1172/JCI113241 (1987).
- 153 Henderson, R. B., Hobbs, J. A., Mathies, M. & Hogg, N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* **102**, 328-335, doi:10.1182/blood-2002-10-3228 (2003).
- 154 O'Connell, P. A., Surette, A. P., Liwski, R. S., Svenningsson, P. & Waisman, D. M. S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood* **116**, 1136-1146, doi:10.1182/blood-2010-01-264754 (2010).
- 155 Serhan, C. N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* **21**, 325-332, doi:10.1096/fj.06-7227rev (2007).
- 156 Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* **31**, 318-324, doi:10.1016/j.it.2010.05.006 (2010).

- 157 Brunn, G. J. & Platt, J. L. The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends Mol Med* **12**, 10-16, doi:10.1016/j.molmed.2005.11.002 (2006).
- 158 Vaishnavi, C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. *Indian J Med Microbiol* **31**, 334-342, doi:10.4103/0255-0857.118870 (2013).
- 159 Perel, A. Bench-to-bedside review: the initial hemodynamic resuscitation of the septic patient according to Surviving Sepsis Campaign guidelines--does one size fit all? *Crit Care* **12**, 223, doi:10.1186/cc6979 (2008).
- 160 Simmons, J. P. & Wohl, J. S. in *Small Animal Critical Care Medicine* (ed Deborah C. SilversteinKate Hopper) 27-30 (W.B. Saunders, 2009).
- 161 Ozier, Y. *et al.* Two-dimensional echocardiographic demonstration of acute myocardial depression in septic shock. *Crit Care Med* **12**, 596-599 (1984).
- 162 de Laforcade, A. M. & Silverstein, D. C. in *Small Animal Critical Care Medicine* (ed Deborah C. SilversteinKate Hopper) 41-45 (W.B. Saunders, 2009).
- 163 Wada, H., Matsumoto, T. & Yamashita, Y. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *J Intensive Care* **2**, 15, doi:10.1186/2052-0492-2-15 (2014).
- 164 Satran, R. & Almog, Y. The coagulopathy of sepsis: pathophysiology and management. *Isr Med Assoc J* **5**, 516-520 (2003).
- 165 Remick, D. G. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol* **170**, 1435-1444, doi:10.2353/ajpath.2007.060872 (2007).
- 166 Bakker, J., Nijsten, M. W. & Jansen, T. C. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. *Ann Intensive Care* **3**, 12, doi:10.1186/2110-5820-3-12 (2013).
- 167 Vary, T. C. Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: effects on plasma lactate. *Shock* **6**, 89-94 (1996).
- 168 Losser, M. R., Damoiseil, C. & Payen, D. Bench-to-bedside review: Glucose and stress conditions in the intensive care unit. *Crit Care* **14**, 231, doi:10.1186/cc9100 (2010).
- 169 Bakker, J., Gris, P., Coffernils, M., Kahn, R. J. & Vincent, J. L. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *Am J Surg* **171**, 221-226, doi:10.1016/S0002-9610(97)89552-9 (1996).
- 170 Levraut, J. *et al.* Mild hyperlactatemia in stable septic patients is due to impaired lactate clearance rather than overproduction. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 1021-1026, doi:10.1164/ajrccm.157.4.9705037 (1998).
- 171 Jansen, T. C., van Bommel, J. & Bakker, J. Blood lactate monitoring in critically ill patients: a systematic health technology assessment. *Crit Care Med* **37**, 2827-2839, doi:10.1097/CCM.0b013e3181a98899 (2009).
- 172 Chertoff, J., Chisum, M., Garcia, B. & Lascano, J. Lactate kinetics in sepsis and septic shock: a review of the literature and rationale for further research. *J Intensive Care* **3**, 39, doi:10.1186/s40560-015-0105-4 (2015).
- 173 Zhou, J. *et al.* Epidemiology and outcome of severe sepsis and septic shock in intensive care units in mainland China. *PLoS One* **9**, e107181, doi:10.1371/journal.pone.0107181 (2014).
- 174 Mikkelsen, M. E. *et al.* The epidemiology of acute respiratory distress syndrome in patients presenting to the emergency department with severe sepsis. *Shock* **40**, 375-381, doi:10.1097/SHK.0b013e3182a64682 (2013).
- 175 Matthay, M. A., Ware, L. B. & Zimmerman, G. A. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* **122**, 2731-2740, doi:10.1172/JCI60331 (2012).

- 176 Ware, L. B. & Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **342**, 1334-1349, doi:10.1056/NEJM200005043421806 (2000).
- 177 Bachofen, M. & Weibel, E. R. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* **116**, 589-615 (1977).
- 178 Marik, P. E. & Zaloga, G. P. Hypothermia and cytokines in septic shock. Norasept II Study Investigators. North American study of the safety and efficacy of murine monoclonal antibody to tumor necrosis factor for the treatment of septic shock. *Intensive Care Med* **26**, 716-721 (2000).
- 179 Vincent, J. L., Opal, S. M., Marshall, J. C. & Tracey, K. J. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* **381**, 774-775, doi:10.1016/S0140-6736(12)61815-7 (2013).
- 180 Landis, R. C. 20 Years On: Is It Time to Redefine the Systemic Inflammatory Response to Cardiothoracic Surgery? *J Extra Corpor Technol* **47**, 5-9 (2015).
- 181 Martin, G. S., Mannino, D. M. & Moss, M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* **34**, 15-21 (2006).
- 182 Annane, D. *et al.* Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* **288**, 862-871 (2002).
- 183 Le GALL, J. R. M., P. Quels scores pronostiques dans le sepsis ? *Réanimation* **11**, 85 (2002).
- 184 Lemeshow, S. & Le Gall, J. R. Modeling the severity of illness of ICU patients. A systems update. *JAMA* **272**, 1049-1055 (1994).
- 185 Vincent, J. L. *et al.* 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).
- 186 Nawroth, P. P. *et al.* Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med* **163**, 1363-1375 (1986).
- 187 Lv, S. *et al.* Anti-TNF-alpha therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *Int J Clin Pract* **68**, 520-528, doi:10.1111/ijcp.12382 (2014).
- 188 Moraes, L. A. *et al.* Ligand-specific glucocorticoid receptor activation in human platelets. *Blood* **106**, 4167-4175, doi:10.1182/blood-2005-04-1723 (2005).
- 189 Coutinho, A. E. & Chapman, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* **335**, 2-13, doi:10.1016/j.mce.2010.04.005 (2011).
- 190 Varga, G. *et al.* Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* **84**, 644-650, doi:10.1189/jlb.1107768 (2008).
- 191 Moran, J. L., Graham, P. L., Rockliff, S. & Bersten, A. D. Updating the evidence for the role of corticosteroids in severe sepsis and septic shock: a Bayesian meta-analytic perspective. *Crit Care* **14**, R134, doi:10.1186/cc9182 (2010).
- 192 Annane, D. *et al.* Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA* **301**, 2362-2375, doi:10.1001/jama.2009.815 (2009).
- 193 Minneci, P. C., Deans, K. J., Eichacker, P. Q. & Natanson, C. The effects of steroids during sepsis depend on dose and severity of illness: an updated meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* **15**, 308-318, doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02752.x (2009).

- 194 Sprung, C. L. *et al.* The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. A prospective, controlled study. *N Engl J Med* **311**, 1137-1143, doi:10.1056/NEJM198411031111801 (1984).
- 195 Bone, R. C. *et al.* A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* **317**, 653-658, doi:10.1056/NEJM198709103171101 (1987).
- 196 Ertel, W. *et al.* Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* **85**, 1341-1347 (1995).
- 197 Munoz, C. *et al.* Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* **88**, 1747-1754, doi:10.1172/JCI115493 (1991).
- 198 Landelle, C. *et al.* Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med* **36**, 1859-1866, doi:10.1007/s00134-010-1962-x (2010).
- 199 Monneret, G. *et al.* Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* **32**, 1175-1183, doi:10.1007/s00134-006-0204-8 (2006).
- 200 Kovach, M. A. & Standiford, T. J. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis* **25**, 321-327, doi:10.1097/QCO.0b013e3283528c9b (2012).
- 201 Li, C. H., Liu, J., An, M., Redmond, H. P. & Wang, J. H. Bacterial lipoprotein-induced tolerance is reversed by overexpression of IRAK-1. *Immunol Cell Biol* **90**, 314-320, doi:10.1038/icb.2011.37 (2012).
- 202 Matsushita, H. *et al.* Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells. *Int Immunol* **22**, 739-747, doi:10.1093/intimm/dxq062 (2010).
- 203 Wysocka, M. *et al.* IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J Immunol* **166**, 7504-7513 (2001).
- 204 Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E. & Libert, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* **19**, 198-208, doi:10.1016/j.tim.2011.01.001 (2011).
- 205 Hoshino, K. *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**, 3749-3752 (1999).
- 206 Coutinho, A., Forni, L., Melchers, F. & Watanabe, T. Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* **7**, 325-328, doi:10.1002/eji.1830070517 (1977).
- 207 Qureshi, S. T. *et al.* Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* **189**, 615-625 (1999).
- 208 Remick, D. G., Newcomb, D. E., Bolgos, G. L. & Call, D. R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* **13**, 110-116 (2000).
- 209 Copeland, S. *et al.* Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin Diagn Lab Immunol* **12**, 60-67, doi:10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005 (2005).
- 210 Schultz, M. J. & van der Poll, T. Animal and human models for sepsis. *Ann Med* **34**, 573-581 (2002).
- 211 Cross, A. S., Opal, S. M., Sadoff, J. C. & Gemski, P. Choice of bacteria in animal models of sepsis. *Infect Immun* **61**, 2741-2747 (1993).

- 212 Buras, J. A., Holzmann, B. & Sitkovsky, M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 854-865, doi:10.1038/nrd1854 (2005).
- 213 Zanetti, G. *et al.* Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor-alpha and to lipopolysaccharide. *J Immunol* **148**, 1890-1897 (1992).
- 214 Nemzek, J. A., Hugunin, K. M. & Opp, M. R. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med* **58**, 120-128 (2008).
- 215 Evans, G. F., Snyder, Y. M., Butler, L. D. & Zuckerman, S. H. Differential expression of interleukin-1 and tumor necrosis factor in murine septic shock models. *Circ Shock* **29**, 279-290 (1989).
- 216 Mahieu, T. *et al.* The wild-derived inbred mouse strain SPRET/Ei is resistant to LPS and defective in IFN-beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2292-2297, doi:10.1073/pnas.0510874103 (2006).
- 217 Jordan, J. M., Woods, M. E., Olano, J. & Walker, D. H. The absence of Toll-like receptor 4 signaling in C3H/HeJ mice predisposes them to overwhelming rickettsial infection and decreased protective Th1 responses. *Infect Immun* **76**, 3717-3724, doi:10.1128/IAI.00311-08 (2008).
- 218 Roy, M. F. & Malo, D. Genetic regulation of host responses to Salmonella infection in mice. *Genes Immun* **3**, 381-393, doi:10.1038/sj.gene.6363924 (2002).
- 219 Maier, S. *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* **21**, 505-511 (2004).
- 220 Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* **4**, 31-36, doi:10.1038/nprot.2008.214 (2009).
- 221 Cotroneo, T. M. *et al.* Effects of buprenorphine on a cecal ligation and puncture model in C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **51**, 357-365 (2012).
- 222 Walley, K. R., Lukacs, N. W., Standiford, T. J., Strieter, R. M. & Kunkel, S. L. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* **64**, 4733-4738 (1996).
- 223 Ebong, S. *et al.* Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun* **67**, 6603-6610 (1999).
- 224 Theodorakis, E. D., E;Tsatsanis, C;Georgopoulos, D;Vaporidi, K. Macrophage phenotype in sepsis immunosuppression. *Critical Care* **19** (2015).
- 225 Cao, J. *et al.* IL-27 controls sepsis-induced impairment of lung antibacterial host defence. *Thorax* **69**, 926-937, doi:10.1136/thoraxjnl-2014-205777 (2014).
- 226 Jung, E. *et al.* Cecal ligation and puncture followed by methicillin-resistant Staphylococcus aureus pneumonia increases mortality in mice and blunts production of local and systemic cytokines. *Shock* **37**, 85-94, doi:10.1097/SHK.0b013e3182360faf (2012).
- 227 Ashare, A. *et al.* Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L633-640, doi:10.1152/ajplung.00231.2004 (2005).
- 228 Bouazza, Y. *et al.* Comparative effects of recombinant human activated protein C and dexamethasone in experimental septic shock. *Intensive Care Med* **37**, 1857-1864, doi:10.1007/s00134-011-2327-9 (2011).

- 229 Sillard, R. *et al.* A novel 77-residue peptide from porcine brain contains a leucine-zipper motif and is recognized by an antiserum to delta-sleep-inducing peptide. *Eur J Biochem* **216**, 429-436 (1993).
- 230 Shibanuma, M., Kuroki, T. & Nose, K. Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors. *J Biol Chem* **267**, 10219-10224 (1992).
- 231 Vogel, P., Magert, H. J., Cieslak, A., Adermann, K. & Forssmann, W. G. hDIP--a potential transcriptional regulator related to murine TSC-22 and Drosophila shortsighted (shs)--is expressed in a large number of human tissues. *Biochim Biophys Acta* **1309**, 200-204 (1996).
- 232 Seidel, G. *et al.* Solution structure of porcine delta sleep-inducing peptide immunoreactive peptide A homolog of the shortsighted gene product. *J Biol Chem* **272**, 30918-30927 (1997).
- 233 D'Adamio, F. *et al.* A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* **7**, 803-812 (1997).
- 234 Cannarile, L. *et al.* Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell Death Differ* **8**, 201-203, doi:10.1038/sj.cdd.4400798 (2001).
- 235 Ayroldi, E. *et al.* Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* **98**, 743-753 (2001).
- 236 Berrebi, D. *et al.* Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* **101**, 729-738, doi:10.1182/blood-2002-02-0538 (2003).
- 237 Pinheiro, I. *et al.* LPS resistance of SPRET/Ei mice is mediated by Gilz, encoded by the Tsc22d3 gene on the X chromosome. *EMBO Mol Med* **5**, 456-470, doi:10.1002/emmm.201201683 (2013).
- 238 Canterini, S., Bosco, A., De Matteis, V., Mangia, F. & Fiorenza, M. T. THG-1pit moves to nucleus at the onset of cerebellar granule neurons apoptosis. *Mol Cell Neurosci* **40**, 249-257, doi:10.1016/j.mcn.2008.10.013 (2009).
- 239 Pepin, A. *et al.* [TSC-22D proteins: new regulators of cell homeostasis?]. *Med Sci (Paris)* **31**, 75-83, doi:10.1051/medsci/20153101016 (2015).
- 240 Asselin-Labat, M. L. *et al.* GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* **104**, 215-223, doi:10.1182/blood-2003-12-4295 (2004).
- 241 Asselin-Labat, M. L. *et al.* FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Mol Endocrinol* **19**, 1752-1764, doi:10.1210/me.2004-0206 (2005).
- 242 Koberle, M. *et al.* Yersinia enterocolitica YopT and Clostridium difficile toxin B induce expression of GILZ in epithelial cells. *PLoS One* **7**, e40730, doi:10.1371/journal.pone.0040730 (2012).
- 243 Latre de Late, P. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner. *J Biol Chem* **285**, 5594-5605, doi:10.1074/jbc.M109.068346 (2010).
- 244 Vinson, C. R., Sigler, P. B. & McKnight, S. L. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* **246**, 911-916 (1989).

- 245 Kester, H. A., Blanchetot, C., den Hertog, J., van der Saag, P. T. & van der Burg, B. Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *J Biol Chem* **274**, 27439-27447 (1999).
- 246 Huttlin, E. L. *et al.* The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* **162**, 425-440, doi:10.1016/j.cell.2015.06.043 (2015).
- 247 Di Marco, B. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* **35**, 517-528, doi:10.1093/nar/gkl1080 (2007).
- 248 Ayroldi, E. *et al.* GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest* **117**, 1605-1615, doi:10.1172/JCI30724 (2007).
- 249 Srinivasan, M. D., A. Keith. Proline Rich Motifs as Drug Targets in Immune Mediated Disorders. *International Journal of Peptides* **2012** (2012).
- 250 Srinivasan, R. & Rose, G. D. A physical basis for protein secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14258-14263 (1999).
- 251 Eddleston, J., Herschbach, J., Wagelie-Steffen, A. L., Christiansen, S. C. & Zuraw, B. L. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 115-122, doi:10.1016/j.jaci.2006.08.027 (2007).
- 252 Delfino, D. V. *et al.* Glucocorticoid-induced activation of caspase-8 protects the glucocorticoid-induced protein Gilz from proteasomal degradation and induces its binding to SUMO-1 in murine thymocytes. *Cell Death Differ* **18**, 183-190, doi:10.1038/cdd.2010.86 (2011).
- 253 Ayroldi, E. & Riccardi, C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* **23**, 3649-3658, doi:10.1096/fj.09-134684 (2009).
- 254 Godot, V. *et al.* Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells. *Allergy* **61**, 886-890, doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01065.x (2006).
- 255 Perez, S. A. *et al.* A potential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival. *Blood* **106**, 158-166, doi:10.1182/blood-2004-08-3232 (2005).
- 256 Gimble, J. M. *et al.* Delta sleep-inducing peptide and glucocorticoid-induced leucine zipper: potential links between circadian mechanisms and obesity? *Obes Rev* **10 Suppl 2**, 46-51, doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00661.x (2009).
- 257 Evang, J. A. *et al.* Different levels of various glucocorticoid-regulated genes in corticotroph adenomas. *Endocrine* **44**, 220-227, doi:10.1007/s12020-012-9871-0 (2013).
- 258 Yang, Y. H., Aeberli, D., Dacumos, A., Xue, J. R. & Morand, E. F. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *J Immunol* **183**, 1435-1445, doi:10.4049/jimmunol.0804000 (2009).
- 259 Muller, O. G. *et al.* Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1107-1115 (2003).

- 260 Whirlledge, S. & Cidlowski, J. A. Estradiol antagonism of glucocorticoid-induced GILZ expression in human uterine epithelial cells and murine uterus. *Endocrinology* **154**, 499-510, doi:10.1210/en.2012-1748 (2013).
- 261 Tynan, S. H., Lundeen, S. G. & Allan, G. F. Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol* **91**, 225-239, doi:10.1016/j.jsbmb.2004.05.002 (2004).
- 262 Cohen, N. *et al.* GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* **107**, 2037-2044, doi:10.1182/blood-2005-07-2760 (2006).
- 263 Zhang, X. H. *et al.* Chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps is associated with decreased expression of glucocorticoid-induced leucine zipper. *Clin Exp Allergy* **39**, 647-654, doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03198.x (2009).
- 264 Grugan, K. D., Ma, C., Singhal, S., Krett, N. L. & Rosen, S. T. Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma. *J Steroid Biochem Mol Biol* **110**, 244-254, doi:10.1016/j.jsbmb.2007.11.003 (2008).
- 265 Hoppstadter, J. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper is downregulated in human alveolar macrophages upon Toll-like receptor activation. *Eur J Immunol* **42**, 1282-1293, doi:10.1002/eji.201142081 (2012).
- 266 Nina Hachenthal, T. S., Petra Leidinger, Friedrich Grässer, Eckart Meese, Stefano Bruscoli, Carlo Riccardi, Alexandra K. Kiemer and Jessica Hoppstädter. Mechanisms of MyD88- and TRIF-dependent downregulation of the glucocorticoid induced leucine zipper (GILZ) in macrophages – mRNA destabilization vs. microRNAs. (2013).
- 267 Calmette, J. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper enhanced expression in dendritic cells is sufficient to drive regulatory T cells expansion in vivo. *J Immunol* **193**, 5863-5872, doi:10.4049/jimmunol.1400758 (2014).
- 268 Hoppstadter, J. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper: a critical factor in macrophage endotoxin tolerance. *J Immunol* **194**, 6057-6067, doi:10.4049/jimmunol.1403207 (2015).
- 269 Yang, N., Zhang, W. & Shi, X. M. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression. *J Cell Biochem* **103**, 1760-1771, doi:10.1002/jcb.21562 (2008).
- 270 Cheng, Q. *et al.* GILZ overexpression inhibits endothelial cell adhesive function through regulation of NF-kappaB and MAPK activity. *J Immunol* **191**, 424-433, doi:10.4049/jimmunol.1202662 (2013).
- 271 Jain, J., Valge-Archer, V. E. & Rao, A. Analysis of the AP-1 sites in the IL-2 promoter. *J Immunol* **148**, 1240-1250 (1992).
- 272 Coffey, P. *et al.* junB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene* **9**, 911-921 (1994).
- 273 Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**, 289-305 (2000).
- 274 Ayroldi, E. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol* **22**, 7929-7941 (2002).
- 275 Mittelstadt, P. R. & Ashwell, J. D. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* **276**, 29603-29610, doi:10.1074/jbc.M101522200 (2001).

- 276 Wang, C. *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351, doi:10.1038/35085597 (2001).
- 277 Waterfield, M. R., Zhang, M., Norman, L. P. & Sun, S. C. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol Cell* **11**, 685-694 (2003).
- 278 Aoki, M., Akiyama, T., Miyoshi, J. & Toyoshima, K. Identification and characterization of protein products of the cot oncogene with serine kinase activity. *Oncogene* **6**, 1515-1519 (1991).
- 279 Lu, H. T. *et al.* Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J* **18**, 1845-1857, doi:10.1093/emboj/18.7.1845 (1999).
- 280 Dumitru, C. D. *et al.* TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**, 1071-1083 (2000).
- 281 Fan, H. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor inhibits the antiinflammatory effects of glucocorticoids via glucocorticoid-induced leucine zipper. *Arthritis Rheumatol* **66**, 2059-2070, doi:10.1002/art.38689 (2014).
- 282 Hsiao, Y. W. *et al.* CCAAT/enhancer binding protein delta in macrophages contributes to immunosuppression and inhibits phagocytosis in nasopharyngeal carcinoma. *Sci Signal* **6**, ra59, doi:10.1126/scisignal.2003648 (2013).
- 283 Odegaard, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116-1120, doi:10.1038/nature05894 (2007).
- 284 Ruffell, D. *et al.* A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17475-17480, doi:10.1073/pnas.0908641106 (2009).
- 285 Bouhrel, M. A. *et al.* PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* **6**, 137-143, doi:10.1016/j.cmet.2007.06.010 (2007).
- 286 Chen, Y. *et al.* Isoniazid suppresses antioxidant response element activities and impairs adipogenesis in mouse and human preadipocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **273**, 435-441, doi:10.1016/j.taap.2013.10.005 (2013).
- 287 Zhang, W., Yang, N. & Shi, X. M. Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *J Biol Chem* **283**, 4723-4729, doi:10.1074/jbc.M704147200 (2008).
- 288 Pan, G. *et al.* Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in bone acquisition. *J Biol Chem* **289**, 19373-19382, doi:10.1074/jbc.M113.535237 (2014).
- 289 Shi, X. *et al.* A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO Rep* **4**, 374-380, doi:10.1038/sj.embor.embor805 (2003).
- 290 Bruscoli, S. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *J Biol Chem* **285**, 10385-10396, doi:10.1074/jbc.M109.070136 (2010).
- 291 Yosef, N. *et al.* Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* **496**, 461-468, doi:10.1038/nature11981 (2013).
- 292 Luz-Crawford, P. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper governs the therapeutic potential of mesenchymal stem cells by inducing a switch from pathogenic to

- regulatory Th17 cells in a mouse model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol* **67**, 1514-1524, doi:10.1002/art.39069 (2015).
- 293 Jones, S. A. *et al.* GILZ regulates Th17 responses and restrains IL-17-mediated skin inflammation. *J Autoimmun* **61**, 73-80, doi:10.1016/j.jaut.2015.05.010 (2015).
- 294 Majewski, M. *et al.* Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res* **59**, 2815-2819 (1999).
- 295 Luo, Y. *et al.* Isorhamnetin attenuates atherosclerosis by inhibiting macrophage apoptosis via PI3K/AKT activation and HO-1 induction. *PLoS One* **10**, e0120259, doi:10.1371/journal.pone.0120259 (2015).
- 296 Maiese, K. FoxO proteins in the nervous system. *Anal Cell Pathol (Amst)* **2015**, 569392, doi:10.1155/2015/569392 (2015).
- 297 Reedquist, K. A., Ludikhuizen, J. & Tak, P. P. Phosphoinositide 3-kinase signalling and FoxO transcription factors in rheumatoid arthritis. *Biochem Soc Trans* **34**, 727-730, doi:10.1042/BST0340727 (2006).
- 298 Srinivasan, M., Blackburn, C. & Lahiri, D. K. Functional characterization of a competitive peptide antagonist of p65 in human macrophage-like cells suggests therapeutic potential for chronic inflammation. *Drug Des Devel Ther* **8**, 2409-2421, doi:10.2147/DDDT.S59722 (2014).
- 299 Suarez, P. E. *et al.* The glucocorticoid-induced leucine zipper (gilz/Tsc22d3-2) gene locus plays a crucial role in male fertility. *Mol Endocrinol* **26**, 1000-1013, doi:10.1210/me.2011-1249 (2012).
- 300 Bruscoli, S. *et al.* Long glucocorticoid-induced leucine zipper (L-GILZ) protein interacts with ras protein pathway and contributes to spermatogenesis control. *J Biol Chem* **287**, 1242-1251, doi:10.1074/jbc.M111.316372 (2012).
- 301 Ngo, D. *et al.* Divergent effects of endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models of inflammation and arthritis. *Arthritis Rheum* **65**, 1203-1212, doi:10.1002/art.37858 (2013).
- 302 Beaulieu, E. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper is an endogenous antiinflammatory mediator in arthritis. *Arthritis Rheum* **62**, 2651-2661, doi:10.1002/art.27566 (2010).
- 303 Van den Bossche, J., Neele, A. E., Hoeksema, M. A. & de Winther, M. P. Macrophage polarization: the epigenetic point of view. *Curr Opin Lipidol* **25**, 367-373, doi:10.1097/MOL.000000000000109 (2014).
- 304 Campeau, E. *et al.* A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* **4**, e6529, doi:10.1371/journal.pone.0006529 (2009).
- 305 Yatim, A. *et al.* NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function. *Mol Cell* **48**, 445-458, doi:10.1016/j.molcel.2012.08.022 (2012).
- 306 Mellacheruvu, D. *et al.* The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods* **10**, 730-736, doi:10.1038/nmeth.2557 (2013).
- 307 Warner, N. *et al.* A genome-wide siRNA screen reveals positive and negative regulators of the NOD2 and NF-kappaB signaling pathways. *Sci Signal* **6**, rs3, doi:10.1126/scisignal.2003305 (2013).
- 308 Warner, N., Burberry, A., Pliakas, M., McDonald, C. & Nunez, G. A genome-wide small interfering RNA (siRNA) screen reveals nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-

- independent regulators of NOD2-induced interleukin-8 (IL-8) secretion. *J Biol Chem* **289**, 28213-28224, doi:10.1074/jbc.M114.574756 (2014).
- 309 Gewurz, B. E. *et al.* Genome-wide siRNA screen for mediators of NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 2467-2472, doi:10.1073/pnas.1120542109 (2012).
- 310 Parnas, O. *et al.* A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks. *Cell* **162**, 675-686, doi:10.1016/j.cell.2015.06.059 (2015).
- 311 Jianxin, W. *et al.* ClusterViz: A Cytoscape APP for Cluster Analysis of Biological Network. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* **12**, 815-822, doi:10.1109/TCBB.2014.2361348 (2015).
- 312 Lopes, C. T. *et al.* Cytoscape Web: an interactive web-based network browser. *Bioinformatics* **26**, 2347-2348, doi:10.1093/bioinformatics/btq430 (2010).
- 313 Sawa, A., Khan, A. A., Hester, L. D. & Snyder, S. H. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11669-11674 (1997).
- 314 Sirover, M. A. Induction of the DNA repair enzyme uracil-DNA glycosylase in stimulated human lymphocytes. *Cancer Res* **39**, 2090-2095 (1979).
- 315 Zheng, L., Roeder, R. G. & Luo, Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**, 255-266 (2003).
- 316 Brohee, S. & van Helden, J. Evaluation of clustering algorithms for protein-protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* **7**, 488, doi:10.1186/1471-2105-7-488 (2006).
- 317 Lan, F., Nottke, A. C. & Shi, Y. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 316-325, doi:10.1016/j.ceb.2008.03.004 (2008).
- 318 Haas, T. L. *et al.* Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell* **36**, 831-844, doi:10.1016/j.molcel.2009.10.013 (2009).
- 319 Choi, S. J. *et al.* Tsc-22 enhances TGF-beta signaling by associating with Smad4 and induces erythroid cell differentiation. *Mol Cell Biochem* **271**, 23-28 (2005).
- 320 Wen, M. *et al.* Stk38 protein kinase preferentially inhibits TLR9-activated inflammatory responses by promoting MEKK2 ubiquitination in macrophages. *Nat Commun* **6**, 7167, doi:10.1038/ncomms8167 (2015).
- 321 Eames, H. L. *et al.* KAP1/TRIM28: an inhibitor of IRF5 function in inflammatory macrophages. *Immunobiology* **217**, 1315-1324, doi:10.1016/j.imbio.2012.07.026 (2012).
- 322 Kakar, R., Kautz, B. & Eklund, E. A. JAK2 is necessary and sufficient for interferon-gamma-induced transcription of the gene encoding gp91PHOX. *J Leukoc Biol* **77**, 120-127, doi:10.1189/jlb.0704429 (2005).
- 323 Pena, G., Cai, B., Deitch, E. A. & Ulloa, L. JAK2 inhibition prevents innate immune responses and rescues animals from sepsis. *J Mol Med (Berl)* **88**, 851-859, doi:10.1007/s00109-010-0628-z (2010).
- 324 Davies, L. C. *et al.* A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol* **41**, 2155-2164, doi:10.1002/eji.201141817 (2011).
- 325 Saraiva, M. & O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* **10**, 170-181, doi:10.1038/nri2711 (2010).

- 326 Hart, M. L., Mosier, D. A. & Chapes, S. K. Toll-like receptor 4-positive macrophages protect mice from *Pasteurella pneumotropica*-induced pneumonia. *Infect Immun* **71**, 663-670 (2003).
- 327 Serafini, N. *et al.* The TRPM4 channel controls monocyte and macrophage, but not neutrophil, function for survival in sepsis. *J Immunol* **189**, 3689-3699, doi:10.4049/jimmunol.1102969 (2012).
- 328 Howard, M., Muchamuel, T., Andrade, S. & Menon, S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* **177**, 1205-1208 (1993).
- 329 Amura, C. R., Silverstein, R. & Morrison, D. C. Mechanisms involved in the pathogenesis of sepsis are not necessarily reflected by in vitro cell activation studies. *Infect Immun* **66**, 5372-5378 (1998).
- 330 Okusawa, S., Gelfand, J. A., Ikejima, T., Connolly, R. J. & Dinarello, C. A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* **81**, 1162-1172, doi:10.1172/JCI113431 (1988).
- 331 Tracey, K. J. *et al.* Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* **234**, 470-474 (1986).
- 332 Cavillon, J. M. & Adib-Conquy, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* **10**, 233, doi:10.1186/cc5055 (2006).
- 333 Xiong, Y. & Medvedev, A. E. Induction of endotoxin tolerance in vivo inhibits activation of IRAK4 and increases negative regulators IRAK-M, SHIP-1, and A20. *J Leukoc Biol* **90**, 1141-1148, doi:10.1189/jlb.0611273 (2011).
- 334 Fong, Y. *et al.* Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL-6 in man. *J Immunol* **142**, 2321-2324 (1989).
- 335 Marchant, A. *et al.* Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet* **343**, 707-708 (1994).
- 336 Trinkle-Mulcahy, L. *et al.* Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J Cell Biol* **183**, 223-239, doi:10.1083/jcb.200805092 (2008).
- 337 Nakatani, Y. & Ogryzko, V. Immunoaffinity purification of mammalian protein complexes. *Methods Enzymol* **370**, 430-444, doi:10.1016/S0076-6879(03)70037-8 (2003).
- 338 Nesvizhskii, A. I. A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. *J Proteomics* **73**, 2092-2123, doi:10.1016/j.jprot.2010.08.009 (2010).
- 339 Nesvizhskii, A. I. Computational and informatics strategies for identification of specific protein interaction partners in affinity purification mass spectrometry experiments. *Proteomics* **12**, 1639-1655, doi:10.1002/pmic.201100537 (2012).
- 340 Moon, G. *et al.* Phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibits TRAF6 ubiquitination by interrupting the formation of TAK1-TAB2 complex in TLR4 signaling. *Cell Signal*, doi:10.1016/j.cellsig.2015.09.018 (2015).
- 341 Laguette, N. *et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654-657, doi:10.1038/nature10117 (2011).
- 342 Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45-65, doi:10.1038/sj.cdd.4401189 (2003).

- 343 Ishitani, T. *et al.* Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J* **22**, 6277-6288, doi:10.1093/emboj/cdg605 (2003).
- 344 Takaesu, G. *et al.* TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* **5**, 649-658 (2000).
- 345 Dai, L., Aye Thu, C., Liu, X. Y., Xi, J. & Cheung, P. C. TAK1, more than just innate immunity. *IUBMB Life* **64**, 825-834, doi:10.1002/iub.1078 (2012).
- 346 Shim, J. H. *et al.* TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev* **19**, 2668-2681, doi:10.1101/gad.1360605 (2005).
- 347 Ajibade, A. A. *et al.* TAK1 negatively regulates NF-kappaB and p38 MAP kinase activation in Gr-1+CD11b+ neutrophils. *Immunity* **36**, 43-54, doi:10.1016/j.immuni.2011.12.010 (2012).
- 348 Lamothe, B., Lai, Y., Xie, M., Schneider, M. D. & Darnay, B. G. TAK1 is essential for osteoclast differentiation and is an important modulator of cell death by apoptosis and necroptosis. *Mol Cell Biol* **33**, 582-595, doi:10.1128/MCB.01225-12 (2013).
- 349 Wang, J. S., Wu, D., Huang, D. Y. & Lin, W. W. TAK1 inhibition-induced RIP1-dependent apoptosis in murine macrophages relies on constitutive TNF-alpha signaling and ROS production. *J Biomed Sci* **22**, 76, doi:10.1186/s12929-015-0182-7 (2015).
- 350 Ajibade, A. A., Wang, H. Y. & Wang, R. F. Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends Immunol* **34**, 307-316, doi:10.1016/j.it.2013.03.007 (2013).
- 351 Iwai, K. Diverse ubiquitin signaling in NF-kappaB activation. *Trends Cell Biol* **22**, 355-364, doi:10.1016/j.tcb.2012.04.001 (2012).
- 352 Kirisako, T. *et al.* A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J* **25**, 4877-4887, doi:10.1038/sj.emboj.7601360 (2006).
- 353 Tokunaga, F. *et al.* Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol* **11**, 123-132, doi:10.1038/ncb1821 (2009).
- 354 Sasaki, Y. *et al.* Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells. *EMBO J* **32**, 2463-2476, doi:10.1038/emboj.2013.184 (2013).
- 355 Rodgers, M. A. *et al.* The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med* **211**, 1333-1347, doi:10.1084/jem.20132486 (2014).
- 356 Kim, T. H. *et al.* A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* **436**, 876-880, doi:10.1038/nature03877 (2005).
- 357 Bernstein, B. E. *et al.* Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**, 169-181, doi:10.1016/j.cell.2005.01.001 (2005).
- 358 Homig-Holzel, C. *et al.* Antagonistic TSC22D1 variants control BRAF(E600)-induced senescence. *EMBO J* **30**, 1753-1765, doi:10.1038/emboj.2011.95 (2011).

Bibliographie des légendes

1. Zimmermann, H. W., Trautwein, C. & Tacke, F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol* **3**, 56, doi:10.3389/fphys.2012.00056 (2012).
2. Cassado Ados, A., D'Imperio Lima, M. R. & Bortoluci, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol* **6**, 225, doi:10.3389/fimmu.2015.00225 (2015).
3. Flannagan, R. S., Cosio, G. & Grinstein, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**, 355-366, doi:10.1038/nrmicro2128 (2009).
4. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820, doi:10.1016/j.cell.2010.01.022 (2010).
5. Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* **5**, 491, doi:10.3389/fimmu.2014.00491 (2014).
6. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-969, doi:10.1038/nri2448 (2008).
7. Centanni. Ueber Infectionsfieber. Das fiebergift der Bakterien. *Deutsche med. Wochenshr.* (1894).
8. Zinsser, H. & Dwyer, J. G. On the Immunization of Animals with Bacterial Proteotoxins (Anaphylatoxins). *J Exp Med* **20**, 387-396 (1914).
9. Foster, S. L., Hargreaves, D. C. & Medzhitov, R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* **447**, 972-978, doi:10.1038/nature05836 (2007)
10. Porta, C. *et al.* Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 14978-14983, doi:10.1073/pnas.0809784106 (2009).
11. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. & Baltimore, D. The I kappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* **298**, 1241-1245, doi:10.1126/science.1071914 (2002)
12. Medzhitov, R. & Horng, T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* **9**, 692-703, doi:10.1038/nri2634 (2009).
13. Ware, L. B. & Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **342**, 1334-1349, doi:10.1056/NEJM200005043421806 (2000).
14. Alberti, C. *et al.* Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 77-84, doi:10.1164/rccm.200208-785OC (2003).
15. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **13**, 862-874, doi:10.1038/nri3552 (2013).
16. Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E. & Libert, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* **19**, 198-208, doi:10.1016/j.tim.2011.01.001 (2011).

17. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* **4**, 31-36, doi:10.1038/nprot.2008.214 (2009).
18. Shibamura, M., Kuroki, T. & Nose, K. Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors. *J Biol Chem* **267**, 10219-10224 (1992).
19. Bruscoli, S. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *J Biol Chem* **285**, 10385-10396, doi:10.1074/jbc.M109.070136 (2010).
20. D'Adamio, F. *et al.* A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* **7**, 803-812 (1997).
21. Latre de Late, P. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner. *J Biol Chem* **285**, 5594-5605, doi:10.1074/jbc.M109.068346 (2010).
22. Ayroldi, E. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol* **22**, 7929-7941 (2002).

Annexe

Communications scientifiques



STING Products

The latest buzz in innate immunity

STING Ligands - Variants - Reporter Cells



Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Enhanced Expression in Dendritic Cells Is Sufficient To Drive Regulatory T Cells Expansion In Vivo

This information is current as of October 29, 2015.

Joseph Calmette, Mehdi Ellouze, Thi Tran, Soumaya Karaki, Emilie Ronin, Francis Capel, Marc Pallardy, Françoise Bachelerie, Roman Krzysiek, Dominique Emilie, Géraldine Schlecht-Louf and Véronique Godot

J Immunol 2014; 193:5863-5872; Prepublished online 31 October 2014;

doi: 10.4049/jimmunol.1400758

<http://www.jimmunol.org/content/193/12/5863>

-
- Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2014/10/31/jimmunol.1400758.DCSupplemental.html>
- References** This article **cites 45 articles**, 23 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/193/12/5863.full#ref-list-1>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright © 2014 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Enhanced Expression in Dendritic Cells Is Sufficient To Drive Regulatory T Cells Expansion In Vivo

Joseph Calmette,^{*,†,1} Mehdi Ellouze,^{*,†,1} Thi Tran,^{*,†,1} Soumaya Karaki,^{*,†}
 Emilie Ronin,^{*,†} Francis Capel,^{*,†} Marc Pallardy,^{*,†} Françoise Bachelerie,^{*}
 Roman Krzysiek,^{*,†} Dominique Emilie,^{*,†} Géraldine Schlecht-Louf,^{*,†} and
 Véronique Godot^{§,¶,||}

Tolerance induction by dendritic cells (DCs) is, in part, mediated by the activation of regulatory T cells (Tregs). We have previously shown in vitro that human DCs treated with glucocorticoids (GCs), IL-10, or TGF- β upregulate the GC-Induced Leucine Zipper protein (GILZ). GILZ overexpression promotes DC differentiation into regulatory cells that generate IL-10-producing Ag-specific Tregs. To investigate whether these observations extend in vivo, we have generated CD11c-GILZ^{hi} transgenic mice. DCs from these mice constitutively overexpress GILZ to levels observed in GC-treated wild-type DCs. In this article, we establish that GILZ^{hi} DCs display an accumulation of Foxp3⁺ Tregs in the spleens of young CD11c-GILZ^{hi} mice. In addition, we show that GILZ^{hi} DCs strongly increase the Treg pool in central and peripheral lymphoid organs of aged animals. Upon adoptive transfer to wild-type recipient mice, OVA-loaded GILZ^{hi} bone marrow-derived DCs induce a reduced activation and proliferation of OVA-specific T cells as compared with control bone marrow-derived DCs, associated with an expansion of thymus-derived CD25⁺Foxp3⁺ CD4 T cells. Transferred OVA-loaded GILZ^{hi} DCs produce significantly higher levels of IL-10 and express reduced levels of MHC class II molecules as compared with OVA-loaded control DCs, emphasizing the regulatory phenotype of GILZ^{hi} DCs in vivo. Thus, our work demonstrates in vivo that the GILZ overexpression alone is sufficient to promote a tolerogenic mode of function in DCs. *The Journal of Immunology*, 2014, 193: 5863–5872.

Immune homeostasis requires the equilibrium between responses against pathogens and tolerance toward self-Ags and innocuous environmental Ags. Regulatory T cells (Tregs) are recognized as essential contributors to this balance. Two main Treg subsets have been described: the thymically derived CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ Tregs (tTregs) that differentiate in the thymus, and the peripheral

Tregs (pTregs) that differentiate from naive conventional CD4 T cells (Tconvs) and acquire Foxp3 expression in the periphery (1). Tregs depend on dendritic cells (DCs) for both their differentiation and activation. Indeed, DCs are required to activate tTregs in periphery and to convert Tconvs into pTregs (2). The exact nature of the regulatory DCs (DCregs) that are endowed with Treg induction and activation capacity is not entirely understood. Convergent studies show that this activation is not a default pathway but rather an active process that requires the expression of a regulatory genetic program by specialized DC subsets (3). Both developmental characteristics and environmental signals are reported to impact tolerogenic potential of DCs. IL-10, TGF- β , glucocorticoids (GCs), vasoactive intestinal peptide, vitamin D3, antioxidative vitamins, and retinoic acid, used alone or in combination, skew DC maturation toward DCregs (4, 5). However, the molecular mechanisms controlling the maturation of DCs into DCregs remain elusive.

The GC-Induced Leucine Zipper protein (GILZ) is a GC-induced protein initially reported in dexamethasone (Dex)-treated thymocytes (6). We have previously shown ex vivo that the level of GILZ expression in human DCs controls their tolerance-inducing function (7–9) and extended to other hematopoietic cells these observations (10, 11), which were confirmed by others (12–15). GILZ expression is partly dependent on endogenous steroids in vivo (12), and its expression in DCs is enhanced in vitro by GC, IL-10, TGF- β (7, 8), mitomycin C (16), rapamycin (15), vitamin D3 (15), and tumor environment (17). Human GILZ^{hi}-DCs secrete large amounts of IL-10 compared with GILZ^{low}-DCs and by this way induce Ag-specific CTLA-4⁺IL-10⁺ CD4⁺ Tregs, some of which coexpress Foxp3 (7, 8). Furthermore, we have shown in humans that GILZ mediates the immunoregulatory effects of GC

^{*}INSERM U996, Clamart, 92 140, France; [†]Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, 94 275, France; [‡]Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Chateaufort Malabry, 92 296, France; [§]INSERM U955, Eq16, Créteil, 94 000, France; [¶]Vaccine Research Institute, Créteil, 94 000, France; and ^{||}Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, 94 000, France

¹J.C., M.E., and T.T. contributed equally to this work.

Received for publication March 24, 2014. Accepted for publication October 6, 2014.

This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (Grant 09-GENO-030-01), the Fondation pour la Recherche Médicale, the Université Paris-Sud (Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur UniverSud and Appel à Projet Attractivité 2012), a doctoral fellowship from the Ecole Doctorale Innovation Thérapeutique (Grant ED 425 to J.C.), a doctoral fellowship from INSERM (to M.E.), a doctoral fellowship from the Région Ile de France (to S.K.), and a one-year postdoctoral fellowship from the Agence Nationale pour la Recherche (Grant 09-GENO-030-01 to S.K.).

Address correspondence and reprint requests to Prof. Véronique Godot or Dr. Géraldine Schlecht-Louf, INSERM U955, Eq16, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, Créteil, 94 010 Cedex, France (V.G.) or INSERM U996, 32 Rue des Carnets, Clamart, 92 140, France (G.S.-L.). E-mail addresses: veronique.godot@gmail.com (V.G.) or geraldine.schlecht-louf@u-psud.fr (G.S.-L.)

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BM-DC, bone marrow-derived DC; cDC, conventional DC; ctrl, control littermate; DC, dendritic cell; DCreg, regulatory DC; Dex, dexamethasone; eGFP, enhanced GFP; GC, glucocorticoid; GILZ, GC-induced leucine zipper protein; MFI, mean of fluorescence intensity; MLN, mesenteric lymph node; pDC, plasmacytoid DC; polyI:C, polyinosinic:polycytidylic acid; pTreg, peripheral Treg; SDLN, skin draining lymph node; Tconv, conventional CD4 T cell; Treg, regulatory T cell; tTreg, thymically derived CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ Treg.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

on DCs (8, 9). Downregulation of GILZ in DCs promotes the activation of effector CD4⁺ T cells (8, 13, 14, 17).

To gain insight into the impact of GILZ on the regulatory functions of DCs in vivo, we generated CD11c-GILZ^{hi} transgenic mice. DCs from these mice constitutively overexpress GILZ to the same extent as GC-treated wild type DCs. In *in vitro* studies, GILZ^{hi} DC phenotype and function is not different from that observed in DCs from control littermates (ctrl). However, CD11c-GILZ^{hi} mice display an age-dependent accumulation of Foxp3⁺ Tregs in vivo. In adoptive transfer models, we further demonstrate that the GILZ^{hi} DCs acquire a regulatory phenotype after cognate interaction with T cells. They express reduced levels of MHC class II molecules, secrete higher amounts of IL-10, poorly induce Tconv proliferation and activation, but promote tTreg expansion. In conclusion, our work formally identifies GILZ as a factor that contributes to DC tolerogenic function in vivo and validates the CD11c-GILZ^{hi} mice as a relevant model for studying in vivo the therapeutic potential of GILZ-expressing DCregs in immunopathologies relying on Treg defects.

Materials and Methods

Mice

CD11c-GILZ^{hi} mice were generated by a single targeted insertion (at the hprt docking site on the X chromosome) of GILZ coding sequences driven by the CD11c promoter (Nucleis, Lyon, France; Supplemental Fig. 1). Genetic uniformity was reached by a 10-generation backcross to the C57BL/6J background (>98%). The resulting CD11c-GILZ^{hi} transgenic mice are viable and fertile, with litters of normal size and sex ratio. Mice were maintained by heterozygous crossing with C57BL/6 males and CD11c-GILZ^{hi} mice were compared with controls from the same litter. Unless specified, hemizygous male mice were used between 8 and 14 wk of age.

OT-II TCR transgenic mice were obtained from Charles River (L'Arbresle, France) and CD45.1 C57BL/6 mice from CDTA (Orléans, France). Foxp3-enhanced GFP (eGFP) and IL-10-GFP mice were kind gifts from Dr. B. Malissen (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France) (18) and Dr. R. Flavell (Yale University School of Medicine, New Haven, CT) (19), respectively.

Mice were bred in the Animex animal facility under specific pathogen-free facilities. Experimentation was approved by the local Ethics Committee for Animals (C2EA-26; Animal Care and Use Committee, Villejuif, France) and complied with French and European guidelines for the use of laboratory animals.

Proteins, peptides, and activators

The synthetic OVA₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR) peptide corresponding to the immunodominant I-A^b-restricted T cell epitope from OVA was purchased from ANASPEC (Fremont, CA). The OVA protein was obtained from Sigma-Aldrich. TLR agonists were purchased from Invivogen (Cayla SAS).

RNA extraction and quantitative RT-PCR

RNAs were extracted from 2 to 5 × 10⁶ bone marrow-derived DCs (BM-DCs) according to manufacturer's instructions (RNeasy Plus Micro kit; Qiagen, France). cDNA were obtained by reverse transcription with the MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR was performed using SYBR Green I Master Mix kit (Roche Applied Science) and Light-Cycler 480 (Roche). Normalization was made by standard curve method based on β-actin expression. The primers sequences are available upon request.

Cell preparations

BM-DCs were generated as previously described (20), using DC culture medium (CM; Life Technologies; RPMI 1640, 5% FCS, 50 μg/ml gentamicin, 5 × 10⁻⁵ M 2-ME, and 20 ng/ml murine rGM-CSF; PreproTech). Cells (containing >90% of CD11c⁺ cells) were used at days 9 and 10.

Splenic DCs were recovered from CD11c-GILZ^{hi} or littermate mice as described by Schlecht et al. (21). Magnetic cell sorting was done using autoMACS (Miltenyi Biotec). Cell purity ranged from 90 to 95%.

CD4 T cells were purified from CD45.2 OT-II mice by negative magnetic selection using CD4 T Cell Isolation kit (autoMACS; Miltenyi Biotec). A biotinylated anti-CD25 Ab was added to the Ab mixture for Foxp3⁺CD25⁺ T cell depletion. T cells were labeled with 5 μM CFSE (Vybrant CFDA SE

Cell Tracer Kit; Invitrogen) during 15 min at room temperature. CD4 T cells were either injected *i.v.* into CD45.1 C57BL/6 mice (5 × 10⁶ cells/mouse) or used *in vitro*.

Western blots

Protein extracts from 2 × 10⁶ BM-DCs or splenic DCs were lysed with 20 μl lysis buffer (Roche Applied Science) as previously described (8). Fifty micrograms of proteins was loaded on a 4–12% gradient polyacrylamide gel (NuPAGE; Invitrogen). GILZ staining was performed with a rabbit anti-GILZ Ab (FL-134 clone; Santa Cruz) and a donkey anti-rabbit secondary Ab conjugated to peroxidase (Amersham, GE-Healthcare) as described in Hamdi et al. (8). β-Actin (eBioscience SAS) expression was used as loading control.

Ag capture and processing

A total of 2 × 10⁵ DCs was distributed in wells of a 96-well plate. Ag capture was measured using Alexa 488-labeled OVA (Molecular Probes), dextran-FITC, and zymosan-FITC (both from Sigma-Aldrich). Dextran polymers are preferentially taken up by mannose receptor (CD206)-dependent endocytosis (22), OVA by both CD206-dependent endocytosis and macropinocytosis (23, 24), and zymosan by dectin-1-dependent endocytosis (25). OVA DQ (Molecular Probes) was used for Ag processing assay (26). After 90 min or 5 h of incubation at 4°C or 37°C, DCs were labeled with anti-CD11c Abs and analyzed on FACSCalibur or LSR Fortessa (BD Biosciences, San Diego, CA). Δ means of fluorescence intensity (MFIs) were calculated by subtracting the MFI at 4°C (control) from the MFI at 37°C.

DC activation for phenotype and cytokine/chemokine detection

The phenotype and cytokine/chemokine secretion profiles of DCs were assessed by incubating 2 × 10⁵ BM-DCs in 96-well plates with 1.5 μM CpG (TLR9 agonist), 1 μg/ml LPS (TLR4 agonist), 10 μg/ml polyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C; TLR3 agonist), or 10 μg/ml zymosan (TLR2 agonist). After 15 h, culture supernatants were recovered for cytokine measure, and DC phenotype was analyzed by flow cytometry.

Cytokines and chemokines were assessed by ELISA using IL-10 and IL-12(p70) BD OptEIA Set Mouse (BD Biosciences) or by Luminex assay using the Procarta mouse 26-plex from eBioscience.

T cell stimulation in vitro and in vivo

BM-DCs were loaded with OVA or OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide for 5 h and 90 min, respectively, at 37°C. In *in vitro* assays, 2.5 × 10³, 5 × 10³, or 10⁴ DCs per well were used in triplicate to stimulate 5 × 10⁴ CFSE-labeled OT-II CD4 T cells. After 72 h of incubation, T cell proliferation was analyzed by flow cytometry.

Splenic DCs were loaded with OVA for 4 h and cocultured with OT-II CD4 T cells at a 1:10 ratio. After 72 h, [³H]thymidine (50 μCi/well) was added to cultures. Cells were harvested 6 h later to evaluate incorporated [³H]thymidine by scintillation counting.

In *in vivo* assays, 5 × 10⁵ BM-DCs were transferred *i.v.* into CD45.1 mice 1 d after OT-II T cell injection. Sixty-six hours later, CD45.1 mice were sacrificed and spleens recovered as described in Schlecht et al. (27). T cell phenotype and proliferation were analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry

Cells suspended at 10⁷ cells/ml in PBS-FCS 2% were first incubated with anti-CD16/32 (2.4G2 clone) Fc-Block, then labeled for 15–30 min at 4°C in the dark with combinations of mAbs (clone): anti-CD11c (HL-3), -B220 (RA3-6B2), -CD45RA (14.8), -CD11b (M1/70), -CD8α (53-6.7), -CD40 (HM40-3), -CD86 (GL1), -CD3 (17A2), -CD4 (RM4-5), -CD8 (53-6.7), -CD62L (MEL-14), -CD44 (IM7), -CD11b (M1/70), -CD25 (PC61), -MHCI (M5/114.15.2), -PD-L1 (MIH5), -PD-L2 (TY-25), -ICOSL (HK5.3), -OX40 (OX86), -H-2K^b (CTKb), -CD45.2 (104), -CD27 (LG.7F9), -ICOS (7E.17G9), and -NK1.1 (PK136). mAbs and isotype controls were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA), eBioscience (San Diego, CA), Biologend (San Diego, CA), or Caltag (Buckingham, U.K.).

For intracellular Foxp3 staining, Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA) was used. For anti-IL-10 and anti-IFN-γ staining, 10⁶ splenocytes stimulated for 5 h with 1 μg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide at 37°C in the presence of GolgiPlug (BD Biosciences) were permeabilized using the Fix/Perm and Perm/Wash kit (BD Biosciences). Fluorescence was acquired on a FACSAria or a LSR Fortessa (BD Biosciences) flow cytometer and analyzed using the FlowJo Software (Tree Star).

Statistical analysis

Statistical analysis of results was performed with GraphPad Prism software. Depending on experimental settings, (un)paired *t* test, one- or two-way ANOVA, or Wilcoxon signed rank test was used. The *p* values obtained

from multiple comparisons were adjusted by Bonferroni correction. The 5% threshold was considered significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Results

Mice with constitutive overexpression of GILZ in DCs display normal lymphocyte and DC distribution in lymphoid tissues

In the CD11c-GILZ^{hi} transgenic mice, we used the CD11c promoter to drive enforced expression of GILZ in DCs (28). We confirmed an overexpression of GILZ mRNA and protein in splenic DCs and BM-DCs from CD11c-GILZ^{hi} mice as compared with their ctrl (Fig. 1A, 1B). Therefore, DCs from CD11c-GILZ^{hi} mice will be referred to as GILZ^{hi} DCs throughout the text. The enforced expression of GILZ driven by the CD11c promoter in transgenic mice and the expression of GILZ induced by Dex in ctrl mice were comparable, thereby confirming a regular level of GILZ in CD11c-GILZ^{hi} mice (Fig. 1A, 1B). Likewise, the level of GILZ expression was slightly increased in GILZ^{hi} BM-DCs after Dex treatment (Fig. 1A, 1B), pointing out a suboptimal level of GILZ in these transgenic cells.

GILZ overexpression was restricted to DCs because no alteration in GILZ mRNA levels was observed in other hematopoietic cells such as CD4 T cells, CD8 T cells, splenic NK cells, or liver NK cells, a population known to be enriched in CD11c-expressing cells (29) (Fig. 1C–E).

No change in the architecture (data not shown) and total cell numbers in spleen, skin draining lymph nodes (SDLNs), and mesenteric lymph nodes (MLNs) was observed in CD11c-GILZ^{hi} mice as compared with ctrl (Table I). Furthermore, the frequencies and absolute numbers of B cells, T cells, conventional DCs (cDCs), and plasmacytoid DCs (pDCs) were similar in secondary lymphoid organs of CD11c-GILZ^{hi} and ctrl littermates (Fig. 1F and Table I).

Increased Treg pool in CD11c-GILZ^{hi} mice

Because human monocyte-derived DCs overexpressing GILZ induce Treg differentiation *in vitro* (7–9), we investigated whether GILZ overexpression in DCs modified the Treg compartment *in vivo*. To address this issue, we first traced Foxp3-eGFP CD4⁺

Tregs in several lymphoid organs of young (8–12 wk old) and aged (18 mo) Foxp3-eGFP × CD11c-GILZ^{hi} female mice obtained by crossing CD11c-GILZ^{hi} mice with Foxp3-eGFP reporter mice. We observed an increase of Foxp3⁺CD25⁺ Treg frequency restricted to the spleen in young Foxp3-eGFP × CD11c-GILZ^{hi} mice and generalized to the thymus and the secondary lymphoid organs for both CD25⁺ and CD25[−] Tregs in aged Foxp3-eGFP × CD11c-GILZ^{hi} mice as compared with Foxp3-eGFP ctrl littermates (Fig. 2A, 2B). Because both the CD11c-GILZ transgene and the Foxp3 gene are carried on X chromosome, subjected to X-inactivation, we checked GILZ overexpression in DCs from Foxp3-eGFP × CD11c-GILZ^{hi} females (Fig. 2C) and verified that the proportion of Foxp3-eGFP Tregs corresponded to half the Tregs detected by intracellular labeling as expected (Fig. 2D). Likewise, we confirmed the expansion of Tregs in lymphoid organs of young and 24-mo-old CD11c-GILZ^{hi} male by Foxp3 intracellular staining (Fig. 2E, 2F). However, no difference in the percentages and numbers of CD4⁺Foxp3[−] Tconvs was observed between ctrl and CD11c-GILZ^{hi} mice, whatever their age (Fig. 2E, 2F).

The Treg phenotype analyzed in aged CD11c-GILZ^{hi} mice was similar to that of ctrl littermates for CD69, CTLA4, GITR, CD103, PD1, and CCR7 (data not shown). The thymus and SDLN of aged CD11c-GILZ^{hi} mice showed an increase of the ICOS^{hi} Treg subset (Fig. 2H), a subset reported to be highly suppressive and biased toward IL-10 production (30–32). This increase of ICOS^{hi} Tregs was also confirmed in young CD11c-GILZ^{hi} mice (Fig. 2G). Thus, the sole GILZ overexpression in DCs clearly promotes Treg accumulation *in vivo*, and this accumulation is associated with an increase in the ICOS^{hi} Treg subset.

*GILZ^{hi} DC phenotype *in vitro**

The basal phenotype of DCs was investigated on either freshly isolated splenic DCs or BM-DCs. In both cases, the expression levels of CD80, CD86, CD40, MHC class I, or MHC class II molecules were similar between CD11c-GILZ^{hi} and ctrl mice (Fig. 3A, 3B). We further looked at the expression of several

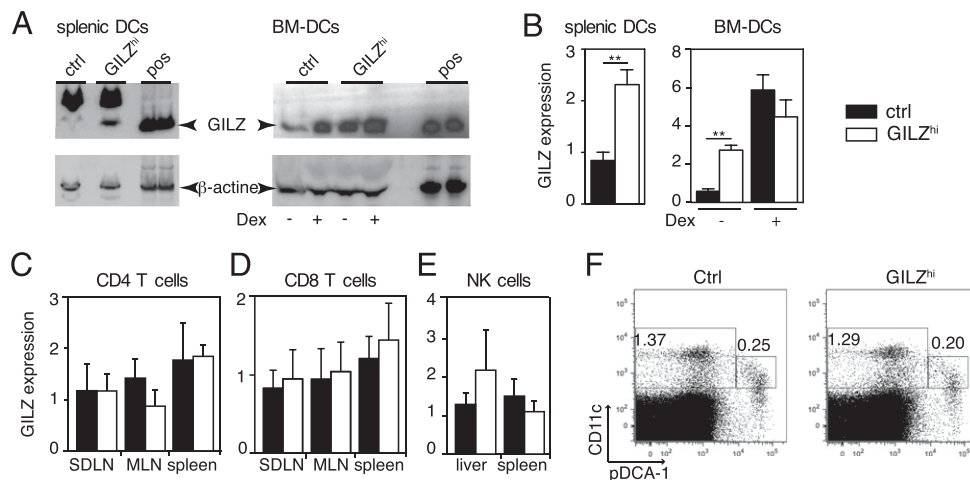


FIGURE 1. GILZ is constitutively and selectively overexpressed in DCs from CD11c-GILZ^{hi} mice. (A and B) Quantification of GILZ expression in freshly isolated splenic DCs or BM-DCs derived from CD11c-GILZ^{hi} or ctrl mice (ctrl). BM-DCs were treated or not with 10^{-7} M Dex for 18 h. (A) Proteins were extracted to quantify GILZ expression by Western blot. A protein extract from a Dex-stimulated mast cell line HMC-1 is used as positive control (pos). After stripping, the membrane was reprobed for β -actin (42 kDa, lower row). Results are representative of three experiments. (B) GILZ mRNA expression in splenic DCs or BM-DCs was determined by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and normalized over β -actin mRNA expression. Results correspond to the mean \pm SEM of three to four independent experiments. (C–E) GILZ expression in lymphocytes and NK cells from CD11c-GILZ^{hi} mice. CD4 T cells, CD8 T cells were FACS-sorted from spleens, MLNs, and SDLNs from GILZ^{hi} or ctrl mice and NK cells from liver and spleen. GILZ mRNA levels were determined by real-time qRT-PCR as in B. Mean \pm SEM of three to four mice per group. (F) DC distribution assessed by flow cytometry in CD11c-GILZ^{hi} (GILZ^{hi}) and littermate control (ctrl) mouse spleens. The percentages of conventional DCs (CD11c^{lo}pDCA-1⁺) and plasmacytoid DCs (CD11c^{hi}pDCA-1[−]) are indicated in the dot plots. ** $p < 0.01$.

Table I. DC, B cell, and T cell frequency in secondary lymphoid organs

	Organ					
	Spleen		SDLN		MLN	
	Ctrl	GILZ ^{hi}	Ctrl	GILZ ^{hi}	Ctrl	GILZ ^{hi}
Cell number ($\times 10^6$)	100.4 \pm 5.3	118 \pm 7.5	4 \pm 0.37	5.2 \pm 0.75	13 \pm 2.2	18.3 \pm 3.6
cDCs, %	1.43 \pm 0.1	1.48 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	1 \pm 0.2	2.1 \pm 0.6	2.3 \pm 0.9
pDCs, %	0.37 \pm 0.16	0.37 \pm 0.25	0.26 \pm 0.01	0.22 \pm 0.1	0.25 \pm 0.1	0.18 \pm 0.1
B cells, %	50.7 \pm 2.9	52.9 \pm 6.1	31.1 \pm 3.5	29.5 \pm 2.5	27.7 \pm 3.2	24.7 \pm 8.9
CD4 T cells, %	36.3 \pm 6.7	34 \pm 2.7	48.5 \pm 8.4	44.6 \pm 4.2	46.5 \pm 3.4	48.6 \pm 7.9
CD8 T cells, %	14.3 \pm 3.9	14 \pm 3	23.6 \pm 13	23.4 \pm 11	24.4 \pm 10	20.5 \pm 9.7

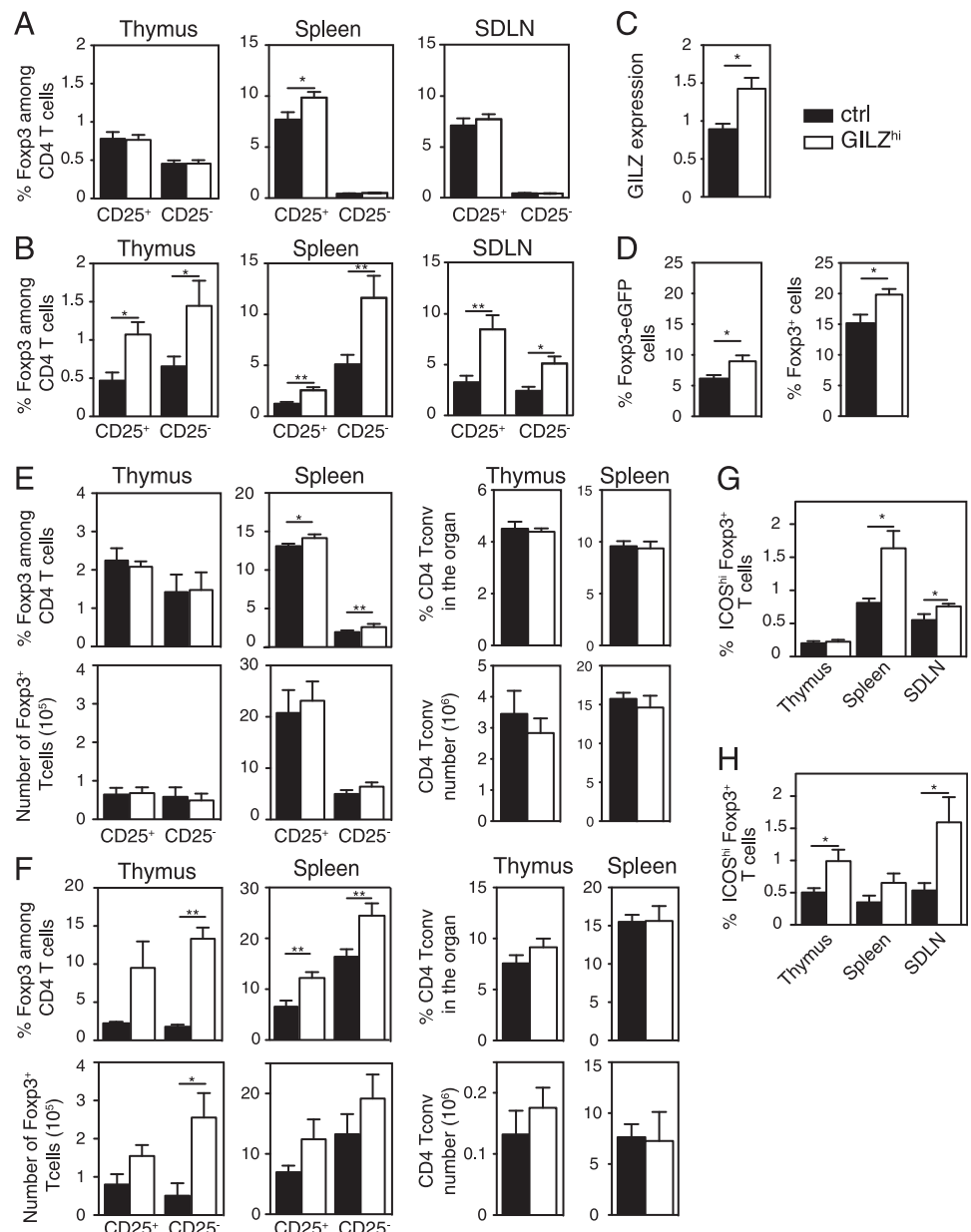
Spleen, SDLNs, and MLNs were harvested and single-cell suspensions prepared. The cells were counted, and the proportions of cDCs (CD11c^{hi} PDCA-1⁻), pDCs (CD11c^{lo} PDCA-1⁺), B cells (CD19⁺B220⁺), CD4 T cells (CD3⁺CD4⁺), and CD8 T cells (CD3⁺CD8⁺) were determined by flow cytometry. Results are from six to eight mice per group.

membrane markers for tolerogenic DCs. The results showed no increased expression of PD-L1, PD-L2, ICOSL, and OX40L on GILZ^{hi} splenic DCs or GILZ^{hi} BM-DCs as compared with their controls (Fig. 3A, 3B). Thus, the sole GILZ overexpression in

freshly isolated DCs or BM-DCs does not significantly modify their basal phenotype ex vivo and in vitro.

We next addressed the impact of GILZ overexpression on DC maturation in vitro. Analysis of the expression of CD86, CD40, and

FIGURE 2. Treg accumulation in CD11c-GILZ^{hi} mice. **(A and B)** Foxp3-eGFP \times CD11c-GILZ^{hi} female mice were obtained by crossing transgenic CD11c-GILZ^{hi} female mice with Foxp3-eGFP male mice. Thymuses, spleens, and SDLNs from young (8–12 wk old) (A; $n = 6$ –8 mice/group) and aged (18-mo-old) (B; $n = 5$ –6 mice/group) Foxp3-eGFP \times CD11c-GILZ^{hi} or Foxp3-eGFP littermate control mice were analyzed by flow cytometry. T cells were gated as single CD3⁺CD4⁺ T cells and assessed for Foxp3 and CD25 expression. **(C)** GILZ overexpression in splenic DCs from Foxp3-eGFP \times CD11c-GILZ^{hi} females was confirmed by quantitative RT-PCR ($n = 5$ –6 mice/group). **(D)** Treg detection in the spleen of Foxp3-eGFP \times CD11c-GILZ^{hi} and littermate control Foxp3-eGFP mice using eGFP signal (left) or intracellular Foxp3 staining (right) was compared to confirm the proportionality between the two detection systems ($n = 4$ –5 mice/group). **(E and F)** Thymuses and spleens from young (E) or 24-mo-old (F) CD11c-GILZ^{hi} and control male mice were recovered. Frequencies and numbers of CD3⁺CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ or CD25⁻ Tregs (left) and CD3⁺CD4⁺Foxp3⁻ Tconv (right) are shown ($n = 3$ –6 mice/group). **(G and H)** Frequency of ICOS^{hi}Foxp3⁺ T cells in lymphoid organs of young (G; $n = 6$ –8 mice) and aged (H; $n = 5$ –6 mice) Foxp3-eGFP \times CD11c-GILZ^{hi} or Foxp3-eGFP littermate female mice are shown. Mean \pm SEM, two-tailed unpaired *t* test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



MHC class II molecules on GILZ^{hi} and ctrl BM-DCs after stimulation with TLR2 (zymosan), TLR3 (polyI:C), TLR4 (LPS), and TLR9 (CpG) ligands revealed no statistically significant differences. Because Dex downregulated costimulatory molecules on human DCs through GILZ induction (7, 8), we evaluated the expression of MHC class II molecules, CD40, and CD86 on Dex-treated-GILZ^{hi} and ctrl DCs. An equivalent downregulation of MHC and costimulatory molecules was observed in both DC subsets (Fig. 3C). This might be explained by the higher expression of GILZ reached in vitro after DC treatment with Dex (see Fig. 1A, 1B) or by GILZ-independent effects of Dex on DC phenotype in mice.

No differences in IL-10 or IL-12p70 production could be observed between GILZ^{hi} and control BM-DCs either in the steady-state or after activation (Fig. 3D). Other cytokines and chemokines were not differently expressed either (Supplemental Fig. 2 and data not shown). Taken together, these data indicate that GILZ^{hi} BM-DCs display no alteration of surface phenotype and cytokine production in vitro.

Ag capture and presentation by GILZ^{hi} DCs in vitro

The absence of a tolerant phenotype for GILZ^{hi} DCs in vitro prompted us to verify whether these DCs loaded with OVA were able to activate OVA-specific OT-II Tregs after in vivo adoptive transfer. Because murine DCs overexpressing GILZ upon lenti-

viral transduction display deficient OVA uptake (17), we first tested the capacity of GILZ^{hi} splenic DCs and BM-DCs to internalize and degrade soluble (OVA, dextran) and particulate (zymosan) Ags. No differences in dextran or zymosan capture were observed (Fig. 4A). Consistently with the results published by Lebson et al. (17), GILZ^{hi} BM-DCs displayed a reduced OVA uptake as compared with control BM-DCs after a short incubation period with this Ag, and OVA degradation was similarly reduced (Fig. 4A). However, these capture and degradation defects were transient and disappeared completely at later times (i.e., 5 h of incubation; Fig. 4B), and were not observed for splenic DCs (Fig. 4C). To test Ag presentation capacity, we loaded GILZ^{hi} and ctrl BM-DCs with OVA for 5 h to avoid differences in Ag access, and incubated them with CFSE-labeled OT-II CD4 T cells. As shown in Fig. 4D, GILZ^{hi} DCs induced OT-II cell proliferation as efficiently as ctrl BM-DCs. Similar results were obtained with splenic DCs (Fig. 4E). Overall, these data demonstrated that GILZ^{hi} DCs display no major alteration in their capacity to take up and present Ags in vitro.

GILZ^{hi} DCs poorly activate effector T cells but promote tTreg expansion in vivo

We next investigated the ability of OVA-loaded GILZ^{hi} DCs to prime naive Ag-specific T cells in vivo, and determined whether they favor the expansion of Ag-specific Tregs. To this end, CFSE-labeled

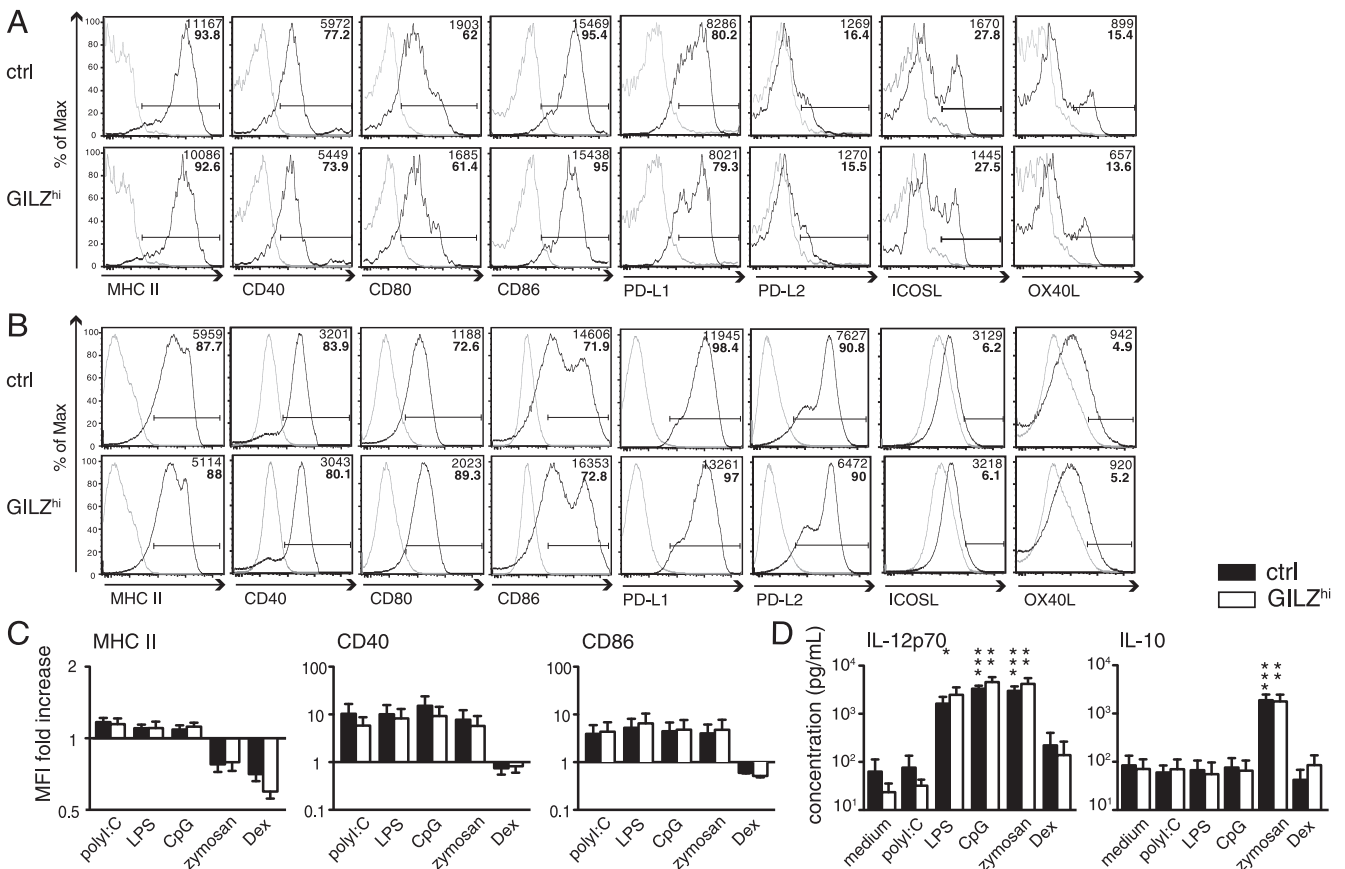


FIGURE 3. GILZ^{hi} DC phenotype and cytokine secretion at resting state or after TLR engagement. (A and B) DCs were harvested from the spleens (A) or derived from the bone marrow (B) of CD11c-GILZ^{hi} (GILZ^{hi}) and littermate control (ctrl) mice and analyzed by flow cytometry. DCs were gated as CD11c⁺ cells, and their expression of MHC class II molecules, costimulatory molecules, or inhibitory molecules was assessed. MFI and percents of positive cells as compared with isotype controls are indicated in regular and bold font, respectively. Results shown are representative of three experiments. (C) GILZ^{hi} and ctrl BM-DCs phenotype after stimulation for 15 h with TLR2 (zymosan), TLR3 (polyI:C), TLR4 (LPS) or TLR9 (CpG ODN) agonists, or Dex. MHC II molecules, CD40, and CD86 expression were measured by FACS on CD11c⁺ cells. Means ± SEM of MFI fold increase for five to eight mice in each group are shown. (D) IL-10 and IL-12p70 concentrations were measured by ELISA in the culture supernatants from GILZ^{hi} and ctrl BM-DCs prepared in (C). Wilcoxon signed rank test corrected by Bonferroni for multiple comparison was used to compare treated ctrl or GILZ^{hi} DCs with unstimulated ctrl or GILZ^{hi} DCs, respectively. ****p* < 0.005, ***p* < 0.01, **p* < 0.05.

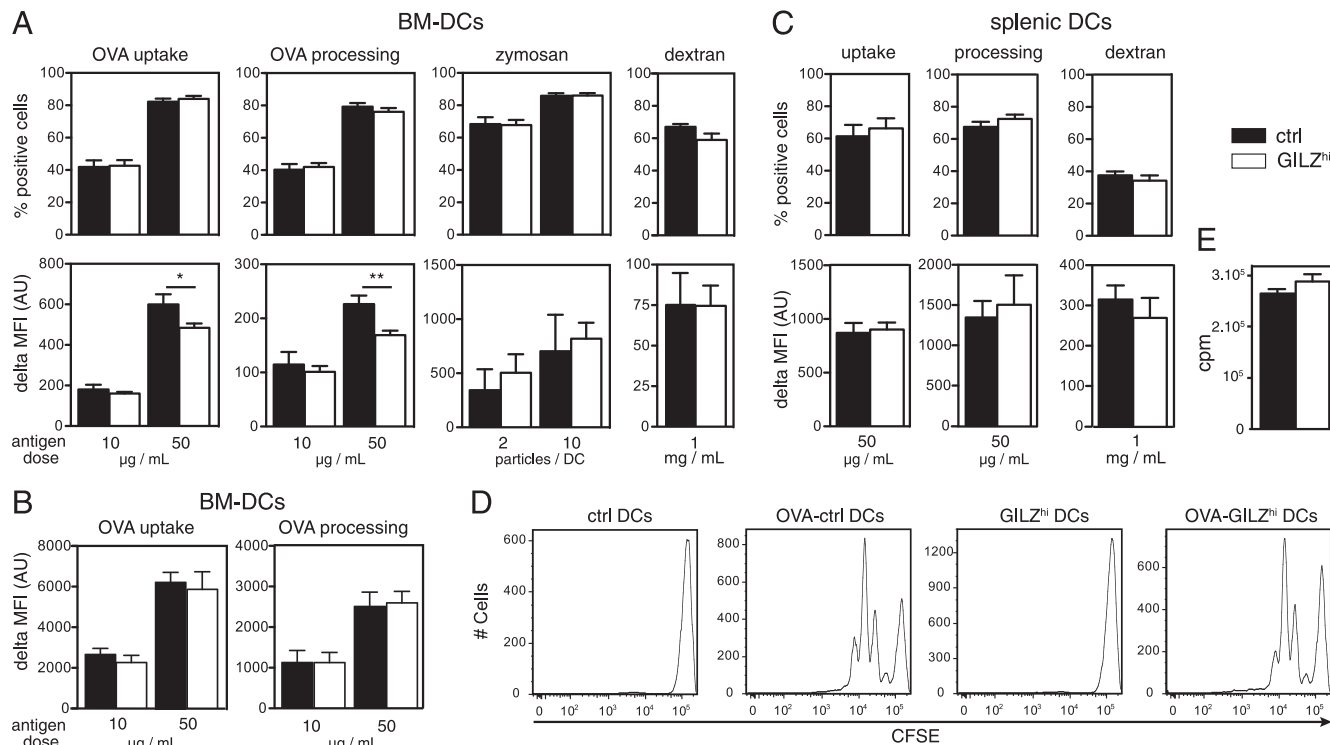


FIGURE 4. Ag uptake, processing, and presentation by GILZ^{hi} BM-DCs and splenic DCs in vitro. BM-DCs (**A** and **B**) or splenic DCs (**C**) from CD11c-GILZ^{hi} (GILZ^{hi}) and littermate control (ctrl) mice were incubated with OVA–Alexa 488, OVA–DQ, dextran–FITC, or Zymosan–FITC at 4°C or 37°C, for 90 min (**A** and **C**) or 5 h (**B**). After washing the cells, Ag capture and processing were measured by flow cytometry. Percents of positive cells and Δ MFI (MFI at 37°C – MFI at 4°C) are indicated as means ± SEM for 5–12 mice per group. Two-tailed unpaired *t* test was used to compare GILZ^{hi} DCs with ctrl DCs. ***p* < 0.01, **p* < 0.05. (**D**) GILZ^{hi} and ctrl BM-DCs were loaded with OVA (1 mg/ml) for 5 h and used to stimulate CFSE-labeled OT-II CD4 T cells in vitro. DC/OT-II cell ratio was 1:5, one representative experiment out of four. (**E**) Splenic DCs were loaded for 4 h with OVA (1 mg/ml) and cocultured for 72 h with OT-II cells at a 1:10 ratio. Results correspond to means ± SEM of [³H]thymidine incorporation (*n* = 4).

OT-II T cells (CD45.2) and GILZ^{hi} or control DCs (CD45.2) loaded with OVA were i.v. injected to CD45.1 congenic recipient mice (Fig. 5A). Three days after DC injection, spleens were recovered and CD45.2 OT-II T cells were analyzed by flow cytometry. CD4 T cells triggered by OVA-loaded GILZ^{hi} DCs proliferated less than those stimulated with control DCs (Fig. 5B, 5D). This decreased proliferation capacity was associated with a lower OT-II cell activation state as revealed by CD44 and CD62L staining (Fig. 5E, 5F). Similar results were obtained when DCs were loaded with the OVA_{323–339} peptide, further demonstrating that the difference in T cell activation between GILZ^{hi} and ctrl DCs is not due to a defect in Ag processing (Fig. 5B, 5D–F). The analysis of cytokine production by splenic OT-II T cells after a 5-h in vitro restimulation with OVA_{323–339} peptide revealed that OVA-loaded GILZ^{hi} DCs induced less IFN-γ-producing T cells and more IL-10-producing T cells than ctrl DCs (Fig. 5G). Thus, although GILZ^{hi} DCs were as efficient as control DCs in inducing T cell proliferation in vitro, they were significantly less efficient in inducing T cell stimulation and proliferation in vivo.

To test whether this reduced stimulation capacity was associated with the proliferation of Tregs, we performed a Foxp3 intracellular staining on the OT-II T cells recovered after the adoptive transfer. This experiment revealed a significantly higher proportion of CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ Tregs after T cell priming with GILZ^{hi} DCs (Fig. 5H, 5J). These Tregs were mainly found among dividing cells (Fig. 5I), suggesting that the increase of Tregs observed after OVA-loaded GILZ^{hi} DC injection results from Treg proliferation. To determine whether these proliferating Tregs derived from tTregs or were differentiated from Foxp3[−] Tconv, we reproduced this experiment using OT-II T cells depleted from CD25⁺ T cells,

which correspond essentially to Tregs in naive OT-II mice. Although CD25-depleted OT-II T cells primed by OVA-loaded GILZ^{hi} DCs still proliferate far less than those activated by OVA-loaded ctrl DCs (Fig. 5C, 5D) and display a less activated phenotype (Fig. 5E, 5F), no Treg accumulation was observed in mice that had received OVA-loaded GILZ^{hi} DCs (Fig. 5J). These adoptive transfers formally demonstrated that GILZ^{hi} DCs are poor inducers of CD4 T cell proliferation and activation, but that they preferentially support tTreg expansion in vivo.

GILZ^{hi} DCs display a regulatory phenotype in vivo

To shed light on the apparent paradoxical phenotype displayed by GILZ^{hi} DCs in vitro and in vivo, where they show no specific phenotype or cytokine secretion, respectively, (Fig. 3) and tolerogenic properties, we analyzed GILZ^{hi} DC phenotype in vivo after an encounter with T cells. We were particularly interested in their production of IL-10 because we previously demonstrated that one characteristic of tolerant human GILZ^{hi} DCs was a higher IL-10 production. Therefore, we crossed the CD11c-GILZ^{hi} and ctrl mice with IL-10–GFP reporter mice (19) and reproduced the earlier-described adoptive transfer in CD45.1 congenic recipient mice, using GILZ^{hi} or ctrl DCs coexpressing GFP with IL-10 (Fig. 6A). Equivalent numbers of DCs were recovered in each condition (data not shown), showing that the differences in T cell priming by GILZ^{hi} DCs cannot be assigned to deficient homing to the spleen. Although no difference was observed for CD86 expression on GILZ^{hi} and ctrl DCs (Fig. 6B), the analysis of MHC class II molecules expression revealed a significant decrease on OVA-loaded GILZ^{hi} DCs (Fig. 6C). OVA-loaded GILZ^{hi} DCs also produced significantly more IL-10 than ctrl OVA-loaded DCs

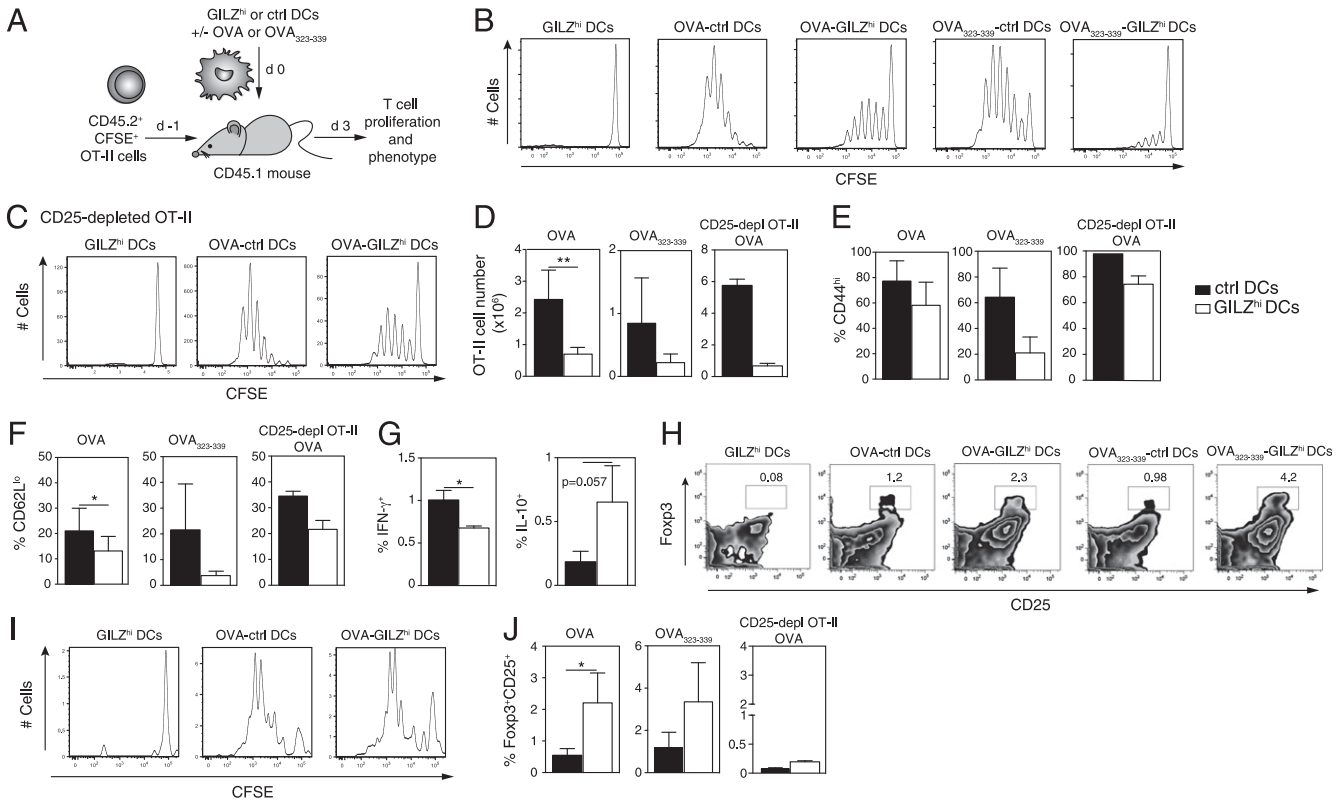


FIGURE 5. GILZ^{hi} DCs promote tTreg expansion in vivo. **(A)** CFSE-labeled OT-II CD4 T cells are injected to congenic CD45.1 mice the day before DC injection. Ctrl or GILZ^{hi} DCs are loaded with OVA or OVA₃₂₃₋₃₃₉ and i.v. injected to recipient mice at day 0. Sixty-six hours later, spleens from recipient mice are recovered and analyzed by FACS for OT-II T cell proliferation (**B–D**, **I**), phenotype (**E**, **F**, **H**, and **J**), and cytokine secretion (**G**). OT-II cells are gated as CD45.2⁺CD3⁺CD4⁺ T cells. **(B)** Representative CFSE dilution profiles after in vivo activation of OT-II T cells by nonloaded DCs, OVA-loaded GILZ^{hi} and ctrl DCs, or OVA₃₂₃₋₃₃₉-loaded GILZ^{hi} and ctrl DCs. **(C)** Representative CFSE dilution profiles after in vivo activation of CD25-depleted OT-II T cells (CD25-depl OT II) by nonloaded DCs and OVA-loaded GILZ^{hi} and ctrl DCs. **(D)** OT-II cell numbers recovered from mice receiving OVA- or OVA₃₂₃₋₃₃₉-loaded GILZ^{hi} and ctrl DCs (OVA, *n* = 5; OVA₃₂₃₋₃₃₉, *n* = 2–3; CD25-depl OT-II OVA, *n* = 2). **(E and F)** Percentages of CD44^{hi} (**E**) and CD62L^{lo} (**F**) cells among divided OT-II cells after in vivo stimulation by OVA- or OVA₃₂₃₋₃₃₉-loaded DCs. **(G)** Ag-specific IFN- γ and IL-10 secretion by OT-II T cells from mice injected with OVA-loaded DCs after a 5-h in vitro stimulation with OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide in the presence of GolgiPlug. **(H)** Frequency of CD25⁺Fopx3⁺ Tregs among OT-II T cells assessed by Fopx3 intracellular staining. Representative dot plots for Fopx3 and CD25 staining on OT-II T cells are shown, with the percentages of CD25⁺Fopx3⁺ Tregs. **(I)** Representative CFSE profiles showing Fopx3⁺ CD4⁺CD45.2⁺CD3⁺ Treg proliferation. **(J)** Histograms present means \pm SEM of the percentages of CD25⁺Fopx3⁺ OT II Tregs after in vivo stimulation by OVA- or OVA₃₂₃₋₃₃₉-loaded GILZ^{hi} and ctrl DCs (OVA, *n* = 5; OVA₃₂₃₋₃₃₉, *n* = 2–3; CD25-depl OT-II OVA, *n* = 2). Two-way ANOVA followed by Bonferroni posttests were used to compare the results from mice injected with OVA-loaded GILZ^{hi} and ctrl DCs. ***p* < 0.01, * *p* < 0.05.

(Fig. 6D). Using DCs from CD11c-GILZ^{hi} \times IL-10-GFP and ctrl \times IL-10-GFP mice, we confirmed that the DCs used for the adoptive transfer displayed the same capacity to produce IL-10 in vitro upon TLR2 engagement (Fig. 6E), results consistent with those obtained in Fig. 3D. The significant increase in IL-10 production in vivo was observed only for OVA-loaded GILZ^{hi} DCs, and not for nonloaded GILZ^{hi} DCs, suggesting a role for DC–T cell interactions in DC phenotype modification. However, the sole engagement of CD40 on GILZ^{hi} DCs by anti-CD40 Abs was not sufficient to increase their IL-10 production in vitro (data not shown). The analysis of the CD45.2⁺CD4⁺ OT-II T cells recovered from the spleens 15 h after DC transfer revealed a similar activation of T cells that had interacted with OVA-loaded GILZ^{hi} and ctrl DCs, as assessed by CD25 and CD69 staining (Fig. 6F). Overall, these data show that upon in vivo transfer, GILZ^{hi} DCs acquire a regulatory phenotype, characterized by a reduced MHC class II expression at the cell surface and an increased IL-10 production.

Discussion

We set up a new mouse strain that constitutively expresses enhanced GILZ levels in DCs to investigate in vivo the contribution of GILZ to the tolerogenic function of DCs. In this study, we show that

the sole GILZ overexpression in DCs is sufficient to promote thymus-derived Fopx3⁺ Treg expansion in vivo.

We previously reported that high levels of GILZ expression in human DCs endow these cells with a regulatory potential, stimulating the proliferation of IL-10-secreting Ag-specific Tregs in vitro (7–9). In this article, we show that young CD11c-GILZ^{hi} mice have significantly increased frequencies of Tregs in the spleen. Noteworthy, this increase in Treg frequency is exacerbated and generalized to all the lymphoid organs in 18- to 24-mo-old animals (33, 34), pointing to an age-dependent accumulation of Tregs driven by GILZ-expressing DCs. In addition, the pool of ICOS-expressing Tregs is significantly increased in CD11c-GILZ^{hi} mice. ICOS contributes to the homeostatic survival of Tregs and to the expansion of Ag-specific Tregs (31). The ICOS^{hi} Tregs were reported to be prone to produce IL-10 (30, 31, 35). The increase of the ICOS^{hi} Tregs in the CD11c-GILZ^{hi} mice may therefore result from a constitutively enhanced activation of Tregs that could participate in Treg accumulation over time.

To exclude the possibility that the increase in Treg frequency observed in the CD11c-GILZ^{hi} mice results from a CD11c-driven expression of GILZ in a subset of T cells (36) that could promote their survival (37) or alter their differentiation (38), we used an

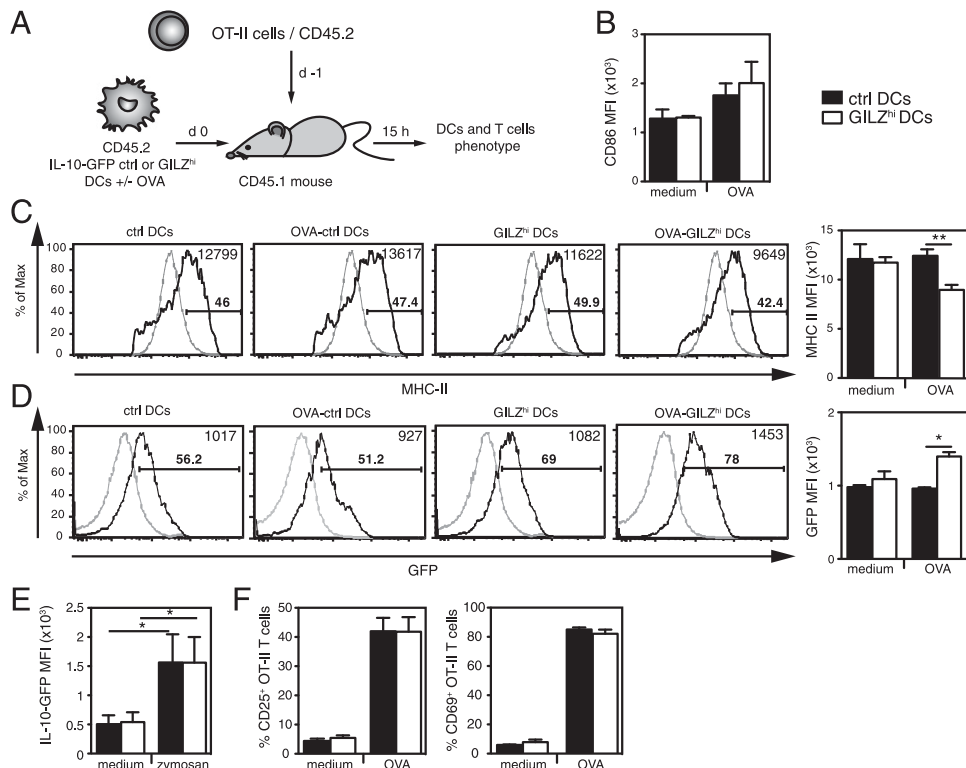


FIGURE 6. GILZ^{hi} DCs acquire a regulatory phenotype upon in vivo transfer. (A) Adoptive transfer approach to analyze DC phenotype (B and C) and their IL-10 production (D) after T cell encounter in vivo. Transferred DCs were gated as CD45.2⁺CD11c⁺MHCII⁺ cells. (B) CD86 expression at the surface of the CD45.2 DCs (C), MHC class II expression, and (D) IL-10 production were assessed by FACS analysis. Left histograms show the results for one representative experiment out of three. MHC class II and IL-10 expression by CD45.1⁺ endogenous DCs (gray lines) and CD45.2⁺ transferred DCs (black lines) are presented. MFI and percents of positive cells as compared with endogenous DCs are indicated in regular and bold fonts, respectively. Right histograms represent the MFI ± SEM for the three experiments. (E) IL-10 production by GILZ^{hi} × IL-10-GFP and ctrl IL-10-GFP DCs in the resting state (medium) and upon in vitro stimulation with zymosan ($n = 3$). Two-way ANOVA followed by Bonferroni posttests were used for statistical analysis. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. (F) CD45.2⁺CD3⁺CD4⁺ OT-II T cells activation was revealed by the percentages of cells expressing CD25 (left panel) and CD69 (right panel) ($n = 3$).

adoptive transfer model in which only the transferred DCs over-express GILZ. When OVA-loaded GILZ^{hi} DCs and OT-II T-cells were cotransferred to wild-type recipient mice, OVA-specific T cell proliferation and activation were reduced as compared with that induced by OVA-loaded control DCs. This was associated with an increase in the percentages of CD25⁺Foxp3⁺ Tregs and of IL-10-producing cells among proliferating cells, which was consistent with our findings in humans (8, 9). Because GILZ^{hi} DCs display a significant but transient reduction of OVA uptake and processing in vitro, we verified that the kinetics of loading we used in adoptive transfer results in similar OVA uptake by control and GILZ^{hi} DCs, suggesting that the reduced T cell activation by GILZ^{hi} DCs is not due to differences in Ag uptake capacity. This is further supported by the observation that control and GILZ^{hi} DCs induced a similar T cell proliferation in vitro, and by the experiments with OVA_{323–339} peptide-loaded DCs in vivo.

One question raised by the Treg proliferation achieved in vivo in our adoptive transfer model, as well as in vitro with human GILZ^{hi} DCs (8, 9), is the nature of these Tregs. To determine whether GILZ^{hi}DC-expanded Tregs originate from pre-existing tTregs or from the conversion of Tconvs into pTregs, we used OT-II T cells depleted from Foxp3⁺CD25⁺ cells. This depletion completely abrogated Treg accumulation, formally demonstrating that GILZ^{hi} DCs trigger the proliferation of tTregs. In these experiments, OVA-specific CD4 Tconvs barely proliferate upon challenge with GILZ^{hi} DCs despite absence of tTreg amplification. This low proliferation may simply result from the reduced MHC II expression by OVA-loaded GILZ^{hi} DCs in vivo but could also reflect

a state of anergy as classically observed when a T cell meets its Ag in the absence of costimulation (39) or alternatively when it is activated in the presence of IL-10 (40). At this stage of their differentiation, it is not possible to distinguish anergic T cells induced by TCR ligation in the absence of costimulation from IL-10–anergized T cells, because both populations fail to produce cytokines (40, 41). IL-10 and TGF- β production by IL-10–anergized T cells require several rounds of restimulation (42). In this article, we report that OVA-loaded GILZ^{hi} DCs produce significantly higher levels of IL-10 and do not harbor reduced CD86 expression as compared with OVA-loaded control DCs. Thus, GILZ^{hi} DCs could contribute to the induction of IL-10–anergized T cells, a hypothesis supported by our previous observation in humans (8).

Remarkably, the regulatory phenotype of GILZ^{hi} DCs was only observed in vivo and restricted to Ag-loaded DCs, suggesting that it may be acquired in vivo upon DC–T cell cognate interactions that are currently under investigation. This would explain why we did not detect a global phenotype alteration in DCs from GILZ^{hi} DCs in vitro under steady-state or after TLR engagement, results that corroborate the data obtained by other groups using GILZ-knockout mice (43, 44). GILZ is known to inhibit transcription factors like NF- κ B, AP1, and FoxO3 (12). One possibility is that GILZ alters the signaling pathways activated in DCs upon their interaction with T cells in vivo.

Our results do not support a role of GILZ in Dex-mediated effects on murine DC phenotype (reduction in MHC class II molecules and CD86 expression), as opposed to the results we observed with human monocyte-derived DCs (8). This discrepancy may result from the

experimental procedures used to upregulate GILZ in human DCs (Dex treatment and GILZ gene transfection) or intrinsic differences, which may exist between human and murine DCs. The latter hypothesis is supported by the fact that Dex treatment of murine DCs did not induce IL-10 production in contrast with human DCs, pointing to interspecies differences in responses of DCs to GC exposure.

Collectively, our work demonstrates that DCs overexpressing GILZ acquire a tolerogenic function, associated with their ability to produce IL-10, and expand Foxp3⁺ Tregs in vivo. These results identify the CD11c-GILZ^{hi} mouse as a unique and robust model to investigate in vivo the therapeutic potential of GILZ modulation in DCs in immunopathologies such as autoimmune diseases (45) or allergies and in allograft rejection.

Acknowledgments

This article is dedicated to the memory of Prof. Dominique Emilie, the former head of our laboratory who initiated this work. We thank H. Gary and H. Tharinger (Plaimmo, Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique/ Institut Fédératif de Recherche 141, Chatenay-Malabry, France) for excellent technical assistance. We thank M. Levant (Animex, Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique/Institut Fédératif de Recherche 141, Chatenay-Malabry, France) for mice handling, and B. Choisi and M. Horckmans (INSERM UMR 996, Clamart, France) for help with genotyping. We are grateful to Drs. R. Flavell and B. Malissen for providing *IL-10-GFP* and *Foxp3-eGFP* mice, respectively. We thank J. Banchereau (INSERM U955, Eq16, Vaccine Research Institute, Créteil, France) for comments and critical reading of the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Liston, A., and D. H. Gray. 2014. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 154–165.
- Povoleri, G. A., C. Scottà, E. A. Nova-Lamperti, S. John, G. Lombardi, and B. Afzali. 2013. Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators? *Front. Immunol.* 4: 169.
- Yamazaki, S., and A. Morita. 2013. Dendritic cells in the periphery control antigen-specific natural and induced regulatory T cells. *Front. Immunol.* 4: 151.
- Maldonado, R. A., and U. H. von Andrian. 2010. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.* 108: 111–165.
- Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 476–483.
- D'Adamo, F., O. Zollo, R. Moraca, E. Ayroldi, S. Bruscoli, A. Bartoli, L. Cannarile, G. Migliorati, and C. Riccardi. 1997. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7: 803–812.
- Cohen, N., E. Mouly, H. Hamdi, M. C. Maillot, M. Pallardy, V. Godot, F. Capel, A. Balian, S. Naveau, P. Galanaud, et al. 2006. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* 107: 2037–2044.
- Hamdi, H., V. Godot, M. C. Maillot, M. V. Prejean, N. Cohen, R. Krzysiek, F. M. Lemoine, W. Zou, and D. Emilie. 2007. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 110: 211–219.
- Karaki, S., G. Garcia, C. Tcherakian, F. Capel, T. Tran, M. Pallardy, M. Humbert, D. Emilie, and V. Godot. 2014. Enhanced glucocorticoid-induced leucine zipper in dendritic cells induces allergen-specific regulatory CD4(+) T-cells in respiratory allergies. *Allergy* 69: 624–631.
- Berrebi, D., S. Bruscoli, N. Cohen, A. Foussat, G. Migliorati, L. Bouchet-Delbos, M. C. Maillot, A. Portier, J. Couderc, P. Galanaud, et al. 2003. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 101: 729–738.
- Godot, V., G. Garcia, F. Capel, M. Arock, I. Durand-Gasselini, M. L. Asselin-Labat, D. Emilie, and M. Humbert. 2006. Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells. *Allergy* 61: 886–890.
- Beaulieu, E., and E. F. Morand. 2011. Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7: 340–348.
- Benkhoucha, M., N. Molnarfi, I. Dunand-Sauthier, D. Merkler, G. Schneider, S. Bruscoli, C. Riccardi, Y. Tabata, H. Funakoshi, T. Nakamura, et al. 2014. Hepatocyte Growth Factor Limits Autoimmune Neuroinflammation via Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Expression in Dendritic Cells. *J. Immunol.* 193: 2743–2752.
- Cathelin, D., Ö. Met, and I. M. Svane. 2013. Silencing of the glucocorticoid-induced leucine zipper improves the immunogenicity of clinical-grade dendritic cells. *Cytotherapy* 15: 740–749.
- Zimmer, A., J. Bouley, M. Le Mignon, E. Pliquet, S. Horiot, M. Turfkruyer, V. Baron-Bodo, F. Horak, E. Nony, A. Louise, et al. 2012. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129: 1020–1030.
- Terness, P., T. Oelert, S. Ehser, J. J. Chuang, I. Lahdou, C. Kleist, F. Velten, G. J. Hämmerling, B. Arnold, and G. Opelz. 2008. Mitomycin C-treated dendritic cells inactivate autoreactive T cells: toward the development of a tolerogenic vaccine in autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 18442–18447.
- Lebson, L., T. Wang, Q. Jiang, and K. A. Whartenby. 2011. Induction of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene limits the efficacy of dendritic cell vaccines. *Cancer Gene Ther.* 18: 563–570.
- Wang, Y., A. Kissenpennig, M. Mingueneau, S. Richelme, P. Perrin, S. Chevrier, C. Genton, B. Lucas, J. P. DiSanto, H. Acha-Orbea, et al. 2008. Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 180: 1565–1575.
- Kamanaka, M., S. T. Kim, Y. Y. Wan, F. S. Sutterwala, M. Lara-Tejero, J. E. Galán, E. Harhaj, and R. A. Flavell. 2006. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 25: 941–952.
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693–1702.
- Schlecht, G., C. Leclerc, and G. Dadaglio. 2001. Induction of CTL and non-polarized Th cell responses by CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *J. Immunol.* 167: 4215–4221.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389–400.
- Autenrieth, S. E., and I. B. Autenrieth. 2009. Variable antigen uptake due to different expression of the macrophage mannose receptor by dendritic cells in various inbred mouse strains. *Immunology* 127: 523–529.
- Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek, and C. Kurts. 2006. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J. Immunol.* 176: 6770–6776.
- Goodridge, H. S., D. M. Underhill, and N. Touret. 2012. Mechanisms of Fc receptor and dectin-1 activation for phagocytosis. *Traffic* 13: 1062–1071.
- Mourès, J., G. Moron, G. Schlecht, N. Escriou, G. Dadaglio, and C. Leclerc. 2008. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* 112: 3713–3722.
- Schlecht, G., S. Garcia, N. Escriou, A. A. Freitas, C. Leclerc, and G. Dadaglio. 2004. Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8+ T-cell responses in vivo after viral stimulation. *Blood* 104: 1808–1815.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, et al. 2002. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17: 211–220.
- Lian, Z. X., T. Okada, X. S. He, H. Kita, Y. J. Liu, A. A. Ansari, K. Kikuchi, S. Ikehara, and M. E. Gershwin. 2003. Heterogeneity of dendritic cells in the mouse liver: identification and characterization of four distinct populations. *J. Immunol.* 170: 2323–2330.
- Burmeister, Y., T. Lischke, A. C. Dahler, H. W. Mages, K. P. Lam, A. J. Coyle, R. A. Kroczeck, and A. Hutloff. 2008. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J. Immunol.* 180: 774–782.
- Chen, Y., S. Shen, B. K. Gorenthal, J. Gao, and X. P. Zhong. 2012. Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression. *J. Immunol.* 188: 1698–1707.
- Löhning, M., A. Hutloff, T. Kallinich, H. W. Mages, K. Bonhagen, A. Radbruch, E. Hamelmann, and R. A. Kroczeck. 2003. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J. Exp. Med.* 197: 181–193.
- Fessler, J., A. Ficjan, C. Duftner, and C. Dejaco. 2013. The impact of aging on regulatory T-cells. *Front. Immunol.* 4: 231.
- Nishioka, T., J. Shimizu, R. Iida, S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. 2006. CD4+ CD25+Foxp3+ T cells and CD4+CD25-Foxp3+ T cells in aged mice. *J. Immunol.* 176: 6586–6593.
- Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 8: 1024–1032.
- Huleatt, J. W., and L. Lefrançois. 1995. Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo. *J. Immunol.* 154: 5684–5693.
- Asselin-Labat, M. L., M. David, A. Biola-Vidamment, D. Lecoeuche, M. C. Zennaro, J. Bertoglio, and M. Pallardy. 2004. GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* 104: 215–223.
- Cannarile, L., F. Fallarino, M. Agostini, S. Cuzzocrea, E. Mazzon, C. Vacca, T. Genovese, G. Migliorati, E. Ayroldi, and C. Riccardi. 2006. Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines. *Blood* 107: 1039–1047.

39. Jenkins, M. K., E. Burrell, and J. D. Ashwell. 1990. Antigen presentation by resting B cells. Effectiveness at inducing T cell proliferation is determined by costimulatory signals, not T cell receptor occupancy. *J. Immunol.* 144: 1585–1590.
40. Groux, H., M. Bigler, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 184: 19–29.
41. Schwartz, R. H. 1996. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* 184: 1–8.
42. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737–742.
43. Ngo, D., E. Beaulieu, R. Gu, A. Leaney, L. Santos, H. Fan, Y. Yang, W. Kao, J. Xu, V. Escriou, et al. 2013. Divergent effects of endogenous and exogenous glucocorticoid-induced leucine zipper in animal models of inflammation and arthritis. *Arthritis Rheum.* 65: 1203–1212.
44. Suarez, P. E., E. G. Rodriguez, R. Soundararajan, A. M. Merrillat, J. C. Stehle, S. Rotman, T. Roger, M. J. Voirol, J. Wang, O. Gross, et al. 2012. The glucocorticoid-induced leucine zipper (gilz/Tsc22d3-2) gene locus plays a crucial role in male fertility. *Mol. Endocrinol.* 26: 1000–1013.
45. Krzysiek, R. 2010. Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expression by dendritic cells in tolerance induction. *Transplant. Proc.* 42: 3331–3332.

HIV-associated pulmonary arterial hypertension onset is associated with the soluble CD14 level and inflammation related to monocyte activation by LPS translocation from the gut

Tasnime Issoufaly, David Zucman, **Mehdi Ellouze**, Sophie Hüe, Jean-Daniel Lelievre, Louis-Jean Couderc, Philippe Devillier, Veronique Godot, Colas Tcherakian

Congrès de pneumologie de langue Française 2015 (poster et communication orale)

Abstract

Introduction

PAH onset during HIV infection has an epidemiological pattern which matches with a "non-AIDS event" (i.e.:not linked to HIV-load or T-CD4+ level). Inflammation mediated by monocytes in response to bacterial translocation from the gut is involved in non-AIDS events onset. We conducted a proof of concept study to evaluate the soluble (s)CD14 and (s)CD163 levels, which both increase after monocyte activation by lipopolysaccharide (LPS), and so used as surrogate markers of both bacterial translocation and monocyte activation in non-AIDS events evaluation.

Methods

We compared a HIV-PAH group (n=11) to a HIV-infected group without PAH (n=11) to ensure that sCD14 or sCD163 were higher in the HIV-PAH group.

Results

Both sCD14 and sCD163 were significantly higher in HIV-PAH group versus HIV-group. Moreover sCD14 significantly decrease in HIV-PAH sub-group with normalized hemodynamics. The same result was obtained for TNF level. PAH-HIV group also experienced a distinct monocyte phenotype pattern (CD163+) and a higher number of activated CD8+T-cells (HLADR+CD38+). As surrogate markers of LPS translocation (LBP) and enterocyte apoptosis (I-FABP) appeared similar between the two groups we looked for a higher LPS-sensitivity of monocytes in HIV-PAH group, which effectively exhibited a higher level of TNF after LPS stimulation in vitro.

Conclusion

These preliminaries data are consistent with an association between inflammation and HIV-PAH onset. The inflammation seems related to monocyte activation with LPS translocation and a particular susceptibility of monocytes to LPS in the HIV-PAH group.

HIV-associated pulmonary arterial hypertension (HIV-PAH) onset is associated with inflammation related to monocyte activation by LPS and assessed by the soluble CD14 level

Tasnime Issoufaly, David Zucman, **Mehdi Ellouze**, Sophie Hüe, Jean-Daniel Lelievre, Louis-Jean Couderc, Philippe Devillier, Veronique Godot and Colas Tcherakian

Au congrès de physiologie et biologie intégrative (CPBI)

Abstract

Introduction

PAH, which occurs 10.000 times higher during HIV-infection than in general population, matches with a "non-AIDS event" (i.e.: not linked to HIV-load or T-CD4+ level). Monocyte-related inflammation in response to chronic LPS translocation from the gut is involved in non-AIDS events genesis. This LPS-induced inflammation is assessed by the soluble (s)CD14 level, which is released from the LPS-activated monocyte. We hypothesized a similar mechanism in PAH-HIV

Methods

We assayed sCD14 in a HIV-PAH group (n=11), a HIV-infected group without PAH (n=11) and healthy donors (n=11).

Results

sCD14 was significantly higher in HIV-PAH group versus other groups. Moreover sCD14 significantly decrease in HIV-PAH sub-group with normalized hemodynamics, reinforcing the link between sCD14 and PAH.

The soluble CD163, a vascular marker which also rises after monocyte LPS-induced activation, was significantly higher in the HIV-PAH group.

The TNF level, which is the main monocyte LPS-induced cytokine, was significantly higher in the PAH-HIV group.

Finally PAH-HIV group exhibited a prominent CD163+monocyte pattern, already observed in systemic vascular diseases.

Surrogate marker of LPS translocation (LBP) and enterocyte apoptosis (I-FABP) were higher in both HIV-groups versus healthy donors but similar between them. We then questioned LPS-oversensitivity of monocytes in HIV-PAH group, which effectively produced significant higher amount of TNF after LPS stimulation *in vitro*.

Conclusion

These preliminaries data suggest an association between monocyte-related inflammation and HIV-PAH onset. This inflammation seems related to both LPS translocation and a higher susceptibility of monocytes to LPS in the HIV-PAH group.

Functional consequences of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper protein expression in dendritic cells

Joseph Calmette, **Mehdi Ellouze**, Marc Pallardy, Françoise Bachelerie, Eric Morand, Véronique Godot, Géraldine Schlecht-Louf

European Congress of Immunology – ECI 2015, Vienna

Abstract

The Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper protein (GILZ) is a key endogenous regulator of the immune response. We have shown, in Human and mouse, that GILZ expression in dendritic cells (DC) is tightly controlled and constitutes a molecular switch, which drives DC differentiation from a pro-inflammatory towards a tolerance-inducing function. We have established in vivo that GILZ up-regulation in DC (GILZ^{hi} DC) results in reduced antigen presentation and increased interleukin-10 secretion, and that GILZ^{hi} DC promote thymus-derived regulatory T cells (Treg) expansion. To gain further insight into the cellular processes controlled by GILZ in DC, and the mechanisms beneath, we have generated conditional knock-out (KO) mice. In these mice, the DC do not express GILZ (GILZ^{ko} DC). These mice display normal DC subsets distribution in their lymphoid organs and GILZ^{ko} DC basal phenotype is not different from that observed in control DC. However, functional analyses reveal that GILZ^{ko} DC display a dramatic and selective increase in antigen macropinocytosis but not receptor-mediated endocytosis, as compared to control DC, with the corollary transient decrease of antigen uptake in GILZ^{hi} DC. Collectively, these results suggest that GILZ modulation in DC may fine-tune their access to antigens in vivo and shed light on a previously unknown mechanism, which controls antigen uptake by DC. We now investigate the mechanism(s) underlying this modulation of DC function and its impact on effector T cells and/or Treg activation, both in the steady state and in the context of immunopathologies.

Glossaire

ALDH3B1	<i>Aldehyde Dehydrogenase 3 Family, Member B1</i>
AM	Alveolar macrophage
ANXA1	Annexin A1
AP-1	Activator protein 1
AKTs	Protein kinase B family
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ATF3	Activating Transcription Factor 3
BCG	Bacille de Calmette Guerin
BioGRID	Biological General Repository for Interaction Datasets
BMDM	Bone marrow derived macrophage
BrDU	Bromodésoxyuridine
CCL2	Chemokine ligand 2
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
C3b	Complement protein 3 beta subunit
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CIVD	coagulation intravasculaire disséminée
CLR	C-Lectine receptor
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CR3	Complement receptor 3
CSF1	Colony stimulating factor 1
CSBP	Cytokinin Specific Binding Protein
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1 , récepteur à la fractalkine
DAMP	Dammage associated molecular pattern
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
Dex	Dexaméthasone
EBV	Epstein-Barr Virus, virus de la mononucléose
ELAVL1	
ER	Récepteur aux oestrogènes
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
F4/80	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
FoxO1/2/3/4	Forkhead box protein O1, O2, O3, O4

GAL4	Regulatory protein GAL4
GATA-6	GATA-binding factor 6
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
Gr-1	Granulocyte antigen-1
GILZ	Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper
GILZ-FHC	GILZ taggée en region C-terminal par les tags Flag et HA
GILZ ^{high}	Lignée murine surexprimant GILZ sous le contrôle du promoteur CD68
GILZ-KO	GILZ Knock-out mice, (Conditionnel ou total)
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GOC	Gene Ontology Consortium
HDAC	Histone désacétylase
HIS3	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase
HLA-DR	Human leukocyte antigen
HMGB1	High-mobility group box 1
HOIP	
IFN- γ	Interferon gamma
IKK	Inhibitor of nuclear factor Kappa- β Kinase subunit
IL	Interleukine
ILCs	Innate lymphoid cells ou Cellules lymphoïdes de l'immunité innée
iNOS	Induced Nitric Oxide Synthase
IRAK-1 , 4, M	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1, 4 and M
IRF-3, 7,8	Interferon Regulatory Factor 3 ,7 , 8
JAK2	Janus kinase 2
Jnk	c-Jun N-terminal kinase
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KDM1A	Lysine-specific histone demethylase 1A
KI67	KI Antigène 67
KLF4	Kruppel-like factor 4, transcription factor
LDH	Lactate deshydrogénase
LMP1	Latent membrane protein 1
LoxP	Lox site
LPM	Large Peritoneal Macrophage
LPS	Lipopolysaccharides bactérien
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1A
Ly6C	Lymphocyte antigen 6

MF-FAT	Molecular Functions, Gene Ontology Consortium
MAPK	Mitogen Associated Protein Kinase
M1	Macrophage activation: classic
M2	Macrophage activation: alternative
MCL	Markov Cluster Algorithm
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDA-5	Melanoma differentiation-associated gene 5
MDA-4	Melanoma differentiation-associated gene 5
MDR	Macrophage Disappearance Reaction
MSCs	Mesenchymal stem cells – cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse
MHC-I	Major histocompatibility complex class I
miR-24	MicroRNA precursor
MMR	Macrophage mannose receptor
mTOR	
MWCO	Molecular weight cut-off
Myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
MyoD1	Myogenic transcription factor
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NES	Signal d'exportation nucléaire
NCBI	National Center for Biology Information
NFAT	Nuclear factor of activated T cell
NO	Monoxyde d'azote
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)
NF-κB	Nuclear factor kappa B
Oct-1	
ORF	Open Reading Frame, cadre ouvert de lecture
PAF	Platelet activating factor ou facteur d'agrégation plaquettaire
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PFKL	Phosphofructokinase Liver
PTGES	Prostaglandin E Synthase
PDL1	Programmed death-ligand 1
PAX5	Paired box gene 5
PER	Proline Enriched Region domain
PI3Ks	Phosphatidylinositide 3-kinases
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma PPAR
PRR	Pathogen recognition receptor
PU1	Spi-1 proto-oncogene

Raf-1	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein Kinase
Rap 1A	RAP1A, member of RAS oncogene family
Ras	Petite GTPase
Rel	NF- κ B subunit
RIP-1	Receptor Interacting Protein 1
RLR	Rig like Receptors
ROS	Reactive oxygen species
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium for culturing cells
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aiguë
SH3	Sarc Homology Domain 3
SHIP1	SH-2 containing inositol 5'-polyphosphatase 1
Siglec-F	sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F
siRNA	Small interfering RNA
SIRS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SPM	Small Peritoneal Macrophages
STAT6	Signal transducer and activator of transcription
SUMO-1	Small Ubiquitin-like Modifier
TAK-1	TGF beta associated kinase 1
TAP, TAP_TAG	Tandem affinity purification on tags
HA tag	Human influenza hemmaglutinin tag
TCR	T cell receptor
TCF4E	
TetR	Tet Repressor Protein
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
THP-1	Human leukemia monocytic cell line
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR associated protéin
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR1 - 2	TNF Receptor 1 et 2
TNFSR-II	TNF Soluble receptor II
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
TRIF	Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN- β
TSC	Transforming growth factor Stimulated Clone
TTP	Tristetraprolin
V-ATPase	Vacuolar ATPases
vYFP	Venus fluorescent protein

Résumés

Abstract

Sepsis and septic shock, associated with a severe and uncontrolled systemic inflammation, are the main causes of death in intensive care units. Macrophages play a central role in these pathologies. They are involved in the initiation and regulation of inflammation. They recognize LPS from the bacterial cell wall via TLR4, which triggers the activation of MAPK signaling pathway and transcription factors such as NF- κ B and AP1 and ultimately, the production of pro-inflammatory cytokines including TNF and IL6. The expression of the protein GILZ in macrophages limits *in vitro* the production of IL6 and TNF in response to LPS. This effect is attributed to inactivation of NF- κ B. Moreover, GILZ expression decreases in human and mouse macrophages exposed to LPS.

Given the regulatory effects of GILZ in macrophages, the objectives of our study were 1) to determine whether GILZ expression is down-regulated in monocytes / macrophages (M/M) in the sepsis, 2) to determine whether the modulation of GILZ expression in M/M is sufficient to influence systemic inflammation, and 3) to identify GILZ mechanism of action in human M/M.

GILZ expression was measured in the M/M of patients with septic shock and in a murine model of endotoxemia. We observed a significant reduced expression of GILZ in these pathological contexts in human and mice. The impact of this alteration was explored in unique transgenic mouse model in which macrophages stably overexpress GILZ (CD68-GILZ).

We confirmed that GILZ overexpression limits TNF production and promotes IL-10 production in *in vitro* LPS-stimulated macrophages. We further studied the inflammatory response and survival of these mice in models of endotoxemia and septic shock. We showed that GILZ overexpression restricted to macrophages, limits serum pro-inflammatory cytokines production, therefore decreases systemic inflammation and significantly improves mice survival. These results highlight the effects of macrophage polarization by GILZ at a systemic level.

This result confirmed the need to characterize GILZ interactome in human macrophages. Two complementary approaches have been used. The first one consists of a pan-genomic double hybrid screening of human GILZ partners. The second method consists of a tandem affinity purification (TAP-TAG) of GILZ protein and its associated partners, followed by the identification of these partners by mass spectrometry. Analyses have been performed independently on nuclear and cytoplasmic extracts from human macrophage cells, genetically engineered to express GILZ protein with the two tags required for purification. This dual approach led us to identify new direct and indirect interactions between GILZ and other key proteins of TLR4 signaling pathway in human macrophages and highlight a likely role of GILZ as a transcription regulatory factor.

These results confirm the anti-inflammatory role of GILZ on systemic inflammation and enhancement of lifetime in murine models of endotoxemia and septic shock. Furthermore, this work identifies for the first time the cytoplasmic and nuclear GILZ partners in human macrophages and would allow in the future, a better understanding of GILZ mechanism of action.

Résumé

Le Sepsis et le choc septique associés à une inflammation systémique sévère et incontrôlée sont les principales causes de mortalité dans les unités de soins intensifs. Les macrophages jouent un rôle central dans ces pathologies. Ils participent à l'initiation et à la régulation de l'inflammation. Lors d'une infection bactérienne, ils reconnaissent le LPS de la paroi bactérienne par l'intermédiaire du TLR4, ce qui déclenche l'activation des MAPK, des facteurs de transcription NF- κ B et AP1 et *in fine* la production des cytokines pro-inflammatoires dont le TNF et l'IL6. L'expression de la protéine GILZ dans les macrophages limite *in vitro* la production d'IL6 et de TNF en réponse au LPS. Cet effet est attribué à une inactivation de NF- κ B. D'autre part, l'expression de GILZ décroît dans les macrophages humains et murins après une stimulation par du LPS.

Compte tenu des effets régulateurs de GILZ dans les macrophages, les objectifs de notre étude sont 1) de déterminer si l'expression de GILZ est altérée dans les monocytes/macrophages (M/M) au cours du sepsis, 2) de déterminer si une modulation de l'expression de GILZ dans les M/M est suffisante pour influencer l'inflammation systémique, 3) d'identifier le mécanisme d'action de GILZ dans les M/M humains.

Nous avons mesuré l'expression de GILZ dans les M/M de patients atteints de choc septique et dans un modèle murin d'endotoxémie. Nous avons observé une diminution significative de GILZ dans ces contextes pathologiques, chez l'homme et la souris. L'impact de cette altération a été exploré dans des souris transgéniques uniques dont les macrophages sur-expriment GILZ de façon non régulable. Nous avons confirmé que la surexpression de GILZ limite la production de TNF et favorise celle de l'IL-10 dans les macrophages stimulés *in vitro* par du LPS. Nous avons ensuite étudié la réponse inflammatoire et la survie de ces souris dans un modèle d'endotoxémie et de choc septique et montré respectivement que cette surexpression de GILZ restreinte aux macrophages limite la production sérique de cytokines pro-inflammatoires et, par conséquent, l'inflammation systémique en améliorant significativement la survie des souris. Ces résultats mettent en évidence les conséquences au niveau systémique de la régulation des macrophages par GILZ.

Dans l'optique d'élucider les mécanismes impliqués dans la régulation des macrophages par GILZ, nous avons confirmé que GILZ inhibe NF- κ B dans les macrophages humains sans toutefois retrouver l'interaction directe décrite entre GILZ murin et la sous-unité p65 de NF- κ B.

Ce résultat nous a conforté dans la nécessité de caractériser l'interactome de GILZ dans les macrophages humains. Deux approches complémentaires ont été utilisées. La première est un criblage pan-génomique des interactants de GILZ humaine par la technique du double-hybride. La seconde méthode consiste en une purification d'affinité en tandem (TAP-TAG) de la protéine GILZ et de ses interactants, suivie d'une identification de ces protéines par spectrométrie de masse. Ce complexe a été isolé à partir d'extraits nucléaires ou cytoplasmiques de cellules humaines différenciées en macrophages et génétiquement modifiées afin d'exprimer la protéine GILZ flanquée des deux étiquettes nécessaires à sa purification. Ces deux approches ont mis en évidence des interactions nouvelles entre GILZ et des protéines clés de la signalisation du TLR4 dans les macrophages humains ainsi qu'un probable rôle de GILZ comme facteur régulateur de la transcription.

Ces résultats montrent que la régulation de la réponse anti-inflammatoire des macrophages par GILZ a un impact sur l'inflammation systémique *in vivo* et améliore la survie dans un modèle de choc septique sévère. De plus, ces travaux identifient pour la première fois les partenaires cytoplasmiques et nucléaires de GILZ dans les macrophages humains et devraient permettre dans le futur, une meilleure compréhension de cette protéine.

Résumé

Le Sepsis et le choc septique associés à une inflammation systémique sévère et incontrôlée sont les principales causes de mortalité dans les unités de soins intensifs. Les macrophages jouent un rôle central dans ces pathologies. Ils participent à l'initiation et à la régulation de l'inflammation. Lors d'une infection bactérienne, ils reconnaissent le LPS de la paroi bactérienne par l'intermédiaire du TLR4, ce qui déclenche l'activation des MAPK, des facteurs de transcription NF- κ B et AP1 et *in fine* la production des cytokines pro-inflammatoires dont le TNF et l'IL6. L'expression de la protéine GILZ dans les macrophages limite *in vitro* la production d'IL6 et de TNF en réponse au LPS. Cet effet est attribué à une inactivation de NF- κ B. D'autre part, l'expression de GILZ décroît dans les macrophages humains et murins après une stimulation par du LPS.

Compte tenu des effets régulateurs de GILZ dans les macrophages, les objectifs de notre étude sont 1) de déterminer si l'expression de GILZ est altérée dans les monocytes/macrophages (M/M) au cours du sepsis, 2) de déterminer si une modulation de l'expression de GILZ dans les M/M est suffisante pour influencer l'inflammation systémique, 3) d'identifier le mécanisme d'action de GILZ dans les M/M humains.

Nous avons mesuré l'expression de GILZ dans les M/M de patients atteints de choc septique et dans un modèle murin d'endotoxémie. Nous avons observé une diminution significative de GILZ dans ces contextes pathologiques, chez l'homme et la souris. L'impact de cette altération a été exploré dans des souris transgéniques uniques dont les macrophages sur-expriment GILZ de façon non régulable. Nous avons confirmé que la surexpression de GILZ limite la production de TNF et favorise celle de l'IL-10 dans les macrophages stimulés *in vitro* par du LPS. Nous avons ensuite étudié la réponse inflammatoire et la survie de ces souris dans un modèle d'endotoxémie et de choc septique et montré respectivement que cette surexpression de GILZ restreinte aux macrophages limite la production sérique de cytokines pro-inflammatoires et, par conséquent, l'inflammation systémique en améliorant significativement la survie des souris. Ces résultats mettent en évidence les conséquences au niveau systémique de la régulation des macrophages par GILZ.

Dans l'optique d'élucider les mécanismes impliqués dans la régulation des macrophages par GILZ, nous avons confirmé que GILZ inhibe NF- κ B dans les macrophages humains sans toutefois retrouver l'interaction directe décrite entre GILZ murin et la sous-unité p65 de NF- κ B.

Ce résultat nous a conforté dans la nécessité de caractériser l'interactome de GILZ dans les macrophages humains. Deux approches complémentaires ont été utilisées. La première est un criblage pan-génomique des interactants de GILZ humaine par la technique du double-hybride. La seconde méthode consiste en une purification d'affinité en tandem (TAP-TAG) de la protéine GILZ et de ses interactants, suivie d'une identification de ces protéines par spectrométrie de masse. Ce complexe a été isolé à partir d'extraits nucléaires ou cytoplasmiques de cellules humaines différenciées en macrophages et génétiquement modifiées afin d'exprimer la protéine GILZ flanquée des deux étiquettes nécessaires à sa purification. Ces deux approches ont mis en évidence des interactions nouvelles entre GILZ et des protéines clés de la signalisation du TLR4 dans les macrophages humains ainsi qu'un probable rôle de GILZ comme facteur régulateur de la transcription.

Ces résultats montrent que la régulation de la réponse anti-inflammatoire des macrophages par GILZ a un impact sur l'inflammation systémique *in vivo* et améliore la survie dans un modèle de choc septique sévère. De plus, ces travaux identifient pour la première fois les partenaires cytoplasmiques et nucléaires de GILZ dans les macrophages humains et devraient permettre dans le futur, une meilleure compréhension de cette protéine.