



HAL
open science

Impact du peptide antimicrobien issu du venin de la fourmi *Tetramorium bicarinatum* P17 sur la polarisation et l'acquisition des fonctions antifongiques des macrophages humains vis-à-vis de *Candida albicans*

Khaddouj Benmoussa

► **To cite this version:**

Khaddouj Benmoussa. Impact du peptide antimicrobien issu du venin de la fourmi *Tetramorium bicarinatum* P17 sur la polarisation et l'acquisition des fonctions antifongiques des macrophages humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30379 . tel-02013759

HAL Id: tel-02013759

<https://theses.hal.science/tel-02013759>

Submitted on 4 Nov 2021

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité : *Immunologie*

Présentée et soutenue par
Khaddouj BENMOUSSA

Le Vendredi 13 Janvier 2017

Titre :

Impact du peptide antimicrobien issu du venin de la fourmi Tetramorium bicarinatum P17 sur la polarisation et l'acquisition des fonctions antifongiques des macrophages humains vis-à-vis de Candida albicans

JURY

M. Lhousseine Touqui, Directeur de recherches, INSERM, PARIS - Rapporteur
M. Thierry Noël, Professeur des Universités, BORDEAUX - Rapporteur
M. François Meurens, Professeur Ecole Nationale Vétérinaire, NANTES - Rapporteur
Mme Bettina Couderc, Professeur des Universités, TOULOUSE - Présidente du jury
Mme Agnès Coste, Maître de Conférences, TOULOUSE - Examinatrice
M. Michel Treilhou, Professeur des Universités, ALBI - Examineur
M. Bernard Pipy, Directeur de recherche émérite, INSERM, TOULOUSE-Examineur

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologies*

Unité de recherche : *UMR 152 équipe MacroPol et EA7417 – BTSB « Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives »*

Directeur(s) de Thèse : *Mme Agnès Coste et M. Michel Treilhou*

Rapporteurs : *M. L. Touqui, M. T. Noël, M. F. Meurens*

Sommaire

Sommaire	1
Remerciements	3
Table des illustrations	12
Table des abréviations	14
Introduction Bibliographique	19
Les peptides antimicrobiens	20
I. Structure et classification des peptides antimicrobiens	22
1. <u>Les peptides linéaires formant des hélices α</u>	24
2. <u>Les peptides à ponts disulfure</u>	25
3. <u>Les peptides linéaires riches en certains acides aminés</u>	25
II. Les peptides antimicrobiens produits par les insectes	26
1. <u>Généralités sur les peptides antimicrobiens d'insectes</u>	26
2. <u>Les peptides antimicrobiens issus du venin de fourmis</u>	27
3. <u>Les peptides antimicrobiens produits par la fourmi <i>Tetramorium bicarinatum</i></u>	29
III. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens cationiques	32
1. <u>Modèle de déstabilisation en tapis ou Carpet-like model</u>	33
2. <u>Modèle des pores toroïdaux ou Wormhole model</u>	34
3. <u>Modèle de pores en douve de tonneaux ou Barrel-stave model</u>	35
4. <u>Cibles intracellulaires des peptides antimicrobiens</u>	37
a) <i>Inhibition de la synthèse du peptidoglycane</i>	37
b) <i>Inhibition de la synthèse protéique bactérienne</i>	37
IV. Mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens	38
Les macrophages	42
I. Origine et différenciation	42
II. Propriétés fonctionnelles des macrophages	49
1. <u>La phagocytose</u>	49
2. <u>Les intermédiaires réactifs de l'oxygène (IROs)</u>	50
3. <u>Cytokines/chimiokines</u>	52
a) <i>Les cytokines</i>	53
b) <i>L'inflammasome</i>	56
c) <i>Les chimiokines</i>	58
4. <u>Eicosanoïdes</u>	59
a) <i>La voie des cyclooxygénases</i>	60
b) <i>La voie des lipoxygénases</i>	62
III. Polarisation des macrophages	64
1. Les macrophages M1	66
a) <i>Caractéristiques phénotypiques</i>	66
b) <i>Récepteurs exprimés à la surface des macrophages M1</i>	69
i. <u>Les récepteurs Toll-like (TLRs)</u>	70
ii. <u>Les récepteurs reconnaissant les pathogènes opsonisés</u>	73
c) <i>Facteurs de transcription impliqués dans la polarisation M1 des macrophages</i>	77
i. <u>STAT-1</u>	77
ii. <u>IRF5</u>	79
iii. <u>NF-κB</u>	81
2. Les macrophages M2	84
a) <i>Caractéristiques phénotypiques</i>	84
b) <i>Les différents sous-types de macrophages M2</i>	85
i. <u>Macrophages M2a</u>	85
ii. <u>Macrophages M2b</u>	86
iii. <u>Macrophages M2c</u>	87
iv. <u>Macrophages M2d</u>	87
c) <i>Récepteurs exprimés à la surface des macrophages M2</i>	88
i. <u>Les récepteurs scavenger</u>	88
ii. <u>Les récepteurs lectine de type C (CLR)</u>	91
d) <i>Facteurs de transcription impliqués dans la polarisation M2 des macrophages</i>	96
i. <u>STAT-6</u>	97
ii. <u>PPARγ</u>	99
iii. <u>LRH-1</u>	104
e) <i>Rôle des macrophages M2 dans la réponse à <i>Candida albicans</i></i>	107

i. <u>Reconnaissance et élimination de C. albicans par les macrophages</u>	108
ii. <u>Polarisation des macrophages en réponse à C. albicans</u>	111
Rôle des peptides antimicrobiens dans l'immuno-modulation	115
I. <u>Modulation de la défense immunitaire innée par les PAMs</u>	115
1. <u>Effets des PAMs sur la production de cytokines/chimiokines par les cellules immunitaires innées</u>	116
2. <u>Effet des PAMs sur le chimiotactisme</u>	117
3. <u>Effet des PAMs sur la modulation de la réponse inflammatoire et la réponse anti-infectieuse</u>	119
a) <u>Contrôle de la réponse inflammatoire</u>	119
b) <u>Contrôle de la réponse anti-infectieuse</u>	123
II. <u>Modulation de la défense immunitaire adaptative par les PAMs</u>	124
III. <u>Mécanismes d'action</u>	127
IV. <u>Implication des PAMs dans les pathologies</u>	128
Résultats	133
Conclusion générale Et perspectives	165
Références	176

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Noël, Monsieur Touqui et Monsieur Meurens pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à vous pour vos remarques constructives durant l'évaluation de mon manuscrit mais aussi pour ces discussions enrichissantes lors de ma soutenance.

Merci au Professeur Bettina Couderc pour avoir accepté de présider le jury de thèse. Nous avons été amenées à nous voir à de nombreuses reprises lors de ma thèse et j'aimerais également vous remercier pour votre bonne humeur permanente et contagieuse. Ce fut un plaisir de discuter avec vous et de vous avoir en tant que présidente de mon jury de thèse.

Merci à mes co-directeurs de thèse, Agnès Coste et Michel Treilhou. Merci à vous deux de m'avoir fait confiance suite à notre entretien après mon M2 et de m'avoir donné la chance de réaliser mes travaux de thèse dans votre équipe.

Agnès, nous avons passé la grande majorité de ces trois ans ensemble et j'ai pu énormément découvrir et me découvrir grâce à toi sur le plan professionnel et personnel. En tant que directrice de thèse, j'aimerais te remercier encore une fois pour la confiance que tu m'as accordé, mais aussi pour ton soutien, ton aide précieuse, ainsi que ta disponibilité, ton investissement et toutes les connaissances scientifiques que tu as pu m'apporter. Ces années sous ta direction m'auront permis de confirmer mon envie de continuer dans la recherche et auront été une excellente formation à la paillasse et dans la valorisation de mes travaux. Mais ce n'est pas tout ce que je

retiendrai de ces trois ans à tes côtés. En effet, tu m'as également beaucoup apporté sur le plan personnel. Toujours disponible pour discuter, pour m'apporter ton point de vue sur de nombreux sujets, même si nous n'avons pas toujours été d'accord tu n'as jamais hésité à me faire part de ton opinion, qui a été constructive et c'est aussi cela qui a rendu nos discussions aussi enrichissantes et je t'en remercie. Tu m'as également aidée à prendre confiance en moi et à me poser moins de questions pour pouvoir mieux avancer. Merci également pour ton aide d'après thèse dans mes recherches de post-doctorat. Tu es une chef de labo, une directrice de thèse mais aussi une personne formidable. Et je sais que quel que soit l'endroit où mon aventure de jeune docteur se poursuivra, nous resterons en contact.

Michel, même si mes travaux ont été réalisés à Toulouse, vous êtes resté disponible tout au long de ma thèse pour m'accompagner, faire avancer le projet et m'apporter votre aide. Je vous remercie pour votre disponibilité, vos conseils avisés et votre aide durant ces trois ans. J'aimerais également vous remercier pour votre gentillesse et votre confiance. Vous m'avez également donné l'opportunité, durant ma thèse, de dispenser des TD et TP à l'université Champollion, ce qui m'a permis d'évoluer dans un domaine que je n'envisageais pas, d'acquérir une première expérience en enseignement et ainsi de prendre conscience de mon intérêt pour le métier d'enseignant chercheur. Je vous en suis beaucoup reconnaissante. Merci également de m'avoir permis de rencontrer d'autres chercheurs présentant un intérêt commun pour les peptides antimicrobiens et de mettre en avant mon projet de recherche lors de plusieurs communications orales. Cela fut enrichissant.

Bernard, « mon troisième co-directeur de thèse ». Merci pour votre investissement et votre soutien au cours de ma thèse. Vous avez participé à ce projet et m'avez aidé comme si vous étiez un de mes encadrants de thèse et votre aide, vos conseils et les réflexions autour des résultats, des mises au point et des manip m'ont été très précieux. Disponible à toute heure de la journée, tôt le matin, pendant les heures de repas, vous m'avez énormément apporté tout au long de ces trois ans. Vous êtes un puits de connaissances et de savoir scientifique mais aussi sur de nombreux autres sujets, et toutes les discussions avec vous furent agréables, et très constructives. Je souhaiterais vous témoigner ici toute ma reconnaissance, mon admiration et mon profond respect.

Mes petits chouchous du labo... Mélissa et Mouna.

Méli, la prochaine sur la liste des soutenances! Ta gentillesse, ta douceur, ta générosité et ta folie (que tu peux assez bien cacher) ont vite fait que nous sommes passées de « simples collègues » à de véritables amies. J'ai toujours pu compter sur ton aide et ton soutien que ce soit pour les manips, d'autres tâches du labo mais même en dehors et je t'en remercie du fond du cœur. J'ai également pu me reposer sur toi à la fin de ma thèse, jusqu'à l'organisation de l'après-soutenance pour laquelle je t'ai laissé t'occuper de l'organisation de ma soirée de thèse avec Mouna. Et celle-ci fut au top, je n'aurais pas pu avoir mieux, alors merci beaucoup. Tu as de superbes qualités sur le plan professionnel en étant travailleuse, intelligente, acharnée et réfléchie et en réalisant un travail remarquable. Je suis convaincue que tu finiras cette thèse en beauté. Compte sur moi pour t'apporter le meilleur soutien, comme tu as pu le faire pour moi.

Mouna, arrivée en M2 sur la fin de ma thèse, cela ne nous aura pas empêchées de tisser une amitié solide rapidement. J'ai pu avoir un soutien et une aide imparables de ta part aux moments où j'en avais le plus besoin. Tu as toujours été là pour m'aider en manip, dans les relectures de ma thèse, et j'en passe, mais aussi en dehors du labo. Je te remercie également pour tous les précieux conseils que tu as pu m'apporter, la voix de la maturité et de la sagesse parmi les « bébés du labo ». Toujours sur la même longueur d'onde (pour le bon comme le moins bon), ta générosité, ta bonne humeur nous auront permis de partager des moments mémorables loin de la paillasse lors de nos pauses et en dehors du labo, Mélissa toi et moi. Je te remercie pour toutes ces discussions et ces fous rires que nous avons partagé. Je te remercie sincèrement pour tout.

Tu t'es à ton tour lancée dans cette aventure grandissante qu'est la thèse, et je tefais confiance pour la mener de manière brillante grâce à toutes les qualités professionnelles et humaines ainsi que la maturité dont tu fais preuve.

Momo (ou Thibault?), mon grand frère du labo. Tu as toujours été présent dès lors que j'avais une question existentielle scientifique ou pas, un souci de manip mais aussi lors de mes nombreux « petits coups de stress ». Ton expérience, ton calme, tes solutions à tout et tes nombreux conseils ainsi que ton humour débordant m'auront été d'une grande aide. Egalement la cible idéale de nos petites blagues dans nos jours d'humeur enfantine et de toutes ces discussions de filles que tu as du supporter, je dois te tirer mon chapeau pour la patience dont tu as du t'armer en notre présence. Même si je suis sûre que tu as fini par t'y habituer et les apprécier! J'ai toujours pu compter sur toi en tant que collègue et en tant qu'ami, et tu sais que la réciproque est vraie aussi. Merci du fond du cœur Momo, on ne se lâche pas.

« Il y a les amis et il y a la famille. Puis il y a les amis qui deviennent la famille ». Je trouve que cette citation nous caractérise à la perfection.

Merci à vous pour votre soutien sans faille tout au long de ma thèse, pour toutes ces heures passées au labo à m'aider et supporter mon stress, jusqu'au dernier moment. J'aurais gagné durant ces trois années de thèse en plus du grade de Docteur, trois vrais amis et je sais que le meilleur reste à venir. Merci encore à vous d'avoir rendu ma thèse plus « gaie » et Mélissa et Mouna, comptez sur moi pour en faire de même votre tour venu.

Hélène, nous aurons été amenées à pas mal manipuler ensemble, et je te remercie de m'avoir fait partager ton expérience pour me permettre d'approprier la technique du western blot notamment. Merci pour tous tes conseils, ta disponibilité, ta patience et ta bonne humeur. J'ai découvert en ta personne une scientifique au top mais aussi une personne douce et généreuse, toujours prête à rendre service dans le labo mais aussi en dehors (par exemple lors de mon super déménagement).

Lise, tu es partie de l'équipe (pour travailler pas très loin certes) au cours de ma thèse mais c'est vers toi que je me suis tournée dès mon arrivée dans l'équipe, te considérant rapidement comme « l'exemple à suivre ». Merci pour le temps que tu m'as accordé afin que je prenne mes marques dans le labo et pour ton aide pour que je me familiarise avec diverses techniques expérimentales. Nous avons pu partager de nombreuses discussions scientifiques mais aussi des moments de rigolade et même des moments sportifs (merci la zumba), ce qui m'a permis de faire la connaissance d'une personne formidable. Je vous souhaite le meilleur à toi, Nicolas et petit Samuel et je sais qu'on se reverra très vite.

Bénédicte, la joie de vivre, les fous rires, les potins mais aussi les coups de gueule du labo. Ce caractère explosif mais attachant ne nous aura pas empêchées de travailler efficacement ensemble ni de nous entendre parfaitement bien. Toujours à l'écoute, disponible pour apporter ton aide et présente pour décompresser, tu m'auras beaucoup apporté et je t'en remercie fortement. Tu découvres maintenant la vie de jeune maman avec votre petit chou Adam et je vous souhaite tout le bonheur dans cette nouvelle page que vous écrivez.

Philippe, la joie de vivre et le roi de l'humour du laboratoire. Merci de m'avoir apporté ton aide pour apprivoiser ces souris sauvages du labo ainsi que pour ta bonne humeur et toutes ces blagues tordantes que tu as pu partager avec nous.

Merci à tout le reste de l'équipe de Toulouse et d'Albi pour votre gentillesse, votre disponibilité, votre bonne humeur, vos conseils et votre aide : Laurent Alric, José, Maryse, Agnès, Saliha, Marie (merci pour ta bonne humeur et ton optimisme), Jade, le copain de bureau (et de blouse) Gaudy, Julia, Christine, Philippe, Sophie, Christophe, Augustin, Elsa, Nathan, Jean-Luc, Jean-Michel, Florence, Pierre, Jean-Yves, Vincent, Marion, François Couderc, Véréna Poinot, Varravaddheay Ong-Meang.

Merci également à Jérôme Leprince pour la synthèse du peptide P17 et l'apport de ses connaissances sur les peptides antimicrobiens et en biochimie.

Johan, j'ai découvert avec toi lors de mon stage de M2 les vraies joies de la recherche. Mais effectuer mon stage sous ton encadrement ne m'aura pas découragée de continuer dans la recherche, bien au contraire. Tu auras fait preuve d'une grande

patience durant mon année de M2, tu m'auras énormément appris et aura été d'un soutien essentiel. Je te remercie pour cette formation solide que tu m'auras dispensés, pour ton accompagnement et au-delà de ton expérience scientifique, je te remercie pour tous ces moments de rire et ta bonne humeur. Tu es resté présent au cours de ma thèse et même après t'être envolé pour les Etats-Unis.

Petit padawan a essayé de suivre l'exemple et les conseils du meilleur maître de stage qu'il aurait pu avoir. Je te souhaite beaucoup de bonheur, d'épanouissement et de réussite pour la suite et je te remercie du fond du cœur.

Karim, impossible de passer sans te remercier. Les deux inséparables Johan et toi, tu m'auras également portée lors de mon M2 par tes précieux conseils, ta disponibilité, ta générosité et aussi tes nombreuses crises de rire contagieuses faisant qu'on ne peut que t'apprécier. Merci pour tout!

Merci aussi à toi Nabila, pour ta confiance, ta gentillesse et toute ton aide.

A ma famille... Ma base, ma force.

Papou, mon pilier, mon modèle, mon soutien, merci de m'avoir toujours portée et d'avoir toujours cru en moi lorsque moi-même je ne le faisais plus. Merci de m'avoir tant encouragé et entouré de tout ton amour, ton calme, ta force et ta fierté pour m'aider à réussir. Ton regard, tes larmes et ton sourire remplis de fierté m'auront rendue la plus heureuse.

Mamoune, mon épaule sur laquelle me reposer, merci pour ton écoute, ta douceur, ton amour, ton soutien, ta patience et tes bras de maman poule qui m'ont si souvent réconforté et encouragé. T'entendre dire « c'est ma fille ! » avec tant de joie et de fierté, bien que me gênant d'habitude, m'aura comblé.

Mes frères et sœurs : ma siamoise Mimi, tu auras été mon calme et mon soutien tout au long de ma thèse et juste avant la soutenance, mes petits mais grands frères Aziz

et Faris, présents avec moi jusqu'au jour J, vous m'aurez supportée en passant par les fous rires et vos blagues sorties de nulle part, et le chouchoutage pré-soutenance, et les « petits derniers » Majdou et Zinou (le pro des blagues dignes des blagues carambar) toujours là pour m'encourager, me changer les idées et me déstresser, même de Pamiers. Vous m'aurez porté jusqu'à la dernière minute et aurez été ma force, merci à vous de m'avoir soutenue et d'avoir autant eu confiance en moi. Merci pour votre patience et d'avoir tant donné de vous pour m'apporter les meilleures conditions pour mes années d'étude.

Vous rendre fiers a été une source essentielle de motivation et mon plus beau cadeau.

Je vous aime au-delà des étoiles.

Merci aussi au meilleur des beaux-frères, Pierre-Alain et à ma petite sœur et belle-sœur à la fois, Coco. On peut dire que tu auras vécu cette thèse avec moi. Toujours présente à chaque étape, tu m'auras beaucoup apporté.

Jamila, je te remercie pour ton soutien, ton écoute et ton aide et merci à toi ainsi que toute la famille du Maroc pour votre implication dans ma thèse dès ton arrivée. Je garderai en mémoire ce pot de thèse parfait que vous m'avez organisé papa, toi et la famille. Vous m'avez enlevé un gros poids en vous occupant de toute l'organisation afin de me laisser me concentrer sur la soutenance. Merci pour tout.

Bernard, merci pour vos encouragements, votre bienveillance et ces discussions scientifiques. « Vise le plus haut ! », je ferai en sorte de suivre votre conseil. J'aurais aimé vous avoir parmi nous lors de ma soutenance. Je ne vous oublie pas, reposez en paix.

Un énorme merci à mes amis et/ou compagnons de galère ... Aicha, ma grande sœur Alicia, Laurent, Pilou, Cathy, Cécile, Marion, Julie, Elo, les amis danseurs Françoise, Barbara, Jean-Marc, Richard, Sylvie.

Allocations de recherche soutien aux doctorants 2013

Par délibération de l'assemblée du conseil régional, une subvention régionale a été attribuée à l'INU Champollion dans le cadre de la politique régionale d'aide à la recherche (dossier numéro 13050177). Cette mesure est destinée à soutenir la valorisation des connaissances et le transfert du savoir-faire au bénéfice notamment des laboratoires par la formation des jeunes docteurs.

L'objectif est de permettre à des étudiants préparant une thèse en Midi-Pyrénées d'effectuer un travail de recherche dans un des établissements du site. Dans le cadre de cette thèse et par le biais de ce soutien régional, une allocation de recherche a été financée par l'INU Champollion au bénéfice de Khaddouj Benmoussa.

Nous tenons à remercier la Région Occitanie Pyrénées Méditerranée (ex Midi-Pyrénées) et l'INU Champollion de leur soutien dans le cadre de ce travail de recherche.

Table des illustrations

Figure 1 : Illustration des différentes structures de peptides antimicrobiens

Figure 2 : Appareil vulnérant d'une fourmi *Tetramorium bicarinatum*

Figure 3 : Modèle de déstabilisation de la membrane cellulaire cible en tapis

Figure 4 : Modèle d'attachement des peptides antimicrobiens à la membrane cellulaire cible par formation de pores toroïdaux

Figure 5 : Modèle d'attachement des peptides antimicrobiens à la membrane cellulaire cible par formation de pores en douves de tonneaux

Figure 6 : Mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens par les pathogènes

Figure 7 : Etapes de différenciation des monocytes/macrophages à partir d'une cellule souche hématopoïétique

Figure 8 : Les différents sous-types de monocytes humains basés sur l'expression des marqueurs de surface CD14 et CD16

Figure 9 : Deux origines distinctes des macrophages péritonéaux

Figure 10 : Activation de la NADPH oxydase et synthèse d'espèces réactives oxygénées et nitrées

Figure 11 : Les différents types d'inflammasomes

Figure 12 : Signaux activateurs de l'inflammasome

Figure 13 : Métabolisme de l'acide arachidonique : voies de synthèse des prostaglandines, leucotriènes et lipoxines

Figure 14 : Les différentes voies de polarisation des macrophages

Figure 15 : Les différents récepteurs exprimés par les macrophages M1

Figure 16 : Les différents récepteurs Toll-like

Figure 17 : Voies de signalisation activées par les récepteurs Toll-like

Figure 18 : Les récepteurs aux IgG

Figure 19 : Exemples d'activation des récepteurs humains aux IgG

Figure 20 : Les différents récepteurs au complément

Figure 21 : Activation du facteur de transcription STAT-1

Figure 22 : Activation du facteur de transcription IRF5

Figure 23 : Les différents membres de la famille NF-κB

Figure 24 : Voies d'activation canonique et non-canonique du facteur de transcription NF-κB

Figure 25 : Les différents récepteurs communs aux macrophages M2

Figure 26 : Principaux récepteurs scavengers humains

Figure 27 : Exemple de récepteurs lectine de type C

Figure 28 : Voies de signalisation activées par Dectine-1

Figure 29 : Voies d'activation du facteur de transcription STAT-6

Figure 30 : Structure du facteur de transcription STAT-6

Figure 31 : Structure du récepteur nucléaire PPAR γ

Figure 32 : Schéma d'activation du récepteur nucléaire PPAR γ

Figure 33 : Les différentes fonctions cellulaires modulées par le récepteur nucléaire PPAR γ

Figure 34 : Structure des isoformes du récepteur nucléaire LRH-1

Figure 35 : Schéma représentant le rôle de LRH-1 dans l'activation alternative des macrophages et l'élimination de *Candida albicans* associée

Figure 36 : Composition de la paroi de *Candida albicans*

Figure 37 : Schéma bilan des fonctions microbicides et immuno-modulatrices des PAMs

Figure 38 : Voies de signalisation déclenchées par les récepteurs couplés aux protéines G

Figure 39: Effet immuno-modulateur du P17 sur la polarisation des h-MDMs et leur activité candidicide associée

Tableau 1 : Exemple des principaux peptides antimicrobiens d'organismes supérieurs

Tableau 2 : Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des différentes sous-populations de monocytes humains

Table des abréviations

AA	Acide arachidonique
ADCC	Antibody dependent cell cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP _c	Adénosine 3'-5' monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adénosine triphosphate
AP-1	Activator protein 1
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CARD	Caspase activation and recruitment domains
CCR	CC chemokine receptor
CCL	CC chemokine ligand
CD	Cluster of differentiation
CLR	C-type lectin receptor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ calcium-dépendante
CR	Complement receptor
CRAMP	Cathelicidin-related antimicrobial peptide
CRP	C-reactive protein
CSF	Colony stimulating factor
CXC KC	Keratinocyte-derived chemokine
CYP	Cytochrome P450
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DBD	DNA-binding domain
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin
DLPC	Dilinoleoylphosphatidylcholine
15dPGJ2	15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ Prostaglandine J2

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermal growth factor
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FcγR	Fc gamma receptor
FLAP	Five lipoxygenase-activating protein
fMLP	N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine peptide
Foxp3	Forkhead box P3
FPR1/2	formyl peptide receptor 1 et 2
GAS	Gamma-activated sequence
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GPI	Glycophosphatidylinositol
fMLP	N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine
hCAP18	Human Cationic peptide 18
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDAC	Histone deacetylase
HETE	Acide hydroxyeicosatétraénoïque
HO [•]	Radical hydroxyle
HOCl	Acide hypochloreux
HPETE	Acide hydroperoxyeicosatétraénoïque
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
Iκ-B	Inhibitor of κ-B
IKK	Iκ-B kinase
IL	Interleukine
iNOS	Inductible Nitric oxyde synthase
IP-10	Interferon gamma-induce Protein 10
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
IROs	Intermédiaires réactifs de l'oxygène
ITAM	Immuno-receptor tyrosine based activation motif

ITIM	Immuno-receptor tyrosine based activation motif
Jak	Janus associated kinase
LB	Lymphocytes B
LBD	Ligand binding domain
LDL	Low density lipoprotein
LIF	Leukemia inhibitory factor
LL-37	Leucine leucine-37
LOX	Lipoxygenase
LPM	Large peritoneal macrophages
LPS	Lipopolysaccharide
LRH-1	Liver receptor homologous protein 1
LT	Lymphocytes T
LTs	Leucotriènes
LTA	Acide lipotéichoïque
LTA4/ LTB4	Leucotriène A4/ B4
LX	Lipoxines
LXA4H/ LXB4H	Lipoxine A4/ B4 hydrolase
LXR α	LiverX receptor alpha
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
MCP1/3	Monocyte chemoattractant protein 1 et 3
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor
MGL	Macrophage galactose lectin
Mincle	Macrophage-inducible C-type lectin
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
MPO	Myéloperoxydase
MR	Mannose receptor
Myd44/88	Myeloïd differentiation factor 44 et 88
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH oxydase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NAG	N-acétyl-glucosamine
NAM	N-acétyl-muramique
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
Nlrc4	NLR family CARD domain-containing protein 4
Nlrp1/3/6	Nod-like receptor pyrin containing 3
NO	Nitric oxide/ Monoxide d'azote
O ₂ ⁻	Anion superoxide
ONOO ⁻	Peroxynitrites
PAMs	Peptides antimicrobiens
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PDGF	Platelet derived growth factor
PG	Prostaglandine
Phox	Phagocyte oxidase
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-biphosphate
PLA ₂	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PKC	Protéine kinase C
PPARγ	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
PPRE	PPAR response element
PRR	Pattern recognition receptor
PYD	Pyridin domain
Rantes	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RCPG	Récepteur couple aux protéines G
RHD	Rel homology domain
RLO	Radicaux libres oxygénés
ROS	Reactive oxygen species

RXR	Retinoid X receptor
SDS-PAGE	Sodium-dodécylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SH2	Scr-homology 2 domain
SHIP	SH2 domain-containing inositol 5' phosphatase
SIGNR-3	Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
SOD	Superoxide dismutase
SPM	Small peritoneal macrophages
SR	Scavenger receptor
STAT	Signal transducer and activation of transcription
Syk	Spleen tyrosine kinase
Th 1/2/17	T helper type 1, 2 and 17
TGF- β	Transforming growth factor β
TIR	Toll/II-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRAF6	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
TX	Thromboxane
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Introduction

Bibliographique

Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAMs), également appelés « Host defense peptides », sont de petites molécules de taille et de structure variables (5 à 50 amino-acides) qui interviennent dans la réponse immunitaire innée de nombreux organismes vivants, et constituent ainsi leur première ligne de défense contre les agressions. Ils sont généralement cationiques, à caractère amphipatique et sont conservés dans le règne animal et végétal. En effet, les PAMs sont retrouvés aussi bien chez les plantes, les bactéries, les insectes et les vertébrés.

A la différence des antibiotiques, ils exercent leur action microbicide sur un large spectre de pathogènes qui inclut les bactéries, les champignons et levures, les parasites mais aussi les virus. Les PAMs ont pour fonction première l'élimination directe de pathogènes en induisant la déstabilisation structurale de leur membrane puis la mort de ceux-ci. Cependant, nombre d'entre eux sont maintenant connus pour exercer, en plus de leur fonction microbicide directe, un rôle modulateur de la réponse immunitaire à plusieurs niveaux.

L'émergence d'une résistance de plus en plus importante des pathogènes à l'égard des antibiotiques nécessite de trouver de nouvelles sources thérapeutiques et a contribué à l'essor de la recherche sur les PAMs. Ainsi, à l'heure actuelle, plus de 2600 PAMs d'origines diverses allant des plantes aux animaux, sont connus et répertoriés dans des bases de données telles que « The Antimicrobial Peptide Database » (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). La colicine V fut le premier PAM découvert en 1925 par André Gratia. Il s'agit d'un PAM appartenant à la famille des bactériocines, produit par certaines souches de la bactérie *Escherichia coli* et exerçant une action microbicide dirigée certaines souches de ces bactéries (Cascales et al., 2007), plus particulièrement la souche *E. coli* Φ , en inhibant la croissance de ces bactéries. La

découverte de ce premier PAM a été suivie par la mise en évidence de la nisine par Rogers en 1928 (Rogers, 1928). La nisine est un PAM produit par la bactérie *Lactococcus lactis*, qui inhibe la croissance de bactéries Gram-positives. Ces études ont permis de mettre en évidence l'existence de PAMs chez les organismes inférieurs, mais on les retrouve également chez les plantes, les insectes et les vertébrés. Ainsi, le premier PAM isolé à partir d'un organisme vivant supérieur fut découvert dans les années 1981. Il s'agit d'une cécropine, produite par le lépidoptère *Hyalophora cecropia* (Steiner et al., 1981). Différentes formes de la famille des cécropines ont ensuite été découvertes dans diverses espèces d'insectes comme d'autres lépidoptères, les diptères et les coléoptères (Yi et al., 2014) et même chez les mammifères. En effet, en 1989, Lee et ses collaborateurs ont isolé un PAM de la famille des cécropines chez le porc, nommé cécropine P1 (Lee et al., 1989). Ces PAMs sont connus pour exercer une activité antimicrobienne étendue, ciblant les bactéries Gram positives et Gram négatives mais aussi les champignons (DeLucca et al., 1997; Ekengren and Hultmark, 1999; Moore et al., 1996). La peau des amphibiens est également une souche riche de PAMs. Ainsi, la première découverte de PAMs d'amphibien fut l'identification des bombinines, par G. Kiss et H. Michl en 1962, dans les sécrétions cutanées de la grenouille *Bombina variegata*, constituées de 24 acides aminés, puis les magainines par Zasloff qui sont sécrétées par la peau de la grenouille africaine *Xenopus laevis*. Ces découvertes furent suivies, dans les années 1990s, par la découverte des dermaseptines isolées à partir de la peau des grenouilles appartenant au genre Phyllomedusae (Amiche et al., 1999; Mor et al., 1991). Ces PAMs exercent une activité microbicide sur un large spectre de pathogènes incluant les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus enveloppés (Nicolas and El Amri, 2009).

En plus de leur effet microbicide direct sur un large spectre de pathogènes, les PAMs déclenchent peu de phénomènes de résistance, que nous aborderons plus loin dans ce manuscrit, ce qui en fait une piste thérapeutique alternative aux antibiotiques intéressante.

I. Structure et classification des peptides antimicrobiens

Les PAMs constituent la première ligne de défense de nombreux organismes vivants qui regroupent les organismes invertébrés et vertébrés. Ils peuvent être produits au cours de la réponse immunitaire ou être stockés dans des granules sous forme de précurseurs, puis être excrétés sous forme active par clivage de ces précurseurs suite à une agression extérieure. Certains PAMs peuvent être sécrétés localement, comme les magainines par exemple qui sont sécrétées par la peau d'amphibiens.

On distingue deux voies de synthèse des PAMs : la voie non-ribosomale et la voie ribosomale. Les PAMs obtenus par la voie non-ribosomale sont essentiellement des peptides synthétisés par les organismes inférieurs que sont les bactéries, les champignons et les streptomycètes. Ils sont produits à partir de complexes multi-enzymatiques et sont à l'origine de plusieurs classes d'antibiotiques (Finking and Marahiel, 2004).

La voie de synthèse ribosomale des PAMs concerne les PAMs produits par une grande diversité d'organismes vivants comprenant les mammifères, les reptiles, les oiseaux, les amphibiens, les insectes, les plantes et les microorganismes (Hancock and Chapple, 1999). Ces PAMs, dits « naturels », sont stockés dans des granules de sécrétion et sont libérés sur le site d'agression lors de la réponse immunitaire (Devine, 2003; Levy, 2004).

Malgré leur diversité structurale, les PAMs conservent des caractéristiques communes qui semblent essentielles à leur activité antimicrobienne (Hancock, 1999; Hancock and Lehrer, 1998; Jenssen et al., 2006). Il s'agit de molécules de petite taille, constituées de moins de 50 acides aminés en général, amphipatiques et dont la grande majorité acquière une charge globale positive de par la présence de nombreux résidus Arginine et/ou Lysine, leur conférant un caractère cationique. La séquence d'acides aminés constituant un PAM, allant de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, constitue sa séquence primaire qui est linéaire. Les acides aminés présents dans la chaîne peptidique peuvent interagir entre eux, lui conférant une certaine structure secondaire. Cette structure plus complexe peut être de deux types : les hélices α et les feuilletts β . La séquence tertiaire des PAMs consiste au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace. Elle inclut la présence de ponts disulfures. Les structures secondaires et tertiaires d'un peptide conditionnent son mode de fonctionnement.

Plusieurs classifications ont été établies et il n'existe actuellement aucune nomenclature universelle. Ils peuvent être classés selon leur charge globale en deux familles : les PAMs cationiques et les PAMs anioniques. Cependant, notre PAM d'étude, nommé P17 et isolé à partir du venin de la fourmi *Tetramorium bicarinatum*, est un peptide linéaire cationique. De ce fait, nous nous focaliserons sur ces derniers, dans ce manuscrit. Leur structure permet de classer les PAMs cationiques en 3 familles principales :

- Les peptides linéaires formant des hélices α
- Les peptides riches en Cystéines, contenant un ou plusieurs ponts disulfures
- Les peptides riches en certains acides aminés

1. Les peptides linéaires formant des hélices α

Cette structure est la plus étudiée et est adoptée par de nombreux PAMs de vertébrés et d'invertébrés dans un solvant apolaire mimant ainsi l'environnement membranaire lipidique. Dans cette structure, on retrouve la majorité des acides aminés polaires ou chargés sur une face de l'hélice et les acides aminés hydrophobes sont localisés sur la face opposée. Ceci confère aux PAMs un caractère amphiphile qui semble être à l'origine de leur propriété commune d'interagir avec la bicouche lipidique de la paroi des pathogènes, d'en perturber l'organisation et d'induire ainsi la lyse cellulaire. De ce fait, ces PAMs sont souvent dotés d'une activité cytotoxique mais ont aussi des propriétés antimicrobiennes et parfois même insecticides (Nguyen et al., 2011). Ces peptides ont une forte hydrophobicité, avec leur face apolaire qui recouvre une plus grande surface que la face polaire, riche en Lysine et fortement chargée. Ces peptides linéaires sont aussi caractérisés par l'absence de Cystéines dans leur séquence. Les peptides linéaires en hélice α sont très représentés chez les insectes. A titre d'exemple, les cécropines (Bechinger, 1997), PAMs retrouvés chez les insectes et les mammifères, ainsi que le LL-37 (Porcelli et al., 2008), qui représente le seul PAM de la famille des cathélicidines humaines identifié, adoptent cette structure en hélice α (Figure 1). Ce peptide est majoritairement produit par les cellules épithéliales et neutrophiles humains à partir du précurseur hCAP18 (Cationic peptide 18) de 18 kDa de masse. Ce dernier est stocké sous forme inactive dans des granules des neutrophiles, puis libéré et clivé lorsque la réponse inflammatoire est déclenchée pour fournir le LL-37 actif (4,5 kDa).

2. Les peptides à ponts disulfure

Certains peptides sont riches en Cystéines et sont, de ce fait, caractérisés par la présence d'un ou plusieurs ponts disulfures intramoléculaires qui imposent une structure tertiaire et la stabilisent (Andrès and Dimarcq, 2007; Brogden, 2005). Ces peptides adoptent une structure en épingle à cheveux β . Certains PAMs ne contiennent qu'un seul pont disulfure et sont très nombreux chez les amphibiens. C'est le cas des tigérines, produites par la grenouille indienne *R. tigrina* (Bulet et al., 2004). On retrouve notamment dans ce groupe les défensines (Chen et al., 2006), PAMs conservés aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés, qui contiennent 3 ou 4 ponts disulfures (Figure 1).

3. Les peptides linéaires riches en certains acides aminés

A l'inverse des autres PAMs, ces peptides n'adoptent pas de structures secondaire en hélice α ou en feuillets β et possèdent une séquence dans laquelle un acide aminé prédomine (Andrès and Dimarcq, 2007; Diamond et al., 2009). Plusieurs PAMs ont été identifiés à ce jour. Chez les insectes, on retrouve notamment des peptides riches en proline qui représente au moins 25% des acides aminés présents, ou encore en glycine, comme les attracines et les diptéricines produites par la drosophile *Drosophila melanogaster* (Andrès and Dimarcq, 2007). Certains PAMs de mammifères sont également riches en certains acides aminés comme l'histatine, isolée de la salive de primates dont l'homme et riche en histidine (De Smet and Contreras, 2005; Lehrer and Ganz, 1999), ou encore le dérivé de cathélicidines PR-39 retrouvé chez le porc, riche en proline (49%) et en arginine (24%) (Brogden, 2005; Gudmundsson et al., 1995).

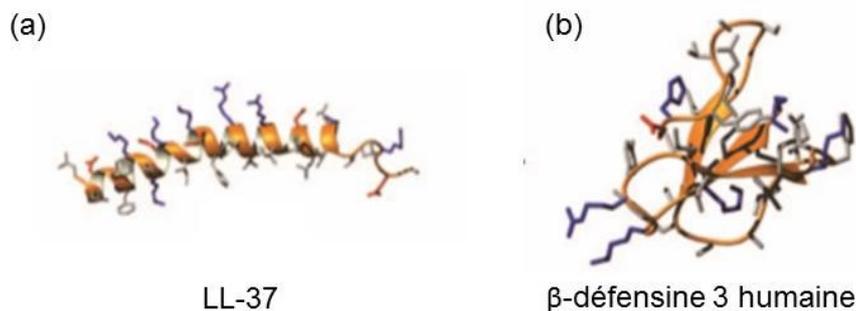


Figure 1 : Illustration des différentes structures de peptides antimicrobiens

(a) LL-37, structure en hélice- α

(b) β -défensine-3 humaine, structure en feuillet β , 3 ponts disulfures

II. Les peptides antimicrobiens produits par les insectes

1. Généralités sur les peptides antimicrobiens d'insectes

Les insectes sont des sources importantes des PAMs. Le premier PAM d'insecte découvert fut la melittine, isolée à partir du venin d'abeille (Habermann, 1972). Elle fut suivie par la mise en évidence de la cécropine, en 1980 (Hultmark et al., 1980). Il s'agit de peptides cationiques, amidés en C-terminal, qui adoptent une conformation en hélice α dans un environnement hydrophobe. La majorité des PAMs issus des insectes sont synthétisés sous forme de précurseurs puis produits sous forme active par protéolyse contrôlée lorsque leur mobilisation est nécessaire. Ils sont synthétisés par le corps gras des insectes, possédant les propriétés fonctionnelles du foie et du tissu adipeux des mammifères, et sécrétés dans l'hémolymphe correspondant au sang (Andrès and Dimarcq, 2004; Zasloff, 2002).

Les insectes venimeux libèrent leurs PAMs dans leur venin qui est riche en composés assurant leur défense et servant à la prédation. Ils se classent en trois classes: les

hémiptères (pucerons, punaises, etc...), les lépidoptères, qui correspondent aux papillons (forme adulte) et aux chenilles sous forme larvaire, et les hyménoptères qui représentent le groupe d'insecte le plus vaste (120 000 espèces décrites) (van Emden, 2013) et regroupent notamment les guêpes, les abeilles et les fourmis. Ces dernières, dont la masse totale dépasse celle de l'ensemble de l'humanité observent des règles de vie en société assimilables à la société humaine, et ont développé des systèmes de défense immune élaborés qui leur permettent de défendre les colonies contre l'infection par divers pathogènes. Ces caractéristiques en font un modèle d'étude intéressant pour la recherche au niveau comportemental et immunitaire.

2. Les peptides antimicrobiens issus du venin de fourmis

Les fourmis sont des insectes sociaux venimeux et ubiquistes, qui représentent 15 à 20% de la biomasse animale en forêt tropicale. Le nombre d'espèces de fourmis est estimé à 25 000 et actuellement, ce sont plus de 14 700 espèces qui ont été décrites. Toutes les espèces de fourmis sont venimeuses et les femelles possèdent un appareil venimeux constitué de deux glandes tubulaires qui sécrètent les différents composés du venin, notamment les PAMs. Ces deux glandes allongées sont associées dans leur partie basale à la poche à venin qui sert de réservoir, elle-même reliée à l'aiguillon situé à l'extrémité de leur abdomen, via un canal excréteur. Cependant, la présence d'aiguillon n'est pas observée chez toutes les espèces de fourmis et cette propriété influence le mode de libération du venin. Les fourmis possédant un aiguillon développé et fonctionnel, dont le nombre est estimé à 9 100 espèces, injectent leur venin. En revanche, les fourmis dépourvues d'aiguillon fonctionnel libèrent leur venin en le pulvérisant ou en le déposant sur les cuticules de leurs proies. L'injection des toxines

peptidiques est nécessaire à leur activité et de ce fait, le venin des fourmis dépourvues d'aiguillon est censé contenir peu de toxines peptidiques.

Le venin des fourmis présente une très grande diversité de fonction et de composition qui diffèrent selon les espèces. Sa composition dépend du mode d'administration du venin mais aussi du régime alimentaire des fourmis. On distingue les fourmis omnivores des fourmis prédatrices généralistes (se nourrissent d'une grande diversité d'invertébrés et petits vertébrés) ou spécialisées (se nourrissant d'un panel restreint d'invertébrés) dont la composition du venin sera propre à ces différentes espèces.

Chez la fourmi comme dans la plupart des animaux venimeux, celui-ci est composé, pour 90% de son poids sec, de protéines et peptides qui apportent la majorité des propriétés toxiques du venin. On y retrouve notamment des enzymes (phospholipases, phosphatases, estérases, etc...) qui servent à lyser les parois cellulaires et agissent comme facteurs de diffusion tissulaire des autres composés toxiques, et de nombreux peptides bioactifs, dont les PAMs. Les enzymes peuvent également être de puissants allergènes, cette fonction étant retrouvée chez les hyménoptères (Schmidt et al., 1986). Ces différences de composition du venin engendrent une importante diversité fonctionnelle. En effet, les fourmis utilisent leur venin dans la prédation pour capturer leurs proies, mais aussi pour se protéger contre leurs propres prédateurs et dans la défense immune contre divers microorganismes. Ces différentes propriétés divergent entre espèces d'un même genre. Le venin de fourmis est une source riche de peptides antimicrobiens et plusieurs de ces peptides ont été isolés et identifiés dans le venin de différentes espèces comme *Tetramorium bicarinatum* (bicarinaline), *Paraponera clavata* (ponéricine-Q42), *Camponotus floridanus* (défensines). La majorité de ces

PAMs adoptent une structure linéaire en hélice α (Cologna et al., 2013; Johnson et al., 2013; Orivel et al., 2001; Rifflet et al., 2012).

Notre équipe s'intéresse principalement au genre *Tetramorium*, et étudie plus particulièrement le venin de l'espèce *Tetramorium bicarinatum*.

3. Les peptides antimicrobiens produits par la fourmi *Tetramorium bicarinatum*

Le genre *Tetramorium* comprend 445 espèces connues à ce jour. Parmi les différentes espèces de ce groupe, la fourmi terricole *Tetramorium bicarinatum*, originaire de l'Asie du Sud-Est, est l'espèce la plus répandue et la plus abondante dans le monde. *Tetramorium bicarinatum* est une Myrmicinae qui appartient à la famille des *Formicinae*. Elle fut identifiée pour la première fois par Nylander en 1846, sous l'appellation de *Myrmica bicarinata*. Cette fourmi « vagabonde » est très répandue dans les régions tropicales et subtropicales. Elle s'est également acclimatée aux régions à climat tempéré, dans les endroits chauds et secs et est actuellement présente dans tous les continents.

Leur croissance se compose, comme pour toutes les fourmis, de quatre étapes différentes (œufs, larves, nymphes et stade adulte) et dure en moyenne $43,44 \pm 1,90$ jours (Astruc et al., 2001). Après la ponte, le stade œufs dure de deux à six semaines avant d'éclore pour donner naissance à des larves blanches. Ce stade larvaire est composé de trois étapes de développement différentes et dure plusieurs semaines. Par la suite, les larves évoluent en nymphes qui aboutiront au stade de développement adulte.

L'appareil à venin de ces fourmis comporte deux glandes à venin qui débouchent sur le réservoir à venin, et de la glande de Dufour qui est de plus petite taille, située à la

base de l'appareil vulnérant et qui joue un rôle dans l'attraction des congénères en libérant des phéromones de piste sur le sol (Figure 2).

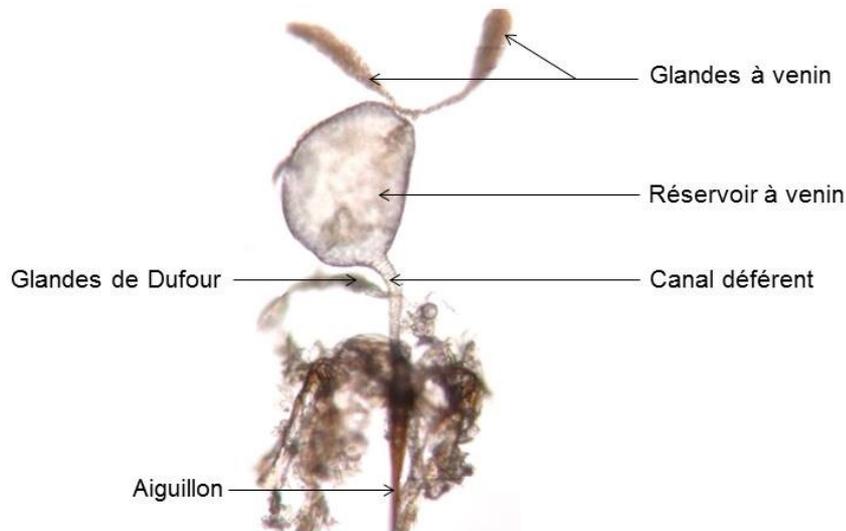


Figure 2: Appareil vulnérant d'une fourmi *Tetramorium bicarinatum*

Les fourmis *Tetramorium bicarinatum* composant notre élevage sont originaires de l'état de Bahia, situé dans la région Nord-Est du Brésil. Notre équipe s'intéresse aux défenses immunitaires de ces fourmis ainsi que leur venin. Nous nous focalisons plus particulièrement sur certains peptides antimicrobiens issus de ce venin. En effet, notre équipe a récemment observé que le venin de cette fourmi démontrait une activité biologique positive envers les bactéries des souches *S. aureus* et *S. xylosus* (Rifflet et al., 2012). Après avoir fractionné le venin par chromatographie et isolé la fraction biologiquement active, notre équipe a identifié, par migration électrophorétique sur gel SDS-PAGE (Sodium-dodécylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) et spectrométrie de masse, deux peptides majoritairement présents dans cette fraction. Ces deux peptides nommées bicarinaline (ou P16) et P17 et dont la séquence a été déterminée par séquençage *de novo* (MS₂) et dégradation d'Edman, sont des peptides cationiques amphipatiques de 20 et 13 acides aminés respectivement, amidés en à

leur extrémité C-terminale (Rifflet et al., 2012). Après synthèse biochimique de ces deux peptides, leur activité biologique a été évaluée.

La bicarinaline (ou P16) a été caractérisée pour avoir une activité microbicide dirigée contre un large panel de bactéries Gram-positives et Gram-négatives, assimilable à l'activité de la mellitine, sans avoir d'activité hémolytique sur les érythrocytes humains (Rifflet et al., 2012). Cependant, elle démontre une forte activité cytotoxique sur les monocytes humains (Téné et al., 2016) même à faibles doses, ce qui en limite son étude sur ces cellules. A l'inverse, le P17 est un peptide dont l'activité microbicide est plus faible. En effet, aucune activité antibactérienne n'a été observée sur les bactéries testées en laboratoire (Rifflet et al., 2012). Il exerce par contre un effet microbicide sur la levure *C. albicans* et ne présente pas ou peu de cytotoxicité vis-à-vis des monocytes humains, même à de fortes concentrations (données obtenues au laboratoire).

Les PAMs représentent donc une grande diversité de molécules bioactives servant à la défense immune. Cette diversité est caractérisée par la variété d'espèces productrices, la structure des PAMs mais aussi leurs caractéristiques physico-chimiques, notamment leur charge globale. Le tableau 1 ci-dessous résume les principaux PAMs étudiés.

PAMs	Origine	Charge	Structure
Attacines	Insecte	Cationique	Riche en proline
Bombinine	Amphibiens	Cationique	Hélice α
cathélicidine LL-37	Homme	Cationique	Hélice α
cathélicidine PR-39	Mammifères	Cationique	Riche en proline et arginine
Cécropines	Insecte	Cationique	Hélice α
Défensines	Mammifères & insectes	Cationique	Feuillets β
Dermcidine	Homme	Anionique	Riche en acide aspartique
Enkélytine	Homme	Anionique	2 hélices α , coudure
Hépcidines	Homme	Cationique	Feuillets β
Histatine	Homme	Cationique	Riche en histamine
Magainines	Amphibiens	Cationique	Hélice α
Melittine	Insecte	Cationique	Hélice α
P16	Insecte	Cationique	Hélice α
P17	Insecte	Cationique	Hélice α
Tigérines	Amphibiens	Cationique	Feuillets β

Tableau 1: Exemples des principaux peptides antimicrobiens d'organismes supérieurs

III. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens cationiques

Pour exercer leur effet microbicide contre les pathogènes, les PAMs agissent selon un mécanisme d'action divisé en trois phases: l'attraction entre le peptide et le pathogène cible, suivie de l'attachement de le PAM à la surface du pathogène et enfin la pénétration du peptide à l'intérieur du microorganisme (Diamond et al., 2009).

La première phase d'attraction est régie par les interactions électrostatiques des PAMs avec les membranes des pathogènes cibles. En effet, ces dernières sont chargées négativement du fait de la présence notamment de LPS ou acide téichoïque, ou encore de phosphomannanes à la paroi des champignons. S'ensuit l'étape d'attachement qui entraîne la déstabilisation de la membrane externe cible. Le caractère amphipatique des PAMs cationiques leur permet, suite à la phase d'attachement, de s'insérer dans la membrane des pathogènes à neutraliser puis de pénétrer dans les cellules de celui-ci afin d'interagir avec des cible intracytoplasmiques. Trois modèles d'insertions sont généralement proposés: le modèle de déstabilisation en tapis (Carpet-like model), le modèle des pores toroïdaux (Wormhole model) et le modèle de pores en douve de tonneaux (Barrel-stave model).

1. Modèle de déstabilisation en tapis ou Carpet-like model

Dans ce modèle, les peptides s'accumulent à la surface de la membrane, formant un tapis peptidique dense, ce qui entraîne l'écartement des têtes hydrophiles des phospholipides. Ceci provoque des perturbations de la membrane conduisant, lorsqu'une concentration critique est atteinte, à sa rupture et sa désintégration en formant des structures micellaires (figure 3). La magainine, lorsqu'elle est présente à de fortes concentrations, et la cécropine sont des exemples de PAMs utilisant ce modèle (Jenssen et al., 2006).

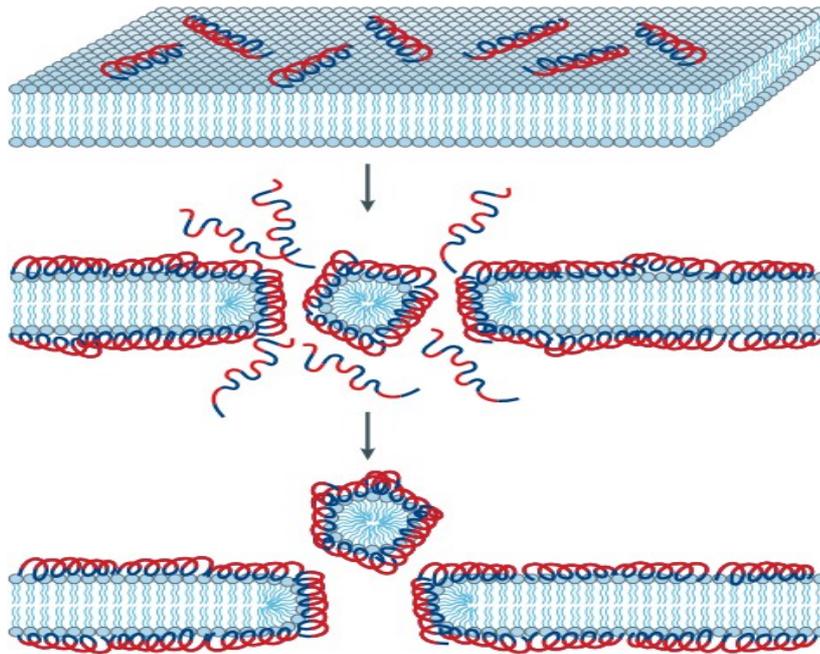


Figure 3: Modèle de déstabilisation de la membrane cellulaire cible en tapis (Brogden, 2005)

2. Modèle des pores toroïdaux ou Wormhole model

Ce modèle est essentiellement connu pour les PAMs en hélices α . Ici, les peptides s'accumulent à la membrane parallèlement à celle-ci, en s'y fixant solidement grâce à leurs domaines hydrophobes. A partir d'une certaine concentration, les peptides s'insèrent entre les phospholipides membranaires, avec une orientation perpendiculaire à la membrane. Par la suite, les PAMs, qui sont amphiphiles, interagissent avec les têtes polaires de phospholipides par l'intermédiaire de leur domaine positif (Hirsh et al., 1996). Les complexes PAMs-phospholipides ainsi formés sont alors à l'origine de la formation de pores (Matsuzaki, 1999; Yeaman and Yount, 2003). La désintégration de ces pores permet ensuite la translocation des peptides dans le cytoplasme des cellules pathogènes (Figure 4). La melittine et la magainine utilisent ce modèle d'insertion (Lee et al., 2004; Matsuzaki, 1999). Cependant, la magainine emploie une variante de ce modèle, appelée « modèle par agrégats » ou

« pores toroïdaux desordonnés » (Jenssen et al., 2006). Dans ce modèle, les PAMs n'adoptent pas de conformation perpendiculaire en s'insérant dans les phospholipides membranaires. Le LL-37 utilise également ce modèle pour s'insérer dans les pathogènes cibles (Henzler-Wildman et al., 2004).

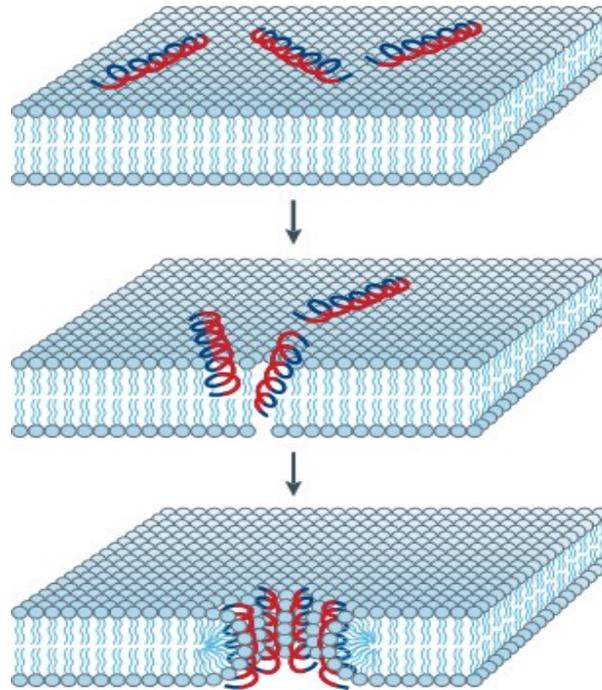


Figure 4: Modèle d'attachement des peptides antimicrobiens à la membrane cellulaire cible par formation de pores toroïdaux (Brogden, 2005)

3. Modèle de pores en douve de tonneaux ou Barrel-stave model

Ce dernier modèle décrit la formation d'amas à l'aspect de tonneaux par les PAMs dans la membrane. Les peptides se fixent à la membrane et, comme dans le modèle de déstabilisation en tapis, induisent l'écartement des têtes hydrophiles externes des phospholipides membranaires. Ils pénètrent ensuite dans la cellule par leurs pôles hydrophobes en repoussant les phospholipides puis s'assemblent avec les chaînes carbonées des phospholipides en laissant leurs domaines hydrophiles libres qui

formeront la paroi de spores (Figure 5). Ce modèle est par exemple décrit pour l'alaméthicine, PAM produit par le champignon *Trichoderma viride* (Bechinger, 1999).

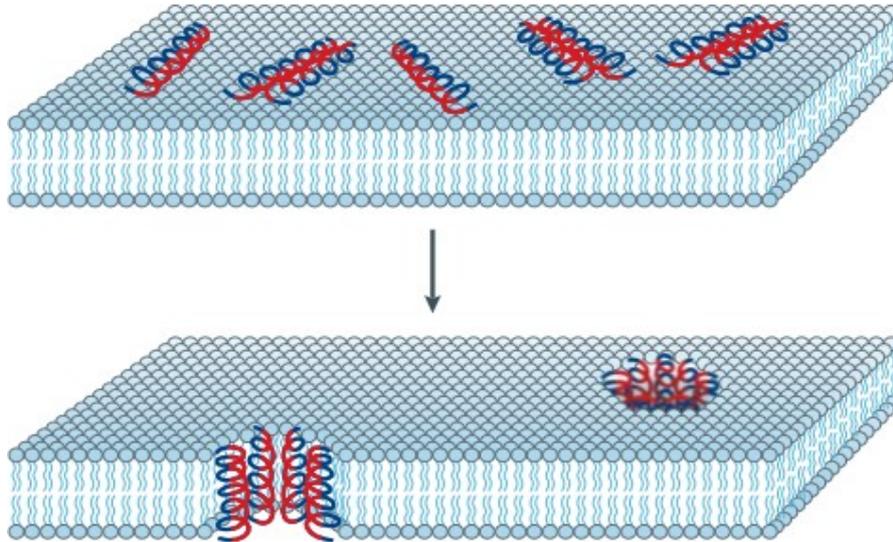


Figure 5: Modèle d'attachement des peptides antimicrobiens à la membrane cellulaire cible par formation de pores en douves de tonneaux (Brogden, 2005)

Ces trois modèles principaux de déstabilisation membranaire ne sont cependant pas exclusifs. D'autres modèles moins fréquents ont en effet été identifiés comme par exemple le modèle de formation de clusters lipidiques, d'électroporation, de transport d'anions, etc... (Nguyen et al., 2011; Wimley and Hristova, 2011).

Après déstabilisation membranaire et translocation du côté intra-cytoplasmique, les PAMs peuvent pénétrer dans le cytoplasme et ainsi agir sur des cibles cytoplasmiques. Ils peuvent notamment interférer avec la synthèse des acides nucléiques, les voies métaboliques, l'activité enzymatique des pathogènes mais ils peuvent également agir sur la synthèse de la paroi (Brogden et al., 2003; Brogden, 2005; Jenssen et al., 2006).

4. Cibles intracellulaires des peptides antimicrobiens

a) *Inhibition de la synthèse du peptidoglycane*

Le peptidoglycane est une structure commune à toutes les bactéries, qui constitue la paroi bactérienne. Il est composé d'une partie glucidique (polysaccharides constitués de polymères de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM) reliés par des liaisons osidiques β 1-4) et d'une partie peptidique qui correspond à un enchaînement répétitif d'unités de 4 acides aminés identiques (L-alanine reliée au NAM en position 1-D-glutamate- Acide diaminopimélique/Lysine- D-alanine).

Les PAMs inhibant la synthèse du peptidoglycane sont en général de petite taille, stables à la chaleur et comportent dans leur séquence des acides aminés soufrés. Ils agissent notamment en se liant au complexe D-Alanine-D-Alanine des précurseurs au stade lipidique, dont le clivage conduit à la formation du tétrapeptide (van Heijenoort, 2001). Ils bloquent ainsi la synthèse du peptidoglycane entraînant la mort cellulaire.

b) *Inhibition de la synthèse protéique bactérienne*

Certains PAMs ciblent, une fois présents dans le cytoplasme, des protéines impliquées dans la synthèse de protéines bactériennes. C'est le cas des apidaecines, PAMs riches en proline isolés chez l'abeille. Otvos et ses collaborateurs ont mis en évidence que ces PAMs se fixent spécifiquement à la protéine de choc thermique Dnak (70 kDa), qui possède une activité ATPase et participe à l'initiation de la synthèse de l'ADN bactérien, et de manière non-spécifique à la protéine chaperonine GroEL. Ce mécanisme est également employé par la pyrrococcine et la drosocine (Otvos et al., 2000).

IV. Mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens

Bien qu'elles soient moins fréquentes et plus lentes à se mettre en place, des résistances aux PAMs se développent aussi chez les microorganismes pathogènes. Elles sont en premier lieu induites par la capacité naturelle de microorganismes d'une niche écologique donnée à résister à de fortes concentrations de peptides endogènes (Kraus and Peschel, 2006). En effet, l'acquisition d'une résistance aux PAMs par des souches naturellement sensibles est peu probable. De plus, l'acquisition de résistances à certains PAMs ne signifie pas que la souche pathogène sera résistante à tous les PAMs. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour déclencher une résistance aux PAMs (Nizet, 2006; Peschel and Sahl, 2006). Les microorganismes peuvent produire diverses protéases entraînant la dégradation des PAMs et les rendant inactifs. Ce mécanisme est notamment utilisé par les bactéries, comme par exemple *Staphylococcus aureus* sur le LL-37 (Sieprawska-Lupa et al., 2004). Certains pathogènes sont également capables de reconnaître les PAMs et peuvent limiter leur accès à la membrane plasmique via l'action de « molécules piègeuses ». Cette action peut être directe, par l'intermédiaire de molécules de surface, ou indirecte via des molécules sécrétées qui vont se lier aux PAMs (Schmidtchen et al., 2001). Les propriétés membranaires des agents pathogènes peuvent également être modifiées. Par exemple, de nombreuses bactéries peuvent réduire la charge négative de leur membrane afin d'éviter les interactions avec les PAMs cationiques et ainsi se protéger de la lyse par ces peptides (Neuhaus and Baddiley, 2003). Par ailleurs, certains microorganismes peuvent modifier la séquence en acides aminés des PAMs dans le but de modifier leur caractère cationique ou amphipatique, ce qui altère les propriétés fonctionnelles de ces peptides (Peschel, 2002; Peschel and Collins, 2001). Un autre

mécanisme courant d'échappement à l'activité antimicrobienne des PAMs par les pathogènes est la présence à la membrane de ces derniers de pompes à efflux. Ces pompes, retrouvées chez certaines bactéries, participent au transport actif de molécules à l'extérieur des cellules de manière ATP-dépendante (Cattoir, 2004) et sont également capables d'expulser les PAMs hors des cellules. Un exemple d'utilisation de ce mécanisme est l'évacuation du LL-37 ou encore de la protégrine-1 par la bactérie *Neisseria gonorrhoeae*, via son système de pompes à efflux nommé MtrCDE (Shafer et al., 1998).

La figure 6 résume les principaux effets de résistance aux PAMs développés par les pathogènes.

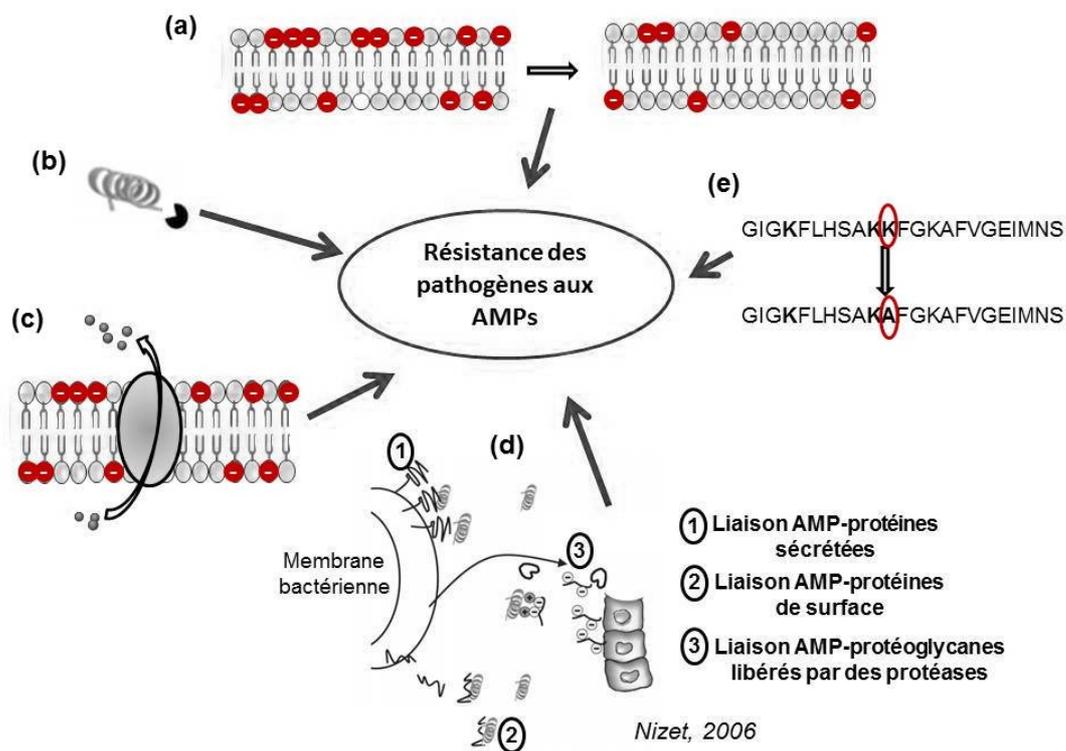


Figure 6 : Mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens par les pathogènes

- (a) Modification des propriétés membranaires : réduction des charges négatives à la membrane
- (b) Dégradation des PAMs
- (c) Expulsion des PAMs de la cellule pathogène par des pompes à efflux
- (d) Inhibition de la liaison des PAMs à la membrane par l'intermédiaire de molécules piègeuses
- (e) Modification de la séquence en acides aminés des PAMs

Résumé

Les PAMs sont de petites molécules de taille et de structure variables conservées dans le règne animal et végétal. La majorité de ces PAMs sont cationiques et exercent leur activité microbicide sur un large spectre de pathogènes incluant les bactéries, les virus, les parasites ainsi que les champignons et les levures en déstabilisant la membrane des pathogènes et en agissant généralement sur des cibles intracytoplasmiques chez ces derniers. De par leur action, ces molécules jouent un rôle clé dans la défense immunitaire des vertébrés et invertébrés.

Il est désormais admis qu'outre leur activité microbicide directe, de nombreux PAMs cationiques interviennent également dans la modulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. Cette propriété est aussi bien retrouvée chez les PAMs de mammifères que d'invertébrés, notamment les insectes.

C'est pourquoi durant mes travaux de thèse, je me suis intéressée au rôle modulateur du peptide P17 sur la réponse immunitaire innée et plus particulièrement à son influence sur la réponse médiée par les macrophages.

Le système immunitaire inné, qui est conservé chez tous les organismes vivants pluricellulaires, est mobilisé rapidement lors d'une agression extérieure et permet ainsi une réponse protectrice immédiate de l'organisme hôte et met en jeu divers acteurs cellulaires et moléculaires. La reconnaissance d'éléments étrangers à l'organisme hôte par les cellules de l'immunité innée se fait par l'intermédiaire de récepteurs appelés PRRs (Pattern recognition receptors). Ces PRR reconnaissent des motifs conservés par les pathogènes (PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns) ou des signaux de danger d'origine endogène (DAMPs, Damage associated molecular patterns). L'activation des cellules de l'immunité innée via les PRRs induit des voies de signalisation permettant la mise en place d'une réponse immunitaire et d'une réponse inflammatoire permettant l'élimination de l'élément étranger et le retour à l'homéostasie tissulaire. Les macrophages sont des acteurs cellulaires clés intervenant dans ces deux réponses et se caractérisent par une forte plasticité phénotypique et fonctionnelle.

Les macrophages

Les macrophages ainsi que leur fonction phagocytaire furent mis en évidence par Elie Metchnikoff en 1883. Ces cellules appartiennent au système des phagocytes mononucléés, défini par Van Furth dans la fin des années 1960s. Dans le contexte scientifique actuel, les macrophages sont reconnus comme étant des cellules clés de la défense immunitaire innée. Ils jouent un rôle central dans la réponse inflammatoire, permettant sa mise en place mais exerçant également un rôle clé dans la phase de résolution de celle-ci. Les macrophages font partie des premières cellules à réagir dans la défense immune innée en cas d'agression extérieure et contribuent au dialogue, au recrutement et à l'activation d'autres cellules du système immunitaire inné et adaptatif.

I. Origine et différenciation

Les monocytes/macrophages appartiennent au système des phagocytes mononucléés. Les macrophages proviennent de la différenciation des monocytes sanguins dont les premières étapes de développement ont lieu dans la moelle osseuse, à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Ces cellules souches pluripotentes se différencient en deux lignages distincts pour donner les cellules progénitrices lymphoïdes ou myéloïdes. Ces dernières subissent ensuite plusieurs étapes de différenciation aboutissant successivement aux stades de monoblastes et pro-monocytes (Figure 7). La différenciation des monocytes dans la moelle osseuse est essentiellement sous la dépendance du facteur de transcription CSF-1 ou M-CSF (Macrophages Colony Stimulating Factor) qui est fortement exprimé

par les précurseurs des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques. Une fois différenciés, les monocytes quittent la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine dont ils représentent environ 10% de la population leucocytaire circulante chez l'Homme, avec une demi-vie de 2-3 jours en conditions physiologiques(Auffray et al., 2009).

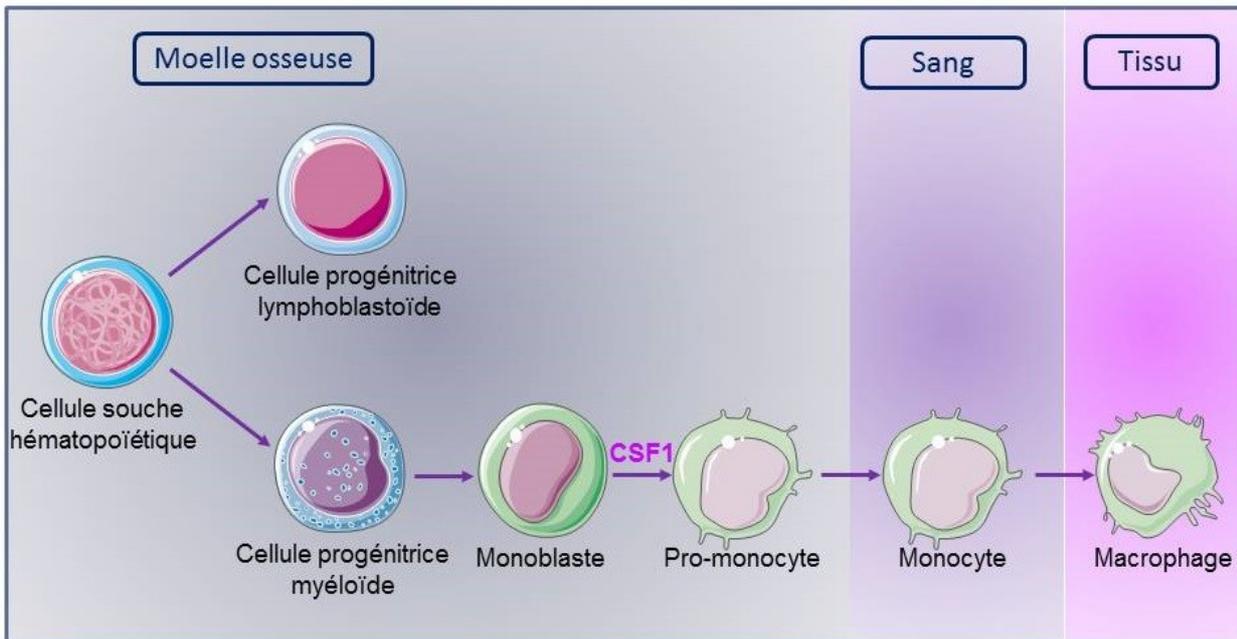


Figure 7: Etapes de différenciation des monocytes/macrophages à partir d'une cellule souche hématopoïétique

Aujourd'hui, il est admis que plusieurs populations de monocytes existent. Chez l'Homme, ils se différencient sur la base de l'expression du co-récepteur au LPS, le CD14, et du récepteur de type FcγRIII CD16. On distingue schématiquement trois catégories de monocytes humains(Wong et al., 2012; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Les monocytes dits « classiques » sont caractérisés par un niveau élevé d'expression du CD14 et l'absence d'expression du récepteur CD16 ($CD14^+ CD16^-$). Ils représentent la population monocyttaire majoritaire (85-90% des monocytes totaux) et sont dotés d'une forte capacité de phagocytose et sont capable de sécréter, après activation, des cytokines pro-inflammatoires telles que le $TNF\alpha$, l' $IL-1\beta$ et l' $IL-6$. Les

monocytes exprimant les deux récepteurs CD14 et CD16 représentent 10 à 15% des monocytes totaux et sont subdivisés en deux groupes, selon le niveau d'expression de ces deux récepteurs. On distingue ainsi les monocytes « non classiques » qui expriment faiblement CD14 et fortement CD16 (CD14^{low} CD16^{high}) et les monocytes « intermédiaires » CD14^{high} CD16^{low} (Figure 8 et tableau 2). Les monocytes CD14⁺ CD16⁺ sécrètent de plus grandes quantités de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6 et les espèces réactives de l'oxygène (ROS)) que les monocytes classiques. De plus, les monocytes intermédiaires expriment fortement les molécules de CMH-II ainsi que des molécules de co-stimulation leur conférant le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (Wong et al., 2012). Ces monocytes, qui sont recrutés spécifiquement au sein d'un tissu, sont à l'origine des différents macrophages tissulaires dont les caractéristiques fonctionnelles sont prédéfinies par le type de monocytes dont ils proviennent.

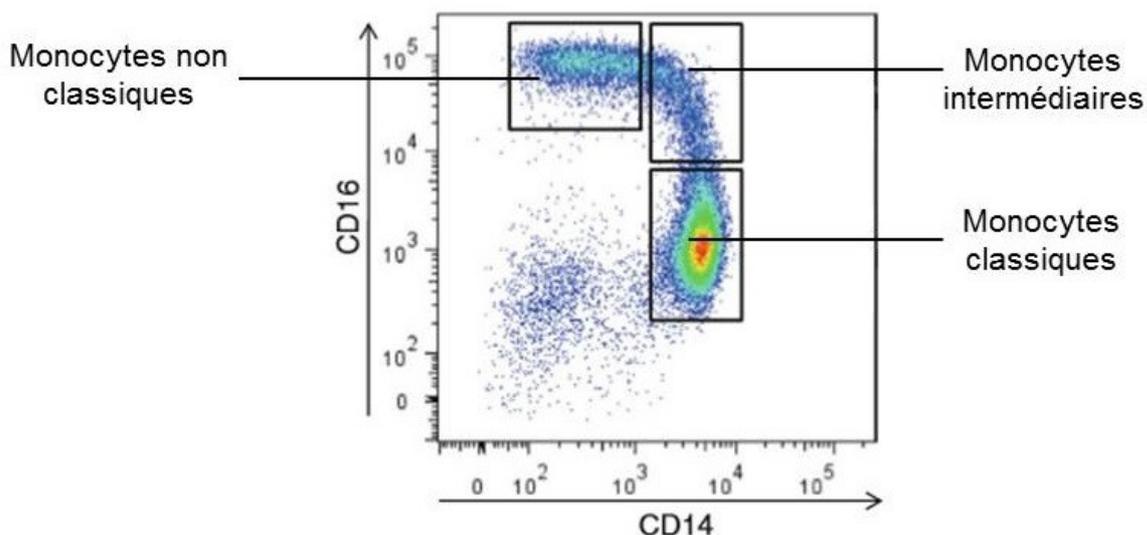


Figure 8: Les différents sous-types de monocytes humains basés sur l'expression des marqueurs de surface CD14 et CD16 (Wong, 2012)

Monocytes	Marqueurs de surface	Proportion	Propriétés fonctionnelles
Classiques	CD14 ^{high} CD16 ⁻	85%	Phagocytose Activité microbicide
Intermédiaires	CD14 ^{high} CD16 ^{low}	5%	Production de cytokines pro-inflammatoires ROS Cellules présentatrices d'antigènes (CMH-II)
Non-classiques	CD14 ^{low} CD16 ^{high}	10%	Production de cytokines anti-inflammatoires Apoptose

Tableau 2: Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des différentes sous-populations de monocytes humains

Aujourd'hui il est décrit que les macrophages présentent deux origines distinctes. Ils peuvent soit se différencier à partir de monocytes sanguins infiltrant les tissus soit présenter une origine fœtale. En conditions inflammatoires ou pathologiques, les monocytes sanguins peuvent infiltrer les tissus pour se différencier en macrophages tissulaires. Ces macrophages dérivés de monocytes sanguins cohabitent avec les macrophages tissulaires résidents. En revanche en conditions physiologiques, les monocytes sanguins ne peuvent contribuer au pool de macrophages résidents dans les tissus (Hashimoto et al., 2013). Des études récentes soutiennent une origine fœtale de ces derniers dont le pool serait maintenu par un auto-renouvellement cellulaire à l'âge adulte (Hashimoto et al., 2013). De même, deux populations distinctes de macrophages possédant des propriétés morphologiques et fonctionnelles différentes ont été identifiées dans le péritoine de souris. On distingue ainsi, essentiellement sur la base d'une expression différentielle des marqueurs F4/80 et CD11b les large peritoneal macrophages (LPMs) des small peritoneal macrophages (SPMs). Les LPMs, qui expriment fortement les marqueurs F4/80 et CD11b, constituent environ 90% des macrophages péritonéaux en condition d'homéostasie. A l'inverse, les SPMs, représentent 10% de la population des macrophages péritonéaux et sont de phénotype F4/80^{low} CD11b^{low} (Cassado et al., 2015 ; Ghosn et al., 2010). En conditions d'homéostasie, les LPMs semblent provenir d'une origine fœtale, indépendante des

précurseurs hématopoïétiques et conservent leur capacité à proliférer *in situ* pour maintenir le nombre physiologique de cellules (Yona et al., 2013). A l'inverse les SPMs, dont le nombre augmente fortement en conditions inflammatoires, semblent se différencier à partir de monocytes sanguins infiltrant (Ghosh et al., 2010). Dans ces conditions une inversion de population des SMPs et des LPMs est constatée.

Ainsi, en conditions physiologiques ou inflammatoires et pathologiques, le renouvellement et l'expansion des macrophages tissulaires résidents peut provenir soit de l'infiltration de monocytes sanguins infiltrant les tissus, soit de la prolifération de macrophages résidents.

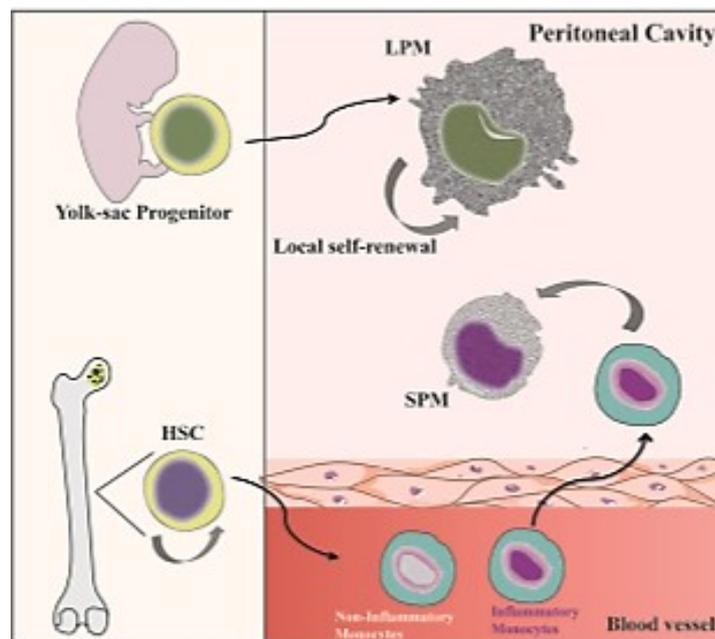


Figure 9: Deux origines distinctes des macrophages péritonéaux (Cassado et al., 2015)

Les macrophages se distinguent des monocytes non seulement par leur localisation tissulaire plutôt que sanguine, mais également par leurs caractéristiques phénotypiques. En effet, les macrophages sont des cellules de plus grande taille que les monocytes et possèdent un système vacuolaire extrêmement développé et varié (endosomes, phagosomes, lysosomes, phagolysosomes, etc...).

Tous les macrophages possèdent des propriétés fonctionnelles communes fondamentales qui sont leur capacité migratoire, leur pouvoir de phagocytose, ainsi que la présentation antigénique aux lymphocytes T via les molécules de CMH de classes I et II. De plus, ils sécrètent divers médiateurs solubles tels que des cytokines, chimiokines, médiateurs lipidiques, ROS, facteurs hématopoïétiques. Les macrophages ont également pour fonction majeure de maintenir l'homéostasie tissulaire à travers leur capacité à moduler l'initiation et l'arrêt de la réponse inflammatoire en fonction des besoins de l'organisme et à orienter la réponse immunitaire. Ainsi, en début du processus inflammatoire, les macrophages ont un rôle prépondérant dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1 β , de l'histamine, des lipides bioactifs comme les prostaglandines et les leucotriènes. Ils produisent aussi des chimiokines, qui permettent le recrutement d'autres cellules immunitaires au niveau du tissu lésé, tout ceci amplifiant ainsi la réponse inflammatoire. Une réaction inflammatoire non contrôlée peut s'étendre dans tout l'organisme ou conduire à des pathologies inflammatoires. Ainsi, celle-ci est finement régulée et une fois l'état d'homéostasie du tissu lésé retrouvée, l'étape de résolution de l'inflammation débute. Les macrophages ont également un rôle central dans cette phase cruciale dont dépend la réussite de la réaction inflammatoire. Pour permettre le retour à l'homéostasie, les macrophages sécrètent des médiateurs anti-inflammatoires, notamment les cytokines anti-inflammatoires TGF- β et IL-10, mais aussi des dérivés lipidiques comme les lipoxines ou encore les résolvines. Ils sécrètent également des facteurs solubles impliqués dans la réparation tissulaire et phagocytent les neutrophiles qui sont entrés en apoptose. Tous ces mécanismes favorisant l'arrêt de la réponse inflammatoire. Ainsi, les macrophages jouent un rôle central dans la mise en place, le bon déroulement et l'arrêt de la réponse inflammatoire, permettant à

l'organisme hôte de se défendre au mieux contre les différentes agressions extérieures. En fonction des tissus dans lesquels ils sont présents, les macrophages disposent de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles induites par leur microenvironnement qui leur sont propres et leur permettent d'assurer au mieux leur fonction au sein du tissu où ils se localisent. Par exemple, le rôle des ostéoclastes dans le remaniement du tissu osseux leur est conféré grâce à leur grande capacité de phagocytose et de sécrétion d'enzymes lytiques telles que les hydrolases lysosomales, les peptidases ou encore les collagénases. Les macrophages alvéolaires expriment fortement des récepteurs reconnaissant des motifs conservés des microorganismes, ce qui leur permet de reconnaître et éliminer efficacement ces pathogènes.

De manière générale, les signaux responsables des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles que les macrophages acquièrent spécifiquement dans les tissus proviennent de molécules sécrétées ou exprimées par les cellules constituant leur microenvironnement. Ainsi, les molécules d'adhésion (intégrines, molécules de la famille des immunoglobulines, sélectines, etc...) exprimées localement par les cellules endothéliales dirigent la migration des monocytes à travers l'endothélium vasculaire et orientent également leur différenciation en macrophages. Il en est de même des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance comme le TGF- β (Transforming Growth Factor β).

II. Propriétés fonctionnelles des macrophages

1. La phagocytose

La phagocytose est une fonction clé des macrophages qui est nécessaire à la défense immunitaire innée et adaptative anti-infectieuse. En effet, elle permet l'élimination des microorganismes pathogènes, mais aussi des cellules sénescents, des débris cellulaires et des particules exogènes. Ce processus est également nécessaire à l'organogenèse, au remodelage et à l'homéostasie tissulaire notamment à travers la phagocytose des cellules et débris apoptotiques (efférocytose). Dans la réponse immunitaire, la phagocytose est une fonction spécifique des phagocytes

« professionnel » que sont les monocytes et macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Elle diffère entre ces différentes populations cellulaires, mais on retrouve cependant de nombreuses caractéristiques communes (Flannagan et al., 2012). Cette fonction phagocytaire correspond à la capture, l'ingestion et la dégradation des pathogènes et est associée à la présentation antigéniques. La reconnaissance des pathogènes à phagocyter par les récepteurs de phagocytose se fait soit par la reconnaissance directe de motifs antigéniques soit indirectement *via* la reconnaissance d'opsonines (molécules du complément, immunoglobulines) recouvrant la surface du pathogène (Underhill and Goodridge, 2012).

La phagocytose se divise en trois phases: la reconnaissance, l'internalisation puis la dégradation du composé à phagocyter. La reconnaissance des structures d'intérêt par le récepteur déclenche le réarrangement du réseau d'actine dans la cellule, ce qui conduit à l'invagination de la membrane plasmique et la formation des phagosomes. Celui-ci est produit à partir de la fusion de la membrane plasmique avec des vésicules issues d'organites intracellulaires (endosomes et réticulum endoplasmique). Ensuite

le phagosome se ferme et entame un processus de maturation qui est reflété par l'acidification des vésicules (pH proche de 4-5) suite à sa fusion avec les lysosomes. Le pH acide des phagolysosomes formé permet l'activation optimale des enzymes lysosomales et nécessaires à la dégradation des éléments ingérés (Flannagan et al., 2012; Kinchen and Ravichandran, 2008).

Le processus de phagocytose est un point commun à tous les états de polarisation des macrophages. Ainsi, le panel de récepteurs qu'ils exprimeront conditionnera le type de ligands et les pathogènes reconnus *via* les récepteurs de phagocytose et, de ce fait, orientera la réponse immunitaire des macrophages engendrée par le processus phagocytaire.

2. Les intermédiaires réactifs de l'oxygène (IROs)

Le processus de phagocytose est le plus souvent associé à une hyperactivité oxydative conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces composés, toxiques pour les microorganismes, participent à leur destruction en entraînant la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines et des acides nucléiques des pathogènes.

Les intermédiaires réactifs de l'oxygène sont produits au niveau des membranes cellulaires (membrane plasmique ou membrane mitochondriale) par l'action du complexe enzymatique NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxydase activé. Ce complexe, qui est présent sous forme inactive dans le cytoplasme des phagocytes non activés, est composé de sous-unités cytosplasmiques (p67 phox, p40 phox, p47 phox et Rac) et membranaires (p21phox, gp91phox et Rap) (Vignais, 2002). Suite à l'activation des monocytes/ macrophages, les sous unités

cytoplasmiques sont recrutées au niveau de la membrane plasmique ou des phagosomes, permettant ainsi l'assemblage de la NADPH oxydase au niveau de ces membranes (El-Benna et al., 2009). Suite à cet assemblage, la NADPH oxydase transfère des électrons du NADPH à l'oxygène moléculaire pour produire l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). S'ensuivent des cascades enzymatiques aboutissant à la production de diverses espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, l'anion superoxyde constitue un substrat de choix pour la génération de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). L' H_2O_2 formé est ensuite engagé dans une réaction catalysée par la myéloperoxydase (MPO) conduisant à la production de puissants agents oxydants comme l'acide hypochloreux (HOCl). Ces différents composés produits se retrouvent alors en concentration importante dans le phagosome et exercent des effets cytotoxiques sur les éléments phagocytés.

De plus, certains types de macrophages ont la capacité à produire, après induction de l'enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase), des dérivés nitrés comme le monoxyde d'azote (NO) par oxydation des noyaux azotés de la L-arginine et de la L-citrulline. Le NO, en association avec l'anion superoxyde, permet la formation de peroxynitrites ($ONOO^-$) qui sont elles aussi des espèces très réactives (Figure 9).

Le contrôle de la production de ces différentes espèces réactives de l'oxygène, qui sont surtout produites par les macrophages M1 en forte quantité, est nécessaire afin d'éviter de causer des dommages cellulaires chez l'hôte. Ainsi, pour se protéger, les cellules disposent d'enzymes telles que les peroxydases et les catalases qui sont capables d'éliminer le peroxyde d'hydrogène limitant ainsi la production de ces radicaux libres toxiques pour la cellule.

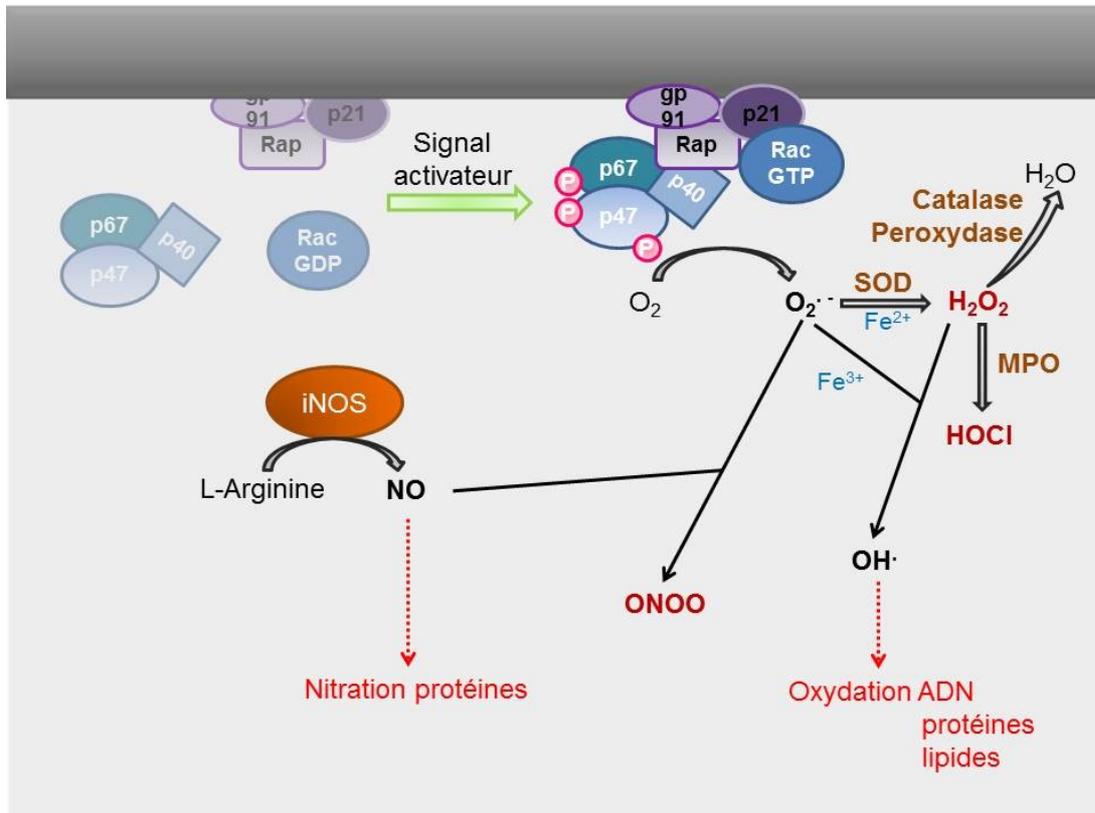


Figure 10: Activation de la NADPH oxydase et synthèse d'espèces réactives oxygénées et nitrées (d'après Ago et al., 2011)

3. Cytokines/chimiokines

La production de cytokines et de chimiokines est fortement liée à la différenciation et au type d'activation des monocytes et macrophages. Ces médiateurs, qui sont de petits peptides intervenant dans la réponse immunitaire, sont important dans le dialogue entre les lymphocytes T et les monocytes/macrophages, permettant à la réponse immune d'évoluer dans le temps, de modifier le panel de cellules recrutées ainsi que leur répertoire fonctionnel.

a) *Les cytokines*

Les cytokines constituent une grande famille complexe de petites molécules solubles impliquées dans la réponse immunitaires comprenant notamment les interleukines (IL, au nombre de 35), les interférons (IFN), le TNF α , etc... Elles contribuent au microenvironnement des monocytes et macrophages et de ce fait, orientent finement le comportement de ces cellules. En effet, ces molécules constituent des signaux majeurs de différenciation des monocytes et macrophages, en induisant la transcription et l'expression de nombreux gènes impliqués dans la programmation de ces cellules. Les lymphocytes T CD4⁺ helper (comprenant les lymphocytes Th1 et les Th2) et les lymphocytes Natural killer(NK) sont les principales sources de production des cytokines intervenant dans la polarisation des macrophages. Les lymphocytes Th1 produisent des cytokines telles que l'IFN γ et l'IL-2 qui interviennent dans l'immunité à médiation cellulaire contre les pathogènes intracellulaires (bactéries, virus, champignons) (Mosmann and Coffman, 1989). L'IFN γ produit par ces cellules est un facteur crucial d'activation des macrophages vers un phénotype M1 et dans le rétrocontrôle négatif de la réponse Th2. Cette dernière, via la production de cytokines comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10 ou encore l'IL-13 et l'IL-25, est impliquée dans la défense contre les pathogènes extracellulaires multicellulaires (parasites: helminthes, etc...) mais aussi dans des pathologies allergiques comme par exemple la dermatite atopique ou l'asthme allergique (Riffo-Vasquez and Spina, 2002). L'IL-4 et l'IL-13 produites par ces cellules représentent les cytokines majeures de l'induction de la polarisation alternative (M2a) des macrophages (Mantovani et al., 2004).

Les macrophages produisent également une grande diversité de cytokines dont le panel varie selon leur état d'activation, orientant ainsi leur réponse. Suite à la reconnaissance d'organismes pathogènes, ils produisent des cytokines pro-

inflammatoires telles que les cytokines de la famille de l'IL-1 (IL-1 α , IL-1 β et IL-18), l'IL-6 et l'IL-12 (Barksby et al., 2007). Le TNF- α est une cytokine principalement sécrétée par les monocytes et macrophages, qui initie la production d'une cascade de cytokines qui vont favoriser la mise en place de la réponse inflammatoire (Mukhopadhyay et al., 2006).

La production de cytokines de la famille de l'IL-1 a récemment été associée à l'activation d'un complexe protéique majeur impliqué dans le développement de la réponse inflammatoire, appelé inflammasome (Ciraci et al., 2012; Martinon et al., 2009) et qui sera décrit plus tard dans ce manuscrit. Brièvement, l'inflammasome est un complexe qui, en s'activant, induit la maturation de la forme inactive de l'IL-1 β (pro-IL-1 β) en IL-1 β active sécrétée grâce à un clivage enzymatique finement contrôlé par la Caspase-1. De la même manière, il intervient également dans la sécrétion d'IL-18 sous forme mature. Ceci permet une réponse très rapide ne nécessitant pas de régulation transcriptionnelle directe. Ce complexe joue un rôle majeur dans le développement de la réponse inflammatoire puisque la sécrétion des cytokines de la famille de l'IL-1 est indispensable à la mise en place de cette réponse *via* l'activation et le recrutement de nombreux médiateurs cellulaires et solubles. L'importance de ces cytokines dans le processus inflammatoire est telle qu'une mauvaise régulation de la sécrétion de ces facteurs solubles est à l'origine de nombreuses pathologies inflammatoires d'origine génétique (Syndrome de Muckle Wells, etc...), auto-immune (goutte et pseudo-goutte par exemple) ou environnementale (allergie, asbestose, silicose) (Agostini et al., 2004; Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008; Duewell et al., 2010).

Les macrophages sont également capables de sécréter des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, qui inhibe la production d'IFN γ et d'IL-2 (Zuany-

Amorim et al., 1997), et le TGF- β . L'IL-10 régule aussi négativement la production de TNF- α , d'IL-1 β ainsi que des chimiokines CC telles que MCP1 (Monocyte chemoattractant protein 1 ou CCL2), Rantes (Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted ou CCL5) ou MIP-1 (Macrophage inflammatory protein 1 α) et les chimiokines CXC KC (Keratinocyte-derived chemokine) et IP-10 (Interferon gamma-induced protein 10 ou CXCL10) par les macrophages (Moore et al., 2001). De plus, cette cytokine est responsable du phénomène d'anergie des lymphocytes qui est associé à l'induction des lymphocytes T régulateurs (Moore et al., 2001).

Le TGF- β produit par les monocytes et les macrophages permet quant à lui de limiter la réponse inflammatoire en inhibant la E-sélectine impliquée dans l'adhésion et le recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation et en diminuant la production de RLO (Wahl, 1994). Il induit également l'expression de Foxp3 (Forkhead box P3) chez les lymphocytes T régulateurs, facteur de transcription indispensable au maintien de leur activité immunosuppressive, ce qui démontre que le TGF- β est également important dans le contrôle de la réponse immune adaptative (Chen et al., 2003; Williams and Rudensky, 2007). De plus, il favorise la réparation tissulaire en stimulant la prolifération des fibroblastes, la synthèse de collagène et le remodelage de la matrice extracellulaire néoformée (Mosser and Edwards, 2008; Nall et al., 1996).

La sécrétion de ces cytokines varie selon l'état d'activation des macrophages. Ainsi, les macrophages M1 sécrèteront d'avantage de cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages M2 sécrètent quant à eux des cytokines anti-inflammatoires en grande quantité. Cependant, certains d'entre eux, comme les macrophages M2b, sont capable de sécréter des chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α , en association avec les chimiokines anti-inflammatoires.

b) *L'inflammasome*

L'inflammasome est un complexe multiprotéique exprimé dans les cellules myéloïdes qui est capable d'activer des caspases inflammatoires, conduisant à la production et à la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18. A ce jour, 5 complexes inflammasomes différents ont été et caractérisés: les inflammasomes Nlrp 1, 3 et 6, AIM2 (Absent in melanoma 2) et Nlrc4 (Figure 10). Ils reconnaissent et sont activés par une large gamme de PAMPs et de DAMPs et chaque inflammasome est induit par des signaux différents.

D'une manière générale, les inflammasomes sont constitués d'une protéine récepteur reconnaissant le stimulus inducteur et permettant, dans les cellules activées, le recrutement de la protéine adaptatrice ASC (ou PYCARD, Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD). Celle-ci permet le recrutement et l'activation de caspases qui sont des protéases à Cystéine, principalement la caspase-1 conduisant ainsi à la production par clivage protéolytique et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 sous forme active.

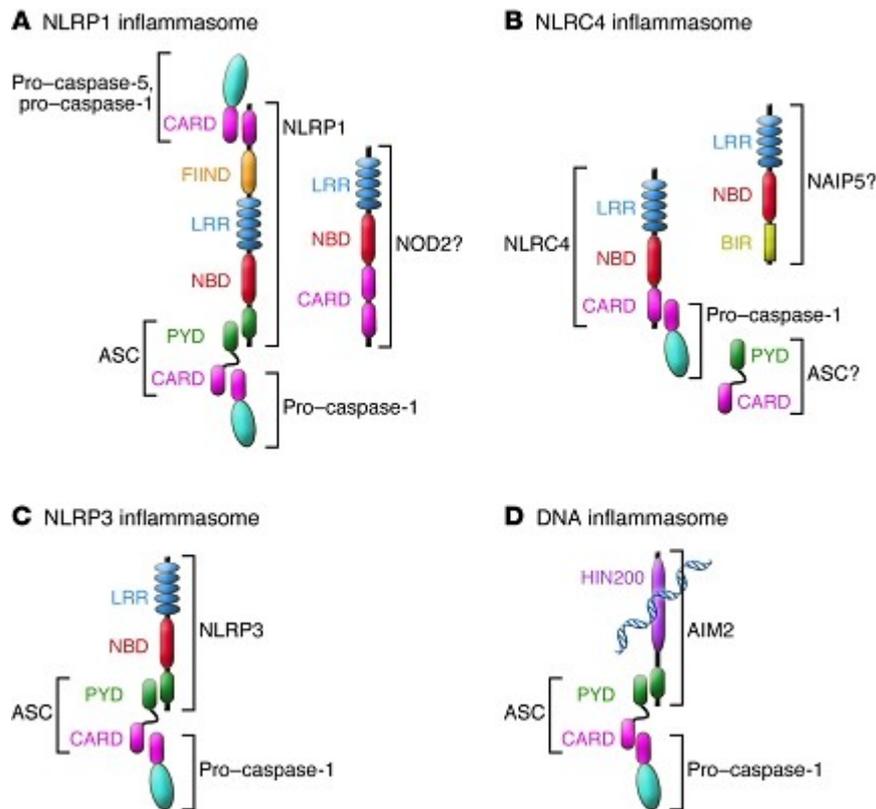


Figure 11: Les différents types d'inflammasomes (Stutz et al., 2009)

L'inflammasome Nlrp3 étant le mieux caractérisé et majoritairement exprimé par les monocytes et macrophages, nous nous focaliserons sur celui-ci dans ce manuscrit.

Celui est composé de la protéine Nod-like receptor Nlrp3, de la protéine adaptatrice ASC et de la caspase-1. Nlrp3 contient un domaine PYD qui permet le recrutement de la protéine ASC. Celle-ci possède un domaine CARD qui permet le recrutement et l'oligomérisation de la pro-caspase-1 suivi de l'activation de cette dernière en caspase-1 par clivage auto-protéolytique. Un nombre élevé de stimuli endogènes et exogènes, différents de par leur structure et leur nature physico-chimique, sont capable d'activer cet inflammasome (Figure 11). Ils peuvent être soit des PAMPs, soit de nature indépendante de ceux-ci, comme par exemple l'ATP (Adénosine triphosphate) ou les ROS (Davis and Ting, 2010).

Le rôle central de l'inflammasome dans la réponse inflammatoire nécessite une régulation fine de son activation. En effet, ce complexe protéique a été associé à diverses pathologies autoimmunes et autoinflammatoires comme la sclérose en plaques (Gris et al., 2010), la maladie de Crohn et l'athérosclérose (Düwell et al., 2010).

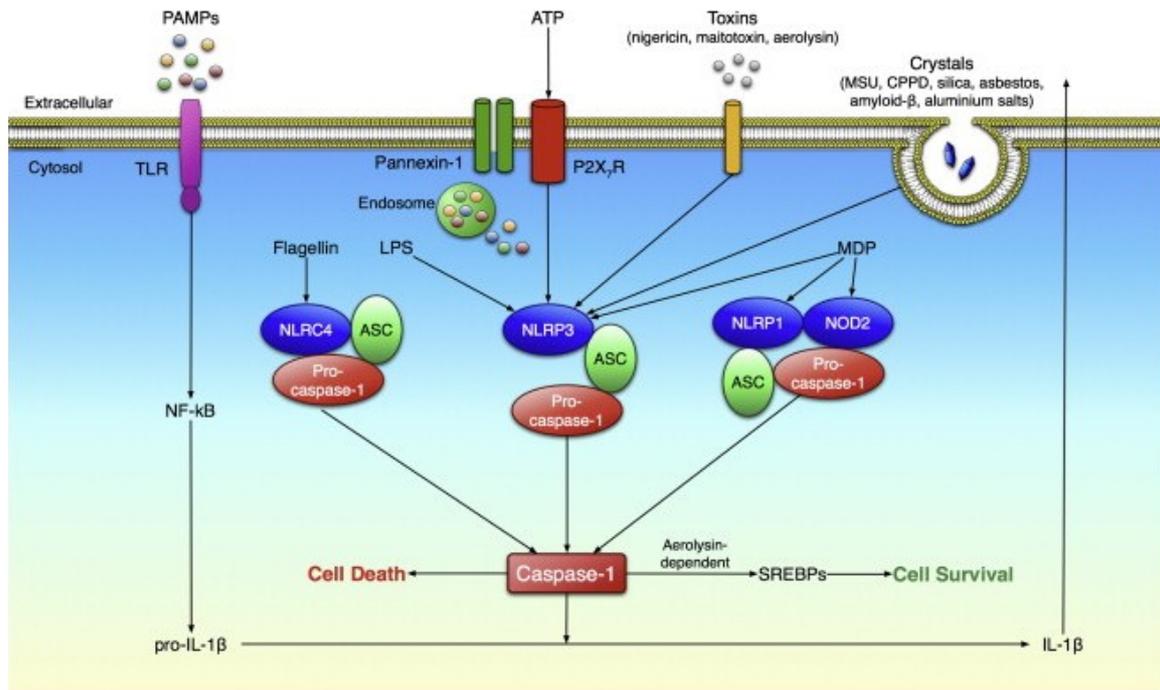


Figure 12: Signaux activateurs de l'inflammasome (Yu and Finlay, 2008)

c) Les chimiokines

Les chimiokines sont de petits peptides de faible poids moléculaire (8 à 14 kDa) qui jouent également un rôle crucial dans la réponse immunitaire et l'inflammation (Mantovani, 1999; Rollins, 1997). Elles se caractérisent par leur capacité à recruter les cellules immunitaires sur le site lésé, appelée chimiotactisme. Ainsi cette propriété qui est spécifique de certains types cellulaires en fonction des chimiokines impliquées est essentielle au développement, au maintien et à la résolution de la réponse inflammatoire. Elles sont également impliquées dans la régulation de l'angiogenèse,

la production de collagène ainsi que la prolifération des précurseurs hématopoïétiques (Mantovani et al., 2004). Les chimiokines exercent leurs fonctions suite à l'interaction avec des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés aux protéines G (RCPG). La nomenclature des chimiokines (et de leurs récepteurs associés) est basée sur les propriétés structurales de ces dernières. En effet, elles possèdent quatre résidus Cystéines conservés dont le changement de position a permis d'établir quatre sous-familles: CXC, CC, C et CX3C. Leur structure est également responsable de la spécificité d'action de ces molécules sur certains types cellulaires.

Certaines chimiokines sont également des marqueurs d'activation des macrophages et caractérisent les différents phénotypes obtenus suite à leur différenciation et leur activation. Ainsi, les macrophages M1 sécrètent des chimiokines inflammatoires comme CCL2, 3, 4, 5 ainsi que CXCL9, 10 et 11 tandis les macrophages de phénotype M2 produisent principalement les chimiokines CCL1, 17, 22 (Mantovani et al., 2004).

4. Eicosanoïdes

En plus des cytokines et chimiokines, les macrophages produisent des médiateurs lipidiques qui jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire. Les lipides bioactifs majoritairement produits dans les cellules de mammifères sont les eicosanoïdes, issus du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) qui est un acide gras polyinsaturé composé de 20 atomes de carbone. Au cours d'un stimulus ou d'une réaction inflammatoire, l'AA est libéré à partir des phospholipides membranaires sous l'action de phospholipases, principalement la phospholipase A2 (PLA₂). La PLA₂ calcium dépendante (cPLA₂) est l'enzyme clé impliquée dans la synthèse des eicosanoïdes. En effet, elle est activée par phosphorylation sur sérine puis est

transloquée à la membrane où elle entraîne la libération de l'AA issu des phospholipides membranaires (Evans et al., 2001). L'AA est ensuite métabolisé pour former des eicosanoïdes selon deux voies principales qui sont la voie des cyclooxygénases (COX) et celle des lipoxygénases (Figure 12). Deux enzymes interviennent dans la voie des COX, COX-1 et COX-2, et permettent la production des prostaglandines (PGs) PGG₂ et PGH₂. La PGH₂ est à son tour métabolisée afin de fournir divers prostanoïdes, *via* différentes prostaglandines synthétases. Ainsi, la PGE synthétase conduit à la formation de la PGE₂. Les macrophages produisent divers prostanoïdes qui sont les PG (PGD₂, PGE₂ et PGF_{2α}), les prostacyclines (PGI₂) et leur métabolite stable 6-céto-PGF_{1α}, mais aussi le thromboxane (TX) TXA₂ et son métabolite stable TBX₂. La voie des lipoxygénases implique, quant à elle, les enzymes 5-lipoxygénase (5-LO), 12-lipoxygénase (12-LO) et 15-lipoxygénase (15-LO), conduisant à la synthèse de leucotriènes (LTs), d'acides gras hydroperoxydés (HPETEs ; acides hydroperoxyeicosatétraénoïques) et d'acides gras hydroxylés (HETEs ; acides hydroxyeicosatétraénoïques).

Les eicosanoïdes produits par ces deux grandes voies de synthèse peuvent exercer leurs effets autocrines par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques ou par voie intracellulaire.

a) *La voie des cyclooxygénases*

La synthèse des prostanoïdes par les monocytes et les macrophages est induite suite à un signal inflammatoire ou infectieux, déclenché par la phagocytose de levures comme *C. albicans* ou de parasites comme *Leishmania infantum*.

Suite à la libération de l'AA par la cPLA₂, celui-ci subit une étape de cyclisation puis l'addition de deux molécules d'oxygène sous l'action des COX. Les COX sont des enzymes membranaires possédant deux activités enzymatiques distinctes, dont l'action combinée conduit à la formation de la PGH₂. Dans un premier temps, l'activité cyclooxygénase convertit l'AA en PGG₂ (Smith et al., 1996). Ce métabolite instable est ensuite rapidement oxydé via l'activité peroxydase des COX. La PGH₂ ainsi formée sert ensuite de substrat commun à la formation de PG, des thromboxanes et prostacyclines qui seront produites sous l'action de différentes enzymes.

Les COX existent sous deux isoformes qui sont codées par deux gènes distincts. COX1 est exprimée de manière constitutive, c'est-à-dire qu'elle s'exprime en absence de toute stimulation dans la plupart des tissus. A l'inverse, COX2 est une enzyme inductible qui peut être activée par un grand nombre de facteurs parmi lesquels les facteurs de croissance (TGFβ, EGF (Epidermal growth factor), etc...), certaines cytokines comme l'IL-1α, l'IL-1β ou le TNF-α, des endotoxines, etc... (Crofford, 1997). Les PGs sont reconnues par des RCPG et peuvent agir, par l'intermédiaire de ces derniers, en tant que messagers autocrines ou paracrines. Elles interviennent dans la modulation du taux d'AMPc (Adénosine 3'-5' monophosphate cyclique) et le flux calcique à travers l'activation de la phospholipase C (PLC) et de la protéine kinase C (PKC) (Narumiya and FitzGerald, 2001; Narumiya et al., 1999). Elles peuvent également induire la stabilisation du complexe cytosolique NF-κB/Iκ-B et ainsi inhiber la transcription des gènes cibles de NF-κB. De façon intéressante, la PGD₂ peut aussi être métabolisée en 15-déoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ dans les macrophages, ce métabolite étant un ligand endogène du récepteur nucléaire PPARγ.

b) *La voie des lipoxygénases*

Parallèlement à la voie des COX, la voie des lipoxygénases permet la formation de leucotriènes (LTs), de lipoxines (LXs) et d'acides gras hydroperoxydés (HPETEs) ou hydroxylés (HETEs) à partir de l'AA (Samuelsson et al., 1987).

Les leucotriènes sont des lipides bioactifs produits par un nombre restreint de cellules, en particulier par les mastocytes et les macrophages. Comme les PGs, ils exercent leurs effets par l'intermédiaire de RCPGs. Ils sont produits grâce à l'action de la 5-LOX combinée à d'autres enzymes spécifiques des différents leucotriènes existant. Cette enzyme, initialement présente dans le cytosol ou le noyau, est recrutée à la membrane plasmique en même temps que la cPLA₂ lors de son processus d'activation. Au niveau de la membrane plasmique, la FLAP (Five lipoxygenase-activating protein) favorise la présentation de l'AA à la 5-LOX qui induit, dans un premier temps, l'oxygénation de ce dernier. Ceci conduit à la formation de composés intermédiaires que sont les 5-HPETEs. La 5-LOX catalyse ensuite la déshydratation de ces 5-HPETEs en leucotriène A₄ (LTA₄). Ce métabolite électrophile instable est directement converti soit en LTB₄, par l'action de la LTA₄ hydrolase, soit en LTC₄ obtenu par la conjugaison du LTA₄ avec le glutathion grâce à la LTC₄ synthase. Ce dernier est converti en LTD₄ et LTE₄ et est impliqué dans les réactions allergiques (Gronert et al., 1999; Peters-Golden and Brock, 2001). Le LTB₄ est quant à lui, un puissant agent chimiotactique des neutrophiles. Cependant, des études récentes ont également démontré son rôle dans l'activation de l'inflammasome et ainsi dans la production d'IL-1 β (Amaral et al., 2012).

Le LTA₄ formé suite à la conversion de l'AA par la 5-LO peut également être métabolisé par les enzymes 12-LO et 15-LO, ces deux enzymes étant présentes sous forme combinée 12/15-LOX chez la souris. Ceci conduit à la formation de

l'intermédiaire métabolique 5(S),6(S)-époxy-15(S)-hydroxy-eicosatétraénoïque qui sera à son tour converti en lipoxine A4 (LXA4) ou en lipoxine B4 (LXB4) selon les hydrolases présentes dans les cellules (LXA4 hydrolase pour la LXA4 hydrolase (LXA4H) et LXB4H respectivement). Les lipoxines peuvent également être produites par l'action des 12 et 15-LOX sur l'AA qui va directement former du 12 ou 15-HPETE qui sera ensuite métabolisé par la 5-LOX puis la LXA4H ou la LXB4H.

Les lipoxines ont un rôle anti-inflammatoire et agissent également dans la résolution de l'inflammation, notamment *via* des RCPGs. En effet, elles sont connues pour contrôler la réponse inflammatoire dans des pathologies comme l'asthme, l'arthrite ou encore les affections gastro-intestinales, parodontales, rénales et pulmonaires. Elles interviennent aussi dans la régulation de la réponse immunitaire suite à une infection par des parasites (Bafica et al., 2005; Serhan and Savill, 2005).

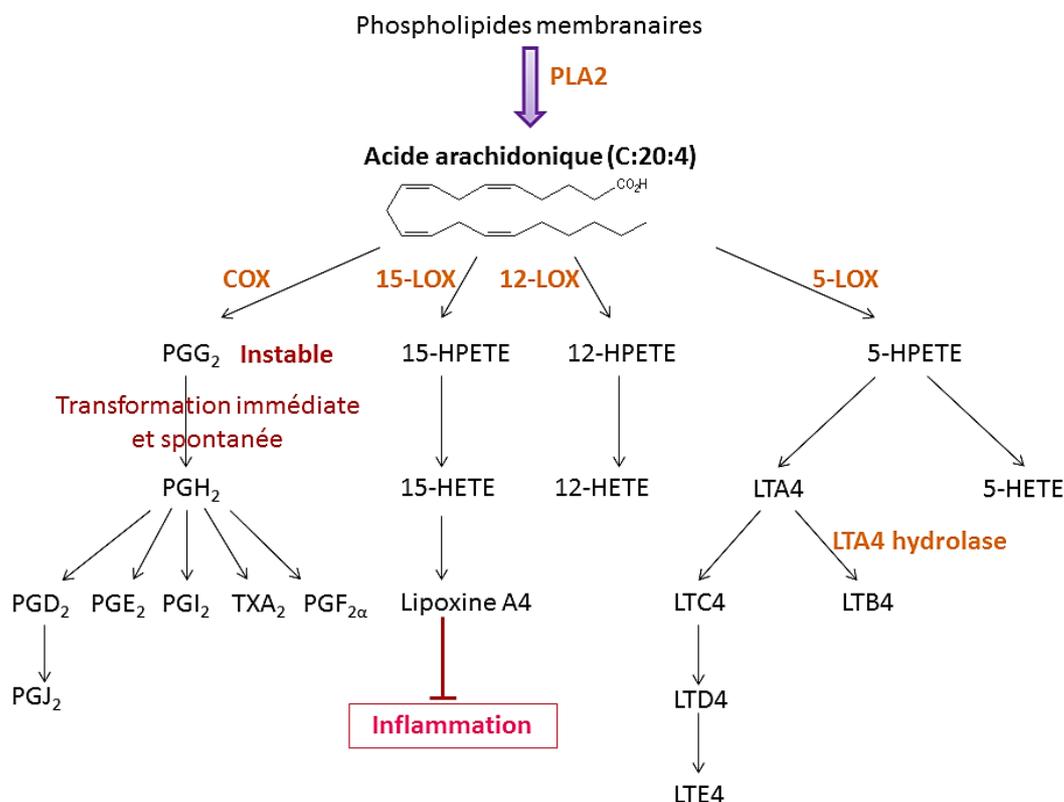


Figure 13: Métabolisme de l'acide arachidonique: voies de synthèse des prostaglandines, leucotriènes et lipoxines

III. Polarisation des macrophages

Les fonctions effectrices des macrophages sont étroitement liées à leur état de différenciation et d'activation, lui-même dicté par leur environnement cellulaire et moléculaire. Ces cellules sont caractérisées par une plasticité phénotypique et fonctionnelle qui leur permet de répondre aux différents signaux micro-environnementaux (cytokines, signaux de danger, etc...) en se polarisant.

Il a été mis en évidence dans les années 1970s qu'en fonction des signaux, les macrophages pouvaient se polariser selon deux voies d'activation : la voie classique et la voie alternative de polarisation. Ainsi, des macrophages soumis à un environnement cytokinique Th1 produisant de l'interféron- γ (IFN- γ) ou de TNF α , associé à la présence de LPS, composant de la paroi des bactéries Gram négatif, se dirigent vers la voie classique d'activation et deviennent pro-inflammatoires. Ces macrophages sont aussi appelés macrophages M1 en référence au contexte Th1 les induisant. A l'inverse, tous les macrophages activés par une voie différente de la « voie classique » sont par extension associés à la « voie alternative », plus tard renommés macrophages M2, car induits dans un contexte Th2 (Figure 13). C'est en 2003 que l'équipe de Gordon crée la classification M1/M2 des macrophages, basée sur le modèle de nomenclature Th1/Th2 des lymphocytes T CD4⁺ déjà existante (Gordon, 2003). Les macrophages M1 et M2 se distinguent par le niveau d'expression de récepteurs membranaires et intracellulaires mais aussi en fonction des médiateurs solubles qu'ils produisent (cytokines, chimiokines, médiateurs lipidiques, ROS, etc...). Cependant, les données scientifiques actuelles ont permis de nuancer cette notion de polarisation. En effet, on ne parle plus de dichotomie M1/M2. La polarisation M1/M2 se définit plutôt comme étant un continuum d'états fonctionnels avec un panel différent

d'expression des récepteurs (PRR entre autres) et de fonctions variant selon les stimuli présents dans le microenvironnement.

En 2004, Mantovani et ses collègues affinent encore plus la classification des macrophages en subdivisant les types de macrophages M2 (Mantovani et al., 2004). Schématiquement, on retrouve les macrophages M2a induits par l'exposition à l'IL-4 ou à l'IL-13 et qui participent à l'inflammation de type 2 (Th2/Th17), les macrophages M2b dits « immunomodulateurs » de l'inflammation de type 2, les macrophages M2c « réparateurs » des tissus endommagés et les macrophages M2d qui ont un rôle anti-inflammatoire (Figure 13). Chaque polarisation n'est pas un état figé et est dépendante de l'environnement cellulaire et moléculaire des macrophages.

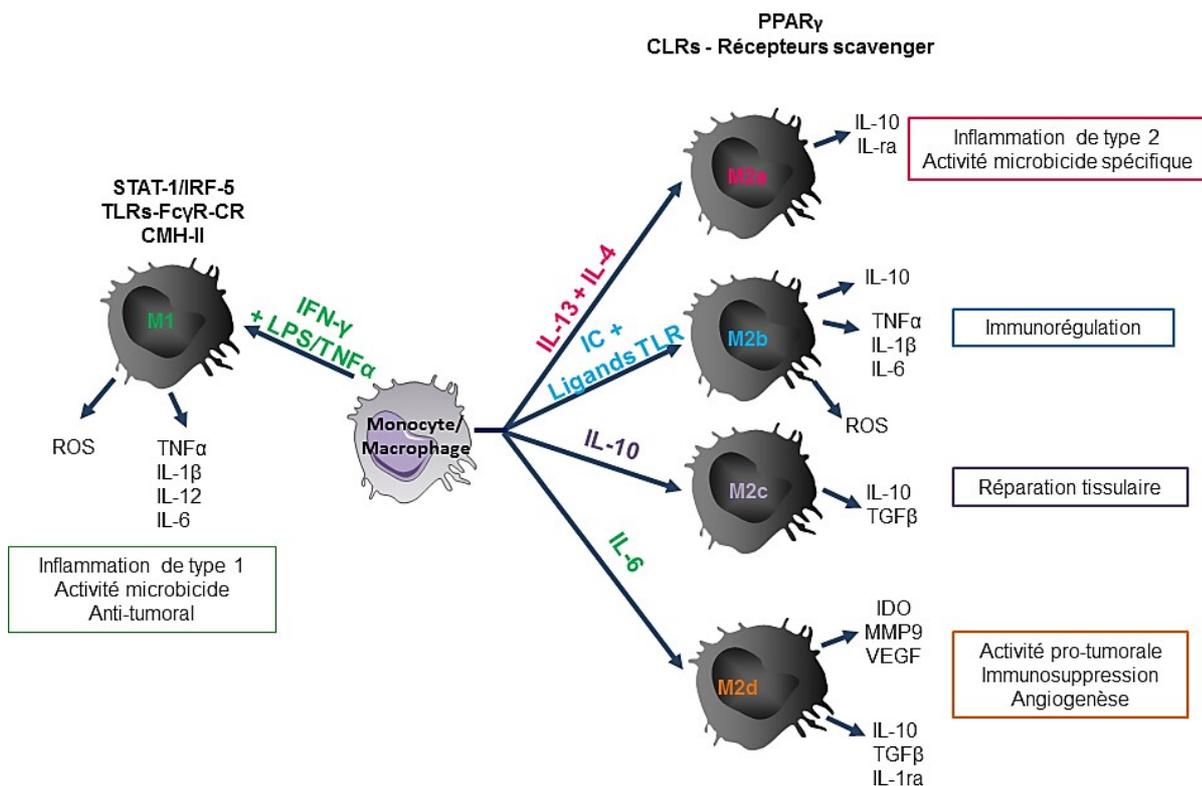


Figure 14: Les différentes voies de polarisation des macrophages

1. Les macrophages M1

a) *Caractéristiques phénotypiques*

Les macrophages M1 correspondent à une activation « classique » des macrophages induite dans un contexte Th1, par l'association de deux signaux : l'interféron gamma (IFN γ) couplé à un stimulus bactérien tel que les LPS ou à des cytokines comme le TNF α ou le GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor) (Martinez et al., 2006; Mosser, 2003). Ces macrophages M1 produisent alors de l'IL-12 qui, en synergie avec l'IL-18, constitue un signal fort pour le développement d'une réponse adaptative Th1. En retour, les lymphocytes Th1 ainsi activés produisent des niveaux plus élevés d'IFN γ . L'activation classique des macrophages est alors totale et déclenchée de manière durable.

D'une manière générale, la polarisation M1 est caractérisée par une forte inflammation et est nécessaire à la résistance de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires tels que les mycobactéries, les bactéries et les virus. Ces macrophages à activation classique favorisent également la résistance aux tumeurs (Mantovani, 2008). Cependant, les macrophages M1 sont aussi impliqués dans les dommages tissulaires, notamment les lésions de l'ADN suite à la production d'espèces radicalaires, et dans des pathologies dues à une inflammation chronique comme la polyarthrite rhumatoïde (Gordon, 2003).

Les macrophages M1 sont caractérisés par la surexpression de récepteurs membranaires qui reconnaissent les pathogènes opsonisés par les molécules du complément (CRs) ou les immunoglobulines (récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines, Fc γ R) mais aussi les TLRs (Toll-like receptor). Les voies de signalisation déclenchées suite à l'engagement de ces récepteurs induisent l'activation

des facteurs de transcription NF- κ B (Nuclear factor kappa B) et STAT (Signal transducer and activation of transcription)-1 ainsi que des voies de signalisation des MAPK (Mitogen activated protein kinase) et des IRFs (Interferon regulatory factor) (Held et al., 1999; Schroder et al., 2006). L'activation de ces différentes voies permet la production en grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 ou encore l'IL-23. L'amplification de la réponse inflammatoire déclenchée par les macrophages M1 passe également par la capacité de l'IFN- γ à inhiber l'effet de l'IL-10. Ainsi, l'IFN- γ inhibe le rétrocontrôle négatif déclenché par une activation excessive du TLR-2 et la production d'IL-10 via l'activation du facteur de transcription AP-1 (Activator protein-1) (Hu et al., 2007). De plus, l'expression des Fc γ R et des CR confère aux macrophages M1 une forte activité de phagocytose des pathogènes opsonisés.

Les macrophages M1 sont également d'importants producteurs de chimiokines permettant le recrutement des lymphocytes Th1, T CD8 cytotoxiques de type 1 et NK (Natural Killer) mais aussi d'autres macrophages inflammatoires. Les principales chimiokines produites sont essentiellement de type CC (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL19, CCL20) mais aussi la production de CXCL10 et CXCL13 est également augmentée par l'IFN- γ (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2006).

Ils produisent également des lipides bioactifs tels que les prostaglandines (PG), notamment la PGE₂, et les leucotriènes, principalement le leucotriène B4 (LTB₄). Les eicosanoïdes produits par les macrophages M1 permettent, entre autres, de déclencher la libération de cytokines (Aoki and Narumiya, 2012). Par exemple, la PGE₂ induit, *via* son récepteur EP4 et avec le LPS, l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β mais aussi l'expression de l'enzyme responsable de la synthèse des prostaglandines COX-2 (Cyclooxygénase 2) (Hinz et al., 2000).

Cependant, elle est également connue pour avoir des effets opposés selon le stimulus et le récepteur engagé (EP1 ou EP4). Ainsi, elle peut induire la production d'IL-10 et de ce fait avoir des propriétés immunomodulatrices (Akaogi et al., 2004; Hata and Breyer, 2004; Nataraj et al., 2001; Takayama et al., 2002). Le LTB₄, un autre lipide bioactif important dans la réponse inflammatoire et jouant un rôle chimiotactique essentiel, est impliqué dans le recrutement des monocytes et des neutrophiles sur le site inflammatoire (Hoover et al., 1984; Lewis et al., 1981). Cet eicosanoïde entraîne également la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages et d'IL-2 ou encore d'INF- γ par les lymphocytes (Amaral et al., 2012; Rola-Pleszczynski and Lemaire, 1985; Rola-Pleszczynski et al., 1986). Il a également été montré que le LTB₄ favorise la phagocytose de pathogènes par les neutrophiles et les macrophages (Mancuso et al., 2001; Okamoto et al., 2010).

En outre, les macrophages M1 sont capables de déclencher un puissant mécanisme microbicide en induisant l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) et de sous-unités de la NADPH oxydase. L'induction de ces enzymes, suite à la reconnaissance d'agonistes reconnus par les récepteurs exprimés par les macrophages M1, a pour conséquence une forte production d'intermédiaires réactif de l'oxygène (ROS) par la NADPH et d'espèces nitrosylées produites par l'enzyme iNOS (MacMicking et al., 1997; Vignais, 2002). Cette forte activité microbicide des macrophages M1 est associée à une capacité importante de présentation de l'antigène par les molécules de CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) I et II dont l'expression est augmentée par l'INF- γ .

b) Récepteurs exprimés à la surface des macrophages M1

Les fonctions effectrices des macrophages sont déclenchées suite à la reconnaissance d'éléments pathogènes par l'intermédiaire de nombreux récepteurs. Ces récepteurs peuvent interagir soit avec des molécules sécrétées par le système immunitaire qui se fixent sur les pathogènes (opsonisation des pathogènes), comme les molécules du complément et les fragments d'immunoglobulines (Ig), ou avec des structures microbiennes conservées telles que des constituants de la paroi ou les acides nucléiques (Plüddemann et al., 2011). Une qualité optimale de l'interaction récepteurs-pathogènes est indispensable pour le déclenchement des fonctions effectrices adaptées des macrophages. La coordination des réponses immunes innée et adaptative dépend également de cette étape initiale et est nécessaire à la clairance du pathogène tout en limitant les effets cytotoxiques de la réponse inflammatoire et les dommages tissulaires associés.

Les macrophages M1 expriment à leur surface trois familles de récepteurs: les TLRs qui reconnaissent des PAMPs exprimés à la surface des pathogènes, les récepteurs au complément (CR) et les récepteurs aux fragments constants des IgG (FcγR, Fc gamma receptor), ces deux derniers reconnaissant les pathogènes opsonisés (Figure 14).

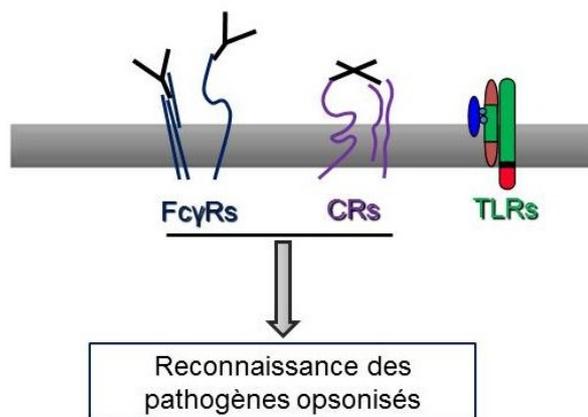


Figure 15: Les différents récepteurs exprimés par les macrophages M1

i. Les récepteurs Toll-like

La réponse immunitaire innée se base sur la reconnaissance de motifs conservés exprimés spécifiquement à la paroi des pathogènes, appelés PAMPs (Pathogen associated molecular pattern). Parmi les motifs les plus conservés et reconnus par les macrophages, on distinguera les composants de la paroi fongique (β -glucanes, résidus mannoses et fucoses) ou encore le LPS (lipopolysaccharide), composant des membranes des bactéries gram-négatives (Barton, 2008; Medzhitov et al., 1997; Nathan, 2002). Les PAMPs sont reconnus par les phagocytes *via* un ensemble de récepteurs nommés PRR (Pattern recognition receptors). Les PRR comprennent plusieurs familles de récepteurs, notamment les TLRs, les récepteurs lectine de type C (CLRs, C-type lectin receptors) et les récepteurs scavengers (SR, Scavenger receptors). Ceux-ci peuvent être exprimés au niveau de la membrane plasmique des cellules ou des membranes des compartiments intracellulaires et dans le cytoplasme. Leur localisation dictera en partie leur spécificité de reconnaissance et leur fonction. Les PRR sont exprimés de manière différentielle par les différents sous-types de macrophages. Les récepteurs Toll-like (TLRs) sont fortement exprimés par les macrophages M1 tandis que les récepteurs CLRs et Scavenger caractérisent les macrophages de phénotype M2.

Les TLRs constituent une famille de PRR regroupant plus de 12 protéines différentes (Medzhitov et al., 1997) qui vont reconnaître des PAMPs divers et variés (Figure 15). Par exemple, le TLR-4 reconnaît le LPS, le TLR-2 les lipopeptides, les lipoarabinomannanes les lipomannanes, l'acide téichoïque et les glycoprotéines. Les TLRs intracellulaires TLR-3 et TLR-7/8 reconnaissent respectivement les ARNs doubles brins et ARNs simples brins.

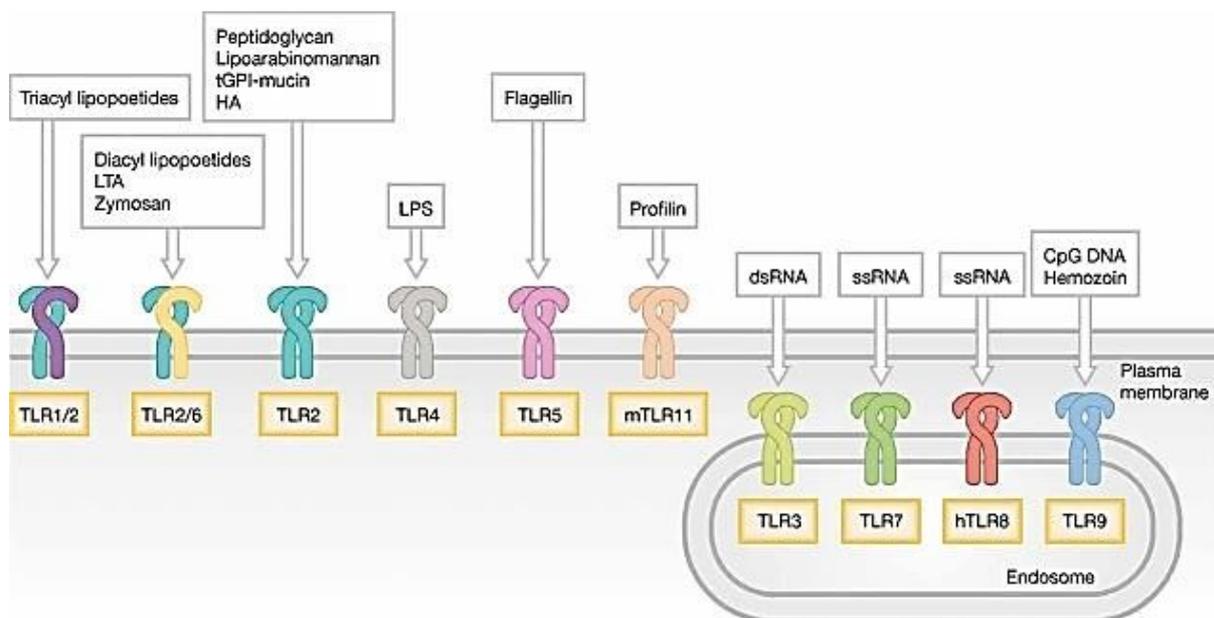


Figure 16: Les différents récepteurs Toll-like (Medzhitov, 2001)

Après leur engagement, les TLRs initient des voies de signalisation grâce à leur domaine intracellulaire TIR (Toll/II-1 receptor) qui leur permet de recruter des protéines adaptatrices. A l'exception du TLR-3, tous les TLRs déclenchent la voie de signalisation dépendante de la protéine adaptatrice Myd88 (Myeloid differentiation factor 88). Le recrutement de Myd88 permet à son tour le recrutement et l'activation de kinases avec notamment les protéines IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) -1 ou 4 aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Krishnan et al., 2007).

Un phénomène de tolérance contrôle la réponse des TLRs à leurs ligands, évitant ainsi une réponse excessive. Ainsi, la stimulation des TLRs avec un ligand donné induit la production de la cytokine inflammatoire TNF α , mais une nouvelle stimulation par le même ligand induit alors une baisse de cette production. Ce phénomène est appelé l'homotolérance. La stimulation d'autres TLRs avec un ligand de nature différente du premier entraîne également la diminution de la production de TNF α , ce mécanisme étant appelé hétérotolérance des TLRs (Dobrovolskaia et al., 2003) (Figure 16).

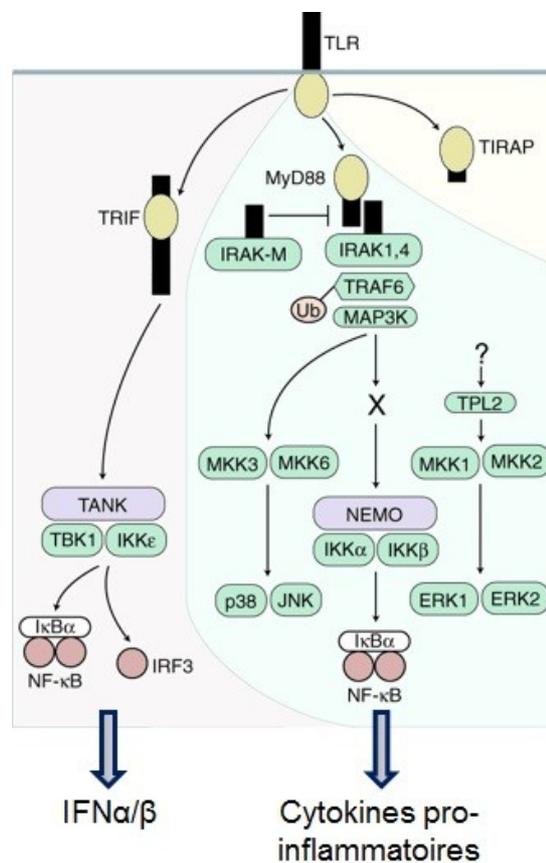


Figure 17: Voies de signalisation activées par les récepteurs Toll-like (tiré de Barton et Medzhitov, 2003)

ii. Les récepteurs reconnaissant les pathogènes opsonisés

Les macrophages peuvent reconnaître de manière non spécifique des pathogènes recouverts de molécules produites par d'autres cellules du système immunitaire que sont les immunoglobulines (Ig) et/ou les facteurs du complément. Ce mécanisme, appelé opsonisation des pathogènes, peut être spécifique ou non spécifique et permet de diversifier et d'augmenter le répertoire de reconnaissance des pathogènes. L'opsonisation est particulièrement importante dans le cas où les pathogènes ne présentent pas de motifs conservés accessibles pour être reconnus par les récepteurs des macrophages (Stuart and Ezekowitz, 2005).

- Les récepteurs aux fragments constants des IgG

Les récepteurs aux fragments constants des IgG (FcγR) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et permettent la reconnaissance de pathogènes recouverts d'IgG. Ils sont au nombre de trois récepteurs différents : FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16)(Gerber and Mosser, 2001) (Figure 18).

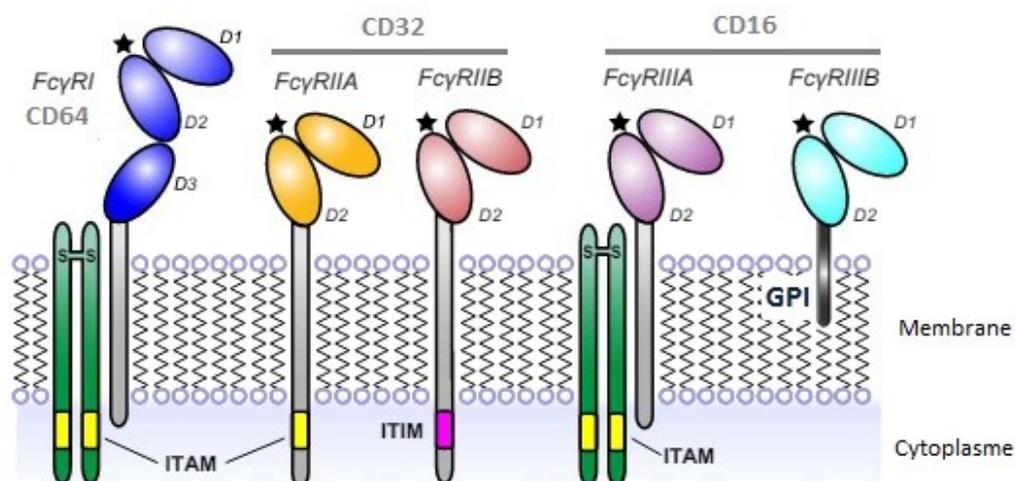


Figure 18: Les récepteurs humains aux IgG (Caaveiro et al., 2015)

Ces récepteurs transmembranaires ont en commun 2 ou 3 domaines extracellulaires immunoglobulin-like qui reconnaissent la partie constante (Fc) des IgG. Ils présentent au niveau de leur extrémité intra-cytoplasmique des domaines de type ITAM/ITIM (Immuno-receptor tyrosine-based activation/inhibition motif) permettant le recrutement de kinases ou de phosphatases. Ces différentes enzymes activent ou inhibent les cascades de phosphorylations nécessaires à l'induction de la phagocytose et à la transduction d'un signal afin de moduler la réponse immunitaire.

Une fois activés, les récepteurs possédant un motif ITAM permettent le recrutement de la protéine tyrosine kinase Syk (Spleen tyrosine kinase) qui à son tour va activer des substrats tels que la PI3K (Phosphoinositide-3-kinase), Erk (Extracellular signal-regulated kinase), etc... (Ravetch and Bolland, 2001). Les récepteurs possédant un motif ITIM (FcγRIIB1/B2) vont recruter la phosphatase SHIP (SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase) qui va inactiver les messagers libérés suite à l'activation d'autres FcγR couplés à un motif ITAM, évitant ainsi la libération de Ca²⁺ (Ravetch and Bolland, 2001). Les voies de signalisation déclenchées par les FcγR permettent d'activer les fonctions cellulaires telles que l'endocytose, la phagocytose, le phénomène de cytotoxicité ADCC (Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity)

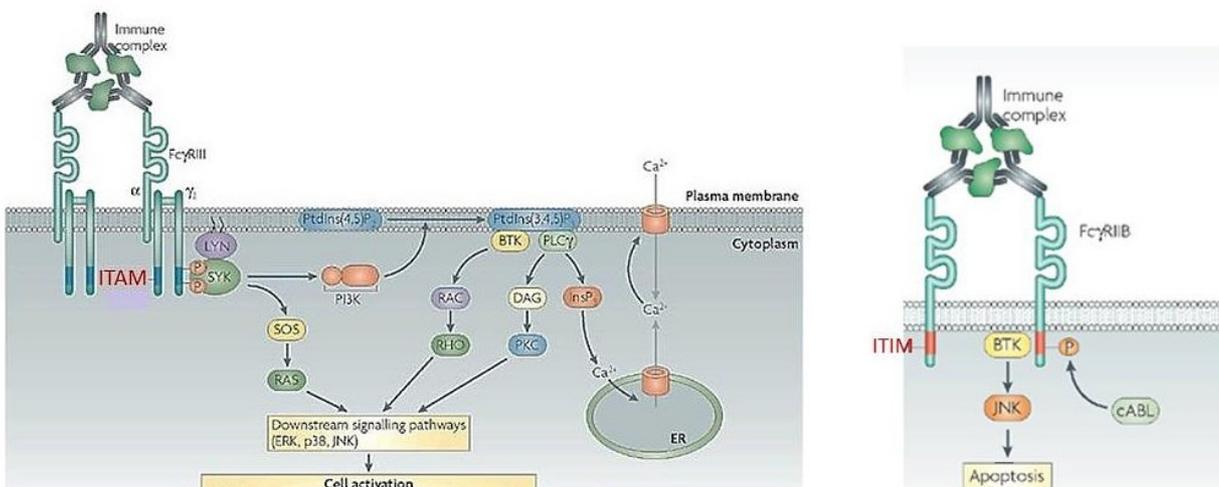


Figure 19: Exemples d'activation des récepteurs humains aux IgG (Nimmerjahn and Ravetch, 2008)

ainsi que la production de médiateurs pro-inflammatoires (Gerber and Mosser, 2001) (Figure 19).

- Les récepteurs au complément

Les récepteurs au complément (CRs) sont subdivisés en trois sous-types de récepteurs. Le premier groupe comporte les récepteurs CR1 et CR2 qui sont composés, dans leur domaine extracellulaire, d'unités répétées consensus appelées SCR (Short consensus repeat). Les récepteurs CR3 et CR4 appartiennent eux à la famille des intégrines β_2 et le troisième type de CR, CR1g fait partie de la superfamille des immunoglobulines (van Lookeren Campagne et al., 2007) (Figure 20).

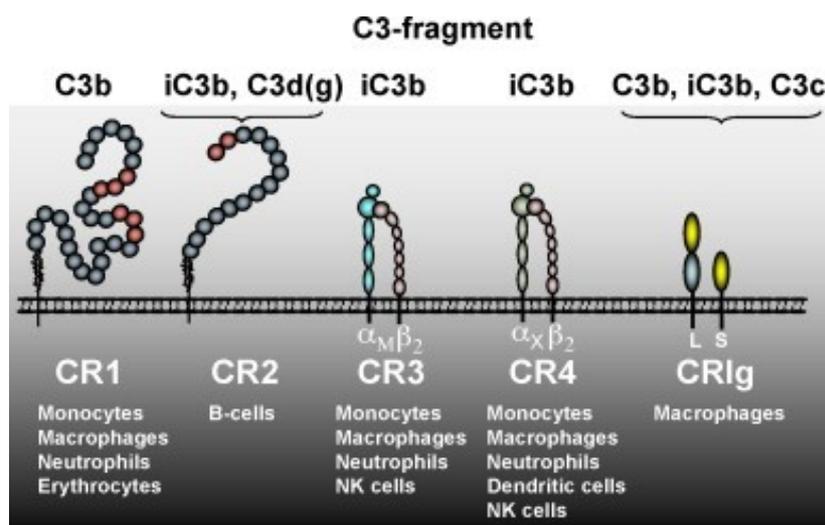


Figure 20: Les différents récepteurs au complément (tiré de He, 2008)

Le récepteur CR1 (CD35) est une glycoprotéine composée de 30 SCR, un segment transmembranaire et d'une petite partie intra-cytoplasmique. Il reconnaît les molécules du complément C3b et C4b sans induire leur internalisation (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001). Il joue un rôle majeur dans la clairance des complexes immuns

présents dans la circulation sanguine, évitant ainsi que leur dépôt ne devienne pathologique.

Le récepteurs CR2 (CD21) reconnaît les fractions du complément iC3b et C3dg et est le récepteur principal favorisant la prolifération des lymphocytes B(Matsumoto et al., 1991; Weis et al., 1984). Chez la souris, les CR1 et CR2 sont produits à partir de l'épissage alternatif du même gène.

Les récepteurs CR3 et CR4 sont des récepteurs hétérodimériques de surface appelés CD11b/CD18 et CD11c/ CD18 respectivement, appartenant à la famille des intégrines (Arnaout, 1990; Newton et al., 1997). Ils sont majoritairement exprimés à la surface des neutrophiles, des monocytes, des macrophages et des cellules NK (Ross, 2000). Ils sont tous deux impliqués dans les phénomènes d'adhésion à la matrice extracellulaire, de phagocytose mais également dans la migration des leucocytes en réponse à une inflammation (Ross, 2000). La chaîne C11b du récepteur CR3 présente à son extrémité N-terminale un domaine I commun à la famille des intégrines qui interagit avec la molécule C3b du complément (Balsam et al., 1998; Zhang and Plow, 1996). CR3 possède également en C-terminal un domaine lectin-like de reconnaissance des polysaccharides, qui lui permet de reconnaître les β -glucanes exprimés à la paroi de pathogènes comme *Candida albicans* (O'Brien et al., 2012; Xia et al., 1999). Ce récepteur est positivement régulé par les cytokines et le PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) (Ross, 2000) et active des voies de signalisation pro- inflammatoires (Xia et al., 1999).

Le récepteur IgCR a récemment été identifié comme appartenant à la superfamille des immunoglobulins (Helmy et al., 2006; Langnaese et al., 2000). Son expression est restreinte à certains macrophages résidents (cellules de Kupffer, macrophages

interstitiels cardiaques, macrophages présents dans la synovie des articulations et les cellules spumeuses contenues dans les plaques d'athérome) et participe à l'homéostasie en internalisant des agents potentiellement pathogéniques.

c) *Facteurs de transcription impliqués dans la polarisation M1 des macrophages*

La reconnaissance par les macrophages d'un élément étranger ou d'un tissu lésé engendre chez ces derniers des signaux qui vont activer un programme de différenciation sous le contrôle de complexes transcriptionnels. Ceux-ci vont être à l'origine de l'expression de différents panels de gènes et ainsi orienter le phénotype et les fonctions des macrophages, induisant des changements marqués dans leur activité.

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux signaux intrinsèques de différenciation des macrophages M1 et plus particulièrement aux facteurs de transcription spécifiques de cette polarisation STAT-1, IRF5. Nous aborderons également le facteur de transcription NF- κ B qui est commun aux polarisations M1 et M2 et intervient dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation.

i. STAT-1

STAT-1 appartient à une famille de protéines transductrices des signaux et activatrices de la transcription, constituée de 7 membres chez les mammifères.

Les protéines STAT sont majoritairement activées par des facteurs de croissance comme l'hormone de croissance (Han et al., 1996), l'EGF (Epidermal growth factor) (Leaman et al., 1996) ou encore le PDGF (Platelet derived growth factor)(Vignais et

al., 1996), et des cytokines comme l'IL-6 et les interférons. La voie Jak (Janus associated kinase)/STAT-1 est impliquée dans la majorité des effets pléiotropiques de l'IFN- γ (Darnell et al., 1994).

L'IFN- γ exerce ses effets sur les cellules en interagissant avec son récepteur spécifique constitué de deux sous-unités, IFNGR1 et IFNGR2, exprimé de façon quasi-ubiquitaire. Cette interaction entraîne l'oligomérisation des deux kinases Jak1 et Jak2 puis leur activation par transphosphorylation. Une fois activées, elles phosphorylent le domaine intracellulaire du récepteur à l'IFN- γ sur des résidus Tyrosine, ce qui permet le recrutement de STAT-1 *via* son domaine SH2 (Src-homology-2 domain). S'ensuit la phosphorylation du facteur de transcription STAT-1 sur un résidu tyrosine, son homodimérisation qui dépend également de son domaine SH2, puis sa translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, l'homodimère STAT-1-STAT-1 se lie à l'élément de réponse à l'IFN- γ GAS (Gamma-activated sequence) au niveau du promoteur de ses gènes cibles et régule ainsi leur transcription (Darnell et al., 1994) (Figure 20). En plus de l'IFN- γ , les récepteurs à l'IL-6, à la cytokine LIF (Leukemia inhibitory factor), à l'oncostatine M, à l'IL-10, à la prolactine, etc... ont également été décrits pour activer STAT-1 (Campbell et al., 1995; David et al., 1994; Vignais et al., 1996).

La voie Jak/STAT-1 intervient, de façon dépendante de l'IFN- γ , dans la protection aux infections virales et microbiennes mais également dans la surveillance immune des tumeurs. En effet, des études réalisées en 1996 mettent en évidence que la délétion de STAT-1 chez des souris n'affecte pas leur développement mais les rend extrêmement susceptibles à certaines infections virales, (VSV, vesicular stomatitis virus) et microbiennes (*Listeria monocytogenes*), du fait qu'elles ne répondent plus aux l'IFN- α et γ (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). De même, des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- γ ou pour STAT-1 présentent une augmentation du

développement spontané de tumeurs après une exposition à des carcinogènes
(Kaplan et al., 1998).

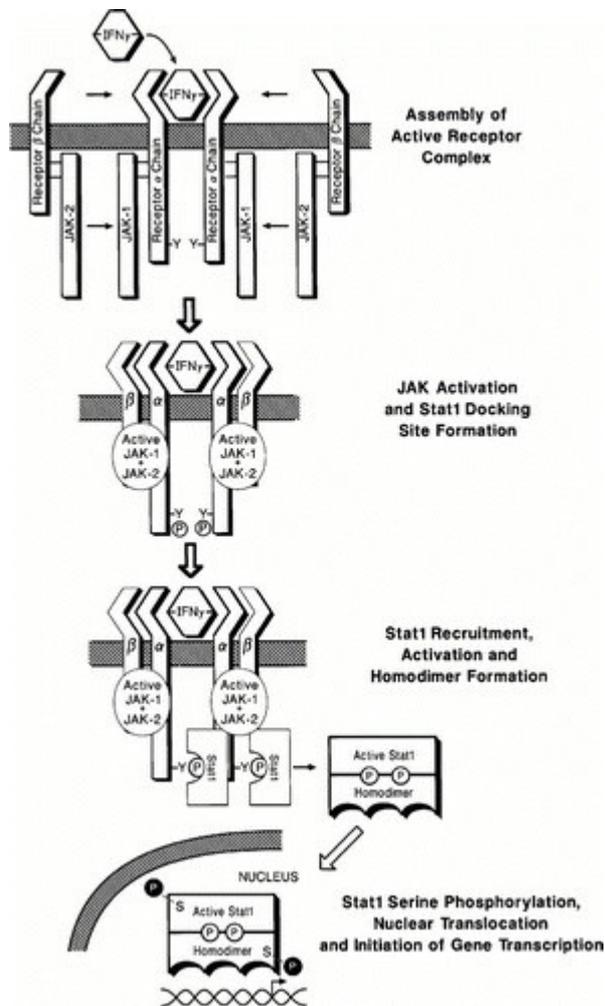


Figure 21: Activation du facteur de transcription STAT-1 (Bach et al., 1997)

ii. IRF5

Les IRFs (Interferon Regulatory Factor) ont d'abord été identifiés comme des régulateurs transcriptionnels des IFNs de type I. Actuellement, ils sont également connus pour jouer un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires innée et adaptative ainsi que dans la croissance cellulaire.

Ils constituent une famille de facteurs de transcription possédant un nouveau motif commun de liaison à l'ADN en position N-terminal, appelé DBD (DNA binding domain)

et structuré en helix-turn-helix (Taniguchi et al., 2001). Ce DBD reconnaît une séquence d'ADN qui correspond à l'élément de réponse à l'IFN- γ (Darnell et al., 1994). La région C-terminale d'IRF5 possède un domaine d'association responsable de la formation d'homodimères et d'hétérodimères avec d'autres IRFs mais aussi d'autres facteurs de transcription comme STAT-1.

IRF5 est activé par la voie de signalisation déclenchée par les TLRs *via* les protéines adaptatrices MyD44 et TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) (Takaoka et al., 2005). IRF5 ainsi activé transloque dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles (Figure 22). Il agit notamment sur des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-12p40, le TNF α et l'IL-23 caractéristiques de la polarisation M1 des macrophages, probablement en coopération avec NF- κ B et d'autres facteurs de transcription. Associé à cela, IRF5 réprime également la polarisation M2 des macrophages en inhibant la production d'IL-10 (Takaoka et al., 2005).

En plus de son implication dans la polarisation des macrophages, en modulant l'expression des gènes pro- et anti-inflammatoires, IRF5 agit également sur la prolifération et l'activation des lymphocytes Th1 et Th17 (Krausgruber et al., 2011).

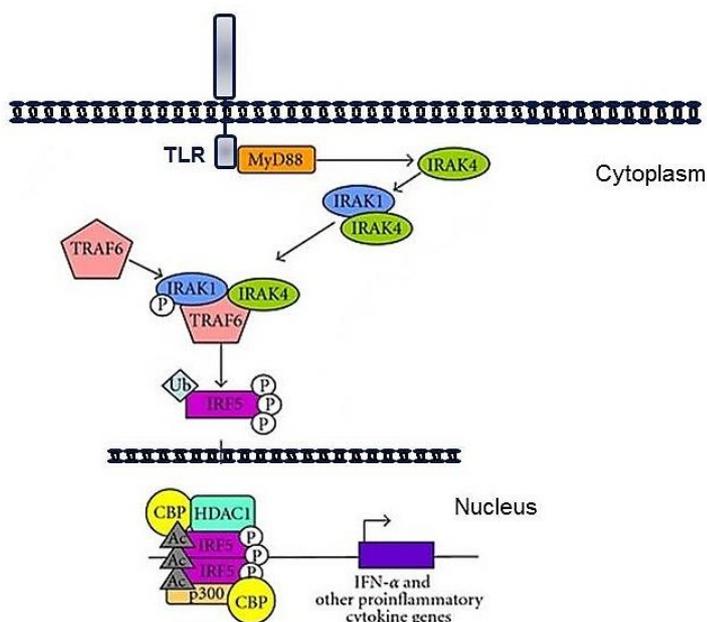


Figure 22: Activation du facteur de transcription IRF5 (Cham et al., 2012)

iii. NF-κB

Le facteur de transcription NF-κB intervient dans la réponse immunitaire en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Chez les mammifères, la famille NF-κB est constituée de cinq membres: NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), RelA (p65), RelB et c-Rel (Figure 23). Chaque membre possède une région N-terminale conservée, appelée le Rel homology domain (RHD) qui contient une séquence de localisation nucléaire (Nuclear localization sequence, NLS). Ce domaine RHD est aussi impliqué dans la dimérisation, la liaison spécifique de NF-κB à l'ADN et l'interaction avec les protéines IκB (Inhibitor of κB) inhibitrices de NF-κB.

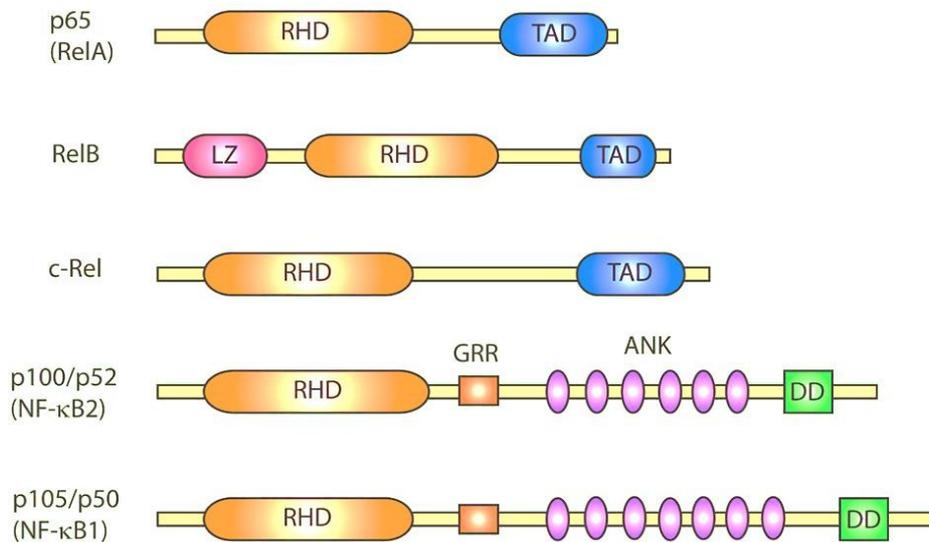


Figure 23: Les différents membres de la famille NF-κB (Oh and Ghosh, 2013)

L'activation de NF-κB est contrôlée par divers signaux extracellulaires. Ainsi, les cytokines et PAMP (Pathogen associated molecular pattern) stimulent des récepteurs exprimés à la surface des macrophages tels que les TLRs et initient une voie de signalisation conduisant à l'activation de NF-κB. Deux voies distinctes peuvent conduire à l'activation de ce facteur de transcription: la voie d'activation canonique et la voie alternative. Dans la voie canonique, NF-κB est séquestré dans le cytosol des cellules résidentes par les protéines IκB. La liaison à IκB empêche la translocation nucléaire du facteur de transcription et le rend donc inactif. L'activation des récepteurs par des PAMPs ou des cytokines déclenche une cascade de signalisation qui conduit à l'activation de la protéine IKK (Inhibitor of κB kinase) (Hayden et al., 2006) qui, une fois activée, phosphoryle IκB entraînant son ubiquitination et ainsi sa dégradation. Ceci permet la libération du complexe p50-RelA/p65 et sa translocation nucléaire pour aller activer la transcription de ses gènes cibles. La voie alternative d'activation est dépendante uniquement d'IKKα. Une fois activée, cette kinase phosphoryle NF-κB2,

sous forme de dimère avec RelB, au niveau de deux sites en C-terminal. Cette phosphorylation provoque la libération du domaine RHD de NF- κ B2, ce qui lui permet de transloquer dans le noyau avec RelB et d'activer la transcription de ses gènes cibles (Figure 24).

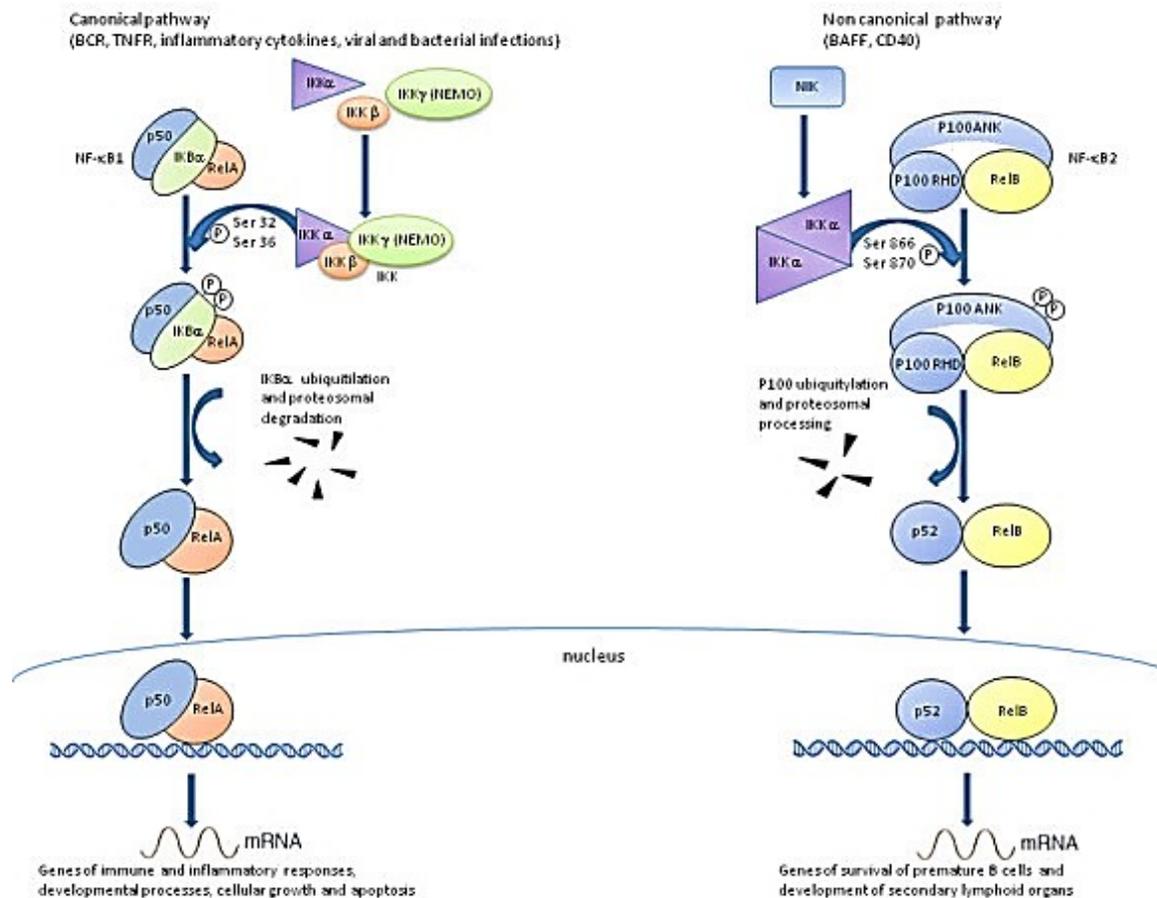


Figure 24: Voies d'activation canonique et non-canonique du facteur de transcription NF- κ B (Madonna et al., 2012)

Les gènes cibles de NF- κ B sont impliqués dans la prolifération cellulaire ainsi que la production de cytokines et de molécules microbicides activant la réponse immune (Hayden and Ghosh, 2008). Les cytokines produites par NF- κ B, telles que l'IL-6, l'IL-1, le TNF α stimulent le système immunitaire adaptatif en activant les lymphocytes T qui vont ensuite proliférer et sécréter plus de cytokines inflammatoires. Ceci permet la

polarisation des macrophages vers un phénotype M1, le recrutement d'autres lymphocytes et ainsi l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. NF- κ B est aussi impliqué dans la production de cytokines par les macrophages M2b et les lymphocytes T régulateurs (Liang et al., 2004). La différenciation NF- κ B- dépendante des macrophages vers un phénotype M1 ou M2 est un élément clé dans le développement des maladies métaboliques inflammatoires comme l'obésité et l'athérosclérose. Elle joue également un rôle important dans la clairance de certaines infections virales.

2. Les macrophages M2

a) *Caractéristiques phénotypiques*

La dénomination « macrophages M2 » a été proposée par Mills et ses collègues en 2000 (Mills et al., 2000) et ont initialement été décrits comme « extincteurs » de l'activation M1.

Cette population de macrophages M2 est très hétérogène en fonction des facteurs du microenvironnement les induisant et a été divisée en plusieurs sous-types sur la base des marqueurs phénotypiques et fonctionnels des macrophages M2 (Mantovani et al., 2004; Mosser and Edwards, 2008). Ces deux équipes proposent deux classifications différentes mais non contradictoires des macrophages M2. Mantovani et al, se basent sur le profil cytokinique des M2 et les classent ainsi en macrophages M2a, M2b et M2c (Mantovani et al., 2004). En parallèle, David M. Mosser propose de classer les macrophages M2 selon les fonctions développées par ces cellules afin de favoriser le retour à l'homéostasie (Mosser and Edwards, 2008). Ces deux nomenclatures permettent de mettre en valeur les fonctions immunitaires et homéostatiques des

macrophages. La classification des macrophages selon les signaux inducteurs conduit à distinguer quatre sous-types de macrophages: M2a, M2b, M2c et M2d.

Les macrophages M2 expriment des marqueurs communs et, par opposition aux macrophages M1, expriment fortement des récepteurs reconnaissant les agents pathogènes non opsonisés, notamment les récepteurs lectine de type C (CLRs) et les récepteurs « scavenger ». Cependant, les différents sous-types de macrophages M2 se différencient par leur fonction et leur capacité à produire des cytokines et chimiokines pro- et/ou anti-inflammatoires.

b) Les différents sous-types de macrophages M2

i. Macrophages M2a

Les macrophages M2a, correspondant à l'activation alternative des macrophages, sont produits en réponse à l'IL-4 et l'IL-13 qui peuvent être produites par les cellules de l'immunité innée (éosinophiles, basophiles, mastocytes, cellules NK) et les cellules immunitaires adaptatives (lymphocytes Th2 et T CD8⁺).

L'expression des récepteurs tels que les CLRs Dectine-1, récepteur mannose, DC-SIGN et le récepteur « scavenger » CD36 à la surface des macrophages M2a leur permet de déclencher une réponse immune efficace pour éliminer les agents pathogènes reconnus par ces récepteurs. Dans ce contexte, des études récentes menées au laboratoire ont montré que l'activation des macrophages par l'IL-13 conduisait à la surexpression des récepteurs Mannose (MR) et Dectine-1 et par conséquent à l'augmentation des fonctions microbicides qui leur sont associées. Dans

cet état d'activation, les macrophages ont une capacité accrue à éliminer la levure *Candida albicans* (Coste et al., 2003, 2008a; Galès et al., 2010a).

Ces macrophages sécrètent peu de cytokines pro-inflammatoires mais produisent des chimiokines caractéristiques comme CCL17, CCL22 et CCL24. Ces chimiokines sont des agonistes des récepteurs CCR3 et CCR4 qui participent au recrutement des polynucléaires éosinophiles et basophiles ainsi que des lymphocytes Th2, et confèrent aux macrophages M2a un rôle dans l'inflammation allergique (inflammation de type 2) et l'asthme (Mantovani et al., 2004).

ii. Macrophages M2b

Les macrophages M2b sont induits par les complexes immuns et les ligands des TLRs ou agonistes du récepteur à l'IL-1 (Mantovani et al., 2004) et ont une activité immunorégulatrice. A l'inverse des autres sous-types de macrophages M2, les macrophages M2b sont caractérisés par une forte sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 associée à une forte production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF α et l'IL-6 (Mantovani et al., 2004).

La production importante d'IL-10 et de la chimiokine CCL1 permet le recrutement de lymphocytes T CD4⁺ et T régulateurs, conférant ainsi aux macrophages M2b un rôle majeur dans l'immunorégulation. Ils sont également impliqués dans la protection contre la toxicité au LPS et interviennent dans des contextes pathologiques caractérisés par une inflammation excessive comme le lupus (Mantovani et al., 2004; Mosser, 2003; Mosser and Karp, 1999; Zhang et al., 2010).

iii. Macrophages M2c

Un environnement riche en glucocorticoïdes ou en IL-10 polarise les macrophages M2 vers un phénotype M2c dits « réparateurs ». En effet, ils produisent, comme les macrophages M2a, de faibles quantités de cytokines pro-inflammatoires mais sécrètent en revanche de grandes quantités d'IL-10 et de TGF β (Tumor growth factor β). Ainsi, ils sont retrouvés lors de la phase de résolution et réparation de l'inflammation (Mantovani et al., 2004).

Ces macrophages sont également caractérisés par la surexpression de l'arginase-1 qui conduit à la formation de L-ornithine et d'urée (Morris, 2004). La L-ornithine est un précurseur de polyamines et de L-proline qui sont respectivement impliquées dans les phénomènes de prolifération cellulaire et de synthèse du collagène. Ces mécanismes favorisent ainsi la réparation et le remodelage des tissus endommagés.

iv. Macrophages M2d

Des travaux récents ont mis en évidence un nouveau sous-type de macrophages, appelé M2d, induits par l'IL-6, LIF (Leukemia inhibitory factor) et le M-CSF. Ces macrophages M2d présentent un phénotype pro-tumoral ainsi que des propriétés immunosuppressives similaires à celles des macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Duluc et al., 2007).

Ils produisent du VEGF (vascular endothelial growth factor) et MMP9 (Matrix metallopeptidase 9) favorisant l'angiogenèse, la croissance tumorale et le processus métastatique. En parallèle, ils exercent également une activité immunosuppressives de par l'expression de facteurs tels que l'IL-10, le TGF β ou encore l'IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase).

c) *Récepteurs exprimés à la surface des macrophages M2*

Malgré la diversité des macrophages M2, ceux-ci sont caractérisés par l'expression de certains marqueurs communs avec notamment l'expression de CLR et récepteurs scavengers (Figure 25).

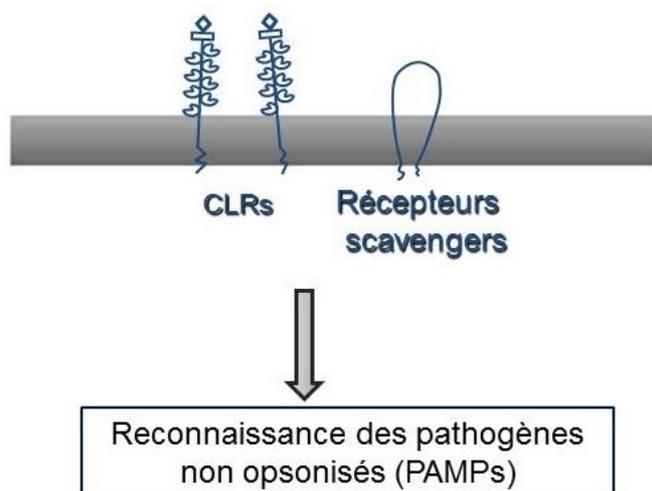


Figure 25: Les différents récepteurs communs aux macrophages M2

i. Les récepteurs scavenger

Le terme de « récepteurs scavenger » englobe une superfamille de récepteurs de surface exprimés par plusieurs types cellulaires comme les phagocytes mononucléés, les plaquettes, les cellules épithéliales ou encore certaines cellules endothéliales. Ces récepteurs, qui appartiennent à la famille des protéines transmembranaires de type II, sont classés en 10 familles allant des récepteurs scavenger de classe A à la classe J en fonction de leurs propriétés structurales (Figure 26). Ils sont multifonctionnels et reconnaissent une multitude de ligands (Zani et al., 2015) comme par exemple des composés anioniques, des LDL oxydés mais aussi certains agents pathogènes.

Contrairement aux CLR, les récepteurs scavenger éliminent les composés qu'ils ont reconnus puis phagocytés.

Nous nous focaliserons plus particulièrement sur les récepteurs scavenger de classe A et B, qui sont principalement exprimés par les monocytes et macrophages (Kzhyshkowska et al., 2012).

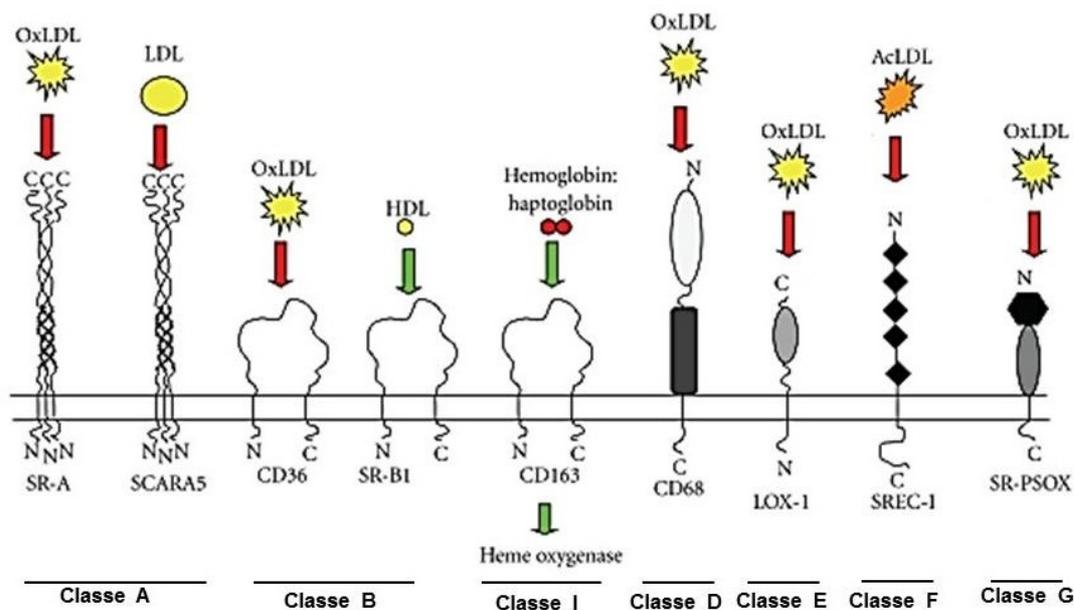


Figure 26: Principaux récepteurs scavenger humain (Stephen et al., 2010)

- Récepteurs scavenger de classe A

Parmi les récepteurs scavenger de classe A, on retrouve le SRA qui existent sous trois isoformes différentes, générées par l'épissage alternatif du même gène ; SRA-I, SRA-II et SRA-III(Emi et al., 1993). Parmi ces trois isoformes, le récepteur SRA-I est exprimé à la surface des macrophages mais aussi sur les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Zani et al., 2015). Les récepteurs SRA sont impliqués dans la reconnaissance et la capture des lipoprotéines oxydées et acétylées mais aussi l'acide lipotéichoïque (LTA) présent sur la paroi de bactéries Gram-positives

comme *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus* ainsi que d'agents pathogènes fongiques comme *Mycobacterium tuberculosis*. Ceci souligne l'implication de ces récepteurs dans la réponse immunitaire innée (Gough and Gordon, 2000; Zimmerli et al., 1996).

Le récepteur MARCO (Macrophage receptor with collagenous structure) est un autre récepteur scavenger de classe A, dont l'expression est restreinte à une sous-population de macrophages (Gough and Gordon, 2000). Il semble intervenir dans la défense antimicrobienne en reconnaissant des bactéries Gram-positives et négatives, notamment en *via* la reconnaissance du LPS exprimé à la surface de ces dernières, et comme les SRA, en phagocytant des bactéries pathogènes telles que *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseria meningitidis* mais aussi des parasites comme *Leishmania major* (Arredouani et al., 2004; Gomes et al., 2009; Mukhopadhyay et al., 2006).

- Récepteurs scavenger de classe B

Parmi les récepteurs scavenger de classe B, le récepteur CD36 (ou SR-B2) est exprimé par les macrophages et est impliqué dans la réponse aux agents pathogènes comme *Plasmodium falciparum*, en reconnaissant une protéine parasitaire exprimée par les érythrocytes infectés (Olagnier et al., 2011). Il participe également à l'homéostasie des lipoprotéines et à la clairance des cellules apoptotiques en reconnaissant les phospholipides oxydés, les acides gras et les cellules apoptotiques (Endemann et al., 1993; Podrez et al., 2002; Silverstein et al., 2010).

SRB1, un autre récepteur de classe B, est exprimé par les tissus stéroïdogènes tels que les glandes surrénales, les ovaires, mais aussi les hépatocytes, les cellules endothéliales et les macrophages (Ashraf and Gupta, 2011; Ji et al., 2011; Krieger,

1999). Comme le CD36, il reconnaît une diversité de ligands tels que les lipoprotéines oxydées ou non, les phospholipides anioniques et les produits avancés de la glycosylation. Ceci lui confère un rôle important dans la régulation des lipoprotéines, la sécrétion biliaire du cholestérol et dans la captation des HDL (High Density Lipoproteins). En effet, il a été montré que l'expression de SRB1 au niveau des macrophages protège de l'athérosclérose en stimulant l'efflux de cholestérol empêchant ainsi la formation des cellules spumeuses (Zhang et al., 2003). Il intervient également dans la reconnaissance d'agents pathogènes tels que le virus de l'hépatite C et les mycobactéries (Valacchi et al., 2011).

ii. Les récepteurs lectine de type C

Les récepteurs lectine de type C (CLRs) appartiennent à la famille des PRR et sont importants dans la reconnaissance de certains motifs conservés à la surface des agents pathogènes et reconnus par les macrophages (PAMPs). Ils reconnaissent notamment les β -glucanes ainsi que les résidus mannosylés et fucosylés constituant la paroi des champignons (Barton, 2008; Medzhitov et al., 1997; Nathan, 2002). Les CLRs constituent une superfamille de récepteurs possédant un ou plusieurs domaines lectine de type C appelés CTLDs (Figure 27). Le panel de ligands reconnus par ces récepteurs, ainsi que les voies de signalisation déclenchées en aval de la liaison ligand-récepteur (suite ou non à leur phagocytose) leur permettent d'exercer un rôle majeur dans la réponse immune innée des macrophages. Selon leur expression et leur structure, ces récepteurs sont subdivisés en plusieurs groupes (Sancho and Reis e Sousa, 2012). Bien qu'initialement décrits pour leur activité dépendante du calcium, de nombreux CLRs ne nécessitent pas de calcium pour fonctionner.

Chez les macrophages humains, les récepteurs mannose (MR), Dectine-1, Mincle (Macrophage-inducible C-type lectin), MGL (Macrophage galactose lectin) et DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin) sont considérés comme des récepteurs caractéristiques de la polarisation M2 des macrophages. MR, Dectine-1 et DC-SIGN sont également connus pour être des récepteurs clés dans la réponse immunitaire antifongique. De ce fait, seuls ces trois récepteurs seront décrits dans ce manuscrit.

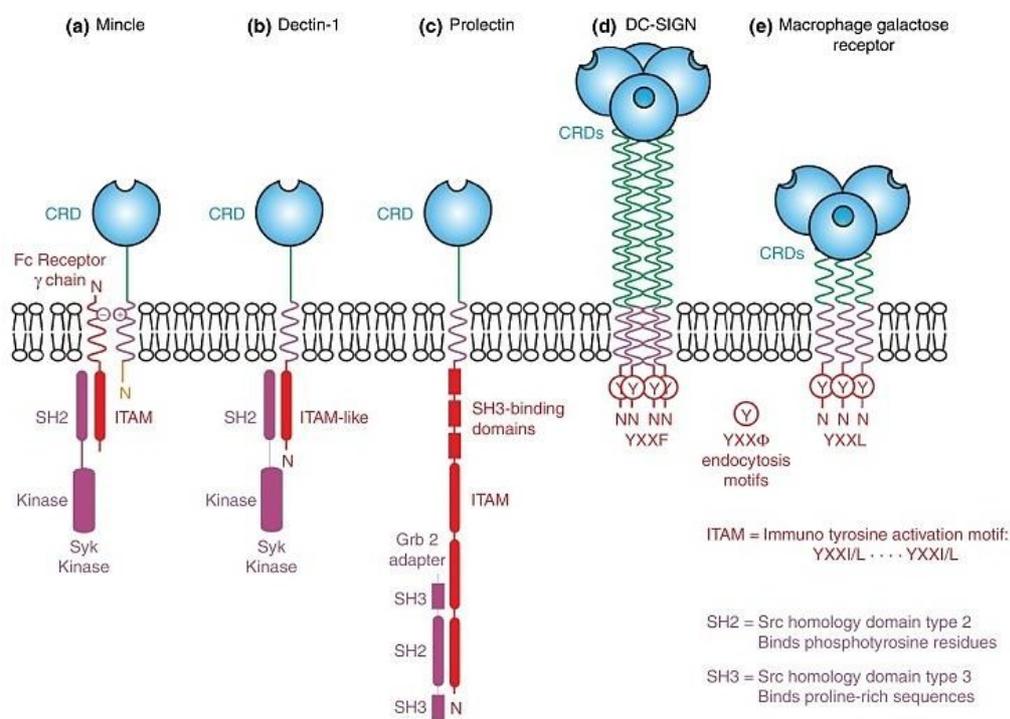


Figure 27: Exemple de récepteurs lectine de type C (Drickamer and Taylor, 2015)

- Récepteur mannose

Le récepteur mannose (MR) est un récepteur transmembranaire de type I, appartenant au groupe VI des CLR. Il est exprimé à la surface des cellules myéloïdes telles que les macrophages, et possède huit domaines CTLDs. Ces CTLDs permettent au MR de reconnaître les résidus mannose, fucoses ou N-acétylglucosamines terminaux

présents sur la paroi d'agents pathogènes comme *C. albicans*, *Leishmania donovani* ou encore *Pneumocystis carinii* (Ezekowitz et al., 1990; Galès et al., 2010; Lefèvre et al., 2015; Schulert and Allen, 2006; Taylor et al., 2005), et sont nécessaire à l'activité de ce récepteur. Le MR est impliqué dans la reconnaissance et les phagocytoses de nombreux agents pathogènes et agit en coopérations avec d'autres PRR comme Dectine-1 (Ezekowitz and Stahl, 1988; Yamamoto et al., 1997). Il intervient également dans le déclenchement des fonctions effectrices des macrophages, notamment dans la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène (Coste et al., 2003; Lefèvre et al., 2015; Yamamoto et al., 1997). En plus de son rôle dans l'induction des fonctions microbicides des macrophages, ce récepteur participe à la présentation antigénique par le CMH-I et augmente de l'ordre de 200 à 1000 fois la concentration d'antigène mannosylées présentés par les molécules du CMH-II (Burgdorf et al., 2006; Sallusto et al., 1995; Tan et al., 1997).

- Dectine-1

Ce récepteur est une protéine transmembranaire glycosylée de type II appartenant au groupe V des CLR et est exprimé à la surface des monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et une sous-population de lymphocytes $T\gamma\delta$. Il possède un seul domaine CTLD et reconnaît les β -glucanes (β , 1,3 et β 1,6 –glucanes) exprimés notamment à la paroi des levures *C. albicans*. Il possède dans sa partie intracellulaire un motif hem-ITAM (Tyrosine-based activation motif; YxxL) qui induit une voie de signalisation impliquant les protéines Syk et CARD9 (Caspase recruitment domain-containing protein 9) (Brown, 2006; Gross et al., 2006)(Figure 28). Outre son activité inductrice de la voie NF- κ B, le récepteur Dectine-1 a plus particulièrement été

mis en évidence pour coopérer indirectement avec d'autres PRR comme certains TLRs et le récepteur mannose (Galès et al., 2010a) mais aussi avec l'inflammasome Nlrp3 (Nod-like receptor pyrin containing 3) (Cheng et al., 2011; Hise et al., 2009). En effet, l'engagement de Dectine-1 conduit à l'activation de la caspase-1 et ainsi à la sécrétion spécifique des cytokines pro-inflammatoires de la famille de l'IL-1 (IL-1 β , IL-18 et IL-1 α). Il est également responsable de la production d'autres cytokines telles que le TNF- α en réponse au zymosan par exemple, qui semble dépendre d'une collaboration étroite entre Dectine-1 et certains TLRs comme le TLR2 (Willment and Brown, 2008). De plus, la synergie entre les récepteurs Dectine-1 et MR dans la reconnaissance et la phagocytose de *C. albicans* ainsi que son élimination à travers la production des cytokines IL-1 β et TNF- α par des monocytes humains et des macrophages murins a été récemment mise en évidence (Galès et al., 2010a; Heinsbroek et al., 2008; Lefèvre et al., 2015; Netea et al., 2006).

Ce récepteur intervient aussi dans la mise en place d'autres fonctions microbicides, notamment la phagocytose d'agents pathogènes et la production de ROS (Galès et al., 2010a; Herre et al., 2004; Lefèvre et al., 2015).

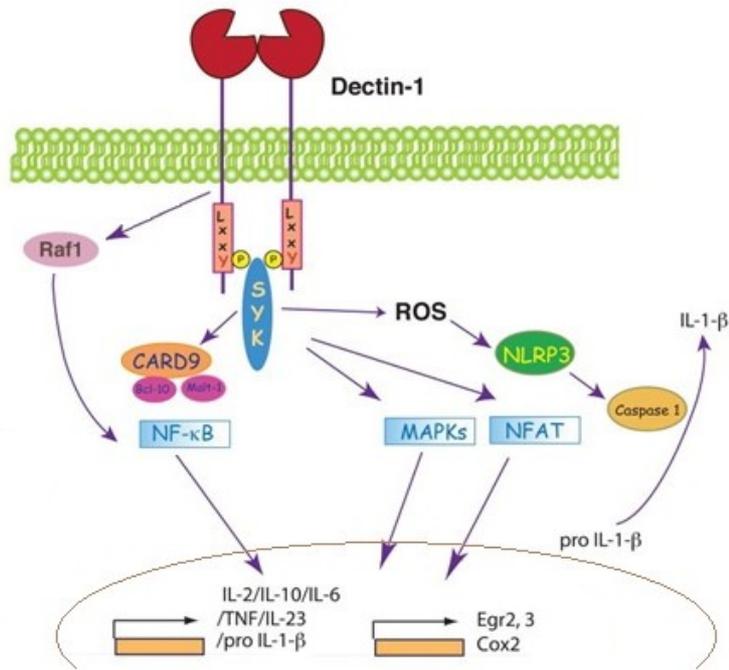


Figure 28: Voies de signalisation activées par Dectine-1 (Sancho and Reis e Sousa, 2012)

- DC-SIGN

DC-SIGN partage des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes avec les récepteurs MR et Dectine-1. En effet, il possède un seul CTLD et appartient à la famille des protéines transmembranaire de type II comme Dectine-1. Comme le MR, il reconnaît des motifs fucosylés ou des résidus mannoses branchés ou terminaux. D'un point de vue fonctionnel, il participe à la phagocytose de nombreux agents pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Schistosoma mansoni*, *Aspergillus fumigatus* ou encore *C. albicans* (Appelmelk et al., 2003; Cambi et al., 2008; van Die et al., 2003; Geijtenbeek and van Kooyk, 2003; Lefèvre et al., 2015; Serrano-Gómez et al., 2004; Tailleux et al., 2003). Ce récepteur, exprimé principalement par les cellules dendritiques et les macrophages humains, possède également des propriétés anti-inflammatoires en induisant notamment la production d'IL-10 et à

l'inverse en inhibant certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-12 (Sancho and Reis e Sousa, 2012). L'homologue murin le plus proche de ce récepteur est le récepteur SIGNR3 (Specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin homolog-related 3) de par sa spécificité de ligand. Une fois activés, ces deux récepteurs déclenchent une voie de signalisation, via un domaine hem-ITAM intracytoplasmique permettant le recrutement de la tyrosine kinase Syk, qui active notamment la voie NF- κ B.

d) Facteurs de transcription impliqués dans la polarisation M2 des macrophages

Plusieurs voies de signalisation distinctes conduisent à la polarisation M2 des macrophages et impliquent divers facteurs de transcription, notamment STAT6 et PPAR γ .

Des études du phénotype de macrophages murins invalidés pour le récepteur nucléaire PPAR γ montrent que l'expression de gènes préférentiellement exprimés lors de l'activation alternative des macrophages comme l'arginase-1, les récepteurs MR ou encore Dectine-1 est diminuée d'au moins 70% par rapport aux macrophages de souris sauvages (Odegaard et al., 2007). Mais l'expression de ces gènes est également altérée dans les macrophages de souris déficientes pour STAT6.

L'ensemble de ces données suggère l'importance d'un axe fonctionnel IL-4/IL-13/STAT6/ PPAR γ dans l'activation alternative M2a des macrophages (Olefsky and Glass, 2010).

i. STAT-6

STAT6 appartient à la même famille de facteurs de transcription que STAT1 et est principalement activé par les cytokines IL-4 et IL-13 (Hou et al., 1994; Kotanides and Reich, 1993; Quelle et al., 1995). La liaison de l'IL-4 ou de l'IL-13 à leur récepteur sur les macrophages induit l'activation des kinases Jak qui phosphorylent ensuite des résidus tyrosine du récepteur. STAT6, qui est alors sous forme latente dans le cytoplasme, se lie au récepteur phosphorylé sur des motifs Tyrosine *via* son domaine SH2 puis est phosphorylé à son tour au niveau du résidu Tyrosine-641 par les protéines Jak. STAT6 phosphorylé forme ensuite un homodimère et transloque au noyau (figure 29) où il se lie à l'ADN *via* son domaine de liaison à l'ADN (DBD DNA-binding domain) pour réguler la transcription de ses gènes cibles (Mikita et al., 1996) (Figure 30).

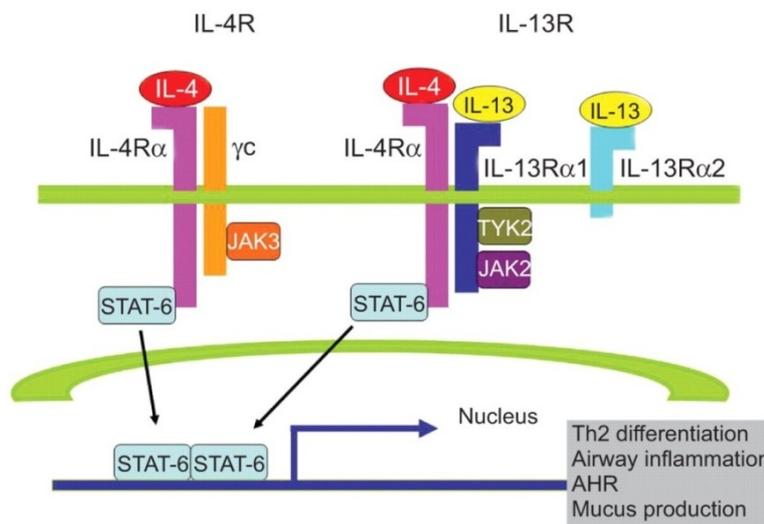


Figure 29: Voies d'activation du facteur de transcription STAT-6 (Oh et al., 2010)

La région C-terminale de STAT6 (TAD, Cterminal transactivation domain) est responsable de l'activation de la transcription et permet la liaison avec des co-facteurs

comme CBP/p300 et NCoA (Nuclear receptor coactivator)-1 (Lu et al., 1997 ; Mikita et al., 1996).

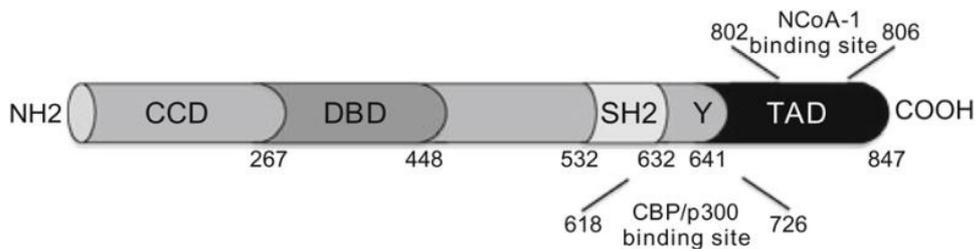


Figure 30: Structure du facteur de transcription STAT-6 (Goenka and Kaplan, 2011)

Dans les macrophages, STAT6 participe à l'activation alternative M2a des macrophages stimulés par l'IL-4 ou l'IL-13 et intervient dans l'induction de gènes cibles comme les gènes codant pour le CMH-II, l'arginase-1, le récepteur mannose et les 12/15-lipoxgénases. Il facilite également la transcription de gènes cibles de PPAR γ (Szanto et al., 2010).

De plus, STAT6 joue un rôle clé dans la régulation de la balance immunitaire entre inflammation et allergie. En effet, des études ont mis en évidence que des souris exprimant STAT6 activé de manière constitutive sont prédisposées aux allergies (Sehra et al., 2008, 2010).

STAT6 a également un rôle important dans la réponse immunitaire contre les infections parasitaires comme les helminthiases (Finkelman et al., 2000, 2004, Urban et al., 1998, 2000). Au cours de ces infections, STAT6 induit la production d'IgE par les lymphocytes B ainsi que la génération de lymphocytes Th2.

ii. PPAR γ

Les récepteurs nucléaires jouent également un rôle prépondérant dans la polarisation des macrophages vers un phénotype M2. Il s'agit de facteurs de transcription particuliers qui sont activés par la liaison à un ligand et transloquent ensuite dans le noyau pour activer la transcription de leurs gènes cibles.

Le récepteur nucléaire PPAR γ appartient à la famille des récepteurs des facteurs de prolifération des peroxyosomes (PPARs, Peroxysome proliferator-activated receptors).

Les PPARs sont situés au carrefour du métabolisme lipidique et des processus inflammatoires (Bensinger and Tontonoz, 2008; Castrillo and Tontonoz, 2004; Feige et al., 2006; Glass and Ogawa, 2006). En effet, ils modulent de nombreuses fonctions cellulaires et ont été initialement décrits pour moduler la différenciation des adipocytes ainsi que le métabolisme des acides gras et du glucose. Les PPARs sont également exprimés par les cellules immunitaires comme les macrophages et sont ainsi susceptibles d'influencer les réponses immunitaires et inflammatoires (Chinetti et al., 2000; Gosset et al., 2001; Marx et al., 2002; Padilla et al., 2000; Ricote et al., 1998). Il existe trois isoformes de PPARs identifiés chez les vertébrés : PPAR α 1 (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) et PPAR γ (NR1C3). Nous nous intéresserons ici à PPAR γ .

Ils sont constitués de cinq domaines fonctionnels distincts : deux sites d'activation indépendante du ligand AF1 (en N-terminal) et AF2 (inséré dans le domaine LBD), un domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain; DBD), une région charnière et un domaine C-terminal qui correspond au site de fixation du ligand (LBD, Ligand-binding domain) et est relativement conservé (Figure 31). Ainsi, la séquence du LBD spécifie les caractéristiques de liaison du ligand et détermine les interactions avec les co-activateurs et les co-répresseurs, modulant la transcription de gènes cibles.

Les PPARs sont des récepteurs nucléaires qui forment obligatoirement un hétérodimère avec le récepteur à l'acide rétinoïque RXR (Issemann et al., 1993; Keller et al., 1993; Miyata et al., 1994). Suite à leur activation, ils régulent l'expression de gènes cibles possédant un PPRE (Peroxisome proliferator responsive element) qui est une séquence consensus AGGTCA, répétée en tandem dans le sens direct, dont les deux hexamères sont séparés par un nucléotide.

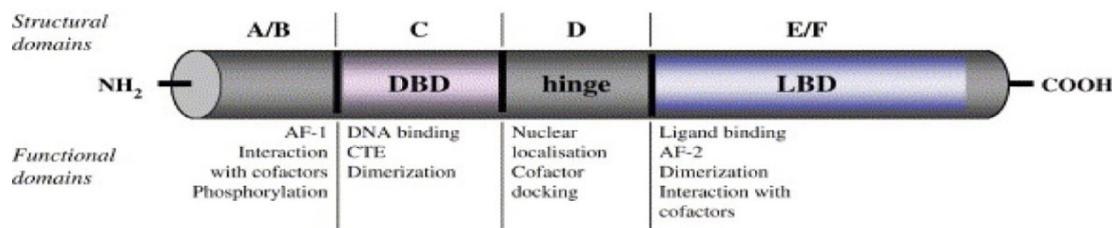


Figure 31: Structure du récepteur nucléaire PPAR γ (Fournier et al., 2007)

PPAR γ est associé à RXR de manière constitutive et diffuse dans le noyau. En l'absence de ligand, l'hétérodimère est retenu dans un complexe contenant notamment des co-répresseurs et des histones désacétylases (HDACs). La liaison d'un ligand initie des changements de conformation. Ceci conduit alors à la dégradation des co-répresseurs, permettant ainsi le recrutement de complexes co-activateurs et la fixation stable à un PPRE associé à des modifications de la chromatine et le recrutement secondaire de la machinerie enzymatique nécessaire à la transcription du gène (Feige et al., 2005, 2006) (Figure 32).

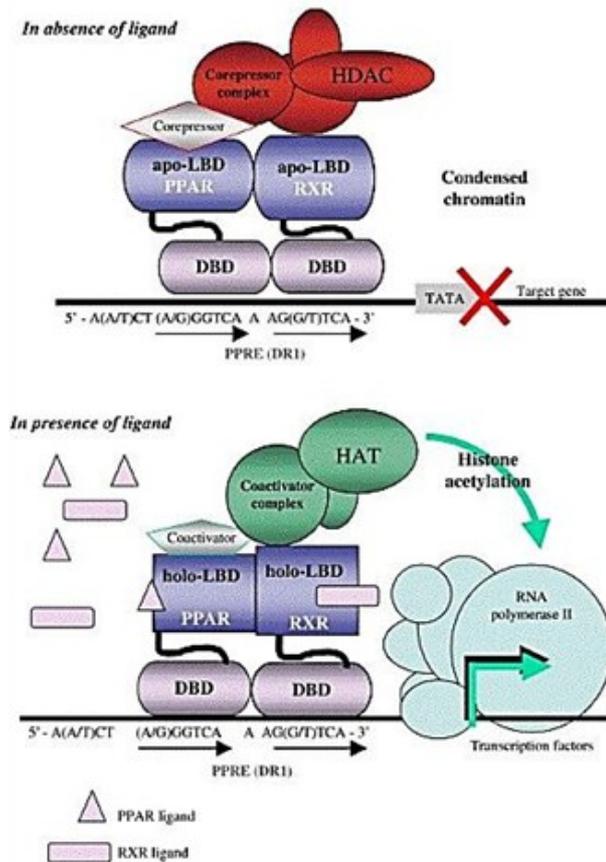


Figure 32: Schéma d'activation du récepteur nucléaire PPAR γ (Fournier et al., 2007)

La reconnaissance des ligands de PPAR γ est un élément essentiel dans la spécificité de la réponse. Il peut être activé par un large spectre de ligands endogènes, en particulier des métabolites lipidiques comme les acides gras insaturés, des composés issus des LDL (Low density lipoprotein) ou encore les eicosanoïdes. Ces derniers incluent les leucotriènes, les prostaglandines comme la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15dPGJ₂) et les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) produits par les 5, 12 et 15 lipoxygénases et les enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYPs) (Daynes and Jones, 2002; Kliewer et al., 1995; Lefèvre et al., 2015). Il existe également des ligands synthétiques de PPAR γ , utilisés en thérapeutique humaine, comme les thiazolidinediones (rosiglitazone ou pioglitazone par exemple) qui sont des

antidiabétiques (Cariou et al., 2012) ou encore les anti-inflammatoires non-stéroïdiens tels que l'indométacine ou l'ibuprofène (Lehmann et al., 1997).

PPAR γ est connu pour avoir un rôle majeur dans le contrôle de la différenciation des adipocytes et pour être essentiel à la formation du tissu adipeux *in vivo* (Barak et al., 1999; Tontonoz et al., 1994). Ainsi, il régule de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, comme le gène de la lipoprotéine lipase ou encore du récepteur scavenger CD36 qui lie les LDL oxydés, et du récepteur nucléaire LXR α (Liver X receptor α) (Chawla et al., 2001; Chinetti et al., 2001; Moore et al., 2001; Tontonoz et al., 1998).

PPAR γ intervient également dans le contrôle de l'inflammation. Son activation semble corrélée à l'amélioration de l'athérosclérose ainsi qu'à la diminution du marqueur de l'inflammation CRP (C-reactiv protein) dans le sang de sujets diabétiques traités à la rosiglitazone (Haffner et al., 2002). De plus, certains ligands spécifiques de PPAR γ entraînent l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β ou le TNF α (Jiang et al., 1998).

Les multiples effets de PPAR γ dans l'organisme sont résumés dans la figure 33.

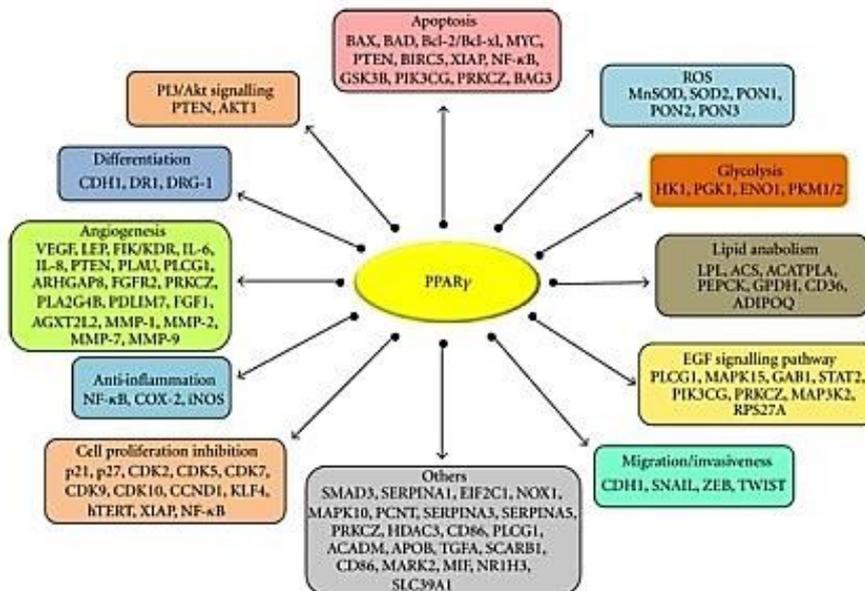


Figure 33: Les différentes fonctions cellulaires modulées par le récepteur nucléaire PPAR γ

Notre laboratoire a montré que l'activation alternative (M2a) des macrophages avait comme point central l'activation de PPAR γ par l'intermédiaire du métabolisme lipidique, et plus particulièrement des eicosanoïdes comme la 15dPGJ2, qui sont produits en réponse aux cytokines Th2 comme l'IL-13 et l'IL-4. Ceci se traduit par l'augmentation de l'expression des récepteurs CLR s tels que les récepteurs MR et Dectine-1, et du récepteur scavenger CD36 (Berry et al., 2007; Coste et al., 2003, 2008a; Galès et al., 2010a). Ceci confère à PPAR γ un rôle important dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes exprimant des motifs reconnus par ces récepteurs. Dans ce contexte, notre laboratoire a démontré que l'induction de MR et Dectine-1 par des ligands de PPAR γ permet une réponse microbicide des macrophages M2 en réponse à *Candida albicans* via l'augmentation de la phagocytose et de la production de ROS (Coste et al., 2003, 2008a; Galès et al., 2010a). Ils ont également mis en évidence que les macrophages activés avec des ligands de PPAR γ ont une capacité accrue à éliminer les globules rouges infectés par le parasite *Plasmodium falciparum* via la surexpression du récepteur CD36 (Berry et al., 2007;

Olagnier et al., 2011). D'autres études montrent que les ligands de PPAR γ permettent de diminuer les capacités d'infections de virus comme les rotavirus et le virus de la grippe (Cloutier et al., 2012; Guerrero et al., 2012). En revanche, le rôle de PPAR γ dans le processus de tumorigenèse reste controversé et les données actuelles suggèrent des effets multiples et tissu-spécifiques de ce récepteur nucléaire.

iii. LRH-1

LRH-1 (Liver receptor homologous protein 1 ou NR5A2) appartient à la famille des récepteurs nucléaires orphelins. Il est principalement exprimé dans le foie, le pancréas, l'ovaire et les cellules des cryptes intestinales. De plus, nous avons récemment montré que LRH-1 était fortement exprimé dans les macrophages (Lefèvre et al., 2015). Il existe sous trois isoformes obtenus par épissage alternatif. Cependant, ces trois isoformes conservent une capacité de liaison à l'ADN et de transactivation similaire. Ce récepteur nucléaire se lie à la séquence consensus YCA AGG YCR sous forme de monomère (Figure 34).

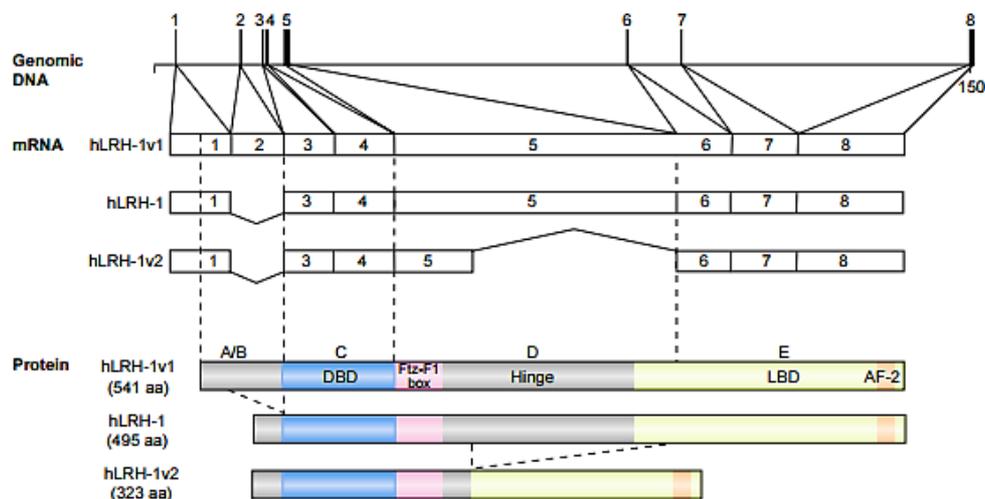


Figure 34: Structure des isoformes du récepteur nucléaire LRH-1 (Fayard et al., 2004)

Comme tous les récepteurs nucléaires orphelins, LRH-1 a une activité constitutive régulée par l'action de co-activateurs comme SRC-1, SRC-3 (Steroid receptor coactivator 1/3) et MBF (Multiprotein bridging factor) et des co-répresseurs tels que SHP (Small heterodimer partner), DAX-1 (Dosage sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital gene on the X chromosome, gene 1) ou SMRT (Silencing mediator for retinoid and thyroid receptors). De plus, l'activité de LRH-1 peut être stimulée suite à sa phosphorylation et l'activation de la voie des MAPK. A l'inverse, la sumoylation de LRH-1 inhibe son activité.

Bien que les récepteurs orphelins ne nécessitent pas de ligands pour exercer leur activité basale certains phospholipides sont connus chez l'homme pour être des ligands de LRH-1, comme les PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate), PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) ou encore le DLPC (Dilinoleoylphosphatidylcholine). En effet, ce récepteur nucléaire contient un domaine de liaison pour le ligand appelé LBD (Ligand binding domain) qui est constitué d'une large cavité hydrophobe vide lors de l'activation constitutive qui se fait au niveau de la région N-terminale du LBD.

LRH-1 intervient dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires. Il intervient également dans la stéroïdogénèse notamment via CYP19 et le récepteur scavenger SR-B1 (Fayard et al., 2004). LRH-1 est également impliqué dans le renouvellement et la prolifération des cellules des cryptes intestinales en favorisant la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire via la régulation de l'expression des cyclines E1 et D1 ainsi que du proto-oncogène c-myc. En association avec cette activité, il a été mis en évidence que LRH-1 intervient dans la formation de certains cancers notamment au niveau de l'intestin, du foie, de l'estomac mais aussi

de l'endomètre et des glandes mammaires (Bayrer et al., 2015; Chand et al., 2010, 2012; Schoonjans et al., 2005; Wang et al., 2008; Zhou et al., 2005).

Des études ont également démontré un rôle important de LRH-1 dans le contrôle de la réponse inflammatoire. En effet, une réponse inflammatoire exacerbée est observée chez des souris hétérozygotes pour LRH-1. De plus, chez la souris le LPS diminue l'expression de LRH-1 dans les hépatocytes tout comme il le fait pour l'expression de PPAR γ . De même, une augmentation du TNF α est associée à une expression de LRH-1 diminuée chez des modèles murins de cancer du colon (Schoonjans et al., 2005). L'implication de LRH-1 dans la réponse inflammatoire a également été observée chez l'Homme (Coste et al., 2007; Venteclef and Delerive, 2007; Venteclef et al., 2006).

Dans notre laboratoire, nous avons récemment démontré que LRH-1 était impliqué dans l'activation alternative des macrophages en stimulant la synthèse de 15-HETE, ligands de PPAR γ , en activant l'expression génique de deux enzymes du cytochrome P450 (CYP450) Cyp1a1 et Cyp1b1 (Lefèvre et al., 2015). De plus, il a été montré que LRH-1 intervenait, en activant la polarisation M2 des macrophages *via* l'activation de PPAR γ , dans l'élimination de la levure *Candida albicans*. En effet, une augmentation de la charge fongique est observée chez des souris dont les macrophages sont délétés pour LRH-1 (Lefèvre et al., 2015). Ces cellules ont une capacité de phagocytose diminuée et produisent moins de ROS, ceci étant corrélé avec une diminution de l'expression des récepteurs MR et Dectine-1 à la surface des macrophages LRH-1^{-/-}. Ceci souligne l'importance du facteur de transcription LRH-1 dans l'activation alternative des macrophages *via* PPAR γ et dans la défense antifongique des macrophages en réponse à *Candida albicans* (Lefèvre et al., 2015).

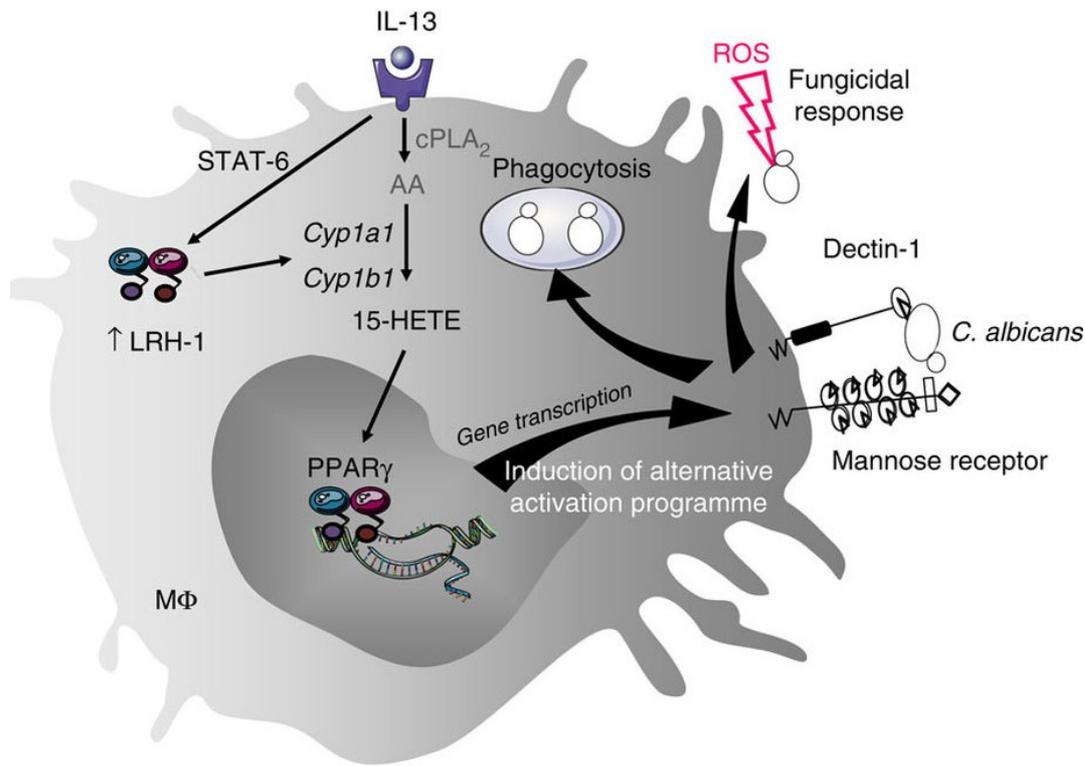


Figure 35: Schéma représentant le rôle de LRH-1 dans l'activation alternative des macrophages et l'élimination de *Candida albicans* associée (Lefèvre et al., 2015)

L'expression abondante de différents CLR s par les macrophages M2 leur permet de reconnaître les motifs glucidiques constituant la paroi de *C. albicans*. De ce fait les CLR s jouent un rôle primordial dans la reconnaissance, l'internalisation et l'élimination de ces levures.

e) Rôle des macrophages M2 dans la réponse à *Candida albicans*

Candida albicans (*C. albicans*) est un commensal saprophyte présent dans les muqueuses du tractus digestif et des muqueuses vaginales ainsi qu'au niveau de la peau chez l'Homme. Il peut également être isolé de manière exceptionnelle dans la nature (eau, sol, plantes, etc...) suite à une contamination fécale et se comporte comme une levure pathogène opportuniste. En effet, bien qu'il soit retrouvé chez l'Homme dans des conditions physiologiques, *C. albicans* peut également être à l'origine de pathologies chez les individus immunodéprimés appelées candidoses.

i. Reconnaissance et élimination de *Candida albicans* par les macrophages

C. albicans est composé d'une paroi qui est responsable de la versatilité et de l'ensemble des propriétés d'adhésion, de pénétration et de diffusion des levures. Elle est constituée à 80-90% de glucides dont trois catégories représentent la majorité des polysaccharides présents, à savoir des polymères de glucose (β -1,3 et/ou β -1,6 glucanes), des polymères de N-acétylglucosamine reliés entre eux par des liaisons osidiques de type β -1,4(chitine) et de polymères de mannose (mannanes). Les mannanes peuvent être liés de manière covalente à des protéines et ainsi former des mannoprotéines. La paroi de *C. albicans* contient également 6 à 25% de protéines et une faible quantité de lipides.

Les β -glucanes, représentent entre 50 et 60% de la paroi et confèrent sa rigidité à la paroi de *C. albicans* et ainsi sa forme et sa résistance aux contraintes physiques auxquelles elle est exposée. La chitine, qui constitue seulement 1 à 3% de la paroi, participe également à ces propriétés. Ces deux composants apparaissent plus concentrés à la paroi interne. A l'inverse, les mannanes et mannoprotéines représentent 30 à 40% de la paroi et constituent essentiellement la couche externe de la paroi (Figure 36). De ce fait, ils jouent un rôle déterminant dans les propriétés d'adhérence de *C. albicans* aux tissus hôtes et contribuent donc à la pathogénicité de *C. albicans*. Les différents composants de la paroi interagissent entre eux pour conférer à la paroi cellulaire son architecture globale. Ainsi, les β -glucanes constituent des sites d'ancrage pour les glycoprotéines et la chitine et se lieent aux mannoprotéines de manière covalente par l'intermédiaire d'une structure glycophosphatidylinositol (GPI). Cependant, la proportion et la disposition de ces principaux constituants semble varier en fonction de la morphologie de la levure et de sa forme de développement. La paroi, notamment à travers ses propriétés

d'adhérence contribuant à la pathogénicité de *C. albicans*, constitue une cible de choix d'une catégorie d'antifongiques que sont les échinocandines. Les échinocandines inhibent la biosynthèse de glucanes de la paroi, induisant l'arrêt de la synthèse de la paroi cellulaire (effet fongistatique) suivi de sa destruction (action fongicide).

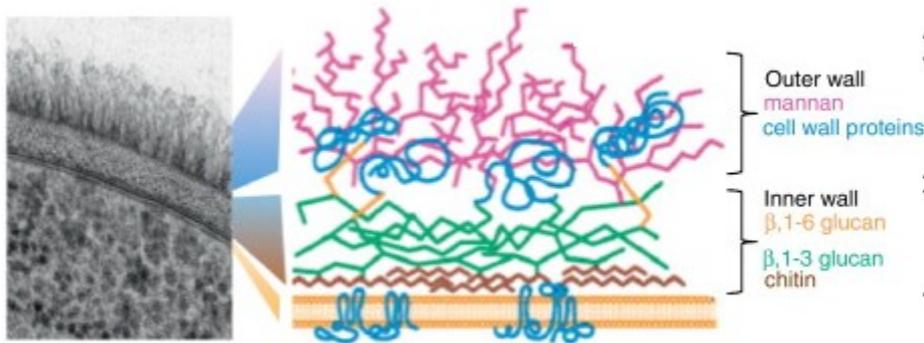


Figure 36: Composition de la paroi de *Candida albicans*

Les résidus glucidiques exposés à la paroi fongique conditionnent la reconnaissance de *C. albicans* par les macrophages et les récepteurs mis en jeu et ainsi la réponse immune. Ainsi, la localisation des mannoprotéines et des mannanes dans la couche externe de la paroi de *C. albicans* et des β -glucanes, notamment au niveau des zones de bourgeonnement entre cellule fille et cellule mère, ont permis de définir les récepteurs mannose et dectine-1 comme faisant partie des récepteurs majeurs permettant aux macrophages de reconnaître les levures (Coste et al., 2003; Galès et al., 2010a). Dectin-1, qui reconnaît les β -glucanes de la paroi de *C. albicans*, joue un rôle central dans la réponse immunitaire antifongique. Suite à la reconnaissance de *C. albicans*, il contribue à la phagocytose des levures, notamment avec le récepteur MR (Ezekowitz et al., 1990; Herre et al., 2004; Porcaro et al., 2003). Suite à la phagocytose, l'élimination de *C. albicans* est principalement liée à un stress oxydant. En effet, des souris déficientes pour la myéloperoxydase (MPO) sont plus sensibles à l'infection à *C. albicans*. Sept jours après infection par injection intra-péritonéale, la

dissémination des levures est plus importante chez ces souris par rapport aux souris sauvages, ce qui indique que la MPO est un élément important dans la défense précoce des infections fongiques (Aratani et al., 1999). Des mécanismes complémentaires peuvent améliorer l'élimination des levures comme l'opsonisation et la production de cytokines Th1 par les lymphocytes T qui peuvent augmenter l'expression et l'activité de la NADPH oxydase (Romani, 1999). La production d'espèces réactives de l'oxygène par les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris déficientes pour le TLR-2 ou pour MyD88 (adaptateur nécessaire à la signalisation en aval des TLRs), alors qu'elle est inhibée par des β -glucanes solubles, indique que la production de radicaux libres oxygénés en réponse au zymosan non opsonisé semble dépendante du récepteur Dectin-1 et indépendante des TLRs. Cependant, cette production peut être amplifiée par une pré-stimulation des cellules par des ligands des TLRs (Gantner et al., 2003). Ce rôle important de Dectin-1 dans la production d'espèces réactives de l'oxygène est également confirmé dans la réponse des macrophages à la forme levure de *C. albicans* (Gantner et al., 2005).

L'induction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages est un autre élément majeur dans la défense anti-*Candida*. Le rôle des TLRs dans ce mécanisme est particulièrement étudié et la balance TLR4/TLR2 apparaît comme fondamentale dans le contrôle de l'infection à *C. albicans*. En effet, le TLR4 induit une forte production de cytokines pro-inflammatoires via la voie de signalisation MyD88/NF- κ B et les MAPK. En revanche, la voie de signalisation déclenchée par la reconnaissance de *C. albicans* par le TLR2 conduit à une production modérée de ces cytokines pro-inflammatoire associée à la production d'IL-10 et de TGF- β en grandes quantités. En plus de la voie des TLRs, les CLR s contribuent également à la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à *C. albicans*. Et on observe une

collaboration entre ces récepteurs. C'est le cas par exemple de Dectin-1 qui, en collaboration avec le TLR2, amplifie la réponse pro-inflammatoire de ce dernier (Gantner et al., 2003). Dectin-1 participe à l'élimination de *C. albicans* via la production de cytokines pro-inflammatoire, telles que le TNF- α et l'IL-1 β , à travers la voie de signalisation dépendante de Syk. MR, qui intervient sous forme membranaire et soluble dans l'activité antifongique des macrophages, intervient également dans la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse à *C. albicans*. Des études indiquent qu'une coopération entre les récepteurs Dectin-1 et MR est mise en œuvre dans l'activité candidicide des macrophages. Ainsi, il a été montré que lors d'une réponse antifongique, le clivage du domaine extracellulaire du récepteur MR pour libérer le MR soluble est induite par Dectin-1 (Vautier et al., 2012). De plus, la synergie entre les récepteurs mannose et Dectin-1 dans la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β par les monocytes humains et macrophages murins infectés par *C. albicans* a récemment été mise en évidence (Netea et al., 2006; van de Veerdonk et al., 2009).

ii. Polarisation des macrophages en réponse à *Candida albicans*

La réponse immune Th1 exerce un rôle bien établi dans la résistance aux infections à *C. albicans* (Maródi et al., 1993). Les cytokines produites par les lymphocytes Th1, telles que l'IFN γ , activent classiquement les macrophages en macrophages M1 qui deviennent candidicides essentiellement à travers l'augmentation des récepteurs aux opsonines et la production de ROS et de monoxyde d'azote (Coste et al., 2002). La production de ROS en quantités importantes est à l'origine de la désorganisation des membranes cytoplasmiques et mitochondriales mais aussi de la dégradation des

protéines et l'altération des acides nucléiques, entraînant ainsi la destruction des levures.

Cette polarisation M1, et plus généralement la réponse immune Th1, sont inhibées par la réponse Th2 induisant la désactivation des phagocytes et donc une plus grande susceptibilité à l'infection à *C. albicans* (Romani, 1999). Toutefois, il apparaît que l'action coordonnée de ces deux réponses immunes est primordial au maintien de cette levure à l'état commensal au niveau des muqueuses, sans induire de réponse inflammatoire. De plus, les macrophages M2 sont susceptibles d'intervenir dans la réponse anti-*C. albicans* puisqu'ils expriment de nombreux CLR. Récemment, il a été établi que des macrophages de type 2 (M2a ou activation alternative) activés par les cytokines Th2 IL-13 et IL-4 ont une capacité accrue à éliminer les levures pathogènes non opsonisées grâce à la reconnaissance directe de celles-ci par leurs PRR, notamment les récepteurs Dectine-1 et mannose (Coste et al., 2003, 2007; Galès et al., 2010a; Netea et al., 2006). En accord avec ces données, notre équipe a montré que l'IL-13 favorise l'élimination de *C. albicans* via l'induction de ces deux récepteurs dépendante de l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ (Coste et al., 2003; Galès et al., 2010a; Lefèvre et al., 2015)). Ces observations ont été faites *in vitro* mais aussi *in vivo*, sur un modèle de souris immunodéprimées infectées par *C. albicans* au niveau du tractus digestif (Coste et al., 2008a). Ces études ont aussi permis d'établir que l'activation alternative des macrophages par l'IL-13 peut être reproduite par des ligands synthétiques de PPAR γ , les thiazolidinediones avec notamment rosiglitazone. Ainsi, ces ligands de PPAR γ contribuent, via l'expression des récepteurs mannose et Dectine-1, à éliminer *C. albicans* *in vitro* et *in vivo* (Coste et al., 2008a; Galès et al., 2010a).

L'ensemble de ces données souligne bien l'importance de la complémentarité de ces deux types d'activation des macrophages dans la résolution d'une infection fongique.

Quelques traitements antifongiques sont actuellement disponibles et dépendent notamment de la paroi des levures. Ils se distinguent en quatre classes: les polyènes et les dérivés azolés qui ciblent essentiellement l'ergostérol (composant de la membrane plasmique du champignon essentiel à sa structure), les dérivés pyrimidiques comme la 5-flucytosine qui inhibe la biosynthèse d'ADN ou interfèrent avec la traduction d'ARNm et donc la synthèse de protéines fongiques, et les échinocandines qui elles ciblent la paroi.

Le faible nombre d'antifongiques disponibles à ce jour est expliqué par le fait que, les champignons étant des cellules eucaryotes, leur structure est relativement proche de celle des cellules humaines ceci réduisant la possibilité de trouver des cibles spécifiques. La quantité limitée d'antifongiques rend l'émergence de résistances d'autant plus préoccupante. De ce fait, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour limiter le caractère pathogène de *C. albicans*.

Le peu de résistance développée en réponse aux PAMs, le large spectre d'agents pathogènes cibles ainsi que leur capacité à moduler la réponse immunitaire, notamment celle des macrophages, fait des PAMs une piste sérieuse quant au développement de nouveaux traitements antifongiques. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au rôle immuno-modulateur du peptide P17 sur l'activité antifongique des macrophages en réponse à *C. albicans*.

Résumé

Les macrophages sont des cellules effectrices clés de la défense immunitaire innée. Ils peuvent provenir de deux origines distinctes: la différenciation à partir de monocytes circulants ou *via* l'expansion et le renouvellement de macrophages tissulaires résidents. Ces cellules se caractérisent par une forte plasticité phénotypique et fonctionnelle relativement au microenvironnement dans lequel ils se situent. On distingue schématiquement deux types de macrophages: les macrophages M1 provenant de l'activation classique des macrophages et les macrophages M2 qui sont issus de l'activation alternative des macrophages. Les macrophages M1 se caractérisent par l'expression de récepteurs reconnaissant les pathogènes opsonisés et produisant de fortes quantités de médiateurs pro-inflammatoires. Les macrophages M2 représentent une population plus hétérogène, subdivisée en plusieurs sous-types de macrophages M2 qui possèdent chacun des fonctions qui leur sont propres. Cependant, ces derniers partagent des caractéristiques communes dont l'expression de récepteurs lectines de type C, leur permettant de reconnaître des pathogènes non opsonisés.

La polarisation des macrophages conditionne leur activité fonctionnelle. On retrouve ainsi des macrophages impliqués dans la réponse antimicrobienne mais aussi certains types de macrophages spécialisés dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire, ou des macrophages favorisant la croissance tumorale.

Rôle des peptides antimicrobiens dans l'immuno-modulation

Les PAMs sont capables de moduler la réponse immune innée en agissant sur la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et de chimiokines, le recrutement des cellules immunitaires. Ils peuvent également modifier la différenciation cellulaire notamment chez les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Ils exercent aussi leur effet immuno-modulateur sur les cellules de l'immunité adaptative : les lymphocytes T et lymphocytes B, se situant ainsi au carrefour entre la réponse immune innée et adaptative. De plus, ces peptides peuvent réguler l'apoptose, la cicatrisation et l'angiogenèse induites par les cellules immunitaires mais aussi par d'autres cellules non immunitaires mais intervenant dans la réponse inflammatoire ou immune. Tout ceci leur confère un rôle dans la l'élimination de certains agents pathogènes et le contrôle d'une réponse inflammatoire modérée pour éviter les dommages cellulaires et tissulaires. Cependant, certains PAMs se trouvent impliqués dans des contextes pathologiques de par leur place centrale dans la modulation de la réponse immunitaire.

I. Modulation de la défense immune innée par les peptides antimicrobiens

Les PAMs interviennent dans la modulation de cette réponse immune en modifiant la différenciation et les propriétés fonctionnelles de différentes cellules de ce système immunitaire innée. Ils sont principalement capables d'agir sur le chimiotactisme de diverses cellules, de modifier leur profil transcriptionnel et sécrétoire, mais également d'influencer la différenciation des cellules immunitaires et de moduler leur réponse microbicide.

Leurs effets immunomodulateurs varient selon la cellule cible et le stimulus ayant enclenché la réponse immunitaire et nombre d'entre eux sont dépendant de l'induction préalable d'un signal calcique dans la cellule cible (Aung et al., 2011; Moerman et al., 2003; Wan et al., 2011; Willems et al., 2004).

Ils agissent majoritairement sur les cellules immunitaires, mais peuvent aussi agir sur d'autres cibles cellulaires en lien avec la réponse immunitaire ou inflammatoire, comme les kératinocytes et les cellules endothéliales (Koczulla et al., 2003; Smithrithee et al., 2015).

1. Effets des peptides antimicrobiens sur la production de cytokines/chimiokines par les cellules immunitaires innées

Les PAMs sont capables de moduler la réponse immunitaire innée en intervenant dans l'expression et la sécrétion de cytokines pro- et anti- inflammatoires, mais aussi de chimiokines et d'autres médiateurs impliqués dans la réponse immune et l'inflammation. Chez l'Homme, les cathélicidines (LL-37) et les défensines sont bien connues pour agir sur ces propriétés. Ainsi, le LL-37 peut induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β , mais aussi de l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire (Elssner et al., 2004; Yu et al., 2007) et des chimiokines IL-8 (CXCL8), MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1/ CCL2) et MCP-3 dans les monocytes humains (Bowdish et al., 2004; Elssner et al., 2004) et macrophages murins (Scott et al., 2002). Il induit également l'expression du gène et la sécrétion de l'IL-18 par les kératinocytes humains (Niyonsaba et al., 2005). Les défensines, quant à elles, induisent l'expression génique et protéique de l'IL-37 dans les kératinocytes (Smithrithee et al., 2015) et agissent également sur les monocytes humains en induisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β (Funderburg et

al., 2011). Chez les insectes, plusieurs PAMs ont également démontré une capacité à moduler l'expression de cytokines et chimiokines par les cellules immunes. Ainsi, les PAMs nommés venom peptide 7.2 et 7.8, qui sont sécrétés dans le venin du scorpion *Tityus serrulatus*, induisent la sécrétion d'IL-6 par des macrophages murins (Pucca et al., 2016). L'apidaecine qui est un PAM issu du venin d'abeille induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α , IL-12 et IL-6 ainsi que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et les chimiokines IL-8, MIP-1 β (Macrophage inflammatory protein-1 β) et MCP-1 par les macrophages humains (Tavano et al., 2011). En revanche, la sécrétion de ces différents médiateurs solubles n'est pas modulée par cePAM dans les monocytes humains (Tavano et al., 2011). Cette étude souligne l'aspect dépendant du type cellulaire du rôle immuno-modulateur des PAMs.

En plus d'agir sur l'expression génique et protéique de cytokines et chimiokines, certains PAMs induisent l'expression de divers récepteurs. C'est le cas du LL-37 qui augmente l'expression des récepteurs aux cytokines IFN- γ et TGF- β , et aux chimiokines CCR-2 et CXCR-4 par les macrophages (Scott et al., 2002).

2. Effet des peptides antimicrobiens sur le chimiotactisme

L'induction de l'expression de diverses chimiokines et de leurs récepteurs confère aux PAMs un rôle dans la modulation du chimiotactisme cellulaire, de manière récepteur-dépendante.

Ainsi, le LL-37 favorise le chimiotactisme de monocytes du sang périphérique humain en stimulant la sécrétion des chimiokines MCP-1 et MCP-3 (Nijnik et al., 2012; Yang et al., 2001) et agit également sur l'expression des récepteurs aux chimiokines IL-8RB (ou CXCR2), CCR2 et CXCR4 (Scott et al., 2002). De plus, les PAMs synthétiques

IDR-1 et IDR-1002 ainsi que la défensine HNP-1 induisent le chimiotactisme des leucocytes murins sur le site d'infections bactérienne à *Klebsiella pneumonia*, *E. coli* et *S. aureus*, qui est corrélé à la résolution de ces infections (Nijnik et al., 2010; Scott et al., 2007; Welling et al., 1998). L'apidaecine module également la sécrétion des chimiokines IL-8, MIP-1 β et MCP-1 par les macrophages humains (Tavano et al., 2011).

Cependant, ils peuvent également induire le chimiotactisme des cellules de manière directe, en interagissant avec des récepteurs aux chimiokines ou impliqués dans le chimiotactisme. Cet effet a été observé *in vitro* pour le LL-37 qui attire directement les neutrophiles, éosinophiles et monocytes humains en interagissant avec les récepteurs au fMLP (De Yang et al., 2000; Tjabringa et al., 2006). De même, le PAMCRAMP (Cathelicidin-related antimicrobial peptide), équivalent murin de la cathélicidine LL-37, est connu pour exercer un effet chimiotactique sur les monocytes, macrophages et neutrophiles humains ainsi que sur les leucocytes murins, via les récepteurs FPRL-1/2 (Formyl peptide receptor-like 1/2) (Kurosaka et al., 2005). Les β -défensines-2 humaines sont capables de se lier au récepteur CCR6 et ainsi induire le chimiotactisme des cellules dendritiques (Yang et al., 1999). Cet effet est également retrouvé chez les PAMs d'insectes comme la parabutoporine et l'opistoporine isolées du venin de scorpion (Willems et al., 2002, 2004).

Ainsi, les PAMs interviennent à différents niveaux dans l'induction du chimiotactisme des cellules cibles, en modifiant l'expression de diverses chimiokines et/ou récepteurs aux chimiokines mais aussi en interagissant directement avec certains de ces récepteurs.

3. Effet des peptides antimicrobiens sur la modulation de la réponse inflammatoire et la réponse anti-infectieuse

a) *Contrôle de la réponse inflammatoire*

Leur capacité à moduler le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'inflammation ainsi que la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires et donc l'activation de divers effecteurs cellulaires de la réponse immune, comme nous l'avons évoqué dans les chapitres précédents, confère aux PAMs un effet modulateur de la réponse inflammatoire. Selon le microenvironnement cellulaire, ils exercent des effets divers sur la réponse inflammatoire, conduisant à son activation ou son inhibition.

Les PAMs de mammifères en particulier sont connus pour jouer un rôle important dans le contrôle de la réponse inflammatoire dépendante des TLRs. Ils peuvent notamment agir sur la réponse des TLRs déclenchée par des ligands à ces récepteurs, d'origine bactérienne comme le LPS ou l'acide lipotéichoïque (LTA) par exemple. Dans ce contexte, Scott et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence que le LL-37 est capable de moduler la réponse inflammatoire des macrophages et monocytes humains en réponse au LPS en inhibant la synthèse du TNF- α , et apporte ainsi une protection partielle des souris au choc septique (Mookherjee et al., 2006; Scott et al., 2002). La pyroptose, qui est une mort cellulaire dépendante de la caspase-1 et est associée à la production de cytokines pro-inflammatoires, joue un rôle important dans le choc septique. Le LL-37 peut également intervenir à ce niveau pour protéger de cette pathologie inflammatoire. En effet, il peut inhiber l'expression de l'ARNm et la sécrétion de la protéine IL-1 β ainsi que la formation de l'inflammasome et l'activation de la caspase-1 dans la lignée de macrophages murins J774, en empêchant la liaison

du LPS au TLR4/CD14 sur ces cellules. Ces mécanismes sont associés à l'inhibition de la pyroptose des macrophages et protège ainsi du choc septique (Hu et al., 2014). Les PAMs agissent aussi sur la réponse inflammatoire en modifiant la tolérance immunitaire à l'ADN du soi. Ainsi, le LL-37 peut rompre cette tolérance en empêchant la dégradation de l'ADN du soi libéré par les cellules endommagées ou mortes, en formant un complexe avec ce dernier et permettant son transport à travers le compartiment endosomal dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Ceci conduit à l'activation du TLR-9, qui reconnaît les îlots CpG non méthylés de l'ADN, et à la sécrétion d'interférons de type I (IFN- α et IFN- β) (Lande et al., 2007) déclenchant une réponse inflammatoire. Outre le TLR-9, il existe d'autres senseurs de l'ADN de nature différente des TLRs. Ainsi, Chamilos et ses collaborateurs ont démontré que le LL-37 peut également activer cette voie de manière indépendante des TLRs dans les monocytes humains (Chamilos et al., 2012). Les PAMs sont aussi capables d'induire la libération de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β par les kératinocytes, les cellules épithéliales ou encore les fibroblastes (Pistollic et al., 2009; Tomasinsig et al., 2008; Wu et al., 2010).

La réponse inflammatoire peut également être activée par les PAMs *via* l'activation ainsi que la dégranulation cellulaire et la production de médiateurs pro-inflammatoires. Ainsi, le LL-37 induit l'activation, le recrutement, et la dégranulation des mastocytes humains (Subramanian et al., 2011). Il induit, en plus de la production des cytokines IL-2, IL-4 et IL-6, la libération d'histamine par les mastocytes (Niyonsaba et al., 2001). De plus, la parabutoporine et l'opistoporine activent la dégranulation des mastocytes par un mécanisme d'exocytose (Willems et al., 2002). De même, les PAMs synthétiques produits à partir de PAMs bovins et appelée IDR, augmentent l'activation, l'adhésion et le recrutement des neutrophiles humains accompagnés de la libération de PAMs

par ces cellules. Cependant, ils inhibent la dégranulation et la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS induites par le LPS, protégeant là encore l'hôte d'une réponse inflammatoire excessive (Niyonsaba et al., 2013).

Outre les cytokines et chimiokines, la réponse inflammatoire met en jeu des médiateurs inflammatoires lipidiques, principalement dérivés du métabolisme de l'acide arachidoniques (prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes, etc...). Les PAMs, sont également capables d'agir sur la synthèse de ces médiateurs lipidiques qui jouent un rôle crucial dans la mise en place, le maintien et la résolution de la réponse inflammatoire. Wan et ses collaborateurs ont mis en évidence que le LL-37 est capable d'induire la production de LTB₄ et du thromboxane TXA₂ dans les macrophages et neutrophiles humains en interagissant respectivement avec les récepteurs P2XR₇ et FPR₂/ALX. La sécrétion de ces médiateurs lipidiques est dépendante de la mobilisation calcique induite par le LL-37 qui active la phosphorylation de la cPLA₂ puis l'activation de la 5-LOXX pour la production de LTB₄ ou COX_{1/2} pour la production de TXA₂ ainsi que la voie Erk_{1/2} et p38 MAPKs (Wan et al., 2011, 2014a). De même, ce PAM induit la production de PGE₂ via COX-1 dans les cellules endothéliales (Salvado et al., 2013).

Enfin, les PAMs peuvent intervenir dans des phases plus tardives de l'inflammation notamment dans la phase de résolution de la réponse inflammatoire en induisant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires mais aussi en favorisant les mécanismes d'angiogenèse, d'apoptose et de cicatrisation qui sont nécessaires à cette phase de résolution et de régénération tissulaire qui s'ensuit. En effet, l'apidaecine et le LL-37 induisent la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β (par le LL-37) par les monocytes et macrophages humains (Tavano et al., 2011; Torres-Juarez et al., 2015; Yu et al., 2007). Le LL-37 exerce aussi un rôle pro-angiogénique. Ainsi, ce

peptide active directement les cellules endothéliales, conduisant à l'augmentation de la prolifération et de la formation de structures vasculaires (Koczulla et al., 2003) ou favorise l'angiogenèse via l'axe COX-1/PGE2 (Salvado et al., 2013), qui est une prostaglandine connue pour induire l'angiogenèse dans les tumeurs par exemple (Salvado et al., 2012). Il agit également sur la cicatrisation de manière dépendante des voies de signalisation des MAPKs et PI3K/Akt, notamment en activant la migration des kératinocytes humains et des cellules épithéliales murines *in vivo* (Carretero et al., 2008). De même, les β -défensines humaines hBD2 stimulent la migration et la prolifération des cellules endothéliales humaines, favorisant la cicatrisation (Baroni et al., 2009). Le récepteur EGFR est essentiellement impliqué dans ce procédé dans les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes, activant les voies de signalisation p38 MAPK, Erk1/2, NF- κ B et PI3K (Vandamme et al., 2012).

De plus, les PAMs interviennent dans l'apoptose cellulaire, de façon cellule-spécifique, avec notamment l'inhibition de l'apoptose des neutrophiles par le LL-37 (Barlow et al., 2006). Cette inhibition est dépendante de l'engagement des récepteurs FPR2 et P2XR7, qui induisent là encore l'activation de la voie de signalisation Erk1/2 conduisant à la diminution de l'activité de la caspase-3 et l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-xl (Nagaoka et al., 2006). Selon le tissu et le contexte physiopathologique, l'apoptose des cellules épithéliales peut être activée ou inhibée, afin de leur permettre de continuer à sécréter des cytokines et chimiokines (Barlow et al., 2006; Otte et al., 2009; Zasloff, 2009). En effet, l'apoptose de cellules épithéliales infectée par *Pseudomonas aeruginosa* est déclenchée par le LL-37 et est suivie de la phagocytose de ces cellules (Barlow et al., 2010). Cependant, l'inhibition de l'apoptose induite par le LPS dans les cellules endothéliales de certains organes comme le foie et les poumons permet de prévenir du développement d'un choc

septique chez l'hôte (Suzuki et al., 2011). En revanche, l'activation de l'apoptose des ostéoblastes humains par le LL-37 (Säll et al., 2013) lui confère un rôle dans le maintien de l'homéostasie osseuse.

Ainsi, les PAMs régulent la réponse inflammatoire en modulant l'activation, le recrutement et la production de médiateurs pro-inflammatoires afin de limiter cette réponse et éviter les pathologies inflammatoires. Ils interviennent également dans la phase de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire.

Cependant, dans un contexte infectieux, les PAMs sont aussi capable d'activer de manière modérée cette réponse inflammatoire pour favoriser l'élimination de l'agent pathogène.

b) Contrôle de la réponse anti-infectieuse

Les PAMs peuvent, dans certains cas le nécessitant comme lors de maladies infectieuses, activer la réponse inflammatoire de façon modérée, en modulant la sécrétion de médiateurs solubles, l'activation et la différenciation cellulaire. C'est le cas de la fowlicidine qui est une cathélicidine de poulet et qui, en induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires (IL-1 β , CCL2/MCP-1 et CCL3/MIP-1 α) dans les macrophages murinset en entraînant leur différenciation et leur activation *via* l'augmentation de l'expression des marqueurs d'activation CMH-II et CD86 augmente la réponse immune antigène-spécifique. Dans ce contexte, la fowlicidine apporte à l'hôte une protection à l'infection bactérienne à *S. aureus* (Bommineni et al., 2010, 2014).

Ils peuvent également agir sur la production d'espèces réactives de l'oxygène comme la production de H_2O_2 par les neutrophiles humains activés par le LL-37 en réponse au virus Influenza A, via les récepteurs FPR (Tripathi et al., 2014). Il induit également la formation de NETs (Neutrophil extracellular traps, réseau d'ADN extracellulaire à fonction microbicide) contribuant à la clairance du virus Influenza A par les neutrophiles (Tripathi et al., 2014). En revanche, la parabutoporine et l'opistoporine du venin de scorpion, inhibent la production de l'ion superoxide O_2^- par les granulocytes humains (Willems et al., 2002). Un autre mécanisme employé par les PAMs est l'activation de la phagocytose des agents pathogènes par les cellules immunitaires. Wan et ses collègues ont démontré que le LL-37 augmente la phagocytose de bactéries Gram-négatives et Gram-positives opsonisées par des IgG, ceci étant associé à l'augmentation de l'expression des récepteurs FcγRs par les macrophages de la lignée dTHP-1. De plus, les macrophages humains ont une activité phagocytaire vis-à-vis de la bactérie *E. coli* non opsonisé augmenté par le LL-37 (Wan et al., 2014b).

Ceci souligne le fait que le contrôle de la réponse inflammatoire n'est pas incompatible avec l'activité antimicrobienne des cellules ciblées, comme dans le cas de la réponse des macrophages humains à *Mycobacterium tuberculosis* (Torres-Juarez et al., 2015).

II. Modulation de la défense immune adaptative par les peptides antimicrobiens

Les PAMs font le lien entre l'immunité innée et adaptative en modulant l'expression de facteurs de différenciation et d'activation des cellules immunitaires innées mais aussi en induisant la production de cytokines et chimiokines par ces cellules du système immunitaire inné, conduisant à l'activation et au recrutement des cellules de la défense

immune adaptative. De plus, ils favorisent la migration des DC dans les organes lymphoïdes, permettant l'activation des LT naïfs (Davidson et al., 2004; Vandamme et al., 2012), ou sur le site de l'infection. Par exemple, les défensines induisent la migration des DC au niveau du col utérin en cas d'infection par le papilloma virus (Hubert et al., 2007). Ils peuvent également agir sur l'activation des cellules du système immunitaire adaptatif. Par exemple, l'apidaecine antagonise partiellement la réponse immune dans les monocytes et macrophages, en diminuant notamment l'expression de la molécule du CMH-II, et des molécules de co-stimulation CD86 à faible concentration (Tavano et al., 2011), molécules nécessaires à l'activation des lymphocytes T (LT). En revanche, lorsqu'elle est présente à de fortes concentrations, elle augmente l'expression de la molécule de co-stimulation CD80 (Tavano et al., 2011). Le LL-37 est quant à lui capable d'inhiber l'activation des monocytes, macrophages et cellules dendritiques et la production de cytokines pro-inflammatoires nécessaires à la polarisation Th1 des LT par ces cellules en réponse à l'interféron. Ce mécanisme bloquant la réponse des LT helper Th1 est dépendant des voies NF- κ B et des MAPKs (Nijnik et al., 2009).

L'activation ainsi que la prolifération, la migration et la réponse des lymphocytes T et B peuvent être modulées directement par certains PAMs. En effet, les β -défensines induisent le recrutement des lymphocytes T mémoires, via le récepteur CCR6 (Yang et al., 1999) ainsi que les LT CD4⁺ naïfs (LT naïfs CD45RA/CD4) et LT CD8⁺ (Yang et al., 2001). Le LL-37 est également connu pour induire le chimiotactisme des LT, via le récepteur FPR1 (De Yang et al., 2000a).

Les PAMs modulent aussi la réponse des lymphocytes B et T en agissant sur leur prolifération, la production de cytokines et d'anticorps pour les LB. Ainsi, chez des souris ayant reçu de l'ovalbumine par administration intra-péritonéale, les défensines

produites par les neutrophiles (HNP, Human neutrophil peptides) favorisent la production d'IFN- γ , d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-10 par les LT CD4⁺ ainsi que la production d'IgG spécifiques de l'ovalbumine par les LB (Lillard et al., 1999).

Ainsi, les PAMs se retrouvent au carrefour des réponses immunitaires innée et adaptative et constituent un lien entre ces deux réponses, en modulant la différenciation, le recrutement et les différentes fonctions effectrices des cellules immunitaires innées et adaptatives. La figure 36 résume les principales fonctions microbicides et immuno-modulatrices des PAMs.

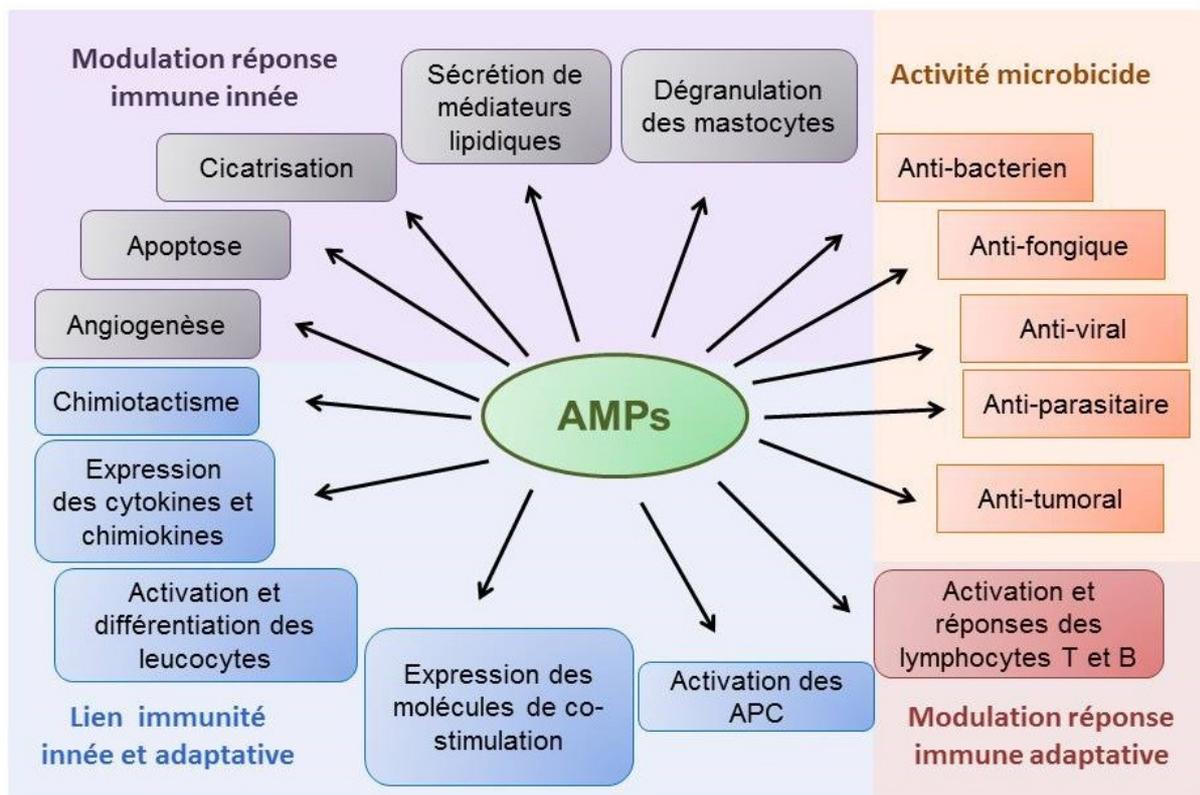


Figure 37: Schéma bilan des fonctions microbicides et immuno-modulatrices des peptides antimicrobiens (adapté de Hilchie et al., 2013)

III. Mécanismes d'action

La majorité des PAMs connus exercent leur effet par l'intermédiaire de récepteurs exprimés soit à la surface soit en intracellulaire, par les cellules cibles. Cependant, certains PAMs exercent leurs effets immunomodulateurs de manière indépendante des récepteurs, après avoir transloqué à travers la membrane plasmique et activé directement des protéines G nécessaires à la transduction de la signalisation intracellulaire. Les récepteurs les plus connus à ce jour sont des RCPG avec notamment les récepteurs au fMLP, tripeptide antimicrobien d'origine bactérienne (FPR1/2, formyl peptide receptor 1/2). Le récepteur FPR2 est notamment utilisé par le LL-37 pour agir sur la voie métabolique de synthèse de l'acide arachidonique par les macrophages (Wan et al., 2011, 2014b) ou induire le chimiotactisme de différentes cellules de l'immunité innée et adaptative (De Yang et al., 2000b). La pleurocidine, qui est un PAM produit par le poisson plat et dont la structure est comparable à celle des cathélicidines, utilise également le récepteur FPR1 pour activer les mastocytes humains. Ce récepteur est également connu pour être impliqué dans l'induction de l'angiogenèse par le LL-37 dans les cellules endothéliales (Koczulla et al., 2003). D'autres récepteurs sont mis en jeu, comme les récepteurs aux chimiokines ou encore les TLRs. Par exemple, la β -défensine-3 est capable d'augmenter l'expression de l'IL-37 par les kératinocytes humains via le récepteur CCR6 (Smithrithee et al., 2015). Cependant, un même peptide peut agir sur plusieurs récepteurs différents selon la cellule cible. Ainsi, en agissant sur l'activation des cellules présentatrices de l'antigène, ces mêmes β -défensines-3 vont exercer leur effet via les récepteurs TLRs 1 et 2 (Funderburg et al., 2007). De même, le LL-37 peut agir via le récepteur purinergique P2XR₇ et déclencher la production d'IL-1 β par les monocytes humains (Elssner et al., 2004).

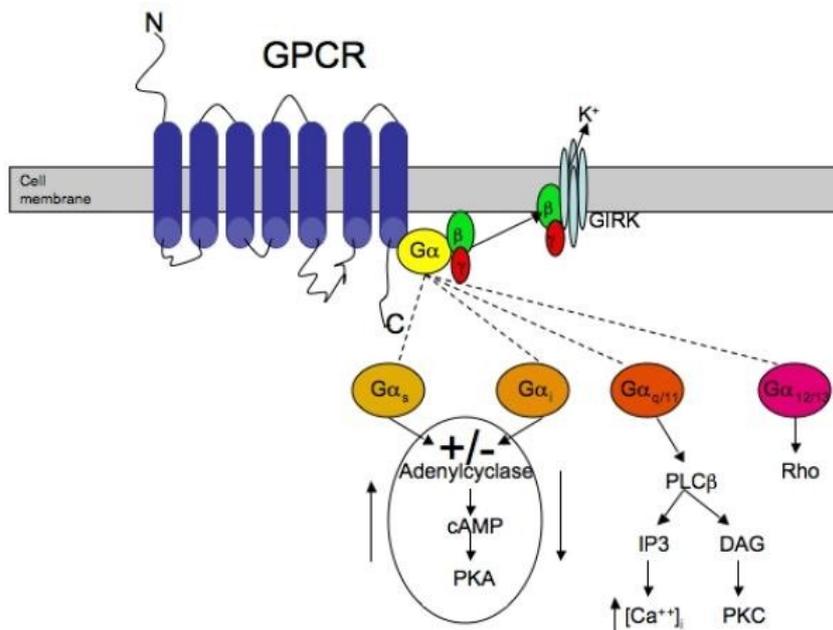


Figure 38: Voies de signalisation déclenchées par les récepteurs couplés aux protéines G (Sladek and Song, 2012)

IV. Implication des peptides antimicrobiens dans les pathologies

Le rôle clé des PAMs dans la modulation des réponses immunes et inflammatoires implique ces peptides dans différentes pathologies.

Une mauvaise régulation de la concentration de PAMs ou un défaut de fonction de ces derniers est notamment retrouvées dans de nombreuses pathologies inflammatoires.

Une surexpression du LL-37 est retrouvée dans les cas de psoriasis, en augmentant la production d'IFN- β par les kératinocytes de manière dépendante du TLR-9 (Morizane et al., 2012) et de rosacée, qui sont des maladies inflammatoires chroniques de la peau (Yamasaki et al., 2007). A l'inverse, une production insuffisante de LL-37 est associée à des pathologies telles que la dermatite atopique (Ong et al., 2002) et augmenterait la probabilité de développer des ulcères chroniques ou une tuberculose

(Heilborn et al., 2003). Les PAMs jouent également une fonction protectrice importante contre le choc septique en modulant la réponse inflammatoire (Hu et al., 2014; Mookherjee et al., 2006; Scott et al., 2002).

Des PAMs, comme notamment le LL-37, interviennent également dans certains cancers, bien que leurs effets soient plus controversés. Ainsi, la présence de LL-37 favorise la croissance tumorale dans le cas de cancers ovariens (Coffelt et al., 2009) ou des poumons, en activant le récepteur EGFR et la voie des MAPK (von Haussen et al., 2008; Heilborn et al., 2005). Coffelt et ses collègues ont également démontré que LL-37 favorise la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales ovariennes *in vitro* (Coffelt et al., 2009). Il semble cependant jouer un rôle protecteur dans le cancer du côlon, en favorisant l'apoptose des cellules tumorales, indépendamment de la voie des caspases (Ren et al., 2012). Le LL-37 peut induire l'élimination de cellules tumorales en activant les cellules NK et les macrophages (Büchau et al., 2010). Ainsi, les PAMs constituent une piste thérapeutique de choix quant aux pathologies inflammatoires, infectieuses et également tumorales.

Résumé

En plus de leur effet microbicide direct, dirigé contre un large spectre de pathogènes, de nombreux PAMs cationiques sont désormais connus pour exercer un rôle immunomodulateur en régulant la différenciation et diverses fonctions effectrices des cellules de l'immunité innée et adaptative. En effet, ils contrôlent notamment les profils transcriptionnels et sécrétoires des monocytes et macrophages ainsi que leurs propriétés de phagocytoses. Les PAMs peuvent également induire un signal calcique dans les neutrophiles et les macrophages, mais aussi moduler le chimiotactisme de diverses cellules. La majorité des PAMs exercent leurs effets immunomodulateurs en interagissant avec des récepteurs couplés aux protéines G, dont les plus connus sont les récepteurs au fMLP et certains récepteurs aux chimiokines.

Le peptide antimicrobien P17, isolé à partir du venin de la fourmi *Tetramorium bicarinatum*, possède de nombreuses similitudes de structure avec le LL-37 notamment par son caractère cationique et sa structure linéaire en hélice α . Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'effet immunomodulateur du P17 sur les monocytes/macrophages humains. Nous nous sommes focalisés sur l'activité antifongique des monocytes/macrophages humains en réponse à *C. albicans*.

Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité du P17 à moduler la polarisation des macrophages dérivés de monocytes humains. Nous avons observé que le P17 induit la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 exprimant notamment les CLR α s, MR et Dectine-1 sous l'influence de l'activation de PPAR γ . Dectine-1 et MR sont deux récepteurs essentiels à l'élimination des levures *C. albicans*. De ce fait, nous nous sommes intéressées à la capacité du P17 à induire la clairance de *C. albicans* par les macrophages humains et avons observé que les macrophages activés par le P17 ont une capacité accrue à reconnaître, phagocyter et éliminer les levures *via* les récepteurs MR et Dectine-1. Ces macrophages activés par le peptide produisent davantage de RLO en activant la NADPH oxydase *via* la phosphorylation de sa sous unité p47 par la kinase Syk. Ils sécrètent également plus d'IL-1 β *via* l'activation de l'inflammasome médiée par l'activation par clivage protéolytique de la caspase-1. L'activation de ces deux axes est dépendante de l'action synergique des récepteurs MR et Dectine-1. Nous avons également démontré que le P17 agit sur la voie de l'acide arachidonique en favorisant la synthèse de LTB $_4$, sans affecter la voie de synthèse des prostaglandines.

Ainsi, le peptide P17 favorise l'élimination de *C. albicans* en activant l'axe de signalisation LTB $_4$ /PPAR γ /MR-Dectine-1 conduisant à l'activation des voies de

synthèse et la production des médiateurs pro-inflammatoires que sont l'IL-1 β et les ROS.

Résultats

**P17, an original antimicrobial peptide from ant venom,
promotes antifungal activities of macrophages through
the induction of C-type Lectin Receptors
dependent on LTB4-mediated PPAR γ activation**

Khaddouj Benmoussa^{1,2,3}, Hélène Authier^{1,2}, Mélissa Prat^{1,2}, Mohammad AlaEddine^{1,2}, Lise Lef evre^{1,2}, Mouna Chirine Rahabi^{1,2}, Jos e Bernad^{1,2}, Elsa Bonnaf e³, Jérome Leprince⁴, Bernard Pipy^{1,2}, Michel Treilhou^{3,¶} and Agnès Coste^{1,2,¶,*}.

¹Universit e de Toulouse, UPS, UMR 152 (PharmaDev), Toulouse, 31432, France

²IRD, UMR 152, Toulouse, 31432, France

³Biochimie et Toxicologie des Substances Biologiques, BTSB, Université de Toulouse, INU Champollion, Albi, France

⁴INSERM U982, PRIMACEN, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

¶ A. Coste and M. Treilhou are co-senior authors

* Correspondence: agnes.coste@univ-tlse3.fr (Tel. +33 5 61 32 29 67; FAX: +33 5 61 32 22 93)

Abstract

Despite the growing knowledge with regard to the immunomodulatory properties of antimicrobial peptides (AMPs), their impact on macrophage differentiation and on its associated microbicidal functions is still poorly understood. Here, we demonstrated that the P17, a new cationic antimicrobial peptide from ant venom, induces an alternative phenotype of human monocytes-derived macrophages (h-MDMs). This phenotype is characterized by a C-type lectin receptors (CLRs) signature composed of mannose receptor (MR) and Dectin-1 expression. Concomitantly, this activation is associated to an inflammatory profile characterized by reactive oxygen species (ROS), IL-1 β and TNF- α release. P17-activated h-MDMs exhibit an improved capacity to recognize and to engulf *C. albicans* through the overexpression both of MR and Dectin-1. This upregulation requires arachidonic acid (AA) mobilization and the activation of PPAR γ nuclear receptor through the leukotriene B4 (LTB4) production. AA/LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR signaling pathway is crucial for P17-mediated antifungal activity of h-MDMs, as indicated by the fact that the activation of this axis by P17 triggered ROS production and inflammasome-dependent IL-1 β release. Moreover, we showed that the increased antifungal immune response of h-MDMs by P17 was dependent on intracellular calcium mobilization triggered by the interaction of P17 with pertussis toxin-sensitive G protein coupled receptors on h-MDMs. Finally, we also demonstrated that P17-treated mice infected with *C. albicans* develop less severe gastrointestinal infection related to a higher efficiency of their macrophages to engulf *Candida*, to produce ROS and IL-1 β and to kill the yeasts. Altogether, these results identify P17 as an original activator of the fungicidal response of macrophages that acts upstream PPAR γ /CLRs axis and offer new immunomodulatory therapeutic perspectives in the field of infectious diseases.

Keywords

Macrophages, Antimicrobial peptides, *Candida albicans*, C-type lectin receptors, Arachidonic acid metabolism, PPAR γ , Inflammasome, IL-1 β , ROS

Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are small molecules produced by all living forms including bacteria, insects, plants and vertebrates. AMPs are especially found in skin and intestine, thus they constitute the first line of organism immune defense (1). Although AMPs can be cationic or anionic, most of them are cationic molecules with an amphipatic structure (2).

Unlike antibiotics, cationic AMPs have a microbicidal activity against a broad spectrum of pathogens including bacteria, yeast and viruses. They exercise their direct antimicrobial effect essentially by interacting with negatively charged membranes of target cells inducing membrane destabilization and cell death (1,3,4). These AMPs can also inhibit intracellular pathways critical for pathogen survival (5–7). Beside their microbicidal activity, most of cationic AMPs exhibit modulatory functions on immune cells. AMPs are produced by and act on several cell types including innate and adaptive immune cells (8–10). Their functions are multiples and depend on their structure, the microenvironment and the target cell. In humans, the two main classes of AMPs are cathelicidins and defensins (11,12). LL-37, the only member of the human cathelicidin antimicrobial peptide family, is well known to modulate innate and adaptive immune responses. Regarding adaptive immune response, this peptide induces T lymphocytes chemotaxis, regulates antigen-presenting cells activation and Th1 polarization of T cells (13). This AMP can also contribute to innate immune response by controlling the activation of monocytes, macrophages and dendritic cells (13). Indeed, it was previously described that LL-37 regulates cytokines and chemokines genes expression and protein secretion in human monocytes and macrophages (14–16). Moreover, this AMP promotes directly microbicidal activities of monocytes, macrophages and neutrophils by increasing pathogen phagocytosis, and reactive oxygen species (ROS) release (14,15,17–19). This human cathelicidin is also involved in immune cells apoptosis, angiogenesis and wound-healing regulation (20–24). Similarly to LL-37, immunomodulatory effects on innate immunity were also described for defensins and several AMPs found in insect venom (25,26). Usually, their effects on immune cells are mediated through G protein coupled receptors (GPCRs). Among the AMPs-activated GPCRs, the N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine receptors 1 and 2 (FPR1 and FPR2) and the chemokine receptors are the most involved (27–30).

Our laboratory has previously isolated two original AMPs from ant venom of *Tetramorium bicarinatum* (31). These peptides, named P16 (Bicarinalin) and P17, are cationic, C-terminal amidated and adopt an α -helix conformation. In this previous study, the authors demonstrated a potent and broad antibacterial activity for the Bicarinalin (31). Although no microbicidal activity for P17 was demonstrated, this AMP could be a good candidate to modulate immune response because of its structural properties and its low toxicity on human cells.

Despite the growing knowledge with regard to the immunomodulatory properties of AMPs, little is known about how they control macrophage differentiation and its associated microbicidal functions. Emerging evidence indicates that the state of macrophage polarization plays a critical role in the host susceptibility against infections. Two programs broadly classify polarized macrophages: classical (M1) and alternative (M2) (32,33). The M1 program arises from type 1 inflammatory conditions (e.g. IFN γ) and is characterized by elevated levels of opsonic receptors. M1 macrophages highly produce pro-inflammatory effector molecules, such as reactive oxygen and nitrogen species, and pro-inflammatory cytokines (interleukin (IL)-1 β , TNF α , IL-6 and IL-12). These macrophages contribute to inflammation and microbial killing. M2 alternative macrophages are characterized by abundant levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and non-opsonic receptors, such as C-type lectin (CLRs) and scavengers receptors. These alternative-activated macrophages can also efficiently participate to pathogen clearance through CLRs-mediated recognition and phagocytosis (34–36).

Among the CLRs, Dectin-1 and Mannose receptor (MR) of the phagocytic system have been described to be essential in antifungal functions of macrophages (34,35,37–42)

After binding of β -glucans and mannans, the major cell wall components of *Candida albicans*, these CLRs act in a cooperative manner to activate syk-p47^{phox} axis essential to reactive oxygen species (ROS) production and inflammasome-dependent signaling pathways for IL-1 β release (36,43,44). Thus, the induction of these two CLRs at the surface of macrophages is critical for the fungicidal response.

The balance of macrophage differentiation toward an alternative phenotype, known to highly express MR and Dectin-1, is controlled by the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation (34,43,44). Among PPAR γ ligands, lipids from the metabolism of arachidonic acid through the COX1/COX2 cyclooxygenases and 5- and 12/15- lipoxygenases, are considered to be critical for PPAR γ endogenous activation (37,45,46). We have previously demonstrated that PPAR γ activation in macrophages promotes the transcription of Dectin-1 and MR and its associated antifungal functions (34,43,47). Although the processes leading to PPAR γ activation, such as arachidonic acid (AA) release and its subsequent metabolic conversion are important aspects of macrophage alternative polarization and CLRs-dependent antifungal defense, the impact of AMPs on this signaling is not yet elucidated.

In the present study, we demonstrated that P17 promotes alternative activation of the human monocytes-derived macrophages (h-MDMs) characterized simultaneously by a CLRs signature composed of MR and Dectin-1 and a proinflammatory profile. Interestingly, this AMP also improves the recognition and the phagocytosis of *C. albicans* by h-MDMs through the overexpression of MR and Dectin-1. This upregulation requires AA release and the activation of PPAR γ through the leukotriene B4 (LTB4) production. The activation of AA/LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR axis by P17 triggers ROS production and inflammasome-dependent IL-1 β release critical in fungicidal activity of P17-activated h-MDMs. Finally, we validated the efficiency of P17 to eliminate *Candida albicans in vivo*. Indeed, P17-treated mice infected with *C. albicans* develop less severe gastrointestinal infection related to a higher ability of their macrophages to engulf *Candida*, to produce ROS, IL1 β and to kill the yeasts as compared to untreated mice. Altogether, these results identify P17 as an original activator of the fungicidal response of macrophages and support that this novel AMP may constitute promising compound to restrain fungal infections.

Material and Methods

P17 antimicrobial peptide

P17 peptide (LFKEILEKIKAKL-NH₂) and its randomly-designed C-terminal amidated scrambled counterpart (KIKEEKFLLKLI-NH₂) were synthesized on a Liberty microwave assisted automated peptide synthesizer (CEM, Saclay, France) at a purity grade higher than 99% as previously described (31,48). The authenticity and the molecular identity of the synthetic peptides were controlled by MALDI-TOF-MS.

Preparation of Human Monocyte-Derived Macrophages

Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from the blood of healthy volunteers by a density gradient centrifugation method on Lymphoprep (Abcys). Monocytes were isolated from mononuclear cells by adherence to plastic for 2 h in special macrophage serum-free medium (SFM; Life Technologies) with L-glutamine at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Non adherent cells were removed by washing with Hanks' balanced salt solution (Gibco, Invitrogen), and the remaining adherent cells (>85% monocytes) were

incubated in SFM medium. The human monocyte-derived macrophages were obtained after 24h of culture in SFM medium. Adherent human monocyte-derived macrophages were pre-incubated 30 min or not before the addition of P17 (200 µg/mL) with GW9662 (1 nM, Santa Cruz Biotechnology), MAFP (20 µM, Calbiochem), MK-886 (10 µM; Calbiochem), N-acetyl-Cysteine (10 mM, Sigma) or Z-Vad-FMK (ZVAD) (50 µM, Calbiochem) for 30 minutes.

***Candida albicans* strains**

The strain of *C. albicans* used throughout these experiments was isolated from a blood culture of a patient in the Toulouse-Rangueil University Hospital. The isolate was identified as *Candida albicans* based on common laboratory criteria and cultured on Sabouraud dextrose agar (SDA; Biorad, Hercules, USA) plates containing gentamicin and chloramphenicol. *Candida albicans* was maintained by transfers on SDA plates. Growth from an 18- to 24-h SDA culture of *C. albicans* was suspended in sterile saline buffer (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS); Lifetechnologies).

Killing Assay

Human monocyte-derived macrophages were treated with P17 (200 µg/mL) for 24h and were allowed to interact for 40 min at 37 °C with *C. albicans* (at a ratio of 0.3 yeast per macrophage) as previously described (36,40). Unbound yeasts were removed by four washes with medium. Human monocyte-derived macrophages were then incubated at 37 °C for 4 h. After incubation, the medium was removed and cells were lysed. The CFU of *C. albicans* were quantified after plating on Sabouraud plates for 24h to 48h at 37 °C.

In some experiments, monocytes-derived macrophages were incubated with 1 µg per well of Mannose receptor siRNA (Santa Cruz Biotechnology sc-45360) and/or Dectin-1 siRNA (Santa Cruz Biotechnology sc-63276) for 6h into siRNA transfection medium (siRNA reagent system, Santa Cruz Biotechnology sc-45064) according to the manufacturer's instructions before the addition of P17.

Binding and phagocytosis assay

Human monocyte-derived macrophages were treated with P17 (200 µg/mL) for 24h and were then challenged with GFP-labeled yeasts at a ratio of 6 yeasts per macrophage. In some experiments the monocyte-derived macrophages were incubated at 4°C for 20 min with 500 µg/mL of mannans and/or laminarins before the addition of the yeasts. The binding was performed at 4°C and the phagocytosis was initiated at 37 °C. The number of *C. albicans* bound or engulfed by macrophages was determined by fluorescence quantification using the Envision fluorimetry-based approach (Perkin Elmer).

Assay for ROS Production

Human monocyte-derived macrophages were treated with P17 (200 µg/mL) for 24h and ROS production was measured by chemiluminescence in the presence of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol, Sigma) using a thermostatically (37°C) controlled luminometer (Envision; Perkin Elmer). The generation of chemiluminescence was monitored continuously for 1h30 after challenge or not with *C. albicans* (yeast-to-macrophage ratio: 3:1). Statistical analysis was performed using the area under the curve expressed in counts x seconds.

ELISA Cytokine Titration

Human monocyte-derived macrophages were treated with P17 (200 µg/mL) for 24h and challenged with *C. albicans* at a ratio of 3 yeasts per macrophage for 8 h. The release of TNF-

α , IL-1 β , IL-12 and IL-10 in the cell supernatants was determined with a commercially available OptiEIA kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Human monocyte-derived macrophages were treated with P17 (200 μ g/mL) for 24h and challenged for 8 h with *C. albicans* at a ratio of 3 yeasts per macrophage. Human monocyte-derived macrophages were lysed with RIPA buffer (Sigma) and protein extracts were separated in SDS-PAGE as previously described (37). After protein transfer, membranes were incubated overnight at 4 °C with a rabbit anti-phosphorylated p47^{phox} (Assay biotechnology, A1171; 1/260), a rabbit anti-caspase-1 (Biovision, 3019-100; 1/100) or a goat anti-GAPDH antibody (Cell Signaling, #5174; 1/1,000) and then for 1 h at room temperature with a peroxidase conjugated secondary antibody. Membranes were washed, and proteins of interest were visualized with WesternBright™ ECL (Advansta) or the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific) for the GAPDH. Images have been cropped for presentation.

Flow Cytometry

Human monocyte-derived macrophages were treated with P17 (200 μ g/mL) for 24h and then incubated with ice-cold PBS and gently scraped. Collected cells were centrifuged at 1,500 r.p.m. for 10 min and the cell pellet was suspended in PBS medium supplemented with 1% fetal calf serum (FCS). Surface expressed Mannose receptor, Dectin-1, DC-SIGN, CD16 or CD36 was detected, respectively, using PerCP-Dectin-1 monoclonal antibody (mAb; R&D FAB1859C-100, 1/40), PE-DC-SIGN (mAb; BD Biosciences 551 265, 1/20), FITC-CD16 (mAb; PNIM 0814, 1/20) or APC-CD36 monoclonal antibodies (mAb; BD Biosciences 550 956, 1/40). To evaluate the mannose receptor (MR) surface expression, we have used MR-specific ligand conjugated with FITC (Sigma A7790, 1 mg/mL/100). All staining were performed on PBS⁻ 1% FCS medium. A population of 10,000 cells was analyzed for each data point. All analyses were carried out in a Becton Dickinson FACScalibur using the FACSDiva version 6.2 software.

Reverse Transcription and Real-Time PCR

Human monocyte-derived macrophages were treated with P17 (200 μ g/mL) and/or LTB4 (100 nM; Cayman Chemical Company) for 8h.

The mRNA preparation was made using the EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super Kit (Bio Basic) using the manufacturer's protocol. Synthesis of cDNA was performed according to the manufacturer's recommendations (Thermo electron). RT-qPCR was performed on a LightCycler 480 system using LightCycler SYBR Green I Master (Roche Diagnostics). The primers (Eurogentec) were designed with the software Primer 3. GAPDH mRNA was used as the invariant control. Serially diluted samples of pooled cDNA were used as external standards in each run for the quantification. Primer sequences are listed in table 1.

Arachidonic acid mobilization and EIA Lipid Quantification

Human monocyte-derived macrophages were pre-labeled with [³H]arachidonic acid. Briefly, human monocyte-derived macrophages (5 \times 10⁵ per well in 48-well plates) were cultured for 18 hours at 37°C in presence of P17 (200 μ g/mL) and 1 μ Ci/mL [³H]arachidonic acid. The culture medium was then removed and pre-labeled macrophages were washed three times with 0.5 mL SFM. The cells were challenged with *C. albicans* at a ratio of 3 yeasts per macrophage for 2 h. The [³H] arachidonic acid metabolites released into the culture medium were quantified by measurement of the radioactivity by beta liquid scintillation counting using a 1217 Wallac Rackbeta LKB 1217, as previously described (37).

Determination of Intracellular Calcium Concentration

Intracellular calcium concentration was measured using the fluorescent probe Fluo 3-AM (Molecular Probe). Briefly, human monocyte-derived macrophages (1.5×10^5) were incubated with 11.5×10^{-6} M Fluo 3-AM for 30 min at 37 °C. The time course of the intracytosolic Ca^{2+} level was recorded every 0.5 s for a total period of 3 min after the addition of P17 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In desensitization experiments, a second injection of bacterial N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine peptide (fMLP) or P17 was performed at the end of fluorescence record and the time course of the intracytosolic Ca^{2+} level was recorded for supplemental 3 minutes. In some experiments, human monocyte-derived macrophages were pre-incubated with U73122 (2 μM) or with calcium-free HBSS for 10 min before the addition of P17. Fluorescence was quantified using the Envision fluorimetry-based approach (Perkin Elmer).

***In vivo* experiment**

Male mice aged 12 weeks on C57BL/6 background were used for *in vivo* experiments. Mice were bred and handled by the protocols approved by the Conseil Scientifique du Centre de Formation et de Recherche Experimental Medico Chirurgical and the ethics board of the Midi-Pyrénées ethic committee for animal experimentation (Experimentation permit number 31–067, approval no. B3155503). All cages were changed twice weekly, and all manipulations of the animals were carried out in a laminar blow hood under aseptic conditions. The photoperiod was adjusted to 12h light and 12h dark. C57BL/6 mice were purchased from Janvier (France).

The gastrointestinal infection with the *C. albicans* strain 98/26135 was established by oral infection with 50×10^6 *C. albicans* per mouse. To establish esophageal and GI candidiasis in mice, we performed intra-esophageal infection with 5×10^7 viable cells of *C. albicans* in sterile saline solution (500 $\mu\text{l}/\text{mouse}$). No antibiotic or immunosuppressive treatment was used to facilitate mucosal infection by *C. albicans* of the oral cavity and GI tract.

Mice were treated intraperitoneally (i.p.) with P17 (10 μg per mouse) 1 day before the day of the infection with *C. albicans* and then every 2 days (four injections). Control groups received saline solution. Therapeutic studies were performed on separate groups of six mice infected with *C. albicans* treated or not with P17.

The body weight of each mouse was recorded daily, and the condition of each mouse was assessed twice daily. Feces were collected on days 4 and 5 post-infection. At day 6 post-infection all mice were euthanized using CO_2 asphyxia and the caecum and colon were aseptically removed to evaluate *C. albicans* colonization. To quantify the number of viable *C. albicans* in caecum, colon and feces, each tissue sample removed was mechanically homogenized in 1 ml of saline with 100 U of penicillin/ml and 100 μg of streptomycin/ml. Serial dilutions of homogenate were plated onto SDA for quantitative determination of the number of *C. albicans* in the tissue samples. Plates were incubated at 37°C for 1–2 days and the number of colonies was counted.

After euthanasia, resident peritoneal cells were harvested by washing the peritoneal cavity with 5 ml of sterile 199 medium with Hanks' salts as previously described (6). Collected cells were centrifuged at $400 \times g$ for 8 min and the cell pellet was suspended in serum-free medium optimized for macrophage culture (Invitrogen Life Technologies). Cells were allowed to adhere for 2 h at 37 C and 5% CO_2 . Non adherent cells were then removed by washing with HBSS. The macrophage monolayers were used to investigate their capacity to bind, to engulf and to kill *Candida albicans* and to produce ROS and IL-1 β in response to yeast challenge.

Statistical Analysis

For each experiment, the data were subjected to one-way analysis of variance followed by the means multiple comparison method of Bonferroni–Dunnnett. $P < 0.05$ was considered as the level of statistical significance.

Results

P17 promotes alternative activation of h-MDMs characterized by an inflammatory signature.

In order to assess the impact of P17 in h-MDMs differentiation, we evaluated the expression of specific markers of classical and alternative activation in P17-treated h-MDMs. Overall, P17-treated h-MDMs displayed a downregulation of membrane receptors characteristics of classical M1 polarization, such as CD11b (*Itgam*), CD16 (*Fcgr3*) and CD32 (*Fcgr2*), which was mirrored by an upregulation of MR (*Mrc1*), Dectin-1 (*Clec7a*), DC-SIGN (*Cd209*), and CD36 (*Cd36*) alternative activation markers (Figure 1A). This finding was further supported by the reciprocal increase of anti-inflammatory IL-10 (*Il10*), IL-1 receptor antagonist (*Il1ra*), TGF β (*Tgfb1*), CCL17 (*Ccl17*) and CCR2 (*Ccr2*) and reduction of IL-12 (*Il12*) and CCL-2 (*Ccl2*) mRNA expression. Moreover, consistent with increased mRNA encoding alternative M2 activation markers, protein levels of MR, Dectin-1 and IL-10 were significantly increased (Figure 1B-C). The acquisition of this alternative phenotype upon P17 activation is reinforced by the strong decrease of IL-12 protein level (Figure 1C). We observed unaffected protein amounts for DC-SIGN, CD16 and CD36 (Figure 1B).

Surprisingly, the increase in alternative markers in P17-treated h-MDMs was accompanied by an inflammatory signature, as demonstrated by an augmentation in the mRNA level of the proinflammatory cytokines IL-1 β (*Il1b*), TNF- α (*Tnfa*) and IL-6 (*Il6*). Consistently, the production of IL-1 β and TNF- α was also induced in P17-treated h-MDMs (Figure 1C). In line with increased IL-1 β production in P17-treated h-MDMs, the processing of pro-caspase-1 into its p20 subunit, which is a hallmark of caspase-1 activation, was significantly increased in P17-treated h-MDMs, demonstrating that the caspase-1-induced IL-1 β release is activated by P17 (Figure 1D).

To further explore the proinflammatory impact of P17 on h-MDMs, we next assessed ROS production by P17-treated h-MDMs. We demonstrated that ROS release was strongly increased in P17-treated h-MDMs (Figure 1E). In line, the mRNA level and the amount of phosphorylated p47^{phox}, a cytosolic subunit of the NADPH oxidase complex whose activation is essential to ROS release, were significantly increased in h-MDMs activated by P17 (Figure 1F,G).

Taken together, these results indicated that P17 induces an alternative phenotype characterized simultaneously by a CLRs signature composed of MR and Dectin-1 and a proinflammatory profile.

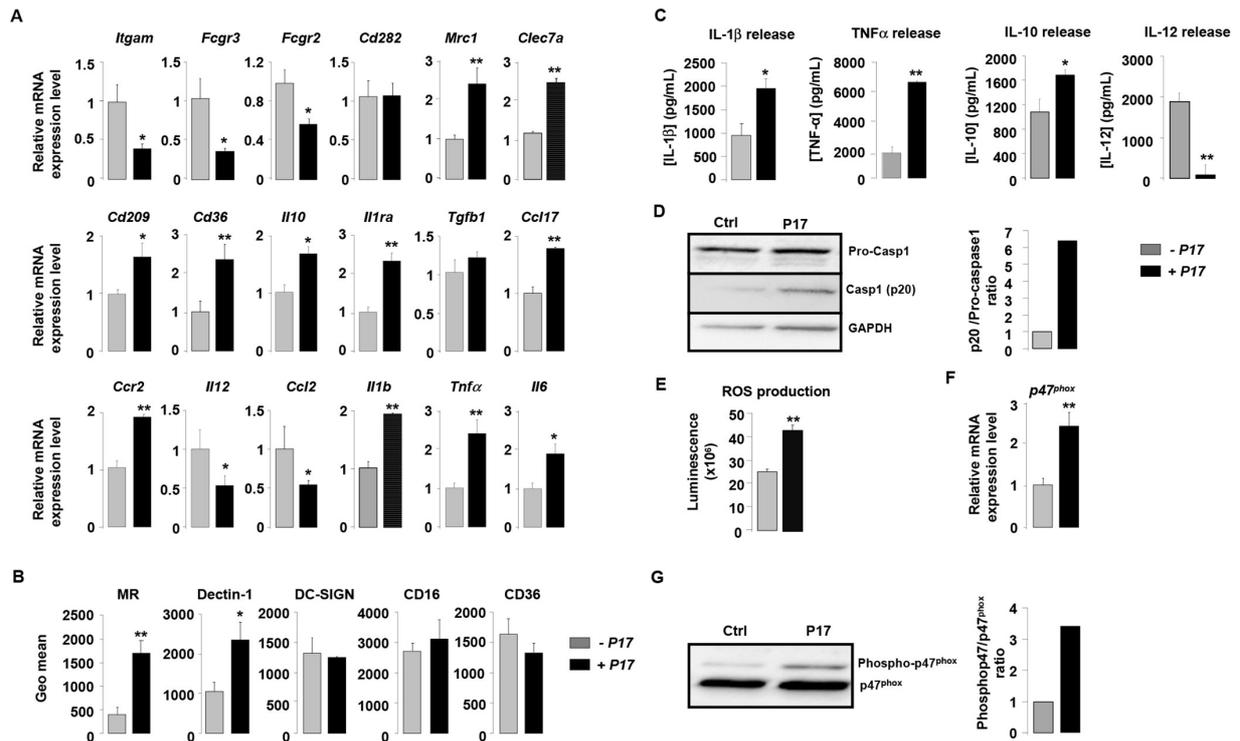


Figure 1. P17 mediates an alternative phenotype of h-MDMs characterized by CLR and inflammatory signatures.

(A) Gene expression analysis of markers of classical and alternative polarization in h-MDMs treated or not with P17. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(B) MR, Dectin-1, DC-Sign, CD16 and CD36 protein expression in h-MDMs treated or not with P17. Graphs represent geomean fluorescence quantification for the indicated proteins.

(C) TNF α , IL-1 β , IL-12 and IL-10 release by h-MDMs treated or not with P17 after challenge with *C. albicans*.

(D) Immunoblot analysis of caspase-1 p20 fragment cleavage in h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge. Band intensity was quantified with Image J software and was represented as the ratio between the band intensities of p20 and of pro-caspase-1.

(E) ROS production by h-MDMs treated or not with P17 after challenge with *C. albicans*.

(F) Gene expression of P47^{phox} in h-MDMs treated or not with P17. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(G) Phosphorylated p47^{phox} immunoblot after *C. albicans* challenge in h-MDMs treated or not with P17. Band intensity was quantified with Image J software and was represented as the ratio between the band intensities of phosphorylated p47^{phox} and of P47^{phox}.

Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments.

*p<0.05, **p<0.01 compared to the respective untreated control.

P17 induces MR and Dectin-1 expression on h-MDMs through PPAR γ activation dependent on LTB $_4$ production.

The nuclear receptor PPAR γ is a key component of the signaling pathway leading to alternative activation of macrophages and directly controls the expression of CLRs (34,36,44). To identify how P17 may have an impact on MR and Dectin-1 overexpression, we evaluated whether P17 can regulate PPAR γ activation. The mRNA levels of PPAR γ (*Pparg*) and of its target gene SRB1 (*Scarbl*) were significantly increased in P17-treated h-MDMs, suggesting that P17 improved PPAR γ activation.

To further explore whether P17-induced PPAR γ activation was involved in MR and Dectin-1 overexpression, we evaluated the gene expression of these two CLRs in presence of GW9662, a selective PPAR γ antagonist. The treatment of P17-activated h-MDMs with GW9662 inhibited *Mrc1* and *Clec7a* gene overexpression, demonstrating that PPAR γ is critically required for P17-induced Dectin-1 and MR expression on human h-MDMs (Figure 2A).

PPAR γ is activated by endogenous ligands derived from arachidonic acid (AA) (34,43,44,49). The COX1/2 cyclooxygenase, 5- and 12/15 lipoxygenases (LOX) are considered to be critical for the conversion of AA into endogenous PPAR γ ligands. To assess whether P17 can coordinate PPAR γ ligand availability, we evaluated the gene expression of enzymes involved in both COX and LOX signaling pathways. The mRNA levels of cPLA2 (*Pla2g4a*), enzyme needed for AA release from membrane phospholipids, 5-LOXX (*Alox5*), FLAP (5-LOXX activating enzyme) (*Alox5ap*) and LTA4 hydrolase (*Lta4h*), critical for LTB $_4$ synthesis, were strongly increased in P17-treated h-MDM (Figure 2B). Moreover, the mRNA levels of COX-2 (*Ptgs2*), PGES (*Ptges*) and 15-LOXX (*Alox15*) were not differentially expressed in untreated and P-17-treated h-MDMs, supporting that P17 had no incidence on COX-2 and 12/15 LOX signaling pathways.

Then, we determined whether these effects on gene expression also translate into changes in ligand availability. Consistent with cPLA2 gene overexpression, the mobilization of AA was induced in P17-treated h-MDMs (Figure 2C). Furthermore, in line with LTA4 hydrolase expression in P-17-treated h-MDMs, we observed strong increase of LTB $_4$ release (Figure 2D). These data suggest that the generation of LTB $_4$ metabolites by h-MDMs upon P17 treatment is dependent both on AA mobilization and metabolism.

To confirm that P17 positively regulate MR and Dectin-1 expression through the AA metabolism, we determined *Mrc1* and *Clec7a* gene expression in presence of MAFP, a specific cPLA2 inhibitor, and MK-886, a FLAP inhibitor which prevents 5-LOXX activation. The increase of MR and Dectin-1 mRNA levels in P17-treated h-MDMs was completely lost in presence of MAFP and MK-886 (Figure 2E), further supporting that P17 controls MR and Dectin-1 expression through AA metabolism.

PPAR γ activity, as determinate by the induction of MR, Dectin-1 and SRB1 specific PPAR γ target genes, was increased similarly with P17 and LTB $_4$ (Figure 2F). Furthermore, the addition of both P17 and LTB $_4$ did not showed any additive effect, suggesting that P17 regulates MR and Dectin-1 surface expression by controlling PPAR γ activation through the LTB $_4$ production. Interestingly, the inhibition of P17-induced PPAR γ target genes expression by MAFP was restored by the addition of LTB $_4$, clearly establishing that P17-mediated PPAR γ activation through LTB $_4$ synthesis. Overall these data showed that P17 induces alternative activation of h-MDMs characterized by Dectin-1 and MR expression through LTB $_4$ -mediated PPAR γ activation.

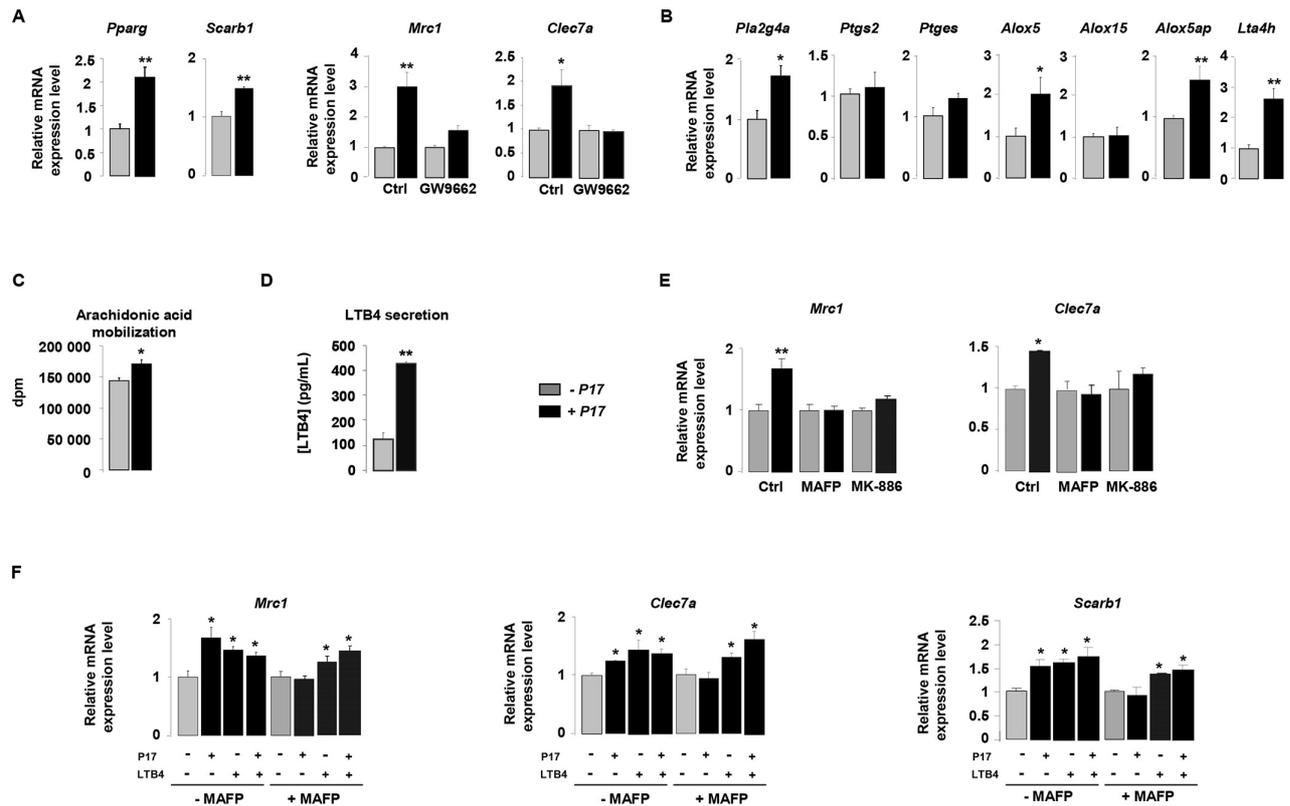


Figure 2. P17 promotes CLR expression on h-MDMs through LTB4-mediated PPAR γ activation.

(A) Gene expression analysis of PPAR γ , SRB1, MR and Dectin-1 in h-MDMs treated or not with P17, in presence of a selective PPAR γ antagonist GW9662. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(B) Gene expression analysis of arachidonic acid metabolic enzymes in h-MDMs treated or not with P17. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(C) [3 H]AA mobilization in membrane phospholipids of h-MDMs treated or not with P17.

(D) LTB4 production by h-MDMs treated or not with P17.

(E) Gene expression analysis of MR and Dectin-1 in h-MDMs treated or not with P17, in presence of MAFP, a specific cPLA2 inhibitor, and MK-886, a FLAP inhibitor which prevents 5-LOXX activation. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(F) Gene expression analysis of MR, Dectin-1, SRB1 and CD36 in h-MDMs treated or not with P17, in presence of MAFP and/or LTB4. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control. Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the respective untreated control.

P17 improves fungicidal properties of h-MDM through AA/LTB4/PPAR γ /MR-Dectin-1 signaling.

Previous works from our laboratory established the importance of alternative activation in the fungicidal functions of macrophages (Coste et al., 2003, 2008; Galès et al., 2010). On the basis of the current findings demonstrating an effect for P17 on alternative polarization, we next investigated whether P17-treated h-MDMs could have an impact on the *C. albicans* clearance. After P17 treatment, h-MDMs showed a robust increase in their ability to kill *C. albicans*, demonstrating that P17 promotes macrophage-intrinsic antifungal activity (Figure 3A). Consistent with our observation, P17-treated h-MDMs were more efficient to bind and to engulf *C. albicans* (Figure 3B,C). Interestingly, the induction of ROS production by P17 is essential in *in vitro* fungicidal activity of P17-activated h-MDMs, since the use of antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) totally abolished the fungicidal effect of P17-treated h-MDMs against *C. albicans* (Figure 3D).

Then, we examined whether ROS production, which act as a common cellular signal upstream of the inflammasome activation (50), was responsible for IL-1 β induction by P17 in response to *Candida*. While the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) suppressed *Candida*-induced IL-1 β secretion by P17-activated h-MDMs, the inhibition of caspase activation by the addition of ZVAD did not change ROS production by P17-activated h-MDMs after *Candida* challenge (Figure 3E,F). Therefore, these results showed that in response to *Candida*, ROS production occurred upstream of the caspase-1-induced IL-1 β production.

To determine whether P17-mediated PPAR γ activation dependently on LTB4 synthesis was involved in fungicidal activity of P17-treated h-MDMs, we evaluated their ability to kill *C. albicans* in presence of a selective PPAR γ antagonist GW9662, a specific inhibitor of AA mobilization MAFP, or of an inhibitor of 5-LOXX activation MK-886. The increased capacity of P17-treated h-MDMs to kill *C. albicans* was totally inhibited in presence of GW9662, MAFP and MK-886 (Figure 3G). Consistent with these findings, the addition of these inhibitors abolished P17-mediated ROS, IL1 β release and caspase-1 activation of h-MDMs in response to *C. albicans* (Figure 3H-J).

To explore whether the increased expression of Dectin-1 and MR on P17-treated h-MDMs has any functional consequence in *C. albicans* elimination, we assessed the ability of P17-treated h-MDMs deficient for Dectin-1 and/or MR to kill the yeast. The gene silencing for Dectin-1 and/or MR in P17-treated h-MDMs resulted in the abolition of the ability of these cells to kill more efficiently *C. albicans* (Figure 3K). In terms of recognition of *C. albicans*, the pre-treatment of P17-activated h-MDMs with soluble MR and Dectin-1 blocking agents (mannan and/or laminarin respectively) abrogated the increased capacity for P17-treated h-MDMs to interact with the yeast (Figure 3L). Moreover, this pre-treatment also totally abolished the induction of ROS production after *Candida albicans* challenge (Figure 3M).

Taken together, these data provided evidence that MR and dectin-1 are critical in fungicidal properties of h-MDMs mediated by P17 and support the importance of AA/LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR axis in the strengthening of antifungal functions of h-MDMs by this AMP.

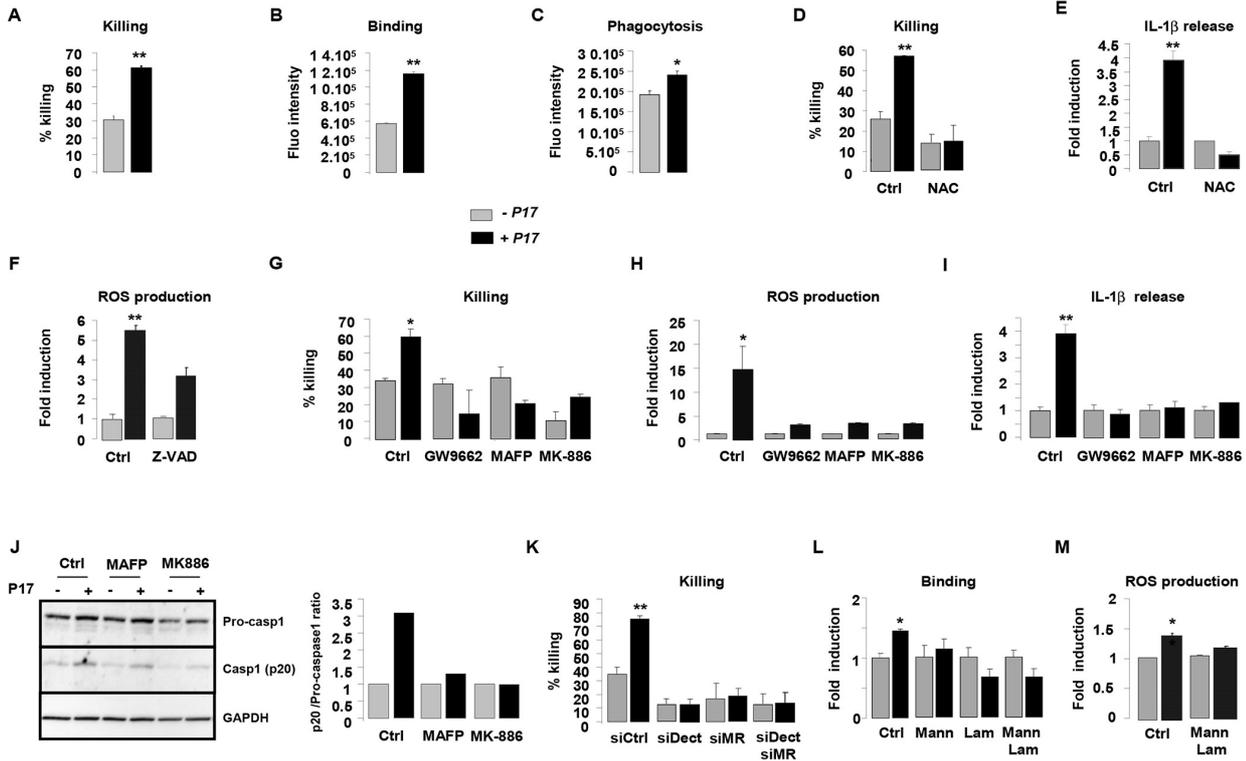


Figure 3. P17 improves antifungal properties of h-MDMs through AA/LTB₄/PPAR γ /Dectin-1-MR signaling pathway.

(A) Killing assay of h-MDMs treated or not with P17 incubated with *C. albicans*.

(B-C) Binding (B) and Phagocytosis (C) of *C. albicans* by h-MDMs treated or not with P17.

(D) Killing assay of h-MDMs treated or not with P17 incubated with *C. albicans* in presence of antioxidant N-acetyl cysteine (NAC).

(E) IL-1 β release by h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge in presence of antioxidant N-acetyl cysteine (NAC). The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.

(F) ROS production by h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge in presence of caspases inhibitor ZVAD. The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.

(G) Killing assay of h-MDMs treated or not with P17 incubated with *C. albicans* in presence of a selective PPAR γ antagonist (GW9662), a specific inhibitor of AA mobilization (MAFP), or of an inhibitor of 5-LOXX activation (MK-886).

(H-I) ROS (H) and IL-1 β (I) production by h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge in presence of a selective PPAR γ antagonist (GW9662), a specific inhibitor of AA mobilization (MAFP), or of an inhibitor of 5-LOXX activation (MK-886). The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.

(J) Immunoblot analysis of caspase-1 p20 fragment cleavage in h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge in presence of a specific inhibitor of AA mobilization (MAFP) or of 5-LOXX activation inhibitor (MK-886). Band intensity was quantified with Image J software and was represented as the ratio between the band intensities of p20 and of pro-caspase-1.

(K) Killing assay of h-MDMs silenced for Dectin-1 and/or MR treated or not with P17 after *C. albicans* challenge.

(L) Binding of *C. albicans* by h-MDMs treated or not with P17 in presence of mannan and/or laminarin. The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.

(M) ROS production by h-MDMs silenced for Dectin-1 and MR treated or not with P17 after *C. albicans* challenge. The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.

Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments.

*p<0.05, **p<0.01 compared to the respective untreated control.

The interaction between P17 and GPCR controls antifungal properties of h-MDM via the induction of intracellular calcium mobilization.

Several studies demonstrated that AMPs induce intracellular calcium mobilization in immune cells (51–54). On this basis, we evaluated cytosolic calcium concentration in P17-activated h-MDMs. P17 treatment induced a significant augmentation of intracellular calcium concentration in h-MDMs, indicating that this AMP triggers intracellular calcium signal (Figure 4A). In order to determine the source of this calcium release, we assessed calcium mobilization in calcium-deprived medium to inhibit extracellular calcium influx (HBSS), and in presence of U73122, an inhibitor of the intracellular pools calcium release. Interestingly, calcium mobilization was abolished both in presence of HBSS and U73122 (Figure 4A), suggesting that the P17-increase intracellular calcium concentration in h-MDMs was dependent on extracellular calcium influx and intracellular calcium stores mobilization.

Most of AMPs immunomodulatory functions are mediated through G protein coupled receptors (GPCRs) (28,29,52,55). In order to evaluate the involvement of these receptors in the activation of h-MDMs mediated by P17, we used pertussis toxin (PTX), known to inhibit some GPCRs. PTX treatment totally inhibited the mobilization of calcium in P17-activated h-MDMs (Figure 4B), suggesting that P17 activity on h-MDMs were mediated by PTX-sensitive GPCR interaction. Interestingly, although PTX-sensitive fMLP (N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine) receptors 1 and 2 (FPR1 and FPR2) are the main GPCRs involved in the modulation of immune response by AMPs, we demonstrated here that the desensitization of these receptors by the addition of fMLP did not affect P17-induced calcium mobilization (Figure 4C).

To investigate the role of P17-induced calcium mobilization in the fungicidal properties of P17-treated h-MDMs, we evaluated their capacity to kill the yeasts in presence of an intracellular calcium chelator BAPTA-AM. The increase of ability to kill *C. albicans* of P17-activated h-MDMs was completely lost in presence of BAPTA-AM (Figure 4D). These findings were consistent with the lack of induction of ROS and IL-1 β production in BAPTA-AM pretreated h-MDMs activated with P17 (Figure 4E,F), further supporting that the intracellular mobilization of calcium is essential in fungicidal properties of P17-treated h-MDMs. Altogether, these data highlight that P17 modulates antifungal immune response of h-MDMs through PTX-sensitive GPCR-triggered intracellular calcium mobilization.

***In vivo* P17 treatment induces fungicidal properties of macrophages hence improving the regression of gastrointestinal candidiasis**

On the basis of the current findings demonstrating the microbicidal activity of P17-treated h-MDM against *C. albicans*, we next explored whether the P17 treatment could have an impact on the *in vivo* candidiasis outcome. In this context, we evaluated the fungal burden in the intestinal tract and the macrophage microbicidal functions in a murine experimental model of gastrointestinal candidiasis. P17-treated mice (P17) infected with *C. albicans* developed less severe gastrointestinal infection than untreated mice (NaCl), as demonstrated by lesser weight loss and by reduced fungal burden as reflected by a decreased number of CFU in the colon, caecum and feces of mice treated with P17 (Figure 5A-C).

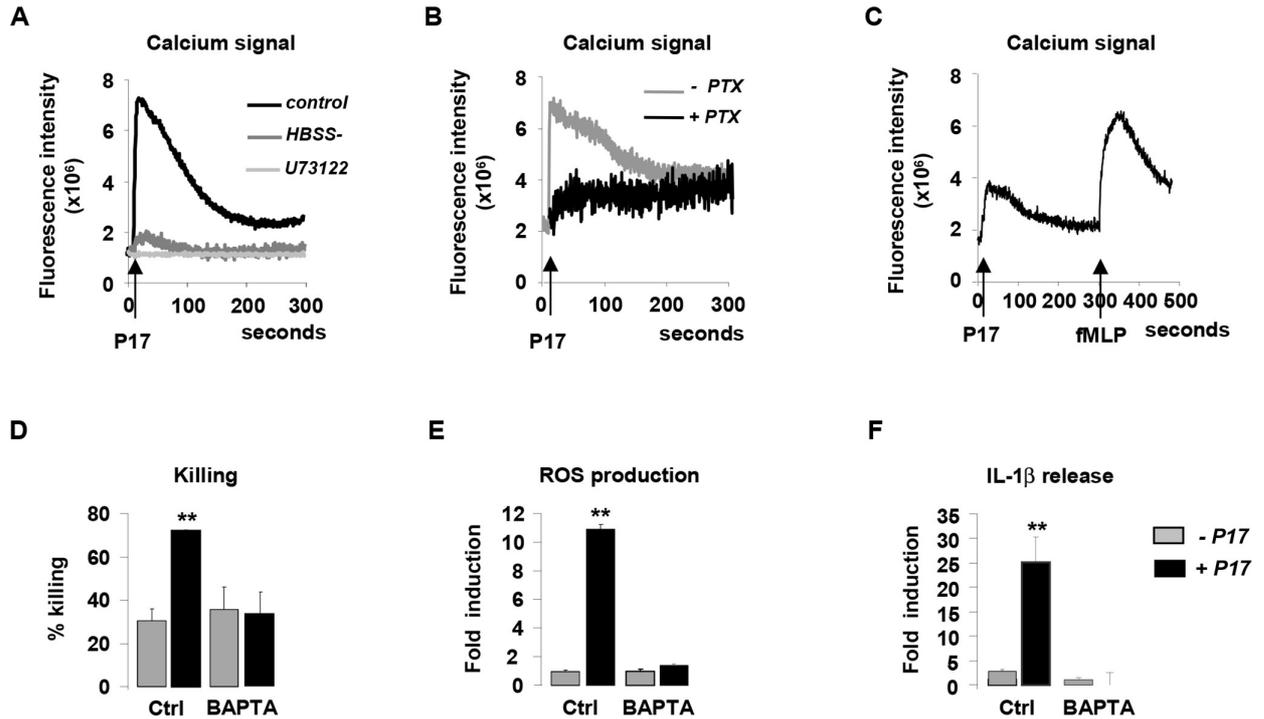


Figure 4. P17 controls antifungal properties of h-MDMs via the induction of intracellular calcium mobilization dependent on PTX-sensitive GPCR interaction.

(A-C) Intracellular calcium concentration in h-MDMs treated or not with P17 using fluorescent probe Fluo 3-AM. (A) Calcium concentration in h-MDMs treated or not with P17 in presence of calcium-deprived medium (HBSS-) and an inhibitor of the intracellular pools calcium release (U73122). (B) Calcium concentration in h-MDM treated or not with P17 in presence of pertussis toxin (PTX). (C) Calcium concentration in h-MDMs treated or not with P17 after desensitization of fMLP receptors. (D) Killing assay of h-MDMs treated or not with P17 incubated with *C. albicans* in presence of calcium chelator (BAPTA-AM). (E-F) ROS (E) and IL-1 β (F) release by h-MDMs treated or not with P17 in presence of calcium chelator (BAPTA-AM) after *C. albicans* challenge. The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.

To investigate whether the effect of P17 on decreased *Candida* gastrointestinal colonization can be correlated to its impact on fungicidal functions of macrophages, we evaluated the capacity of macrophages from P17-treated mice to kill yeasts *in vitro*. Compared with macrophages from untreated mice, macrophages from P17-treated mice showed an increase in their ability to kill *C. albicans* (Figure 5D). Consistent with our observation, macrophages from P17-treated mice were more efficient in engulfing *C. albicans* and producing ROS and IL-1 β (Figure 5E-H). Taken together, these data provide *in vivo* evidence that P17 improves macrophage-intrinsic antifungal activity and support that P17 may constitute promising compound to restrain gastrointestinal fungal infection.

Discussion

Although the majority of human antimicrobial peptides (AMPs) are currently known to exert antimicrobial activities against a broad spectrum of pathogenic microorganisms, they also can modulate the functions of immune cells (8). Among the two major groups of AMPs in humans, cathelicidins and defensins, the LL37 cathelicidin is the major AMP described for its immunomodulatory properties. Indeed, the LL37 controls in several cells, particularly in human monocytes and murine macrophages, the transcription and the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines (Bowdish et al., 2004; Elssner et al., 2004; Scott et al., 2002; Yu et al., 2007). Thus, the LL37 participates to the immune cell differentiation, activation and chemotaxis (13,56). Altogether these properties confer to LL37 a strong microbicidal activity through its involvement in the control of inflammatory and anti-infectious signaling in macrophages. These immunomodulatory functions on human and murine cells are also described for AMPs from arthropods, such as apidaecin, bee venom AMP, or venom peptides 7.2 and 7.8, parabutopirin and opistopirin, isolated from scorpion venom (25,26,57). Our team has recently isolated a new short AMP from *Tetramorium bicarinatum* ant venom, called P17. Previous results demonstrated that this AMP shares common structural properties with LL-37. Indeed, structural studies of P17 revealed that this ant AMP, composed of 13 amino acids, is cationic, amphipatic, amidated in C-terminal position and adopts an alpha helix conformation (31).

Here we reported that the P17 influences phenotypic differentiation of human monocytes-derived macrophages (h-MDMs) toward an alternative phenotype characterized by a C-type lectin receptors (CLRs) signature composed of MR and Dectin-1. Consistent with the key role of MR and Dectin-1 in yeast recognition, phagocytosis and clearance (38,44,58,59), we demonstrated that the P17 increases the ability of h-MDMs to eliminate *C. albicans*. The involvement of MR and Dectin-1 in the P-17-mediated antifungal activity of h-MDMs was further evidenced by the loss of *Candida* elimination in h-MDMs silenced for MR or Dectin-1. In line, the pre-treatment of P17-activated h-MDMs with soluble MR or Dectin-1 blocking agents, also severely compromised their capacity to bind and to kill *C. albicans*. Consistently with the cooperative role of MR and Dectin-1 in the induction of macrophage antifungal signaling pathways (34,35,37), we demonstrated that both MR and Dectin-1 are involved in the recognition of this yeast and in its subsequent elimination by P17-activated h-MDMs.

This study also provided the mechanistic insight into the transcriptional control of MR and Dectin-1 by P17 in h-MDMs. On the basis of the established role of PPAR γ in the alternative activation and in the control of CLRs expression (34,60), these findings identify PPAR γ as a critical component in the signaling cascade that drives P17-mediated MR and Dectin-1 overexpression.

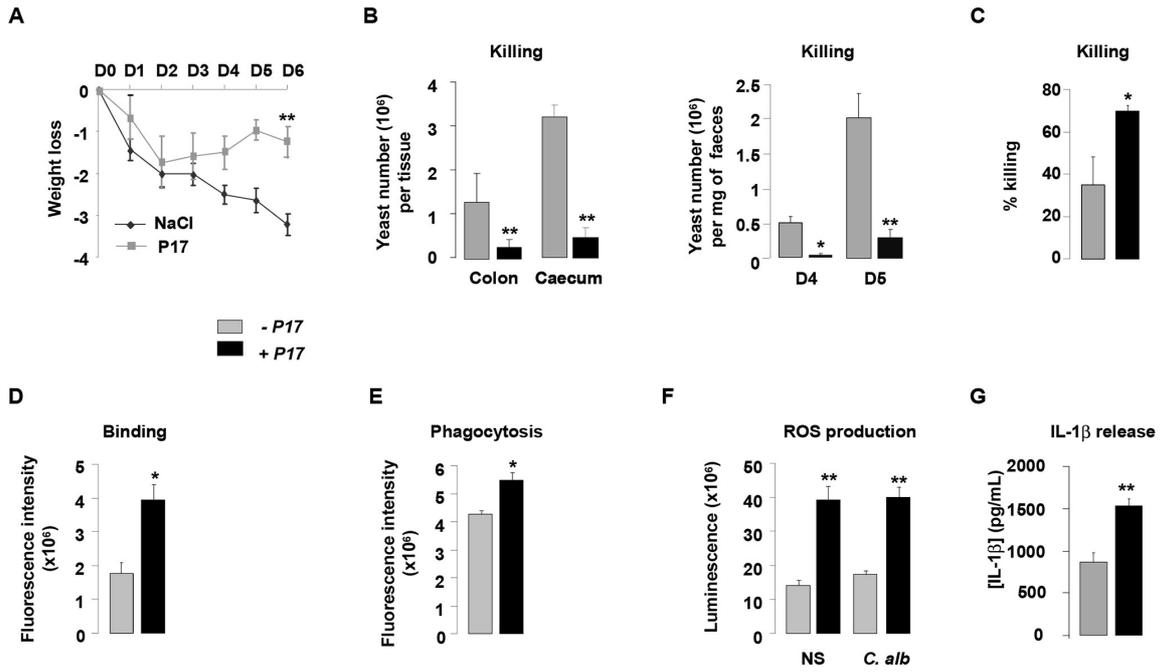


Figure 5. P17 treatment of mice improves macrophage-intrinsic antifungal activities and restrains gastrointestinal fungal infection.

(A) Body weight of untreated or P17-treated mice during *C. albicans* gastrointestinal infection.

(B) *C. albicans* GI colonization in caecum and colon of untreated or P17-treated mice determined on day 6 post-infection. *C. albicans* GI colonization in faeces of untreated or P17-treated mice determined on days 4 and 5 post-infection.

(C) Killing assay of peritoneal macrophages from untreated or P17-treated infected mice.

(D-E) Binding (D) and Phagocytosis (E) of *Candida albicans* by peritoneal macrophages from untreated or P17-treated infected mice.

(F-G) ROS (F) and IL-1 β (G) production upon *Candida* challenge of peritoneal macrophages from untreated or P17-treated infected mice.

Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of at least two independent experiments (n=6 per group). *p<0.05, **p<0.01 compared to the respective untreated control.

In addition to the transcriptional increase of MR and Dectin-1 in h-MDM by P17 treatment, we demonstrated that this AMP also positively regulates the transcription of cPLA2, enzyme needed for arachidonic acid (AA) release from membrane phospholipids, of 5-LOXX, FLAP and LTA4 hydrolase, critical for LTB4 synthesis. Consistent with this observation, AA mobilization and the generation of LTB4 by h-MDMs upon P17 treatment is strongly increased. Interestingly, the impairment of LTB4 production by a specific inhibitor of 5-LOXX activation, completely abolishes the induction of MR and Dectin-1 mediated by P17, suggesting that P17 controls MR and Dectin-1 expression through the LTB4 release. Moreover, the fact that P17 increases MR, Dectin-1 and SRB1 specific PPAR γ target genes, similarly to LTB4, and that the addition of both P17 and LTB4 did not show any additive effect on these gene induction, support that P17 regulates MR and Dectin-1 surface expression by controlling PPAR γ activation through the LTB4 production. This is reinforced by the finding showing that the inhibition of P17-induced MR, Dectin-1 and SRB1 PPAR γ target genes expression by MAFP, a specific inhibitor of AA release, was restored by the addition of LTB4. In agreement with the identification of LTB4 as PPAR γ agonist in P17-mediated CLRs induction, numerous endogenous PPAR γ ligands derived from the metabolism of AA are described (34,35,43,49). A significant contribution of this study was the identification of a novel signaling pathway triggered by an AMP involved in the antimicrobial response of macrophages. Indeed, the h-MDMs treated with PPAR γ specific antagonist, or with inhibitors of LTB4 synthesis, or silenced for MR or Dectin-1 failed to increase the killing of *Candida albicans* in response to P17, establishing LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR axis as crucial in the acquisition of antifungal properties of P17-treated h-MDMs.

Because ROS and pro-inflammatory cytokines are essentials *Candida*-killing components (37,39,44,61,62), we evaluated ROS and IL-1 β release of h-MDMs upon P17 treatment and we investigated the signaling pathways involved in their production. Remarkably, the alternative phenotype of P17-treated h-MDMs is accompanied by an inflammatory signature characterized by IL-1 β and ROS production. In line, previous studies have highlighted the capacity of AMPs to simultaneously promote pro-inflammatory response while protecting host organism against exacerbated inflammatory response (18,25,26,63–66). Consistent with the increased IL-1 β production in P17-treated h-MDMs, the processing of pro-caspase-1 into its p20 subunit, which is a hallmark of caspase-1 activation (67), is augmented in P17-treated h-MDMs. Moreover, the involvement of P17 in ROS production is supported by large amounts of phosphorylated p47^{phox}, a cytosolic subunit of the NADPH oxidase complex whose activation is essential to ROS release (68), in h-MDMs activated by P17. We also established that this LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR signaling drives ROS release in P17-treated h-MDMs, since the addition of GW9662, MAFP and MK-886 or the pre-treatment of P17-activated h-MDMs with soluble MR and Dectin-1 blocking agents abolishes P17-mediated ROS production by h-MDMs in response to *C. albicans*. This is supported by previous reports identifying Syk-dependent ROS production *via* Dectin-1 and MR receptors in fungal infection (69). Furthermore, we provided evidence the major contribution of ROS production in IL-1 β secretion by P17-activated h-MDMs in response to *Candida*. Consistent with these results, ROS production activates IL-1 β processing *via* caspase-1-dependent activity (50). Thus, we identified both MR and Dectin-1 as extracellular sensors for *Candida* recognition by P17-activated h-MDMs and the subsequent activation of the pro-IL-1 β synthesis and ROS production. These oxidant agents are essential in inflammasome-dependent IL-1 β processing and hence in IL-1 β production by P17-activated h-MDMs in response to *Candida* challenge. This is best supported by the fact that the induction of the Nlrp3 inflammasome complex activation is subject to several events, such as the efflux of cellular potassium, the phagocytosis of particles, the generation of ROS, cathepsin B activation and/or the vacuolar acidification (70–73).

One main implication of our study was the validation *in vivo* of the ability of P17 to modulate fungicidal activity of macrophages on a murine model of gastrointestinal candidiasis. The P17 treatment rendered the mice less susceptible to gastrointestinal *C. albicans* infection by promoting macrophage-intrinsic antifungal activity. These data reveal the P17 as an effective immunomodulatory agent for antifungal functions of macrophages.

Lastly, this study identified that the interaction between P17 and G protein coupled receptor (GPCR) is crucial in the induction of antifungal properties of h-MDMs by P17. Consistently, most AMPs control immune cells responses in a GPCR-dependent manner, mainly through fMLP receptors, such as FPR1 and FPR2 (28,29,52,55). Although we demonstrated that P17 did not interact with fMLP receptors, this AMP engages PTX-sensitive GPCR, which is currently under identification. Moreover, in agreement with the involvement of calcium release in immunomodulatory activity triggered by many AMPs (52–54,74,75), P17 modulates antifungal immune response of h-MDMs through PTX-sensitive GPCR-triggered intracellular calcium mobilization. As calcium signaling is an essential factor of cPLA2 activation in monocytes and macrophages (76,77), P17 could promote LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR signaling pathway through the activation of cPLA2 and the subsequent AA release.

Taken together, all these data highlighted the immunomodulatory activity of P17 on h-MDMs differentiation and their associated antifungal response. The identification of molecular mechanisms triggered by P17 responsible of increased microbicidal response of h-MDMs against *C. albicans* revealed the importance of the AA/LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR axis (Figure 6). Confronted to the emergence of many resistances to the usual anti-infectious agents, P17 could constitute a promising compound to fight against fungal infections. Thus, this work offers new therapeutic perspectives and supports the use of PAMs as immunomodulatory compounds to restrain infectious diseases.

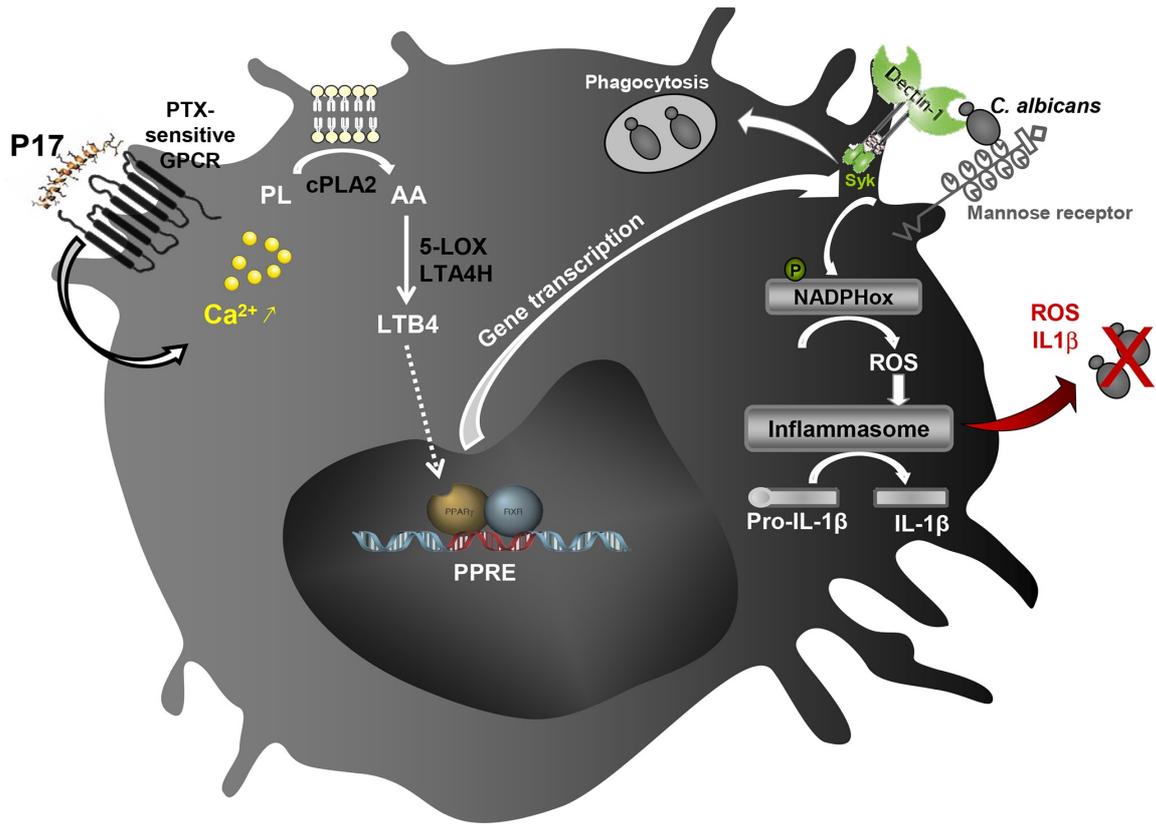


Figure 6. Schematic illustration of the immunomodulatory activity of P17 on human macrophages.

The identification of molecular mechanisms triggered by P17 reveals that this peptide modulates antifungal immune response of h-MDMs through PTX-sensitive GPCR-triggered intracellular calcium mobilization. The increased calcium mobilization in P17-activated h-MDMs is essential in cPLA2 activation and the subsequent AA release. This AA mobilization and the promotion of AA metabolism to LTB4 upon P17 treatment are responsible of the PPAR γ -dependent MR and Dectin-1 overexpression. The activation of AA/LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR axis by P17 triggers ROS production and inflammasome-dependent IL-1 β release critical in fungicidal activity of P17-activated h-MDMs.

Ethics Statement

Mononuclear cells were obtained from healthy blood donors (Etablissement Français du Sang, EFS Toulouse, France). Written informed consents were obtained from the donors under EFS contract no. 21/PVNT/TOU/UPS04/2010–0025. Following articles L1243-4 and R1243-61 of the French Public Health Code, the contract was approved by the French Ministry of Science and Technology (agreement no. AC 2009-921).

All mice were bred and handled by the protocols approved by the Conseil Scientifique du Centre de Formation et de Recherche Experimental Medico Chirurgical and the ethics board of the Midi-Pyrénées ethic committee for animal experimentation (Experimentation permit number 31–067, approval no. B3155503).

Author contributions

A.C., K.B., M.T. and B.P. designed the study and analyzed the data. A.C. and K.B. wrote the manuscript. K.B., H.A. and M.P. did and analyzed experiments. M.A., L.L., and M.C.R. did research. J.L. and E.B. for helpful discussions.

Acknowledgements

We thank Philippe Batigne and Bénédicte Bertrand from Université Paul Sabatier for excellent technical support, Alexia Zakaroff-Girard and Christiane Pécher (TRI imaging platform, I2MC) for flow cytometry technical assistance. This work was supported by Région Midi-Pyrénées and Institut National Universitaire Champollion (K.B.).

Conflicts of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* (2002) **415**:389–395. doi:10.1038/415389a
2. Seo M-D, Won H-S, Kim J-H, Mishig-Ochir T, Lee B-J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules* (2012) **17**:12276–12286. doi:10.3390/molecules171012276
3. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* (1999) **1462**:1–10.
4. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* (1999) **1462**:55–70.
5. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* (2005) **3**:238–250. doi:10.1038/nrmicro1098
6. Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int J Antimicrob Agents* (2003) **22**:465–478.
7. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* (2006) **19**:491–511. doi:10.1128/CMR.00056-05
8. Hilchie AL, Wuerth K, Hancock REW. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol* (2013) **9**:761–768. doi:10.1038/nchembio.1393
9. Mansour SC, Pena OM, Hancock REW. Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol* (2014) **35**:443–450. doi:10.1016/j.it.2014.07.004
10. Nijnik A, Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J* (2009) **2**:e1. doi:10.3134/ehthj.09.001
11. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* (2005) **27**:1337–1347. doi:10.1007/s10529-005-0936-5
12. Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol* (2001) **69**:691–697.
13. Nijnik A, Pistolic J, Wyatt A, Tam S, Hancock REW. Human cathelicidin peptide LL-37 modulates the effects of IFN-gamma on APCs. *J Immunol Baltim Md 1950* (2009) **183**:5788–5798. doi:10.4049/jimmunol.0901491
14. Bowdish DME, Davidson DJ, Speert DP, Hancock REW. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* (2004) **172**:3758–3765.

15. Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol Baltim Md 1950* (2004) **172**:4987–4994.
16. Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DME, Pistollic J, Li Y, Rehaume L, Hancock REW. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol Baltim Md 1950* (2007) **179**:7684–7691.
17. Alalwani SM, Sierigk J, Herr C, Pinkenburg O, Gallo R, Vogelmeier C, Bals R. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *Eur J Immunol* (2010) **40**:1118–1126. doi:10.1002/eji.200939275
18. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol Baltim Md 1950* (2002) **169**:3883–3891.
19. Tang X, Basavarajappa D, Haeggstrom JZ, Wan M. P2X7 Receptor Regulates Internalization of Antimicrobial Peptide LL-37 by Human Macrophages That Promotes Intracellular Pathogen Clearance. *J Immunol* (2015) **195**:1191–1201. doi:10.4049/jimmunol.1402845
20. Barlow PG, Li Y, Wilkinson TS, Bowdish DME, Lau YE, Cosseau C, Haslett C, Simpson AJ, Hancock REW, Davidson DJ. The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J Leukoc Biol* (2006) **80**:509–520. doi:10.1189/jlb.1005560
21. Barlow PG, Beaumont PE, Cosseau C, Mackellar A, Wilkinson TS, Hancock REW, Haslett C, Govan JRW, Simpson AJ, Davidson DJ. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2010) **43**:692–702. doi:10.1165/rcmb.2009-0250OC
22. Carretero M, Escámez MJ, García M, Duarte B, Holguín A, Retamosa L, Jorcano JL, Río MD, Larcher F. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. *J Invest Dermatol* (2008) **128**:223–236. doi:10.1038/sj.jid.5701043
23. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* (2003) **111**:1665–1672. doi:10.1172/JCI17545
24. Salvado MD, Di Gennaro A, Lindbom L, Agerberth B, Haeggström JZ. Cathelicidin LL-37 induces angiogenesis via PGE2-EP3 signaling in endothelial cells, in vivo inhibition by aspirin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2013) **33**:1965–1972. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301851
25. Pucca MB, Cerni FA, Pinheiro-Junior EL, Zoccal KF, Bordon K de CF, Amorim FG, Peigneur S, Vriens K, Thevissen K, Cammue BPA, et al. Non-disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom: Evidence for proline-free ACE-inhibitors. *Peptides* (2016) **82**:44–51. doi:10.1016/j.peptides.2016.05.008
26. Tavano R, Segat D, Gobbo M, Papini E. The honeybee antimicrobial peptide apidaecin differentially immunomodulates human macrophages, monocytes and dendritic cells. *J Innate Immun* (2011) **3**:614–622. doi:10.1159/000327839

27. De Yang null, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* (2000) **192**:1069–1074.
28. Smithrithee R, Niyonsaba F, Kiatsurayanon C, Ushio H, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Human β -defensin-3 increases the expression of interleukin-37 through CCR6 in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* (2015) **77**:46–53. doi:10.1016/j.jdermsci.2014.12.001
29. Wan M, Godson C, Guiry PJ, Agerberth B, Haeggström JZ. Leukotriene B4/antimicrobial peptide LL-37 proinflammatory circuits are mediated by BLT1 and FPR2/ALX and are counterregulated by lipoxin A4 and resolvin E1. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* (2011) **25**:1697–1705. doi:10.1096/fj.10-175687
30. Wan M, van der Does AM, Tang X, Lindbom L, Agerberth B, Haeggström JZ. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *J Leukoc Biol* (2014) **95**:971–981. doi:10.1189/jlb.0513304
31. Rifflet A, Gavalda S, Téné N, Orivel J, Leprince J, Guilhaudis L, Génin E, Vétillard A, Treilhou M. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides* (2012) **38**:363–370. doi:10.1016/j.peptides.2012.08.018
32. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* (2004) **25**:677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
33. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci J Virtual Libr* (2008) **13**:453–461.
34. Coste A, Dubourdeau M, Linas MD, Cassaing S, Lepert J-C, Balard P, Chalmeton S, Bernad J, Orfila C, Séguéla J-P, et al. PPAR γ promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* (2003) **19**:329–339.
35. Galès A, Conduché A, Bernad J, Lefevre L, Olganier D, Béraud M, Martin-Blondel G, Linas M-D, Auwerx J, Coste A, et al. PPAR γ controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* (2010) **6**:e1000714. doi:10.1371/journal.ppat.1000714
36. Lefèvre L, Lugo-Villarino G, Meunier E, Valentin A, Olganier D, Authier H, Duval C, Dardenne C, Bernad J, Lemesre JL, et al. The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity* (2013) **38**:1038–1049. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.010
37. Lefèvre L, Authier H, Stein S, Majorel C, Couderc B, Dardenne C, Eddine MA, Meunier E, Bernad J, Valentin A, et al. LRH-1 mediates anti-inflammatory and antifungal phenotype of IL-13-activated macrophages through the PPAR γ ligand synthesis. *Nat Commun* (2015) **6**:6801. doi:10.1038/ncomms7801
38. Netea MG, Gow NAR, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires

cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* (2006) **116**:1642–1650. doi:10.1172/JCI27114

39. Saijo S, Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol* (2011) **23**:467–472. doi:10.1093/intimm/dxr046

40. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon S, et al. Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* (2007) **8**:31–38. doi:10.1038/ni1408

41. van de Veerdonk FL, Joosten LAB, Devesa I, Mora-Montes HM, Kanneganti T-D, Dinarello CA, van der Meer JWM, Gow NAR, Kullberg BJ, Netea MG. Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1 β production by the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Infect Dis* (2009) **199**:1087–1096. doi:10.1086/597274

42. Wevers BA, Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Future Microbiol* (2013) **8**:839–854. doi:10.2217/fmb.13.56

43. Coste A, Lagane C, Filipe C, Authier H, Gales A, Bernad J, Douin-Echinard V, Lepert J-C, Balard P, Linas M-D, et al. IL-13 Attenuates Gastrointestinal Candidiasis in Normal and Immunodeficient RAG-2 $^{-/-}$ Mice via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Activation. *J Immunol* (2008) **180**:4939–4947. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4939

44. Galès A, Conduché A, Bernad J, Lefevre L, Olagnier D, Béraud M, Martin-Blondel G, Linas M-D, Auwerx J, Coste A, et al. PPAR γ Controls Dectin-1 Expression Required for Host Antifungal Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* (2010) **6**:e1000714. doi:10.1371/journal.ppat.1000714

45. Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARS in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* (2002) **2**:748–759. doi:10.1038/nri912

46. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* (1995) **83**:813–819.

47. Lefèvre L, Galès A, Olagnier D, Bernad J, Perez L, Burcelin R, Valentin A, Auwerx J, Pipy B, Coste A. PPAR γ ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal *Candida* elimination. *PloS One* (2010) **5**:e12828. doi:10.1371/journal.pone.0012828

48. Le Marec O, Neveu C, Lefranc B, Dubessy C, Boutin JA, Do-Régo J-C, Costentin J, Tonon M-C, Tena-Sempere M, Vaudry H, et al. Structure-activity relationships of a series of analogues of the RFamide-related peptide 26RFa. *J Med Chem* (2011) **54**:4806–4814. doi:10.1021/jm200418c

49. Berry A, Balard P, Coste A, Olagnier D, Lagane C, Authier H, Benoit-Vical F, Lepert J-C, Séguéla J-P, Magnaval J-F, et al. IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR γ activation. *Eur J Immunol* (2007) **37**:1642–1652. doi:10.1002/eji.200636625

50. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3

inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* (2009) **459**:433–436. doi:10.1038/nature07965

51. Gupta K, Subramanian H, Ali H. Modulation of host defense peptide-mediated human mast cell activation by LPS. *Innate Immun* (2016) **22**:21–30. doi:10.1177/1753425915610643
52. Pundir P, Catalli A, Leggiadro C, Douglas SE, Kulka M. Pleurocidin, a novel antimicrobial peptide, induces human mast cell activation through the FPRL1 receptor. *Mucosal Immunol* (2014) **7**:177–187. doi:10.1038/mi.2013.37
53. Wan M, Soehnlein O, Tang X, van der Does AM, Smedler E, Uhlén P, Lindbom L, Agerberth B, Haeggström JZ. Cathelicidin LL-37 induces time-resolved release of LTB4 and TXA2 by human macrophages and triggers eicosanoid generation in vivo. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* (2014) **28**:3456–3467. doi:10.1096/fj.14-251306
54. Zhang Y-Y, Yu Y-Y, Zhang Y-R, Zhang W, Yu B. The modulatory effect of TLR2 on LL-37-induced human mast cells activation. *Biochem Biophys Res Commun* (2016) **470**:368–374. doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.037
55. De Yang null, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* (2000) **192**:1069–1074.
56. van der Does AM, Beekhuizen H, Ravensbergen B, Vos T, Ottenhoff THM, van Dissel JT, Drijfhout JW, Hiemstra PS, Nibbering PH. LL-37 directs macrophage differentiation toward macrophages with a proinflammatory signature. *J Immunol Baltim Md 1950* (2010) **185**:1442–1449. doi:10.4049/jimmunol.1000376
57. Willems J, Noppe W, Moerman L, van der Walt J, Verdonck F. Cationic peptides from scorpion venom can stimulate and inhibit polymorphonuclear granulocytes. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology* (2002) **40**:1679–1683.
58. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* (2005) **24**:1277–1286. doi:10.1038/sj.emboj.7600594
59. Willment JA, Brown GD. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol* (2008) **16**:27–32. doi:10.1016/j.tim.2007.10.012
60. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Eagle AR, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* (2007) **447**:1116–1120. doi:10.1038/nature05894
61. Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol* (2016) **14**:163–176. doi:10.1038/nrmicro.2015.21
62. Maródi L, Korchak HM, Johnston RB. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950* (1991) **146**:2783–2789.

63. Bommineni YR, Pham GH, Sunkara LT, Achanta M, Zhang G. Immune regulatory activities of fowlicidin-1, a cathelicidin host defense peptide. *Mol Immunol* (2014) **59**:55–63. doi:10.1016/j.molimm.2014.01.004
64. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol Baltim Md 1950* (2006) **176**:2455–2464.
65. Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock REW. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J Leukoc Biol* (2013) **94**:159–170. doi:10.1189/jlb.1012497
66. Subramanian H, Gupta K, Guo Q, Price R, Ali H. Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *J Biol Chem* (2011) **286**:44739–44749. doi:10.1074/jbc.M111.277152
67. Yu HB, Finlay BB. The Caspase-1 Inflammasome: A Pilot of Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* (2008) **4**:198–208. doi:10.1016/j.chom.2008.08.007
68. El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidalo M-A, Marie J-C, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* (2009) **41**:217. doi:10.3858/emm.2009.41.4.058
69. Osorio F, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity* (2011) **34**:651–664. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.001
70. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* (2009) **27**:229–265. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715
71. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* (2008) **320**:674–677. doi:10.1126/science.1156995
72. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* (2010) **10**:210–215. doi:10.1038/nri2725
73. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* (2011) **469**:221–225. doi:10.1038/nature09663
74. Gupta K, Subramanian H, Ali H. Modulation of host defense peptide-mediated human mast cell activation by LPS. *Innate Immun* (2016) **22**:21–30. doi:10.1177/1753425915610643
75. Moerman L, Verdonck F, Willems J, Tytgat J, Bosteels S. Antimicrobial peptides from scorpion venom induce Ca(2+) signaling in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) **311**:90–97.
76. Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* (1991) **65**:1043–1051.

77. Kramer RM, Roberts EF, Manetta J, Putnam JE. The Ca²⁺(+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 is a 100-kDa protein in human monoblast U937 cells. *J Biol Chem* (1991) **266**:5268–5272.

Figure legends

Figure 1. P17 mediates an alternative phenotype of h-MDMs characterized by CLR and inflammatory signatures.

(A) Gene expression analysis of markers of classical and alternative polarization in h-MDMs treated or not with P17. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(B) MR, Dectin-1, DC-Sign, CD16 and CD36 protein expression in h-MDMs treated or not with P17. Graphs represent geomean fluorescence quantification for the indicated proteins.

(C) TNF α , IL-1 β , IL-12 and IL-10 release by h-MDMs treated or not with P17 after challenge with *C. albicans*.

(D) Immunoblot analysis of caspase-1 p20 fragment cleavage in h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge. Band intensity was quantified with Image J software and was represented as the ratio between the band intensities of p20 and of pro-caspase-1.

(E) ROS production by h-MDMs treated or not with P17 after challenge with *C. albicans*.

(F) Gene expression of P47^{phox} in h-MDMs treated or not with P17. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(G) Phosphorylated p47^{phox} immunoblot after *C. albicans* challenge in h-MDMs treated or not with P17. Band intensity was quantified with Image J software and was represented as the ratio between the band intensities of phosphorylated p47^{phox} and of P47^{phox}.

Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 compared to the respective untreated control.

Figure 2. P17 promotes CLR expression on h-MDMs through LTB₄-mediated PPAR γ activation.

(A) Gene expression analysis of PPAR γ , SRB1, MR and Dectin-1 in h-MDMs treated or not with P17, in presence of a selective PPAR γ antagonist GW9662. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(B) Gene expression analysis of arachidonic acid metabolic enzymes in h-MDMs treated or not with P17. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(C) [³H]AA mobilization in membrane phospholipids of h-MDMs treated or not with P17.

(D) LTB₄ production by h-MDMs treated or not with P17.

(E) Gene expression analysis of MR and Dectin-1 in h-MDMs treated or not with P17, in presence of MAFP, a specific cPLA₂ inhibitor, and MK-886, a FLAP inhibitor which prevents 5-LOXX activation. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

(F) Gene expression analysis of MR, Dectin-1, SRB1 and CD36 in h-MDMs treated or not with P17, in presence of MAFP and/or LTB₄. The results were represented in fold induction relative to the untreated h-MDMs control.

Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 compared to the respective untreated control.

Figure 3. P17 improves antifungal properties of h-MDMs through AA/LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR signaling pathway.

- (A) Killing assay of h-MDMs treated or not with P17 incubated with *C. albicans*.
(B-C) Binding (B) and Phagocytosis (C) of *C. albicans* by h-MDMs treated or not with P17.
(D) Killing assay of h-MDMs treated or not with P17 incubated with *C. albicans* in presence of antioxidant N-acetyl cysteine (NAC).
(E) IL-1 β release by h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge in presence of antioxidant N-acetyl cysteine (NAC). The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.
(F) ROS production by h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge in presence of caspases inhibitor ZVAD. The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.
(G) Killing assay of h-MDMs treated or not with P17 incubated with *C. albicans* in presence of a selective PPAR γ antagonist (GW9662), a specific inhibitor of AA mobilization (MAFP), or of an inhibitor of 5-LOXX activation (MK-886).
(H-I) ROS (H) and IL-1 β (I) production by h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge in presence of a selective PPAR γ antagonist (GW9662), a specific inhibitor of AA mobilization (MAFP), or of an inhibitor of 5-LOXX activation (MK-886). The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.
(J) Immunoblot analysis of caspase-1 p20 fragment cleavage in h-MDMs treated or not with P17 after *C. albicans* challenge in presence of a specific inhibitor of AA mobilization (MAFP) or of 5-LOXX activation inhibitor (MK-886). Band intensity was quantified with Image J software and was represented as the ratio between the band intensities of p20 and of pro-caspase-1.
(K) Killing assay of h-MDMs silenced for Dectin-1 and/or MR treated or not with P17 after *C. albicans* challenge.
(L) Binding of *C. albicans* by h-MDMs treated or not with P17 in presence of mannan and/or laminarin. The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.
(M) ROS production by h-MDMs silenced for Dectin-1 and MR treated or not with P17 after *C. albicans* challenge. The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.
- Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the respective untreated control.

Figure 4. P17 controls antifungal properties of h-MDMs via the induction of intracellular calcium mobilization dependent on PTX-sensitive GPCR interaction.

- (A-C) Intracellular calcium concentration in h-MDMs treated or not with P17 using fluorescent probe Fluo 3-AM. (A) Calcium concentration in h-MDMs treated or not with P17 in presence of calcium-deprived medium (HBSS-) and an inhibitor of the intracellular pools calcium release (U73122). (B) Calcium concentration in h-MDM treated or not with P17 in presence of pertussis toxin (PTX).
(C) Calcium concentration in h-MDMs treated or not with P17 after desensitization of fMLP receptors.
(D) Killing assay of h-MDMs treated or not with P17 incubated with *C. albicans* in presence of calcium chelator (BAPTA-AM).
(E-F) ROS (E) and IL-1 β (F) release by h-MDMs treated or not with P17 in presence of calcium chelator (BAPTA-AM) after *C. albicans* challenge. The results were represented in fold induction relative to the respective untreated h-MDMs control.

Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 compared to the respective untreated control.

Figure 5. P17 treatment of mice improves macrophage-intrinsic antifungal activities and restrains gastrointestinal fungal infection.

(A) Body weight of untreated or P17-treated mice during *C. albicans* gastrointestinal infection.

(B) *C. albicans* GI colonization in caecum and colon of untreated or P17-treated mice determined on day 6 post-infection. *C. albicans* GI colonization in faeces of untreated or P17-treated mice determined on days 4 and 5 post-infection.

(C) Killing assay of peritoneal macrophages from untreated or P17-treated infected mice.

(D-E) Binding (D) and Phagocytosis (E) of *Candida albicans* by peritoneal macrophages from untreated or P17-treated infected mice.

(F-G) ROS (F) and IL-1 β (G) production upon *Candida* challenge of peritoneal macrophages from untreated or P17-treated infected mice.

Results correspond to mean \pm SEM of triplicates. Data are representative of at least two independent experiments (n=6 per group). * p <0.05, ** p <0.01 compared to the respective untreated control.

Figure 6. Schematic illustration of the immunomodulatory activity of P17 on human macrophages.

The identification of molecular mechanisms triggered by P17 reveals that this peptide modulates antifungal immune response of h-MDMs through PTX-sensitive GPCR-triggered intracellular calcium mobilization. The increased calcium mobilization in P17-activated h-MDMs is essential in cPLA2 activation and the subsequent AA release. This AA mobilization and the promotion of AA metabolization to LTB4 upon P17 treatment are responsible of the PPAR γ -dependent MR and Dectin-1 overexpression. The activation of AA/LTB4/PPAR γ /Dectin-1-MR axis by P17 triggers ROS production and inflammasome-dependent IL-1 β release critical in fungicidal activity of P17-activated h-MDMs.

Table 1: Human primer sequences used in qPCR analysis

Gene		5' - 3' sequence
Alox5	antisense sense	ACT-GGA-AAC-ACG-GCA-AAA-AC TTT-CTC-AAA-GTC-GGC-GAA-GT
Itgam (CD11b)	antisense sense	TTG-CAT-CCA-TCT-CAA-ATC-CA CTC-CCA-AAG-TGC-TGG-GAT-TA
Fcgr3 (CD16)	antisense sense	TAC-AGC-GTG-CTT-GAG-AAG-GA GCA-CCT-GTA-CTC-TCC-ACT-GT
Fcgr2 (CD32)	antisense sense	CCA-AAG-GCT-GTG-CTG-AAA-CT TAC-TCC-CCG-CTG-TCA-TTG-TT
Cd36	antisense sense	TGA-TAG-GTG-CAG-CAA-AGC-AC TGT-AAC-CCA-GGA-CGC-TGA-GG
Clec7a (Dectin-1)	antisense sense	CCA-AGC-ATA-GGA-TTC-CCA-AAA AAA-AGG-ATC-GTG-TGC-TGC-ATC
Ptgs2 (COX-2)	antisense sense	TGA-GCA-TCT-ACG-GTT-TGC-TG TGC-TTG-TCT-GGA-ACA-ACT-GC
Pla2g4a (cPLA2)	antisense sense	GCC-TTG-GTG-AGT-GAT-TCA-GCT AGA-TTC-AAG-CCC-AGC-ATG-AAG
Cd209 (DC-SIGN)	antisense sense	GGG-CAT-GGA-GGC-TCC-AC CAA-CTT-AGA-AAC-AGC-CAA-ATG-GAA
Alox5ap (FLAP)	antisense sense	ACC-CGC-TCA-AAG-GCA-ATG-G CAC-GAA-AGC-AGG-ACC-CAG-A
Gapdh	antisense sense	AGG-TCG-GAG-TCA-ACG-GAT-TT ATC-TCG-CTC-CTG-GAA-GAT-GG
Il1b	antisense sense	CAG-CCA-ATC-TTC-ATT-GCT-CA AGG-CAG-AGA-GGG-AAG-GAG-AG
Il6	antisense sense	TAC-CCC-CAG-GAG-AAG-ATT-GT TTT-TCT-GCC-AGT-GCC-TCT-TT
Il12	antisense sense	TGG-GTG-GGT-CAG-GTT-TGA-TG GCC-CAG-CTG-CTG-AGG-AGA-GT
Il10	antisense sense	TGC-AAA-ACC-AAA-CCA-CAA-GA TCT-CGG-AGA-TCT-CGA-AGC-AT
Il1ra	antisense sense	TGG-GAA-TCT-CAG-ATG-GGA-AG CTG-TGT-CCC-CCA-GAA-CTT-GT
Tgfb1	antisense sense	ACT-GAG-GGG-AAG-GGA-CAA-CT TCG-GTA-CCA-GGT-GAG-GGT-AG
p47 ^{phox}	antisense sense	CCT-CAT-TGT-CCA-GTG-TGG-TG TCT-TCC-GTC-TCG-TCA-GGA-CT
Lta4h	antisense sense	ACT-GCT-TGG-AGG-ACC-AGA-GA GGA-AAG-CAT-TAG-CAG-GCA-AG
Mrc-1 (MR)	antisense sense	GGC-GGT-GAC-CTC-ACA-AGT-AT ACG-AAG-CCA-TTT-GGT-AAA-CG
Ptges (PGES)	antisense sense	CAT-GTG-AGT-CCC-TGT-GAT-GG GAC-TGC-AGC-AAA-GAC-ATC-CA
Pparg	antisense sense	GCT-GTG-CAG-GAG-ATC-ACA-GA GGG-CTC-CAT-AAA-GTC-ACC-AA
Tnf α	antisense sense	TCC-TTC-AGA-CAC-CCT-CAA-CC AGG-CCC-CAG-TTT-GAA-TTC-TT

Conclusion générale

Et perspectives

Les PAMs cationiques sont aujourd'hui connus pour jouer un rôle important dans la défense immune en exerçant leur activité microbicide directe sur un large spectre d'agents pathogènes, mais aussi en régulant les réponses immunitaires de l'hôte. Leur rôle immunomodulateur est bien décrit dans la littérature et concerne aussi bien les PAMs de mammifères que ceux d'insectes. En effet, les cathélicidines et défensines de mammifères sont connues pour intervenir dans la régulation de la transcription et la sécrétion de cytokines et chimiokines par diverses cellules immunitaires, comme notamment les monocytes et les macrophages (Bowdish et al., 2004; Elssner et al., 2004; Scott et al., 2002b; Yu et al., 2007). Elles interviennent également dans le contrôle des réponses inflammatoire et anti-infectieuse de l'hôte afin de permettre l'élimination des agents pathogènes sans créer de réaction inflammatoire exacerbée, comme le choc septique, néfaste pour l'hôte (Bommineni et al., 2010, 2014; Mookherjee et al., 2006; Niyonsaba et al., 2013b; Scott et al., 2002b; Subramanian et al., 2011) . Ces différentes propriétés immunomodulatrices sont également décrites chez les PAMs produits par les insectes tels que l'apidaecine, PAM isolé à partir du venin d'abeille, ou encore les venom peptides 7.2 et 7.8, la parabutoporine et l'opistoporine, retrouvés dans le venin de scorpion (Pucca et al., 2016; Tavano et al., 2011; Willems et al., 2002).

Notre équipe a récemment isolé un nouveau PAM à partir du venin de la fourmi *Tetramorium bicarinatum*, nommé P17. Ce peptide cationique amphipatique de 13 acides aminés, amidé en position C-terminale et adoptant une hélice alpha, n'a pas révélé d'activité antibactérienne sur les souches testées en laboratoire (Rifflet et al., 2012). Néanmoins, ce PAM s'est révélé intéressant du fait de sa faible cytotoxicité vis-à-vis des macrophages dérivés de monocytes humains (h-MDMs), même à de fortes concentrations. De ce fait, nous nous sommes intéressés au potentiel

immunomodulateur de ce PAM. Pour cela, nous avons étudié le rôle du P17 sur la polarisation de h-MDMs et sur leur activité antifongique associée vis-à-vis de la levure *C. albicans*.

Mes travaux de thèse se sont plus particulièrement orientés sur trois axes:

- (i) L'impact du P17 sur la polarisation des h-MDMs
- (ii) L'étude de l'effet du P17 sur l'activité microbicide des h-MDMs vis-à-vis de *C. albicans*
- (iii) L'identification des voies de signalisation déclenchées par le P17 induisant l'activité candidicide des h-MDMs

C. albicans est un commensal saprophyte de l'Homme présent dans les muqueuses du tractus digestif et vaginale, ainsi qu'au niveau de la peau (Dupont, 1995). Cette levure représente la levure opportuniste majeure responsable de mycoses. Bien que les individus immunocompétents éliminent facilement ces levures, l'infection de sujets immunodéprimés ou présentant des dysrégulations métaboliques telles que le diabète, conduit à des candidoses systémiques qui peuvent s'avérer difficiles à éradiquer (Belazi et al., 2005; Odds, 1987). Les macrophages jouent un rôle majeur dans la défense immune de l'hôte vis-à-vis de *C. albicans*. Ces cellules, qui sont des acteurs clés de la réponse immunitaire innée, se caractérisent par une plasticité phénotypique et fonctionnelle importante. Ils peuvent se différencier selon deux voies : la voie d'activation dite « classique », conduisant à des macrophages M1, et l'activation « alternative » qui est à l'origine de différents sous-types de macrophages dits M2. Malgré l'hétérogénéité des populations de macrophages M2, ces derniers partagent des caractéristiques communes dont l'expression des récepteurs membranaires lectines de type C (CLRs) (Gordon, 2003; Mantovani et al., 2004). Ces CLRs sont

déterminants dans la phagocytose et l'élimination des levures, *via* la reconnaissance de motifs glucidiques présents sur les parois fongiques (Hardison and Brown, 2012; Maródi et al., 1991; Vautier et al., 2012; Wevers et al., 2013; Taylor et al., 2007). L'étude phénotypique des h-MDMs traités par le P17 nous a permis de montrer que le P17 oriente la différenciation des h-MDMs vers un phénotype « alternatif », caractérisé par la surexpression du récepteur mannose (RM) et Dectine-1. Précédemment, notre équipe a démontré que PPAR γ était un récepteur nucléaire clé de l'activation « alternative » des macrophages et du contrôle transcriptionnel du RM et Dectine-1 (Coste et al., 2003; Galès et al., 2010a; Lefèvre et al., 2015). De manière intéressante, nous avons pu mettre en évidence que la surexpression de ces deux récepteurs à la surface des h-MDMs activés par le P17 dépend de l'activation de PPAR γ . Dans ce travail, nous démontrons également que cette activation est dépendante de la production de leukotriène B4 (LTB4). En effet, le P17 augmente la mobilisation et le métabolisme de l'acide arachidonique, et l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes essentielles à la synthèse du LTB4 abolit complètement l'activation de PPAR γ induite par le P17. Ces résultats sont en accord avec le fait que les principaux ligands endogènes connus de PPAR γ dérivent du métabolisme de l'acide arachidonique (Berry et al., 2007; Coste et al., 2003, 2008a; Galès et al., 2010a). Ainsi, ces résultats mettent en évidence d'une part le rôle majeur du LTB4 produit par les h-MDMs activés par le P17 dans la surexpression du RM et Dectine-1 et d'autre part, suggèrent l'importance de ce médiateur lipidique en tant qu'agoniste endogène de PPAR γ dans l'induction de ces deux CLR par le P17. Une fois activé, PPAR γ se lie à une séquence spécifique de l'ADN appelée PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element) pour pouvoir induire la transcription de ses gènes cibles. De ce fait, il sera nécessaire de confirmer l'activation de PPAR γ par le P17 en utilisant des h-MDMs transfectés

avec un plasmide contenant le promoteur de l'élément de réponse à PPAR γ (PPRE) cloné en amont du gène rapporteur de la luciférase (PPRE-luc).

Dectine-1 et MR sont deux récepteurs essentiels impliqués dans l'activité antifongique des macrophages *via* la reconnaissance et l'internalisation des levures. Leur expression étant augmentée dans les h-MDMs activés par le P17, nous avons évalué la capacité du P17 à contrôler l'élimination de *C. albicans* par les h-MDMs. Nous avons ainsi observé que les h-MDMs activés par le P17 ont une capacité accrue à tuer les levures. L'invalidation de Dectine-1 et MR par des siRNA et l'utilisation d'agents solubles bloquant ces récepteurs, comme les laminarines et les mannanes, nous ont permis de démontrer que l'augmentation de la capacité des h-MDMs activés par le P17 à tuer les levures est corrélée à une meilleure capacité de ces cellules à reconnaître et internaliser *C. albicans* *via* Dectine-1 et MR. L'implication de Dectine-1 et MR dans l'induction des fonctions fongicides des macrophages a déjà été mise en évidence lors d'études précédentes, démontrant que l'IL-13 améliore l'élimination de *C. albicans* par les macrophages murins de façon dépendante des récepteurs Dectine-1 et MR (Coste et al., 2003; Galès et al., 2010; Lefèvre et al., 2015). De façon intéressante, nous montrons également dans ce travail que l'augmentation de l'activité candidicide des h-MDMs par le P17 est totalement abolie en présence d'antagoniste spécifique de PPAR γ et d'inhibiteurs de la synthèse de LTB₄. Ainsi, ces données suggèrent que l'axe LTB₄/PPAR γ /Dectine-1-RM est essentiel à l'induction de la capacité des h-MDMs activés par le P17 à tuer les levures, mettant en évidence pour la première fois une voie de signalisation originale déclenchée par un PAM.

Parmi les mécanismes impliqués dans la réponse fongicide des macrophages, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les cytokines pro-inflammatoires sont des molécules effectrices majeures connues pour jouer un rôle important dans l'élimination

de *C. albicans* (Erwig and Gow, 2016; Galès et al., 2010a; Maródi et al., 1991; Saijo and Iwakura, 2011). De ce fait, nous avons voulu déterminer si le P17 avait un impact sur ces deux mécanismes. Nous avons ainsi pu démontrer que les h-MDMs traités par le P17 produisent de fortes quantités de ROS et d'IL-1 β . L'étude des voies de signalisation à l'origine de l'augmentation de ces deux fonctions dans les h-MDMs activés par le P17 nous a permis de mettre en évidence que le P17 induit la production de ROS par les h-MDMs en activant la sous-unité p47 phox de la NADPH, enzyme essentielle à la production de ROS, par phosphorylation. Ces résultats sont en accord avec des travaux précédemment effectués au laboratoire, démontrant que l'IL-13 favorise l'élimination de *C. albicans* par les macrophages murins en activant la production de ROS via l'activation de la NADPH oxydase (Coste et al., 2003; Galès et al., 2010a; Lefèvre et al., 2015). De même, nous avons également démontré que la production d'IL-1 β par les h-MDMs activés par le P17 nécessite l'activation de la caspase-1, et donc de l'inflammasome, par le P17. L'utilisation d'inhibiteurs de la cPLA₂ et de l'activation de la 5-LOXX abolit cette activation, indiquant que l'activation de la caspase-1 par le P17 conduisant à la sécrétion d'IL-1 β mature est également dépendante du LTB₄. Ces données sont en accord avec les travaux réalisés par Amaral et ses collaborateurs qui ont précédemment identifié le LTB₄ comme un activateur du complexe enzymatique inflammasome (Amaral et al., 2012). Plusieurs études ont mis en évidence l'importance des ROS dans l'activation de l'inflammasome (Dostert et al., 2008; Tschopp and Schroder, 2010; Zhou et al., 2011). Etant donné que l'inhibition de la production de ROS et de l'IL-1 β conduit à la suppression totale de l'augmentation de l'activité candidicide des h-MDM traités par le P17, un lien entre ces deux mécanismes a pu être établi. En effet, l'étude de la production d'IL-1 β en présence d'un inhibiteur des ROS et la perte de l'effet du P17 observée en présence

de cet inhibiteur, nous a permis de montrer que l'induction de la production d'IL-1 β par le P17 était totalement dépendante de l'augmentation des ROS. Ainsi, l'ensemble de ce travail révèle que le P17 active la réponse inflammatoire des h-MDMs en réponse à une infection fongique en augmentant leur capacité à produire des médiateurs pro-inflammatoires tels que le LTB₄, les ROS et l'IL-1 β , à l'origine de l'élimination des levures. Parallèlement à l'induction de ce statut pro-inflammatoire, le P17 augmente la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires, suggérant que ce peptide est capable de déclencher une inflammation « modérée ». En accord avec ces données, plusieurs études ont précédemment mis en évidence l'implication de PAMs dans l'activation d'une réponse inflammatoire contrôlée dans un contexte infectieux. C'est le cas des PAMs du venin de scorpions 7.2 et 7.8 (Pucca et al., 2016) ainsi que du mastoparan (Lentschat et al., 2005), PAM isolé à partir du venin de guêpe, qui induisent tous les trois la production d'IL-6. De même, l'apidaecine active la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α , mais aussi de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Tavano et al., 2011), contrôlant ainsi la réponse inflammatoire de la même façon que nous le démontrons avec le P17.

De manière intéressante, la capacité du P17 à moduler l'activité fongicide des macrophages observée *in vitro* a pu être validée *in vivo*, sur un modèle murin de candidose gastro-intestinale. En effet, nous avons pu démontrer que les souris traitées par le P17 développaient une candidose moins sévère, reflétée à la fois par une moindre perte de poids et une charge fongique au niveau du tractus gastro-intestinal diminuée en comparaison aux souris non traitées. Cette diminution de la susceptibilité des souris traitées par le P17 à l'infection est corrélée à l'augmentation de la capacité de leurs macrophages péritonéaux à reconnaître et phagocyter *C. albicans* et à produire une quantité accrue de ROS. L'induction de ces fonctions effectrices conduit

à une meilleure élimination des levures chez les souris traitées par le P17. Ces observations sont en accord avec des travaux précédents démontrant que l'IL-13 améliore la capacité des macrophages murins à éliminer *C. albicans* dans des modèles d'infection gastro-intestinale ou systémique (Coste et al., 2008a; Galès et al., 2010a; Lefèvre et al., 2010).

Nous avons pu observer *in vitro* que l'amélioration de l'activité candidicide des macrophages par le P17 était dépendante de l'axe LTB₄/PPAR_γ/Dectine-1-RM. Ainsi, afin de confirmer l'importance de cette voie de signalisation *in vivo*, nous évaluerons l'impact du P17 sur la réponse antifongique au cours d'une infection gastro-intestinale chez des souris invalidées spécifiquement au niveau des macrophages pour les gènes codant la 5-LOXX, PPAR_γ, Dectine-1 et RM.

Les PAMs administrés *in vivo* peuvent perdre de leur efficacité ou être dégradés dans l'organisme, rendant leur utilisation difficile en thérapeutique (Bowdish et al., 2005; Goldman et al., 1997; Marr et al., 2006). De ce fait, il sera intéressant de valider l'efficacité du P17 *in vivo* en modifiant son mode d'administration, notamment en l'administrant par voie orale afin de vérifier son efficacité en cas d'infection gastro-intestinale par *C. albicans*.

De nombreux PAMs cationiques sont décrits pour exercer leurs effets immunomodulateurs à travers la génération d'un signal calcique (Gupta et al., 2016; Moerman et al., 2003; Pundir et al., 2014; Wan et al., 2014a; Zhang et al., 2016). En ligne avec ces données, le P17 déclenche un signal calcique dans les h-MDMs, nécessitant à la fois l'entrée de calcium extracellulaire et la libération de calcium à partir des pools calciques intracellulaires. De manière intéressante, nous avons déterminé que ce peptide exerce son activité immunomodulatrice de manière récepteur-dépendante, en interagissant avec un récepteur couplé aux protéines G

(RCPG). Bien que certains PAMs puissent agir indépendamment de récepteurs, la plupart d'entre eux interagissent avec des RCPGs pour exercer leur activité immunomodulatrice. Les RCPGs les plus décrits pour transduire les effets immunomodulateurs des PAMs sont les récepteurs au PAM bactérien fMLP (FPR1/2) (De Yang et al., 2000b; Pundir et al., 2014; Wan et al., 2011) et certains récepteurs aux chimiokines comme CCR6 (Smithrithee et al., 2015). Dans le cas du P17, la désensibilisation des récepteurs au fMLP indique que ces RCPG ne sont pas impliqués dans l'induction de fonctions modulatrices des h-MDMs par le P17. Ainsi, des études d'interaction ligand-récepteurs nous permettront de déterminer plus précisément quel RCPG est mobilisé par le P17 pour exercer son activité immunomodulatrice.

La structure des PAMs conditionne leur activité. Ainsi, la modification de leur charge globale ou de leur enchainement en acides aminés peut renforcer ou à l'inverse diminuer leurs fonctions immunomodulatrices. Dans le but de définir la région essentielle au rôle immunomodulateur du P17, nous testerons l'activité antifongique des h-MDMs après traitement par différents peptides tronqués représentant différentes fractions du P17. Quatre peptides ont ainsi été synthétisés contenant, de la région N-terminale à la région C-terminale, les acides aminés 3 à 13, 5 à 13, 7 à 13 et 9 à 13, respectivement nommés T1, T2, T3 et T4. L'analyse préliminaire de la production de ROS par les h-MDMs activés par ces différents peptides tronqués met en évidence que T1 et T2 induisent une augmentation de la production de ROS par les h-MDMs en présence de *C. albicans* en comparaison aux h-MDMs non traités. Cependant, cette induction reste inférieure à celle induite par le P17. En revanche, T3 et T4 ne démontre aucune propriété activatrice de la synthèse de ROS en comparaison aux h-MDMs contrôles. Ces résultats suggèrent que la partie active du P17 comprend les acides aminés 3 à 7, mais n'exclut pas l'importance des trois premiers acides

aminés N-terminaux dans la modulation de l'activité antifongique conférée aux h-MDMs par le P17. Cependant, ces résultats devront être confirmés par l'évaluation de l'élimination de *C. albicans* par les h-MDMs traités avec ces différents peptides. Une approche similaire a précédemment été réalisée avec le LL-37 par Molhoek et ses collaborateurs, qui ont ainsi pu identifier la partie comprenant les acides aminés 13 à 31 comme étant nécessaire à la suppression de la réponse inflammatoire médiée par les TLRs vis-à-vis de bactéries (Molhoek et al., 2009).

Le P17, de séquence primaire LFKEILEKIKAKL-NH₂, est composé de 4 lysines (K). Ces lysines de charge positive confèrent une charge globale positive aux PAMs et sont importantes à l'activité de ces derniers. Leur impact sur l'activité immunomodulatrice des PAMs a été démontré pour le LL-37 lors d'études précédentes. En effet, les auteurs ont démontré que la carbamylation des lysines du LL-37, qui modifie leur charge, modifie les fonctions du LL-37 qui peut passer d'inhibiteur de la réponse inflammatoire à un rôle activateur de cette dernière (Koro et al., 2016). De ce fait, il pourrait être intéressant de vérifier cette hypothèse sur le P17 en modifiant sa charge globale par suppression ou enrichissement en lysines.

En conclusion, ce travail nous a permis de mettre en évidence l'activité immunomodulatrice du P17 sur la polarisation et les fonctions fongicides des h-MDMs. Nous avons également identifié les mécanismes moléculaires déclenchés par le P17 responsables de l'induction de la réponse microbicide des h-MDMs vis-à-vis de *C. albicans*. Ainsi, ces données révèlent pour la première fois l'implication d'un PAM dans le contrôle de la différenciation des macrophages et dans leurs fonctions microbicides associées. Face à l'émergence de nombreuses résistances aux anti-infectieux usuels, le P17 pourrait constituer un composé prometteur pour lutter contre les infections fongiques. Ainsi, ce travail ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le

domaine des maladies infectieuses et supporte l'utilisation des PAMs en tant que composés immunomodulateurs pour restreindre les maladies infectieuses.

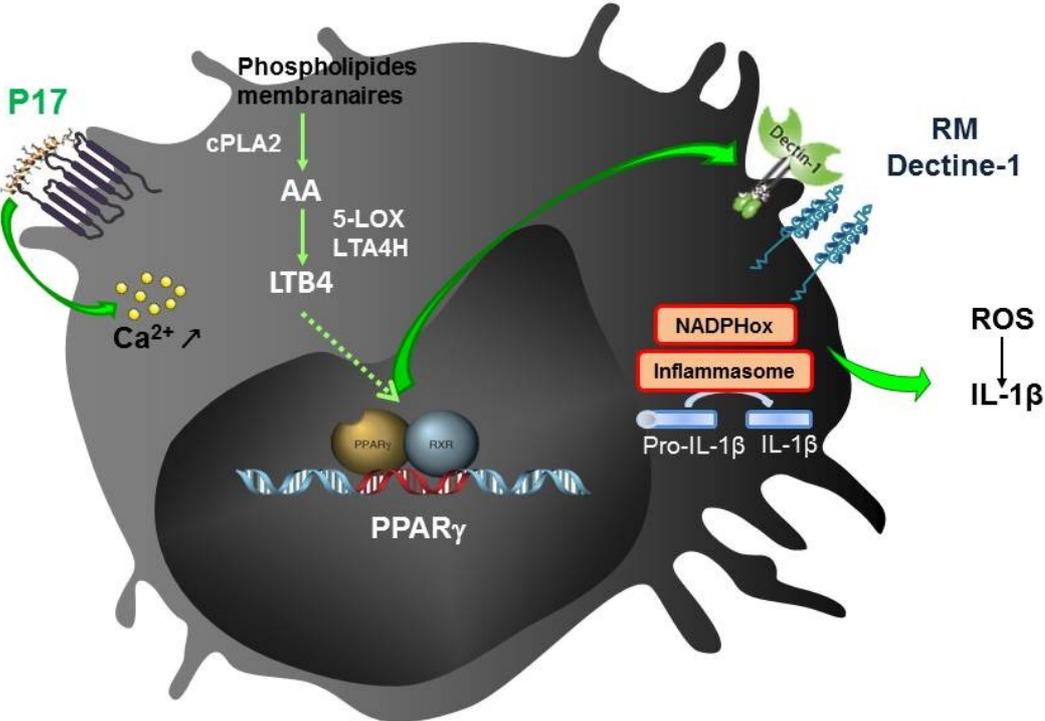


Figure 39: Effet immuno-modulateur du P17 sur la polarisation des h-MDMs et leur activité candidicide associée

Références

A

- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N., and Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20, 319–325.
- Akaogi, J., Yamada, H., Kuroda, Y., Nacionales, D.C., Reeves, W.H., and Satoh, M. (2004). Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF-alpha and IL-6 production. *J. Leukoc. Biol.* 76, 227–236.
- Alalwani, S.M., Sierigk, J., Herr, C., Pinkenburg, O., Gallo, R., Vogelmeier, C., and Bals, R. (2010). The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 40, 1118–1126.
- Amaral, F.A., Costa, V.V., Tavares, L.D., Sachs, D., Coelho, F.M., Fagundes, C.T., Soriani, F.M., Silveira, T.N., Cunha, L.D., Zamboni, D.S., et al. (2012). NLRP3 inflammasome-mediated neutrophil recruitment and hypernociception depend on leukotriene B(4) in a murine model of gout. *Arthritis Rheum.* 64, 474–484.
- Amiche, M., Seon, A.A., Pierre, T.N., and Nicolas, P. (1999). The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 456, 352–356.
- Andrès, E., and Dimarcq, J.-L. (2004). Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. *Rev. Médecine Interne* 25, 629–635.
- Andrès, E., and Dimarcq, J.-L. (2007). [Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development. Up date]. *Med. Mal. Infect.* 37, 194–199.
- Aoki, T., and Narumiya, S. (2012). Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 304–311.
- Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2003). Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 1635–1639.
- Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S., Suzuki, K., Kura, F., and Maeda, N. (1999). Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect. Immun.* 67, 1828–1836.
- Arnaout, M.A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75, 1037–1050.
- Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K., and Kobzik, L. (2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J. Exp. Med.* 200, 267–272.
- Ashraf, M.Z., and Gupta, N. (2011). Scavenger receptors: Implications in atherothrombotic disorders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 697–700.
- Astruc, C., Malosse, C., and Errard, C. (2001). Lack of intraspecific aggression in the ant *Tetramorium bicarinatum*: a chemical hypothesis. *J. Chem. Ecol.* 27, 1229–1248.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692.

Aung, G., Niyonsaba, F., Ushio, H., Kajiwara, N., Saito, H., Ikeda, S., Ogawa, H., and Okumura, K. (2011). Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology* 132, 527–539.

B

Bach, E.A., Aguet, M., and Schreiber, R.D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563–591.

Bafica, A., Scanga, C.A., Serhan, C., Machado, F., White, S., Sher, A., and Aliberti, J. (2005). Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J. Clin. Invest.* 115, 1601–1606.

Balsam, L.B., Liang, T.W., and Parkos, C.A. (1998). Functional mapping of CD11b/CD18 epitopes important in neutrophil-epithelial interactions: a central role of the I domain. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 5058–5065.

Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4, 585–595.

Barksby, H.E., Lea, S.R., Preshaw, P.M., and Taylor, J.J. (2007). The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 217–225.

Barlow, P.G., Li, Y., Wilkinson, T.S., Bowdish, D.M.E., Lau, Y.E., Cosseau, C., Haslett, C., Simpson, A.J., Hancock, R.E.W., and Davidson, D.J. (2006). The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.* 80, 509–520.

Barlow, P.G., Beaumont, P.E., Cosseau, C., Mackellar, A., Wilkinson, T.S., Hancock, R.E.W., Haslett, C., Govan, J.R.W., Simpson, A.J., and Davidson, D.J. (2010). The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 43, 692–702.

Baroni, A., Donnarumma, G., Paoletti, I., Longanesi-Cattani, I., Bifulco, K., Tufano, M.A., and Carriero, M.V. (2009). Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Peptides* 30, 267–272.

Barton, G.M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.* 118, 413–420.

Bayrer, J.R., Mukkamala, S., Sablin, E.P., Webb, P., and Fletterick, R.J. (2015). Silencing LRH-1 in colon cancer cell lines impairs proliferation and alters gene expression programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2467–2472.

Bechinger, B. Structure and Functions of Channel-Forming Peptides: Magainins, Cecropins, Melittin and Alamethicin. *J. Membr. Biol.* 156, 197–211.

Belazi, M., Velegaki, A., Fleva, A., Gidarakou, I., Papanau, L., Baka, D., Daniilidou, N., and Karamitsos, D. (2005). Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses* 48, 192–196.

Bensinger, S.J., and Tontonoz, P. (2008). Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 454, 470–477.

Berry, A., Balard, P., Coste, A., Olagnier, D., Lagane, C., Authier, H., Benoit-Vical, F., Lepert, J.-C., Séguéla, J.-P., Magnaval, J.-F., et al. (2007). IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR γ activation. *Eur. J. Immunol.* 37, 1642–1652.

Bommineni, Y.R., Achanta, M., Alexander, J., Sunkara, L.T., Ritchey, J.W., and Zhang, G. (2010). A fowlicidin-1 analog protects mice from lethal infections induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Peptides* 31, 1225–1230.

Bommineni, Y.R., Pham, G.H., Sunkara, L.T., Achanta, M., and Zhang, G. (2014). Immune regulatory activities of fowlicidin-1, a cathelicidin host defense peptide. *Mol. Immunol.* 59, 55–63.

Bowdish, D.M.E., Davidson, D.J., Speert, D.P., and Hancock, R.E.W. (2004). The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 3758–3765.

Bowdish, D.M.E., Davidson, D.J., Lau, Y.E., Lee, K., Scott, M.G., and Hancock, R.E.W. (2005). Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* 77, 451–459.

Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.

Brogden, K.A., Ackermann, M., McCray, P.B., and Tack, B.F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22, 465–478.

Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 33–43.

Büchau, A.S., Morizane, S., Trowbridge, J., Schaubert, J., Kotol, P., Bui, J.D., and Gallo, R.L. (2010). The host defense peptide cathelicidin is required for NK cell-mediated suppression of tumor growth. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 369–378.

Bulet, P., Stöcklin, R., and Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169–184.

Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., and Kurts, C. (2006). The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 6770–6776.

C

Caaveiro, J.M.M., Kiyoshi, M., and Tsumoto, K. (2015). Structural analysis of Fc/Fc γ R complexes: a blueprint for antibody design. *Immunol. Rev.* 268, 201–221.

Cambi, A., Netea, M.G., Mora-Montes, H.M., Gow, N.A.R., Hato, S.V., Lowman, D.W., Kullberg, B.-J., Torensma, R., Williams, D.L., and Figdor, C.G. (2008). Dendritic cell interaction

with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J. Biol. Chem.* 283, 20590–20599.

Campbell, G.S., Meyer, D.J., Raz, R., Levy, D.E., Schwartz, J., and Carter-Su, C. (1995). Activation of acute phase response factor (APRF)/Stat3 transcription factor by growth hormone. *J. Biol. Chem.* 270, 3974–3979.

Cariou, B., Charbonnel, B., and Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 23, 205–215.

Carretero, M., Escámez, M.J., García, M., Duarte, B., Holguín, A., Retamosa, L., Jorcano, J.L., Ríó, M.D., and Larcher, F. (2008). In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. *J. Invest. Dermatol.* 128, 223–236.

Cassado, A.D.A., D'Império Lima, M.R., and Bortoluci, K.R. (2015). Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front. Immunol.* 6, 225.

Cassel, S.L., Eisenbarth, S.C., Iyer, S.S., Sadler, J.J., Colegio, O.R., Tephly, L.A., Carter, A.B., Rothman, P.B., Flavell, R.A., and Sutterwala, F.S. (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9035–9040.

Castrillo, A., and Tontonoz, P. (2004). Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 455–480.

Cattoir, V. (2004). [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol. Biol. (Paris)* 52, 607–616.

Cham, C.M., Ko, K., and Niewold, T.B. (2012). Interferon Regulatory Factor 5 in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 1–11.

Chamilos, G., Gregorio, J., Meller, S., Lande, R., Kontoyiannis, D.P., Modlin, R.L., and Gilliet, M. (2012). Cytosolic sensing of extracellular self-DNA transported into monocytes by the antimicrobial peptide LL37. *Blood* 120, 3699–3707.

Chand, A.L., Herridge, K.A., Thompson, E.W., and Clyne, C.D. (2010). The orphan nuclear receptor LRH-1 promotes breast cancer motility and invasion. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 965–975.

Chand, A.L., Wijayakumara, D.D., Knower, K.C., Herridge, K.A., Howard, T.L., Lazarus, K.A., and Clyne, C.D. (2012). The Orphan Nuclear Receptor LRH-1 and ER α Activate GREB1 Expression to Induce Breast Cancer Cell Proliferation. *PLOS ONE* 7, e31593.

Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., et al. (2001). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* 7, 161–171.

Chen, H., Xu, Z., Peng, L., Fang, X., Yin, X., Xu, N., and Cen, P. (2006). Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides* 27, 931–940.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.

Cheng, S.-C., van de Veerdonk, F.L., Lenardon, M., Stoffels, M., Plantinga, T., Smeekens, S., Rizzetto, L., Mukaremera, L., Preechasuth, K., Cavalieri, D., et al. (2011). The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses

that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J. Leukoc. Biol.* *90*, 357–366.

Chinetti, G., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* *49*, 497–505.

Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A.T., Neve, B., Torra, I.P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., et al. (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat. Med.* *7*, 53–58.

Ciraci, C., Janczy, J.R., Sutterwala, F.S., and Cassel, S.L. (2012). Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. *Microbes Infect.* *14*, 1263–1270.

Cloutier, A., Marois, I., Cloutier, D., Verreault, C., Cantin, A.M., and Richter, M.V. (2012). The prostanoid 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin-j₂ reduces lung inflammation and protects mice against lethal influenza infection. *J. Infect. Dis.* *205*, 621–630.

Coffelt, S.B., Tomchuck, S.L., Zvezdaryk, K.J., Danka, E.S., and Scandurro, A.B. (2009). Leucine leucine-37 uses formyl peptide receptor-like 1 to activate signal transduction pathways, stimulate oncogenic gene expression, and enhance the invasiveness of ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* *7*, 907–915.

Cologna, C.T., Cardoso, J. dos S., Jourdan, E., Degueldre, M., Upert, G., Gilles, N., Uetanabaro, A.P.T., Costa Neto, E.M., Thonart, P., de Pauw, E., et al. (2013). Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. *J. Proteomics* *94*, 413–422.

Coste, A., Linas, M.D., Cassaing, S., Bernad, J., Chalmeton, S., Séguéla, J.P., and Pipy, B. (2002). A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. *J. Antimicrob. Chemother.* *49*, 731–740.

Coste, A., Dubourdeau, M., Linas, M.D., Cassaing, S., Lepert, J.-C., Balard, P., Chalmeton, S., Bernad, J., Orfila, C., Séguéla, J.-P., et al. (2003). PPARgamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* *19*, 329–339.

Coste, A., Dubuquoy, L., Barnouin, R., Annicotte, J.-S., Magnier, B., Notti, M., Corazza, N., Antal, M.C., Metzger, D., Desreumaux, P., et al. (2007). LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13098–13103.

Coste, A., Lagane, C., Filipe, C., Authier, H., Galès, A., Bernad, J., Douin-Echinard, V., Lepert, J.-C., Balard, P., Linas, M.-D., et al. (2008a). IL-13 attenuates gastrointestinal candidiasis in normal and immunodeficient RAG-2(-/-) mice via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 4939–4947.

Coste, A., Lagane, C., Filipe, C., Authier, H., Gales, A., Bernad, J., Douin-Echinard, V., Lepert, J.-C., Balard, P., Linas, M.-D., et al. (2008b). IL-13 Attenuates Gastrointestinal Candidiasis in Normal and Immunodeficient RAG-2-/- Mice via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Activation. *J. Immunol.* *180*, 4939–4947.

Crofford, L.J. (1997). COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol. Suppl.* 49, 15–19.

D

Darnell, J.E., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415–1421.

David, M., Petricoin, E.F., Igarashi, K., Feldman, G.M., Finbloom, D.S., and Lerner, A.C. (1994). Prolactin activates the interferon-regulated p91 transcription factor and the Jak2 kinase by tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7174–7178.

Davidson, D.J., Currie, A.J., Reid, G.S.D., Bowdish, D.M.E., MacDonald, K.L., Ma, R.C., Hancock, R.E.W., and Speert, D.P. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 1146–1156.

Davis, B.K., and Ting, J.P.-Y. (2010). NLRP3 has a sweet tooth. *Nat. Immunol.* 11, 105–106.

Daynes, R.A., and Jones, D.C. (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 748–759.

De Smet, K., and Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* 27, 1337–1347.

De Stefano, J.A., Myers, J.D., Du Pont, D., Foy, J.M., Theus, S.A., and Walzer, P.D. (1998). Cell wall antigens of *Pneumocystis carinii* trophozoites and cysts: purification and carbohydrate analysis of these glycoproteins. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 334–343.

De Yang, Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters, J., Oppenheim, J.J., and Chertov, O. (2000a). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* 192, 1069–1074.

DeLucca, A.J., Bland, J.M., Jacks, T.J., Grimm, C., Cleveland, T.E., and Walsh, T.J. (1997). Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 481–483.

Devine, D.A. (2003). Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol. Immunol.* 40, 431–443.

Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., and Kisich, K.O. (2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2377–2392.

van Die, I., van Vliet, S.J., Nyame, A.K., Cummings, R.D., Bank, C.M.C., Appelmelk, B., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2003). The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology* 13, 471–478.

Dobrovolskaia, M.A., Medvedev, A.E., Thomas, K.E., Cuesta, N., Toshchakov, V., Ren, T., Cody, M.J., Michalek, S.M., Rice, N.R., and Vogel, S.N. (2003). Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages:

effects of TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NF-kappa B signaling pathway components. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 508–519.

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

Drickamer, K., and Taylor, M.E. (2015). Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **34**, 26–34.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361.

Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.-P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegón, I., Catala, L., Ifrah, N., et al. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110**, 4319–4330.

Dupont, P.F. (1995). *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **85**, 104–115.

Durbin, J.E., Hackenmiller, R., Simon, M.C., and Levy, D.E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* **84**, 443–450.

E

Ekengren, S., and Hultmark, D. (1999). *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 965–972.

El-Benna, J., Dang, P.M.-C., Gougerot-Pocidallo, M.-A., Marie, J.-C., and Braut-Boucher, F. (2009). p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.* **41**, 217.

Elssner, A., Duncan, M., Gavrilin, M., and Wewers, M.D. (2004). A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 4987–4994.

van Emden, H.F. (2013). Subclass Pterygota, Division Endopterygota, Order Hymenoptera (Sawflies, Ants, Bees and Wasps) – c. 120,000 Described Species. In *Handbook of Agricultural Entomology*, (John Wiley & Sons.), pp. 193–220.

Emi, M., Asaoka, H., Matsumoto, A., Itakura, H., Kurihara, Y., Wada, Y., Kanamori, H., Yazaki, Y., Takahashi, E., and Lepert, M. (1993). Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 2120–2125.

Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., and Protter, A.A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**, 11811–11816.

Erwig, L.P., and Gow, N.A.R. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 163–176.

Evans, J.H., Spencer, D.M., Zweifach, A., and Leslie, C.C. (2001). Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *J. Biol. Chem.* *276*, 30150–30160.

Ezekowitz, R.A., and Stahl, P.D. (1988). The structure and function of vertebrate mannose lectin-like proteins. *J. Cell Sci. Suppl.* *9*, 121–133.

Ezekowitz, R.A., Sastry, K., Bailly, P., and Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J. Exp. Med.* *172*, 1785–1794.

F

Fayard, E., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2004). LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol.* *14*, 250–260.

Feige, J.N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W., and Desvergne, B. (2005). Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J. Biol. Chem.* *280*, 17880–17890.

Feige, J.N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., and Wahli, W. (2006). From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid Res.* *45*, 120–159.

Finkelman, F.D., Morris, S.C., Orekhova, T., Mori, M., Donaldson, D., Reiner, S.L., Reilly, N.L., Schopf, L., and Urban, J.F. (2000). Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 2303–2310.

Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., and Urban, J.F. (2004). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.* *201*, 139–155.

Finking, R., and Marahiel, M.A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides¹. *Annu. Rev. Microbiol.* *58*, 453–488.

Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* *7*, 61–98.

Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C.E., Diaquin, M., and Latgé, J.-P. (2000). Molecular Organization of the Alkali-insoluble Fraction of *Aspergillus fumigatus* Cell Wall. *J. Biol. Chem.* *275*, 27594–27607.

Fournier, T., Tsatsaris, V., Handschuh, K., and Evain-Brion, D. (2007). PPARs and the placenta. *Placenta* *28*, 65–76.

Funderburg, N., Lederman, M.M., Feng, Z., Drage, M.G., Jadhowsky, J., Harding, C.V., Weinberg, A., and Sieg, S.F. (2007). Human β -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 18631–18635.

Funderburg, N.T., Jadhowsky, J.K., Lederman, M.M., Feng, Z., Weinberg, A., and Sieg, S.F. (2011). The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam(3) CSK(4) and human β -defensin-3

differentially induce interleukin-10 and nuclear factor- κ B signalling patterns in human monocytes. *Immunology* 134, 151–160.

G

Galès, A., Conduché, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olganier, D., Béraud, M., Martin-Blondel, G., Linas, M.-D., Auwerx, J., Coste, A., et al. (2010a). PPAR γ controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6, e1000714.

Galès, A., Conduché, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olganier, D., Béraud, M., Martin-Blondel, G., Linas, M.-D., Auwerx, J., Coste, A., et al. (2010b). PPAR γ Controls Dectin-1 Expression Required for Host Antifungal Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6, e1000714.

Gantner, B.N., Simmons, R.M., Canavera, S.J., Akira, S., and Underhill, D.M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107–1117.

Gantner, B.N., Simmons, R.M., and Underhill, D.M. (2005). Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 24, 1277–1286.

Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2003). Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 111, 698–714.

Gerber, J.S., and Mosser, D.M. (2001). Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fc γ receptors. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 3, 131–139.

Ghosn, E.E.B., Cassado, A.A., Govoni, G.R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D.M., Bortoluci, K.R., Almeida, S.R., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2568–2573.

Glass, C.K., and Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 44–55.

Goenka, S., and Kaplan, M.H. (2011). Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol. Res.* 50, 87–96.

Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1997). Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88, 553–560.

Gomes, I.N., Palma, L.C., Campos, G.O., Lima, J.G.B., DE Almeida, T.F., DE Menezes, J.P.B., Ferreira, C. a. G., Santos, R.R.D., Buck, G.A., Manque, P. a. M., et al. (2009). The scavenger receptor MARCO is involved in *Leishmania major* infection by CBA/J macrophages. *Parasite Immunol.* 31, 188–198.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23–35.

Gosset, P., Charbonnier, A.S., Delerive, P., Fontaine, J., Staels, B., Pestel, J., Tonnel, A.B., and Trottein, F. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 2857–2865.

Gough, P.J., and Gordon, S. (2000). The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect.* 2, 305–311.

Gris, D., Ye, Z., Iocca, H.A., Wen, H., Craven, R.R., Gris, P., Huang, M., Schneider, M., Miller, S.D., and Ting, J.P.-Y. (2010). NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 974–981.

Gronert, K., Clish, C.B., Romano, M., and Serhan, C.N. (1999). Transcellular regulation of eicosanoid biosynthesis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 120, 119–144.

Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schäfer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Förster, I., and Ruland, J. (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442, 651–656.

Gudmundsson, G.H., Magnusson, K.P., Chowdhary, B.P., Johansson, M., Andersson, L., and Boman, H.G. (1995). Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member: comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic FALL-39. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7085–7089.

Guerrero, C.A., Guererero, C.A., Murillo, A., and Acosta, O. (2012). Inhibition of rotavirus infection in cultured cells by N-acetyl-cysteine, PPAR γ agonists and NSAIDs. *Antiviral Res.* 96, 1–12.

Gupta, K., Subramanian, H., and Ali, H. (2016). Modulation of host defense peptide-mediated human mast cell activation by LPS. *Innate Immun.* 22, 21–30.

H

Habermann, E. (1972). Bee and wasp venoms. *Science* 177, 314–322.

Haffner, S.M., Greenberg, A.S., Weston, W.M., Chen, H., Williams, K., and Freed, M.I. (2002). Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106, 679–684.

Han, Y., Leaman, D.W., Watling, D., Rogers, N.C., Groner, B., Kerr, I.M., Wood, W.I., and Stark, G.R. (1996). Participation of JAK and STAT proteins in growth hormone-induced signaling. *J. Biol. Chem.* 271, 5947–5952.

Hancock, R.E. (1999). Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs* 57, 469–473.

Hancock, R.E., and Chapple, D.S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1317–1323.

Hancock, R.E., and Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16, 82–88.

Hardison, S.E., and Brown, G.D. (2012). C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat. Immunol.* 13, 817–822.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally

throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.

Hata, A.N., and Breyer, R.M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.* 103, 147–166.

von Haussen, J., Koczulla, R., Shaykhiev, R., Herr, C., Pinkenburg, O., Reimer, D., Wiewrodt, R., Biesterfeld, S., Aigner, A., Czubyko, F., et al. (2008). The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer Amst. Neth.* 59, 12–23.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344–362.

Hayden, M.S., West, A.P., and Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–6780.

van Heijenoort, J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11, 25R–36R.

Heilborn, J.D., Nilsson, M.F., Kratz, G., Weber, G., Sørensen, O., Borregaard, N., and Ståhle-Bäckdahl, M. (2003). The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J. Invest. Dermatol.* 120, 379–389.

Heilborn, J.D., Nilsson, M.F., Jimenez, C.I.C., Sandstedt, B., Borregaard, N., Tham, E., Sørensen, O.E., Weber, G., and Ståhle, M. (2005). Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *Int. J. Cancer* 114, 713–719.

Heinsbroek, S.E.M., Taylor, P.R., Martinez, F.O., Martinez-Pomares, L., Brown, G.D., and Gordon, S. (2008). Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog.* 4, e1000218.

Held, T.K., Weihua, X., Yuan, L., Kalvakolanu, D.V., and Cross, A.S. (1999). Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infect. Immun.* 67, 206–212.

Helmy, K.Y., Katschke, K.J., Gorgani, N.N., Kljavin, N.M., Elliott, J.M., Diehl, L., Scales, S.J., Ghilardi, N., and van Lookeren Campagne, M. (2006). CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124, 915–927.

Henzler-Wildman, K.A., Martinez, G.V., Brown, M.F., and Ramamoorthy, A. (2004). Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 8459–8469.

Herre, J., Marshall, A.S.J., Caron, E., Edwards, A.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., and Brown, G.D. (2004). Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 104, 4038–4045.

Hilchie, A.L., Wuerth, K., and Hancock, R.E.W. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat. Chem. Biol.* 9, 761–768.

Hinz, B., Brune, K., and Pahl, A. (2000). Prostaglandin E₂ upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 744–748.

Hirsh, D.J., Hammer, J., Maloy, W.L., Blazyk, J., and Schaefer, J. (1996). Secondary structure and location of a magainin analogue in synthetic phospholipid bilayers. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 12733–12741.

Hise, A.G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B.A., Brown, G.D., and Fitzgerald, K.A. (2009). An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 5, 487–497.

Hoover, R.L., Karnovsky, M.J., Austen, K.F., Corey, E.J., and Lewis, R.A. (1984). Leukotriene B₄ action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2191–2193.

Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Bresseur, M., and McKnight, S.L. (1994). An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265, 1701–1706.

Hu, X., Chen, J., Wang, L., and Ivashkiv, L.B. (2007). Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 82, 237–243.

Hu, Z., Murakami, T., Suzuki, K., Tamura, H., Kuwahara-Arai, K., Iba, T., and Nagaoka, I. (2014). Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PloS One* 9, e85765.

Hubert, P., Herman, L., Maillard, C., Caberg, J.-H., Nikkels, A., Pierard, G., Foidart, J.-M., Noel, A., Boniver, J., and Delvenne, P. (2007). Defensins induce the recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions formed in vitro and transplanted in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 2765–2775.

Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., and Boman, H.G. (1980). Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106, 7–16.

I

Issemann, I., Prince, R.A., Tugwood, J.D., and Green, S. (1993). The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* 75, 251–256.

Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E.W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491–511.

J

Ji, A., Meyer, J.M., Cai, L., Akinmusire, A., de Beer, M.C., Webb, N.R., and van der Westhuyzen, D.R. (2011). Scavenger receptor SR-BI in macrophage lipid metabolism. *Atherosclerosis* 217, 106–112.

Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. (1998). PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82–86.

Johnson, B.R., Borowiec, M.L., Chiu, J.C., Lee, E.K., Atallah, J., and Ward, P.S. (2013). Phylogenomics resolves evolutionary relationships among ants, bees, and wasps. *Curr. Biol.* **CB 23**, 2058–2062.

K

Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7556–7561.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., and Wahli, W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 2160–2164.

Kim, J., and Sudbery, P. (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J. Microbiol. Seoul Korea* **49**, 171–177.

Kinchen, J.M., and Ravichandran, K.S. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 781–795.

Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813–819.

Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239–256.

Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., et al. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* **111**, 1665–1672.

Koro, C., Hellvard, A., Delaleu, N., Binder, V., Scavenius, C., Bergum, B., Główny, I., Roberts, H.M., Chapple, I.L.C., Grant, M.M., et al. (2016). Carbamylated LL-37 as a modulator of the immune response. *Innate Immun.* **22**, 218–229.

Kotanides, H., and Reich, N.C. (1993). Requirement of tyrosine phosphorylation for rapid activation of a DNA binding factor by IL-4. *Science* **262**, 1265–1267.

Kraus, D., and Peschel, A. (2006). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **306**, 231–250.

Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.* **12**, 231–238.

Krieger, M. (1999). Charting the fate of the “good cholesterol”: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 523–558.

Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G., and Choi, S. (2007). Toll-like receptor signal transduction. *Exp. Mol. Med.* **39**, 421–438.

Krych-Goldberg, M., and Atkinson, J.P. (2001). Structure-function relationships of complement receptor type 1. *Immunol. Rev.* 180, 112–122.

Kurosaka, K., Chen, Q., Yarovinsky, F., Oppenheim, J.J., and Yang, D. (2005). Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6257–6265.

Kzhyshkowska, J., Neyen, C., and Gordon, S. (2012). Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* 217, 492–502.

L

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., et al. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564–569.

Langnaese, K., Colleaux, L., Kloos, D.U., Fontes, M., and Wieacker, P. (2000). Cloning of Z39Ig, a novel gene with immunoglobulin-like domains located on human chromosome X. *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 522–525.

Leaman, D.W., Pisharody, S., Flickinger, T.W., Commane, M.A., Schlessinger, J., Kerr, I.M., Levy, D.E., and Stark, G.R. (1996). Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 16, 369–375.

Lee, J.Y., Boman, A., Sun, C.X., Andersson, M., Jörnvall, H., Mutt, V., and Boman, H.G. (1989). Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9159–9162.

Lee, M.-T., Chen, F.-Y., and Huang, H.W. (2004). Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 3590–3599.

Lefèvre, L., Galès, A., Olganier, D., Bernad, J., Perez, L., Burcelin, R., Valentin, A., Auwerx, J., Pipy, B., and Coste, A. (2010). PPAR γ ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. *PLoS One* 5, e12828.

Lefèvre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olganier, D., Authier, H., Duval, C., Dardenne, C., Bernad, J., Lemesre, J.L., et al. (2013). The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 38, 1038–1049.

Lefèvre, L., Authier, H., Stein, S., Majorel, C., Couderc, B., Dardenne, C., Eddine, M.A., Meunier, E., Bernad, J., Valentin, A., et al. (2015). LRH-1 mediates anti-inflammatory and antifungal phenotype of IL-13-activated macrophages through the PPAR γ ligand synthesis. *Nat. Commun.* 6, 6801.

Lehmann, J.M., Lenhard, J.M., Oliver, B.B., Ringold, G.M., and Kliewer, S.A. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 272, 3406–3410.

Lehrer, R.I., and Ganz, T. (1999). Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 23–27.

Lentschat, A., Karahashi, H., Michelsen, K.S., Thomas, L.S., Zhang, W., Vogel, S.N., and Arditi, M. (2005). Mastoparan, a G protein agonist peptide, differentially modulates TLR4- and TLR2-mediated signaling in human endothelial cells and murine macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 4252–4261.

Levy, O. (2004). Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* *76*, 909–925.

Lewis, R.A., Goetzl, E.J., Drazen, J.M., Soter, N.A., Austen, K.F., and Corey, E.J. (1981). Functional characterization of synthetic leukotriene B and its stereochemical isomers. *J. Exp. Med.* *154*, 1243–1248.

Liang, Y., Zhou, Y., and Shen, P. (2004). NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell. Mol. Immunol.* *1*, 343–350.

Lillard, J.W., Boyaka, P.N., Chertov, O., Oppenheim, J.J., and McGhee, J.R. (1999). Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 651–656.

van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C., and Brown, E.J. (2007). Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell. Microbiol.* *9*, 2095–2102.

M

MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 323–350.

Madonna, G., Ullman, C., Gentilcore, G., Palmieri, G., and Ascierto, P. (2012). NF-κB as potential target in the treatment of melanoma. *J. Transl. Med.* *10*, 53.

Mancuso, P., Nana-Sinkam, P., and Peters-Golden, M. (2001). Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* *69*, 2011–2016.

Mansour, S.C., Pena, O.M., and Hancock, R.E.W. (2014). Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol.* *35*, 443–450.

Mantovani, A. (1999). The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* *20*, 254–257.

Mantovani, A. (2008). From phagocyte diversity and activation to probiotics: back to Metchnikoff. *Eur. J. Immunol.* *38*, 3269–3273.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.

Maródi, L., Korchak, H.M., and Johnston, R.B. (1991). Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *146*, 2783–2789.

Maródi, L., Schreiber, S., Anderson, D.C., MacDermott, R.P., Korchak, H.M., and Johnston, R.B. (1993). Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma.

Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J. Clin. Invest.* 91, 2596–2601.

Marr, A.K., Gooderham, W.J., and Hancock, R.E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 468–472.

Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 7303–7311.

Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229–265.

Marx, N., Kehrl, B., Kohlhammer, K., Grüb, M., Koenig, W., Hombach, V., Libby, P., and Plutzky, J. (2002). PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ. Res.* 90, 703–710.

Matsumoto, A.K., Kopicky-Burd, J., Carter, R.H., Tuveson, D.A., Tedder, T.F., and Fearon, D.T. (1991). Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J. Exp. Med.* 173, 55–64.

Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462, 1–10.

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 135–145.

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

Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D., et al. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431–442.

Mikita, T., Campbell, D., Wu, P., Williamson, K., and Schindler, U. (1996). Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5811–5820.

Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 6166–6173.

Miyata, K.S., McCaw, S.E., Marcus, S.L., Rachubinski, R.A., and Capone, J.P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene* 148, 327–330.

Moerman, L., Verdonck, F., Willems, J., Tytgat, J., and Bosteels, S. (2003). Antimicrobial peptides from scorpion venom induce Ca(2+) signaling in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 90–97.

Molhoek, E.M., den Hertog, A.L., de Vries, A.-M.B.C., Nazmi, K., Veerman, E.C.I., Hartgers, F.C., Yazdanbakhsh, M., Bikker, F.J., and van der Kleij, D. (2009). Structure-function relationship of the human antimicrobial peptide LL-37 and LL-37 fragments in the modulation of TLR responses. *Biol. Chem.* 390, 295–303.

- Mookherjee, N., Brown, K.L., Bowdish, D.M.E., Doria, S., Falsafi, R., Hokamp, K., Roche, F.M., Mu, R., Doho, G.H., Pistolic, J., et al. (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 2455–2464.
- Moore, A.J., Beazley, W.D., Bibby, M.C., and Devine, D.A. (1996). Antimicrobial activity of cecropins. *J. Antimicrob. Chemother.* 37, 1077–1089.
- Moore, K.J., Rosen, E.D., Fitzgerald, M.L., Randow, F., Andersson, L.P., Altshuler, D., Milstone, D.S., Mortensen, R.M., Spiegelman, B.M., and Freeman, M.W. (2001). The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat. Med.* 7, 41–47.
- Mor, A., Nguyen, V.H., Delfour, A., Migliore-Samour, D., and Nicolas, P. (1991). Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 8824–8830.
- Morizane, S., Yamasaki, K., Mühleisen, B., Kotol, P.F., Murakami, M., Aoyama, Y., Iwatsuki, K., Hata, T., and Gallo, R.L. (2012). Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 in psoriasis enables keratinocyte reactivity against TLR9 ligands. *J. Invest. Dermatol.* 132, 135–143.
- Morris, S.M. (2004). Enzymes of arginine metabolism. *J. Nutr.* 134, 2743S–2747S; discussion 2765S–2767S.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145–173.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209–212.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Mosser, D.M., and Karp, C.L. (1999). Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 406–411.
- Mukhopadhyay, S., Chen, Y., Sankala, M., Peiser, L., Pikkarainen, T., Kraal, G., Tryggvason, K., and Gordon, S. (2006). MARCO, an innate activation marker of macrophages, is a class A scavenger receptor for *Neisseria meningitidis*. *Eur. J. Immunol.* 36, 940–949.

N

- Nagaoka, I., Tamura, H., and Hirata, M. (2006). An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 3044–3052.
- Nall, A.V., Brownlee, R.E., Colvin, C.P., Schultz, G., Fein, D., Cassisi, N.J., Nguyen, T., and Kalra, A. (1996). Transforming growth factor beta 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 122, 171–177.
- Narumiya, S., and FitzGerald, G.A. (2001). Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J. Clin. Invest.* 108, 25–30.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–1226.

- Nataraj, C., Thomas, D.W., Tilley, S.L., Nguyen, M.T., Mannon, R., Koller, B.H., and Coffman, T.M. (2001). Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J. Clin. Invest.* *108*, 1229–1235.
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature* *420*, 846–852.
- Netea, M.G., Gow, N.A.R., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., et al. (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.* *116*, 1642–1650.
- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *67*, 686–723.
- Newton, R.A., Thiel, M., and Hogg, N. (1997). Signaling mechanisms and the activation of leukocyte integrins. *J. Leukoc. Biol.* *61*, 422–426.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F., and Vogel, H.J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* *29*, 464–472.
- Nicolas, P., and El Amri, C. (2009). The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 1537–1550.
- Nijnik, A., and Hancock, R. (2009). Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg. Health Threats J.* *2*, e1.
- Nijnik, A., Pistolic, J., Wyatt, A., Tam, S., and Hancock, R.E.W. (2009). Human cathelicidin peptide LL-37 modulates the effects of IFN-gamma on APCs. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *183*, 5788–5798.
- Nijnik, A., Madera, L., Ma, S., Waldbrook, M., Elliott, M.R., Easton, D.M., Mayer, M.L., Mullaly, S.C., Kindrachuk, J., Jenssen, H., et al. (2010). Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *184*, 2539–2550.
- Nijnik, A., Pistolic, J., Cho, P., Filewod, N.C.J., Falsafi, R., Ramin, A., Harder, K.W., and Hancock, R.E.W. (2012). The role of the Src family kinase Lyn in the immunomodulatory activities of cathelicidin peptide LL-37 on monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* *91*, 599–607.
- Niyonsaba, F., Someya, A., Hirata, M., Ogawa, H., and Nagaoka, I. (2001). Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 1066–1075.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Okumura, K., and Ogawa, H. (2005). The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *175*, 1776–1784.
- Niyonsaba, F., Madera, L., Afacan, N., Okumura, K., Ogawa, H., and Hancock, R.E.W. (2013a). The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J. Leukoc. Biol.* *94*, 159–170.

Niyonsaba, F., Madera, L., Afacan, N., Okumura, K., Ogawa, H., and Hancock, R.E.W. (2013b). The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *J. Leukoc. Biol.* 94, 159–170.

Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr. Issues Mol. Biol.* 8, 11–26.

O

O'Brien, X.M., Heflin, K.E., Lavigne, L.M., Yu, K., Kim, M., Salomon, A.R., and Reichner, J.S. (2012). Lectin site ligation of CR3 induces conformational changes and signaling. *J. Biol. Chem.* 287, 3337–3348.

Odds, F.C. (1987). *Candida* infections: an overview. *Crit. Rev. Microbiol.* 15, 1–5.

Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Eagle, A.R., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., et al. (2007). Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120.

Oh, H., and Ghosh, S. (2013). NF- κ B: roles and regulation in different CD4⁺ T-cell subsets. *Immunol. Rev.* 252, 41–51.

Oh, C.K., Geba, G.P., and Molino, N. (2010). Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *Eur. Respir. Rev.* 19, 46–54.

Okamoto, F., Saeki, K., Sumimoto, H., Yamasaki, S., and Yokomizo, T. (2010). Leukotriene B₄ augments and restores Fc gammaR_s-dependent phagocytosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* 285, 41113–41121.

Olagnier, D., Lavergne, R.-A., Meunier, E., Lefèvre, L., Dardenne, C., Aubouy, A., Benoit-Vical, F., Ryffel, B., Coste, A., Berry, A., et al. (2011). Nrf2, a PPAR γ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog.* 7, e1002254.

Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246.

Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L., and Leung, D.Y.M. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347, 1151–1160.

Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.P., Krier, F., Revol-Junelles, A.M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., and Rossier, J. (2001). Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J. Biol. Chem.* 276, 17823–17829.

Otte, J.-M., Zdebik, A.-E., Brand, S., Chromik, A.M., Strauss, S., Schmitz, F., Steinstraesser, L., and Schmidt, W.E. (2009). Effects of the cathelicidin LL-37 on intestinal epithelial barrier integrity. *Regul. Pept.* 156, 104–117.

Otvos, L., Bokonyi, K., Varga, I., Otvos, B.I., Hoffmann, R., Ertl, H.C., Wade, J.D., McManus, A.M., Craik, D.J., and Bulet, P. (2000). Insect peptides with improved protease-resistance protect mice against bacterial infection. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9, 742–749.

P

Padilla, J., Kaur, K., Cao, H.J., Smith, T.J., and Phipps, R.P. (2000). Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 6941–6948.

Peschel, A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol.* *10*, 179–186.

Peschel, A., and Collins, L.V. (2001). Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* *22*, 1651–1659.

Peschel, A., and Sahl, H.-G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 529–536.

Peters-Golden, M., and Brock, T.G. (2001). Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett.* *487*, 323–326.

Pistollic, J., Cosseau, C., Li, Y., Yu, J.J., Filewod, N.C.J., Gellatly, S., Rehaume, L.M., Bowdish, D.M.E., and Hancock, R.E.W. (2009). Host defence peptide LL-37 induces IL-6 expression in human bronchial epithelial cells by activation of the NF-kappaB signaling pathway. *J. Innate Immun.* *1*, 254–267.

Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S., and Gordon, S. (2011). Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. *Immunol. Rev.* *240*, 11–24.

Podrez, E.A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P.J., Shan, L., Febbraio, M., Hajjar, D.P., et al. (2002). A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J. Biol. Chem.* *277*, 38517–38523.

Porcaro, I., Vidal, M., Jouvert, S., Stahl, P.D., and Giaimis, J. (2003). Mannose receptor contribution to *Candida albicans* phagocytosis by murine E-clone J774 macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 206–215.

Porcelli, F., Verardi, R., Shi, L., Henzler-Wildman, K.A., Ramamoorthy, A., and Veglia, G. (2008). NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 5565–5572.

Pucca, M.B., Cerni, F.A., Pinheiro-Junior, E.L., Zoccal, K.F., Bordon, K. de C.F., Amorim, F.G., Peigneur, S., Vriens, K., Thevissen, K., Cammue, B.P.A., et al. (2016). Non-disulfide-bridged peptides from *Tityus serrulatus* venom: Evidence for proline-free ACE-inhibitors. *Peptides* *82*, 44–51.

Pundir, P., Catalli, A., Leggiadro, C., Douglas, S.E., and Kulka, M. (2014). Pleurocidin, a novel antimicrobial peptide, induces human mast cell activation through the FPRL1 receptor. *Mucosal Immunol.* *7*, 177–187.

Q

Quelle, F.W., Shimoda, K., Thierfelder, W., Fischer, C., Kim, A., Ruben, S.M., Cleveland, J.L., Pierce, J.H., Keegan, A.D., and Nelms, K. (1995). Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3336–3343.

R

Ravetch, J.V., and Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 275–290.

Ren, S.X., Cheng, A.S.L., To, K.F., Tong, J.H.M., Li, M.S., Shen, J., Shen, J., Wong, C.C.M., Zhang, L., Chan, R.L.Y., et al. (2012). Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer. *Cancer Res.* *72*, 6512–6523.

Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* *391*, 79–82.

Rifflet, A., Gavalda, S., Téné, N., Orivel, J., Leprince, J., Guilhaudis, L., Génin, E., Vétillard, A., and Treilhou, M. (2012). Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides* *38*, 363–370.

Riffo-Vasquez, Y., and Spina, D. (2002). Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacol. Ther.* *94*, 185–211.

Rogers, L.A. (1928). THE INHIBITING EFFECT OF STREPTOCOCCUS LACTIS ON LACTOBACILLUS BULGARICUS. *J. Bacteriol.* *16*, 321–325.

Rola-Pleszczynski, M., and Lemaire, I. (1985). Leukotrienes augment interleukin 1 production by human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *135*, 3958–3961.

Rola-Pleszczynski, M., Chavaillaz, P.A., and Lemaire, I. (1986). Stimulation of interleukin 2 and interferon gamma production by leukotriene B4 in human lymphocyte cultures. *Prostaglandins. Leukot. Med.* *23*, 207–210.

Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* *90*, 909–928.

Romani, L. (1999). Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. *Curr. Opin. Microbiol.* *2*, 363–367.

Ross, G.D. (2000). Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit. Rev. Immunol.* *20*, 197–222.

S

Saijo, S., and Iwakura, Y. (2011). Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int. Immunol.* *23*, 467–472.

Säll, J., Carlsson, M., Gidlöf, O., Holm, A., Humlén, J., Ohman, J., Svensson, D., Nilsson, B.-O., and Jönsson, D. (2013). The antimicrobial peptide LL-37 alters human osteoblast Ca²⁺ handling and induces Ca²⁺-independent apoptosis. *J. Innate Immun.* *5*, 290–300.

- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (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.
- Salvado, M.D., Alfranca, A., Haeggström, J.Z., and Redondo, J.M. (2012). Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2. *Trends Mol. Med.* *18*, 233–243.
- Salvado, M.D., Di Gennaro, A., Lindbom, L., Agerberth, B., and Haeggström, J.Z. (2013). Cathelicidin LL-37 induces angiogenesis via PGE₂-EP3 signaling in endothelial cells, in vivo inhibition by aspirin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1965–1972.
- Samuelsson, B., Dahlén, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A., and Serhan, C.N. (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* *237*, 1171–1176.
- Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 491–529.
- Schmidt, J.O., Blum, M.S., and Overal, W.L. (1986). Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *24*, 907–921.
- Schmidtchen, A., Frick, I.M., and Björck, L. (2001). Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol. Microbiol.* *39*, 708–713.
- Schoonjans, K., Dubuquoy, L., Mebis, J., Fayard, E., Wendling, O., Haby, C., Geboes, K., and Auwerx, J. (2005). Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2058–2062.
- Schroder, K., Sweet, M.J., and Hume, D.A. (2006). Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* *211*, 511–524.
- Schulert, G.S., and Allen, L.-A.H. (2006). Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 563–571.
- Scott, M.G., Davidson, D.J., Gold, M.R., Bowdish, D., and Hancock, R.E.W. (2002a). The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 3883–3891.
- Scott, M.G., Davidson, D.J., Gold, M.R., Bowdish, D., and Hancock, R.E.W. (2002b). The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 3883–3891.
- Scott, M.G., Dullaghan, E., Mookherjee, N., Glavas, N., Waldbrook, M., Thompson, A., Wang, A., Lee, K., Doria, S., Hamill, P., et al. (2007). An anti-infective peptide that selectively modulates the innate immune response. *Nat. Biotechnol.* *25*, 465–472.
- Sehra, S., Bruns, H.A., Ahyi, A.-N.N., Nguyen, E.T., Schmidt, N.W., Michels, E.G., von Bülow, G.-U., and Kaplan, M.H. (2008). IL-4 is a critical determinant in the generation of allergic inflammation initiated by a constitutively active Stat6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 3551–3559.

Sehra, S., Yao, Y., Howell, M.D., Nguyen, E.T., Kansas, G.S., Leung, D.Y.M., Travers, J.B., and Kaplan, M.H. (2010). IL-4 regulates skin homeostasis and the predisposition toward allergic skin inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 3186–3190.

Serhan, C.N., and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* *6*, 1191–1197.

Serrano-Gómez, D., Domínguez-Soto, A., Ancochea, J., Jimenez-Heffernan, J.A., Leal, J.A., and Corbí, A.L. (2004). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by dendritic cells and macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 5635–5643.

Shafer, W.M., Qu, X., Waring, A.J., and Lehrer, R.I. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 1829–1833.

Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* *1462*, 55–70.

Shibata, N., Kobayashi, H., and Suzuki, S. (2012). Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* *88*, 250–265.

Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., et al. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 4673–4679.

Silverstein, R.L., Li, W., Park, Y.M., and Rahaman, S.O. (2010). Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* *121*, 206–220.

Sladek, C.D., and Song, Z. (2012). Diverse Roles of G-Protein Coupled Receptors in the Regulation of Neurohypophyseal Hormone Secretion: GPCR regulation of vasopressin and oxytocin. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 554–565.

Smith, W.L., Garavito, R.M., and DeWitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* *271*, 33157–33160.

Smithrithee, R., Niyonsaba, F., Kiatsurayanon, C., Ushio, H., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2015). Human β -defensin-3 increases the expression of interleukin-37 through CCR6 in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* *77*, 46–53.

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., and Boman, H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* *292*, 246–248.

Stephen, S.L., Freestone, K., Dunn, S., Twigg, M.W., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J.H., Wheatcroft, S.B., and Ponnambalam, S. (2010). Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *Int. J. Hypertens.* *2010*, 646929.

Stuart, L.M., and Ezekowitz, R.A.B. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* *22*, 539–550.

Stutz, A., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2009). Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Invest.* *119*, 3502–3511.

Subramanian, H., Gupta, K., Guo, Q., Price, R., and Ali, H. (2011). Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *J. Biol. Chem.* 286, 44739–44749.

Suzuki, K., Murakami, T., Kuwahara-Arai, K., Tamura, H., Hiramatsu, K., and Nagaoka, I. (2011). Human anti-microbial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the LPS-induced apoptosis of endothelial cells. *Int. Immunol.* 23, 185–193.

Szanto, A., Balint, B.L., Nagy, Z.S., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R.M., et al. (2010). STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR γ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* 33, 699–712.

T

Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.-L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L.P., Gluckman, J.C., et al. (2003). DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 121–127.

Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S.-I., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., et al. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243–249.

Takayama, K., García-Cardena, G., Sukhova, G.K., Comander, J., Gimbrone, M.A., and Libby, P. (2002). Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 44147–44154.

Tan, M.C., Mommaas, A.M., Drijfhout, J.W., Jordens, R., Onderwater, J.J., Verwoerd, D., Mulder, A.A., van der Heiden, A.N., Scheidegger, D., Oomen, L.C., et al. (1997). Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 2426–2435.

Tang, X., Basavarajappa, D., Haeggstrom, J.Z., and Wan, M. (2015). P2X7 Receptor Regulates Internalization of Antimicrobial Peptide LL-37 by Human Macrophages That Promotes Intracellular Pathogen Clearance. *J. Immunol.* 195, 1191–1201.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 623–655.

Tavano, R., Segat, D., Gobbo, M., and Papini, E. (2011). The honeybee antimicrobial peptide apidaecin differentially immunomodulates human macrophages, monocytes and dendritic cells. *J. Innate Immun.* 3, 614–622.

Taylor, P.R., Gordon, S., and Martinez-Pomares, L. (2005). The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 26, 104–110.

Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., et al. (2007). Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat. Immunol.* 8, 31–38.

Téné, N., Bonnafé, E., Berger, F., Rifflet, A., Guilhaudis, L., Ségalas-Milazzo, I., Pipy, B., Coste, A., Leprince, J., and Treilhou, M. (2016). Biochemical and biophysical combined study of bicarinalin, an ant venom antimicrobial peptide. *Peptides* 79, 103–113.

Tjabringa, G.S., Ninaber, D.K., Drijfhout, J.W., Rabe, K.F., and Hiemstra, P.S. (2006). Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 140, 103–112.

Tomasinsig, L., Pizzirani, C., Skerlavaj, B., Pellegatti, P., Gulinelli, S., Tossi, A., Di Virgilio, F., and Zanetti, M. (2008). The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 283, 30471–30481.

Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., and Evans, R.M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93, 241–252.

Torres-Juarez, F., Cardenas-Vargas, A., Montoya-Rosales, A., González-Curiel, I., Garcia-Hernandez, M.H., Enciso-Moreno, J.A., Hancock, R.E.W., and Rivas-Santiago, B. (2015). LL-37 immunomodulatory activity during Mycobacterium tuberculosis infection in macrophages. *Infect. Immun.* 83, 4495–4503.

Tripathi, S., Verma, A., Kim, E.-J., White, M.R., and Hartshorn, K.L. (2014). LL-37 modulates human neutrophil responses to influenza A virus. *J. Leukoc. Biol.* 96, 931–938.

Tschopp, J., and Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 210–215.

U

Underhill, D.M., and Goodridge, H.S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 492–502.

Urban, J.F., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Madden, K.B., Morris, S.C., Collins, M., and Finkelman, F.D. (1998). IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8, 255–264.

Urban, J.F., Schopf, L., Morris, S.C., Orekhova, T., Madden, K.B., Betts, C.J., Gamble, H.R., Byrd, C., Donaldson, D., Else, K., et al. (2000). Stat6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell- and T cell-dependent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 2046–2052.

V

Valacchi, G., Sticozzi, C., Lim, Y., and Pecorelli, A. (2011). Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1229, E1-7.

Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., and Schoofs, L. (2012). A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell. Immunol.* 280, 22–35.

Vautier, S., MacCallum, D.M., and Brown, G.D. (2012). C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. *Cytokine* 58, 89–99.

van de Veerdonk, F.L., Joosten, L.A.B., Devesa, I., Mora-Montes, H.M., Kanneganti, T.-D., Dinarello, C.A., van der Meer, J.W.M., Gow, N.A.R., Kullberg, B.J., and Netea, M.G. (2009). Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1 β production by the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* *199*, 1087–1096.

Venteclef, N., and Delerive, P. (2007). Interleukin-1 receptor antagonist induction as an additional mechanism for liver receptor homolog-1 to negatively regulate the hepatic acute phase response. *J. Biol. Chem.* *282*, 4393–4399.

Venteclef, N., Smith, J.C., Goodwin, B., and Delerive, P. (2006). Liver receptor homolog 1 is a negative regulator of the hepatic acute-phase response. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6799–6807.

Vignais, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *59*, 1428–1459.

Vignais, M.L., Sadowski, H.B., Watling, D., Rogers, N.C., and Gilman, M. (1996). Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 1759–1769.

W

Wan, M., Godson, C., Guiry, P.J., Agerberth, B., and Haeggström, J.Z. (2011). Leukotriene B₄/antimicrobial peptide LL-37 proinflammatory circuits are mediated by BLT1 and FPR2/ALX and are counterregulated by lipoxin A₄ and resolvin E1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 1697–1705.

Wan, M., Soehnlein, O., Tang, X., van der Does, A.M., Smedler, E., Uhlén, P., Lindbom, L., Agerberth, B., and Haeggström, J.Z. (2014a). Cathelicidin LL-37 induces time-resolved release of LTB₄ and TXA₂ by human macrophages and triggers eicosanoid generation in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *28*, 3456–3467.

Wan, M., van der Does, A.M., Tang, X., Lindbom, L., Agerberth, B., and Haeggström, J.Z. (2014b). Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *95*, 971–981.

Wang, S.-L., Zheng, D.-Z., Lan, F.-H., Deng, X.-J., Zeng, J., Li, C.-J., Wang, R., and Zhu, Z.-Y. (2008). Increased expression of hLRH-1 in human gastric cancer and its implication in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biochem.* *308*, 93–100.

Weis, J.J., Tedder, T.F., and Fearon, D.T. (1984). Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 881–885.

Welling, M.M., Hiemstra, P.S., van den Barselaar, M.T., Paulusma-Annema, A., Nibbering, P.H., Pauwels, E.K., and Calame, W. (1998). Antibacterial activity of human neutrophil defensins in experimental infections in mice is accompanied by increased leukocyte accumulation. *J. Clin. Invest.* *102*, 1583–1590.

Wevers, B.A., Geijtenbeek, T.B.H., and Gringhuis, S.I. (2013). C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Future Microbiol.* *8*, 839–854.

Willems, J., Noppe, W., Moerman, L., van der Walt, J., and Verdonck, F. (2002). Cationic peptides from scorpion venom can stimulate and inhibit polymorphonuclear granulocytes. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 40, 1679–1683.

Willems, J., Moerman, L., Bosteels, S., Bruyneel, E., Ryniers, F., and Verdonck, F. (2004). Parabutoporphin--an antibiotic peptide from scorpion venom--can both induce activation and inhibition of granulocyte cell functions. *Peptides* 25, 1079–1084.

Williams, L.M., and Rudensky, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* 8, 277–284.

Willment, J.A., and Brown, G.D. (2008). C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol.* 16, 27–32.

Wimley, W.C., and Hristova, K. (2011). Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J. Membr. Biol.* 239, 27–34.

Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57.

Wu, W.K.K., Wong, C.C.M., Li, Z.J., Zhang, L., Ren, S.X., and Cho, C.H. (2010). Cathelicidins in inflammation and tissue repair: Potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 1118–1122.

X

Xia, Y., Vetvicka, V., Yan, J., Hanikýrová, M., Mayadas, T., and Ross, G.D. (1999). The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 2281–2290.

Y

Yamamoto, Y., Klein, T.W., and Friedman, H. (1997). Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infect. Immun.* 65, 1077–1082.

Yamasaki, K., Di Nardo, A., Bardan, A., Murakami, M., Ohtake, T., Coda, A., Dorschner, R.A., Bonnart, C., Descargues, P., Hovnanian, A., et al. (2007). Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat. Med.* 13, 975–980.

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M., et al. (1999). Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286, 525–528.

Yang, D., Chertov, O., and Oppenheim, J.J. (2001). Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J. Leukoc. Biol.* 69, 691–697.

Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27–55.

Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., and Yu, X.-Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5807–5822.

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.

Yu, H.B., and Finlay, B.B. (2008). The Caspase-1 Inflammasome: A Pilot of Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* 4, 198–208.

Yu, J., Mookherjee, N., Wee, K., Bowdish, D.M.E., Pistolic, J., Li, Y., Rehaume, L., and Hancock, R.E.W. (2007). Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 7684–7691.

Z

Zani, I.A., Stephen, S.L., Mughal, N.A., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S.B., and Ponnambalam, S. (2015). Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells* 4, 178–201.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.

Zasloff, M. (2009). Antimicrobial peptides and suppression of apoptosis in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 129, 824–826.

Zhang, L., and Plow, E.F. (1996). Overlapping, but not identical, sites are involved in the recognition of C3bi, neutrophil inhibitory factor, and adhesive ligands by the alphaMbeta2 integrin. *J. Biol. Chem.* 271, 18211–18216.

Zhang, W., Yancey, P.G., Su, Y.R., Babaev, V.R., Zhang, Y., Fazio, S., and Linton, M.F. (2003). Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 108, 2258–2263.

Zhang, W., Xu, W., and Xiong, S. (2010). Blockade of Notch1 signaling alleviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 184, 6465–6478.

Zhang, Y.-Y., Yu, Y.-Y., Zhang, Y.-R., Zhang, W., and Yu, B. (2016). The modulatory effect of TLR2 on LL-37-induced human mast cells activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470, 368–374.

Zhou, J., Suzuki, T., Kovacic, A., Saito, R., Miki, Y., Ishida, T., Moriya, T., Simpson, E.R., Sasano, H., and Clyne, C.D. (2005). Interactions between prostaglandin E(2), liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Res.* 65, 657–663.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80.

Zimmerli, S., Edwards, S., and Ernst, J.D. (1996). Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15, 760–770.

Zuany-Amorim, C., Vargaftig, B.B., and Pretolani, M. (1997). Modulation by IL-10 of antigen-induced allergic responses in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92 *Suppl* 2, 141–146.

An original antimicrobial peptide isolated from ant venom enhances recognition and elimination of *Candida albicans* by human monocyte-derived macrophages through LTB4/PPAR γ /MR-Dectin-1 dependent ROS and IL-1 β secretion activation

Khaddouj BENMOUSSA^{1,2,3}, H  l  ne AUTHIER^{1,2}, M  lissa PRAT^{1,2}, Mohamad ALAEDDINE^{1,2}, Lise LEFEVRE^{1,2}, Mouna RAHABI^{1,2}, José Bernad^{1,2}, Elsa Bonnaf  3, J  r  me LEPRINCE⁴, Bernard PIPY^{1,2}, Michel TREILHOU³ and Agnès COSTE^{1,2}

¹ *Université de Toulouse, UPS, UMR152 (PHARMADEV), 31432 TOULOUSE, France*

² *IRD, UMR 152, Toulouse, 31432, France*

³ *EA7417 BTSB, 81012 Albi, FRANCE*

⁴ *INSERM U982, PRIMACEN, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France*

agnes.coste@univ-tlse3.fr

michel.treilhou@univ-jfc.fr

Cationic antimicrobial peptides (AMPs) are evolutionary small and amphipatic conserved molecules which are involved in the immune defense of a wide range of organisms, including bacteria, insects, plants and vertebrates. Beside their direct microbicidal activity against pathogens, most of them are known to exert immunomodulatory functions on innate and adaptive immune cells.

Here we evaluated the immunomodulatory properties of an original cationic AMP, named P17, discovered and isolated by our team from the ant *Tetramorium bicarinatum* venom. We have focused on its efficiency to modulate human monocyte-derived macrophages (h-MDM) differentiation and its capacity to provide them an antifungal activity against the main opportunistic yeast *Candida albicans* (*C. albicans*). We showed that P17 directed h-MDM polarization toward an alternative phenotype characterized by mannose (MR) and dectin-1 C-type lectin receptors (CLRs) upregulation. Interestingly, we demonstrated that this upregulation of MR and Dectin-1 in P17-treated h-MDM requires AA mobilization and leukotriene B4 (LTB4) synthesis, essential for PPAR γ activation. We also demonstrated that this AA metabolite led to the PPAR γ nuclear receptor activation which is a key factor of macrophages alternative activation and the associated CLRs expression. In this study, we observed that P17-activated h-MDM exhibited an improved capacity to eliminate *C. albicans*. Indeed, these P17-polarized macrophages displayed an increased ability to recognize and phagocyte yeasts. Furthermore, the study of microbicidal mechanisms leading to *C. albicans* clearance revealed that P17-activated h-MDM produced reactive oxygen species (ROS) and inflammasome-dependant IL-1 β in high amounts. These mechanisms induction in P17-polarized h-MDM was dependent on the LTB4/ PPAR γ /Dectin-1-MR axis.

Finally, these data were supported by *in vivo* experiments demonstrating that P17-treated mice infected with *C. albicans* developed less severe gastrointestinal infection related to a higher efficiency of their macrophages to engulf *C. albicans*, to produce ROS and to kill yeasts.

Altogether, these results identify P17 as an original activator of the fungicidal response of macrophages that acts downstream the pathway leading to CLRs expression through PPAR γ activation.

Un nouveau peptide antimicrobien issu de venin de fourmi améliore l'activité fongicide des macrophages dérivés de monocytes humains en activant la sécrétion de ROS et d'IL-1 β dépendante de l'axe de signalisation LTB4/PPAR γ /MR-Dectine-1

Khaddouj BENMOUSSA^{1,2,3}, Hélène AUTHIER^{1,2}, Mélissa PRAT^{1,2}, Mohamad ALAEDDINE^{1,2}, Lise LEFEVRE^{1,2}, Mouna RAHABI^{1,2}, José Bernad^{1,2}, Elsa Bonnafé³, Jérôme LEPRINCE⁴, Bernard PIPY^{1,2}, Michel TREILHOU³ et Agnès COSTE^{1,2}

¹ Université de Toulouse, UPS, UMR152 (PHARMADEV), 31432 TOULOUSE, France

² IRD, UMR 152, Toulouse, 31432, France

³ EA7417 BTSB, 81012 Albi, FRANCE

⁴ INSERM U982, PRIMACEN, IRIB, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

agnes.coste@univ-tlse3.fr

michel.treilhou@univ-jfc.fr

Les peptides antimicrobiens (PAMs) cationiques sont des molécules amphipatiques conservées chez une grande diversité d'espèces vivantes. Ils participent ainsi à la défense immunitaire de nombreux organismes incluant les bactéries, les insectes, les plantes et les vertébrés. En plus de leur activité microbicide directe dirigée contre un large spectre de pathogènes, la plupart des PAMs cationiques sont désormais connus pour exercer des fonctions immunomodulatrices sur les réponses innée et adaptative.

Notre équipe a récemment découvert et isolé un nouveau PAM à partir du venin de la fourmi *Tetramorium bicarinatum*, nommé P17. Dans ce travail, nous avons étudié les propriétés immunomodulatrices du P17 sur la réponse immunitaire innée médiée par les macrophages. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à sa capacité à moduler la différenciation de macrophages dérivés de monocytes humains (h-MDM) ainsi que leurs fonctions fongicides associées vis-à-vis d'une levure opportuniste majeure *Candida albicans* (*C. albicans*). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le P17 oriente la différenciation des h-MDM vers un phénotype alternatif caractérisé par la surexpression des récepteurs lectine de type C (CLRs) tels que Dectine-1 et le récepteur mannose (MR). De manière intéressante, nous avons mis en évidence que la surexpression de ces deux récepteurs à la surface des h-MDM activés par le P17 nécessite la mobilisation de l'acide arachidonique et la production de leucotriène B4 (LTB4). Nous avons également démontré que ce métabolite de l'AA conduit à l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ , facteur clé de l'activation alternative des macrophages et de l'expression des CLRs associée à ce phénotype. Au cours de ce travail, nous avons démontré que les h-MDM polarisés par le P17 présentent une meilleure capacité à éliminer *C. albicans*. En effet, ces h-MDM activés par le P17 ont une capacité de reconnaissance, par les CLRs Dectine-1 et MR, et de phagocytose de *C. albicans* augmentée. De plus, l'étude des mécanismes microbicides conduisant à l'élimination de *C. albicans* révèle que les h-MDM activés par le P17 produisent de fortes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'IL-1 β via l'inflammasome. Ainsi, ce travail met en évidence que l'induction de l'activité fongicide des h-MDM par le P17 est dépendante de l'axe LTB4/PPAR γ /Dectine-1-MR.

Nous avons finalement confirmé ces données *in vivo* sur un modèle de candidose gastro-intestinale induite chez des souris traitées par voie intra-péritonéale par P17 ou non. Les résultats obtenus ont révélé que les souris traitées par P17 étaient plus résistantes à l'infection gastro-intestinale à *C. albicans*. La diminution de la charge fongique au niveau du cæcum des souris traitées par le P17 est associée à une meilleure efficacité de leurs macrophages à phagocyter *C. albicans*, à produire des ROS et à tuer *C. albicans*.

Ainsi, ces résultats identifient le P17 comme un activateur original des propriétés antifongiques des macrophages agissant en aval de la voie permettant l'induction de l'expression des CLRs via PPAR γ . Ces données révèlent pour la première fois l'implication d'un PAM dans le contrôle de la différenciation des macrophages et leurs fonctions microbicides.