



HAL
open science

Rôle des monocytes dans la régulation de la réponse inflammatoire au cours du sepsis

Camille Baudesson de Chanville

► **To cite this version:**

Camille Baudesson de Chanville. Rôle des monocytes dans la régulation de la réponse inflammatoire au cours du sepsis. Immunologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS376 . tel-02866067

HAL Id: tel-02866067

<https://theses.hal.science/tel-02866067>

Submitted on 12 Jun 2020

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.

Sorbonne Université

École doctorale Complexité du vivant : ED515

Thèse de doctorat

Spécialité : Immunologie

Rôle des monocytes dans la régulation de la réponse inflammatoire au cours du sepsis

Présentée par :

Camille Baudesson de Chanville

Dirigée par le **Dr Christophe Combadière**

CIMI-Paris Inserm U1135, Équipe 6 : Chimiokines dans les pathologies inflammatoires

Présentée et soutenue publiquement le 12 Octobre 2018

Devant le jury composé de :

Dr Christophe Combadière - Directeur de thèse

Dr Nathalie Winter - Rapporteur

Dr François Trottein - Rapporteur

Dr Carole Elbim - Présidente

Dr Emmanuel Gautier - Membre invité

Remerciements

Très peu de moments m'ont permis de remercier les personnes qui m'ont soutenue professionnellement et personnellement. Ces remerciements sont plus qu'une convention ils me tiennent particulièrement à cœur. Ils seront sans doute longs et trop courts à la fois.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Nathalie Winter et le Dr François Trottein d'avoir accepté le rôle de Rapporteurs ainsi que pour leurs remarques constructives sur ce manuscrit.

Merci au Dr Carole Elbim qui a gentiment accepté le rôle de présidente du jury.

Et enfin, je suis amenée à remercier le Dr Emmanuel Gautier, qui a non seulement accepté d'être membre invité de ce jury, mais qui a également participé à mes deux comités de suivi de thèse.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse le Dr Christophe Combadière. Merci de m'avoir portée jusqu'à cette thèse, de m'avoir donnée la chance de faire mes preuves et de m'avoir fait grandir scientifiquement. Je te dois cette thèse et je ne t'en remercierai jamais assez.

Je remercie également le Dr Alexandre Boissonnas avec lequel j'ai tant échangé scientifiquement que partagé des moments de franche rigolade. Merci de ton soutien et de tes conseils avisés que j'ai essayé tant bien que mal d'appliquer.

Merci au Dr Philippe Deterre qui a également suivi mes travaux avec bon esprit.

Merci à Pascale Saurel et Marie-Ange Mesnel pour leur disponibilité et gentillesse durant toutes ces années.

J'ai également, une pensée pour mes collègues actuels, Marie, Jordane, Mathias, Lisa, Damien et Raphaël et aux anciens qui m'ont lâchement quittée pour partir vers de nouvelles aventures : Patricia, Pauline, Nora, Ludovic, Mélodie, Pierre-louis, Simon, Jessica et Clément. Ces années demeureront inoubliables grâce à vous ! Damien je te remercie pour tes remerciements. Marie, merci beaucoup pour ton aide au quotidien et de toutes tes relectures. Un grand merci à Emilie qui a réussi à me remotiver et à me rassurer dans les moments les plus difficiles (la rédaction de ce manuscrit par

exemple !). Tu es une très belle personne et je te souhaite la belle carrière de chercheuse que tu mérites. Une pensée pour ton Tristan aussi bien évidemment. Merci à tout les deux.

De façon plus globale, merci au CIMI et aux nombreuses personnes qui m'ont permis de passer des moments d'échanges scientifiques (ou non) fort agréables.

Merci à Alain Corbier, mon maître de stage de master 2 à Sanofi et à toute son ancienne équipe. Alain, ta gentillesse et ta pédagogie ont particulièrement compté pour moi. Tu as eu entre tes mains un bébé scientifique à qui tu as donné l'envie de grandir. Ce stage m'a permis de découvrir la recherche *in vivo* qui a été une révélation pour moi et qui ne m'a pas quittée durant ces 7 dernières années.

Merci à mes parents sans lesquels je ne serais pas là pour une raison évidente... mais surtout sans lesquels je n'aurais pas pue faire cette thèse. Merci pour leur aide et leur soutien au long de toutes mes études. J'espère vous rendre fiers. Merci à mon frère et à ma sœur pour leurs encouragements et leurs paroles rassurantes. Vos petites familles sont un modèle pour moi. Ma sœur, tu es un modèle de femme travailleuse, courageuse et épanouie, j'espère te ressembler.

Une pensée à mon papi et ma mamie qui nous ont quittés ainsi qu'à ma grand mère Hélène, si fière de cette thèse.

À mes amis :

La petite bande de parisiens, j'aimerais avoir un mot pour chacun mais cela s'avère compliqué. Ophélie, Alice, Mathilde, Lola, Chloé et Florent un grand merci pour votre soutien et votre joie de vivre. Nous avons passé beaucoup de moments à rire, boire des verres, nous raconter nos vies, nos espoirs et nos désespoirs de jeunes trentenaires. Que demander de plus à des amis ? Je n'aurais pas survécu dans cette jungle Parisienne sans vous. Vous avez été bien souvent mon souffle d'air frais extérieur au laboratoire.

Merci d'avoir été là et merci d'être toujours là.

Merci à mes amis de Marseille Luminy. Nos premières années Fac... que dire... que du bonheur ! Ivan, Arnaud, Thomas, Jimmy, Christophe (Christouf) et christophe (Crocro) je vous embrasse bien fort et surtout « allez l'OM ». Arnaud je n'oublierais jamais tes crocs (été comme hiver mais pas quand il pleut). Un merci tout particulier à Maud et Charlotte. Les filles, je vous porte dans mon cœur. La distance ne nous permet pas de nous voir régulièrement mais on sait qu'on est là les une pour les autres et c'est ce qui compte.

À mes amis Avignonnais, merci de votre profonde amitié qui dure depuis le collège. François, Elmahdi, Hugo, Guilleme, Fanie, Soraya et Jeremy, vous me manquez et vos blagues décapantes aussi, même si les miennes sont les meilleures !
Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

À mon amie Pauline, tu es mon âme sœur d'amitié, ma lumière, la personne que je préfère torturer au monde depuis 20 ans... Merci à la vie de t'avoir mise sur mon chemin (elle est pour toi celle là). On ne sait toujours pas pourquoi nous sommes amies tellement nous ne nous ressemblons pas, mais voilà on s'en fou. J'espère que cette amitié durera toute la vie et que nous finirons nos jours toutes fripées au bord de la mer à Cannes. Ta fille Sasha sera là pour s'occuper de nous. Je n'oublie d'ailleurs pas Sasha, pleine de vie et d'amour, je l'embrasse très fort.
Merci de votre amour.

« Souriez, et faites savoir à tout le monde qu'aujourd'hui, vous êtes beaucoup plus fort qu'hier. Cher stress faisons une pause maintenant »

RÉSUMÉ

Le sepsis est une pathologie fréquente et grave. Il est défini comme un dysfonctionnement organique causé par une réponse dérégulée de l'hôte envers une infection. Une phase hyperinflammatoire précoce fait suite à la reconnaissance de l'agent pathogène et est progressivement remplacée par une immunosuppression à long terme entraînant une sensibilité prolongée des patients aux infections nosocomiales.

Les monocytes (Mo) agissent comme étant l'une des premières lignes de défense du système immunitaire contre les infections. Comprendre comment ceux-ci participent à la surveillance des tissus au cours du sepsis permettrait le développement ou l'amélioration des traitements contre les infections initiales et secondaires au sepsis.

Nos travaux ont montré que les Mo inflammatoires étaient fortement impliqués dans le contrôle de l'inflammation durant les phases précoces et tardives au cours d'un sepsis polymicrobien murin. En effet, lors de la phase « hyper-aiguë » la mobilisation des Mo participe à la surveillance et à la protection des tissus rénaux grâce à des mécanismes d'adhésion cellulaire dépendant du récepteur CX3CR1. La seconde phase du sepsis est le plus souvent décrite comme « immunosuppressive ». Nous avons mis en évidence une accumulation systémique des Mo et des PMN durant cette dernière phase. La caractérisation de leur localisation a montré que ces cellules s'accumulaient spécifiquement dans le réseau vasculaire des organes sans infiltrer les tissus. Les Mo Ly6C^{high} et leurs récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 ont été identifiés comme essentiels à la surveillance pulmonaire lors d'une infection secondaire au sepsis.

Cependant, la capacité de ces cellules à stimuler et à réguler les réponses immunitaires semble être altérée. Ainsi, l'état d'activation des Mo inflammatoires ne permettrait pas une protection efficace contre les infections opportunistes pulmonaires secondaires au sepsis.

Ces travaux mettent en évidence le rôle déterminant des Mo inflammatoires au cours de la physiopathologie du sepsis.

ABSTRACT

Sepsis is a common and life-threatening pathology. It is defined as an organic dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. An initial hyper-inflammatory phase follows recognition of the pathogen and is progressively replaced by long-term immunosuppression leading to prolonged sensitivity to superinfections. Monocytes (Mo) are one of the first lines of phagocytic cells in the lung. Understanding how these cells participate in pulmonary supervision during sepsis would allow the development or improvement of treatments for enhancing resistance to secondary nosocomial infections.

We showed that monocytes are strongly involved in the control of inflammation during the early and late phases of murine polymicrobial sepsis. Indeed, during the acute phase of sepsis, inflammatory monocyte mobilization participates to the monitoring of renal tissues and has a protective effect via a CX3CR1-dependent adhesion mechanism. The second phase of sepsis is most often described as “immunosuppressive”. We demonstrated a systemic accumulation of myeloid cells during this last phase. Characterization of their localization showed that these cells accumulated specifically in the vascular network of the organs without infiltrating the tissues. Ly6C^{high} monocytes and their chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 have been identified as essential for pulmonary supervision during first and second infection. However, the ability of these cells to stimulate and regulate immune responses appears to be impaired. Thus, the activation state of inflammatory Mo would not protect against a second pulmonary infections post sepsis.

This work highlights the determining role of inflammatory monocytes during the physiopathology of sepsis.

Sommaire

Chapitre 1 : Le sepsis	13
I. Définition et critères cliniques du sepsis	15
II. Epidémiologie	19
1. Les chiffres	19
2. Etiologie	21
III. Physiopathologie	24
1. Les différentes phases du sepsis	25
2. Mise en jeu des réponses inflammatoires au cours du sepsis: les théories.....	26
3. Mécanismes physiopathologiques cellulaires et moléculaires	30
a. Perturbation de l'hémostase	31
Fuite capillaire.....	31
Microcirculation	31
Coagulation	31
b. Métabolisme oxydatif.....	32
4. Stratégies thérapeutiques	33
a. Prise en charge thérapeutique du sepsis	34
b. Les immunothérapies : une nouvelle approche.....	35
IV. Activation du système immunitaire	37
1. Activation du système immunitaire inné	37
a. Les récepteurs de l'immunité innée : les PRRs.....	38
Implication des récepteurs Toll-like dans le sepsis	41
Implication de l'inflammasome dans le sepsis.....	44
b. Rôle des cytokines	44
c. Effecteurs cellulaires.....	47
Les cellules Natural Killer (NK)	48
Les cellules dendritiques (DCs)	49
Les Neutrophiles.....	51
Les Cellules « MDSC »	59
2. Activation du système immunitaire adaptatif.....	60
Les lymphocytes CD4+ et les sous-populations Th	60
Les lymphocytes T régulateurs	64
Les lymphocytes T non conventionnels	65

Chapitre 2 : Les Monocytes	71
I Monocytes et sous-populations monocytaires.....	73
1. Les monocytes humains.....	73
2. Les monocytes murins.....	76
3. Développement des sous-populations monocytaires	77
II. Fonctions associés aux monocytes dans les pathologies inflammatoires et infectieuses.....	79
1. Mobilisation/recrutement des monocytes	80
2. Fonction antibactérienne des monocytes	82
3. Sécrétion	83
4. Stimulation du système immunitaire adaptatif	84
a. Présentation antigénique et signaux costimulateurs	84
b. Les immunes « checkpoints »	86
IV Réseau chimiokinique dans la migration des monocytes	87
1. Les chimiokines et leurs récepteurs	88
a. Classification des chimiokines.....	88
b. Les récepteurs aux chimiokines	89
c. Fonctions associées aux chimiokines	90
2. Les principaux couples de chimiokines impliqués dans le recrutement des monocytes..	92
a. L'axe CX3CL1/CX3CR1.....	92
L'axe CX3CL1/CX3CR1 dans la physiopathologie du sepsis.....	94
b. L'axe CCL2/CCR2	95
L'axe CCL2/CCR2 dans la physiopathologie du sepsis.....	97
Chapitre 3 : Objectif de la thèse	99
RESULTATS	103
Article 1: Ly6C ^{high} Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1- Dependent Adhesion Mechanism	104
Article 2: Late expansion of inflammatory monocytes in sepsis leads to defective immune responses following pulmonary second infection.....	110
TRAVAUX ANNEXES.....	116
Article 3 : « CX3CR1-dependant endothelial margination modulates LY6C ^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice».....	116

Article 4 : « CX3CR1 deficiency promotes muscle repair and regeneration by enhancing macrophage ApoE production »	118
Article 5 : «CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity »	120
DISCUSSION.....	122
Bibliographie	138

Abréviations

BTLA : B and T Lymphocyte Attenuator

CARS : Syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire

CD : « Dendritic cells » /Cellule Dendritique

CK : Chimiochine

CLP : « Cecal Ligature and Puncture » /Ligature et Ponction Caecale

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CTLA-4 : « Cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4 » /antigène 4 des Lymphocytes T Cytotoxiques

DC : « Cluster of differentiation » /Groupe de différenciation

G(M)-CSF : « Granulocyte (macrophage) colony stimulation factor » /Facteur de stimulation des colonies de granulocytes

HSCs : Cellules souches hématopoïétiques

iNKT : cellules T « Natural Killer » invariante

iNOS : oxyde nitrique synthase inductible

KO : *Knock-out*

LBP : « LPS Binding Protein » / Protéine de liaison du LPS

LPS : Lipopolysaccharide

MAIT : « mucosal-associated invariant T »/ cellules T invariantes associées à la muqueuse.

mDC: Cellule Dendritique dérivé des monocytes

MDSC: Cellule Myéloïde Suppressive

Mo: Monocyte

NETs : « Neutrophils extracellular traps » / Pièges extracellulaires des neutrophiles

NK : Natural Killer

NKT : cellules T « Natural Killer »

NO : Oxyde Nitrique

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PCA : Protéine C Activée

PD-1: « Programmed Cell Death 1 » / Protéine de mort programmée-1

PDL1 : « Programmed Death Ligand 1 » / Ligand de mort cellulaire programmée-1

PMN : Neutrophile

Polymorphonucléaire

PRR : « Pattern Recognition Receptor » /

Récepteur de reconnaissance de motifs
moléculaires

qSOFA: « quick SOFA » /SOFA rapide

appelé

RCK : Récepteur aux chimiokines

ROS: Dérivés réactifs de l'oxygène

SDMO : Syndrome de

Dysfonctionnement Multi-Organique

Sham : Contrôle opératoire / Chirurgie

factice

SIRS : Syndrome de réponse

inflammatoire systémique

SOFA : « Sequential Organ Failure

Assessment » / Evaluation séquentielle
des défaillances d'organes

TCR : Récepteurs des cellules T

TLA : Acides lipotéichoïques

TLR : « Toll Like Receptors »

/Récepteurs de type Toll

Treg : Lymphocytes T régulateurs

T γ δ : cellules T gamma delta

USI : Unité de Soins Intensifs

Chapitre 1 : Le sepsis

I. Définition et critères cliniques du sepsis

En 2001, la définition du sepsis est basée sur les notions de sepsis grave et de choc septique proposé par le Dr Roger C. Bone en 1991 (Bone et al., 1992). Cette définition décrit le sepsis comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) développé par l'hôte suite à une infection. Le sepsis accompagné de dysfonction d'organes est appelé sepsis sévère. Celui-ci peut évoluer en choc septique défini comme une défaillance circulatoire aiguë entraînant des désordres hémodynamiques (hypotension artérielle) persistant (Levy et al., 2001) (**Figure 1**).

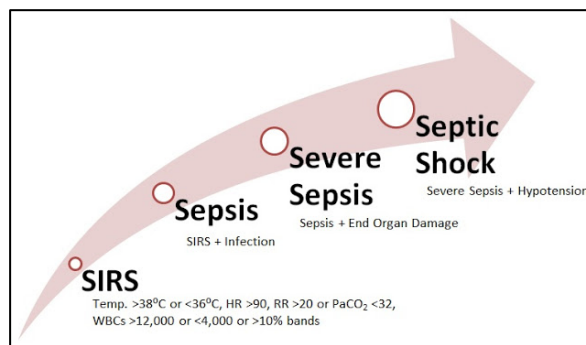


Figure 1 : Définition des catégories du sepsis
D'après (Bone et al., 1992)

Les critères du SIRS (tableau 1) sont largement utilisés par les cliniciens et la communauté scientifique comme éléments de diagnostic, comme critères d'inclusions aux essais cliniques et permettent la standardisation des protocoles de recherche. En effet, si 2 critères SIRS sur 4 sont présents le diagnostic s'oriente vers une septicémie. Cependant, leurs limites ont été mises en évidence ces dernières années. Il est reproché une focalisation excessive sur l'inflammation, parfois trompeuse et non spécifique au sepsis. Le continuum entre le sepsis sévère et le choc septique est lui aussi critiqué. Si les critères SIRS restent vrais au regard du développement de la maladie, ils sont remis en question de par leur manque de spécificité et de sensibilité lié au dépistage de celle-ci en milieu hospitalier.

Critères des SIRS
Température > 38°C ou < 36°C
Rythme cardiaque > 90/min
Hyperventilation : fréquence respiratoire > 20/min ou Gazométrie : Paco2 < 32mmHg
Nombre de globule blanc > 12 000/mm ³ ou < 4 000/mm ³

Tableau 1 : Critère SIRS (Systemic Inflammation Response Syndrome). D'après (Bone et al., 1992)

La nouvelle définition du sepsis est issue d'un groupe de travail de la Society of Critical Care Medicine (SCCM) et de la European Society of Intensive Care Medicine, (ESICM). Elle a abouti à la publication d'un article (Sepsis-3) dans le journal The JAMA Network en 2016 (Singer et al., 2016). Le nom Sepsis-3 fait suite au Sepsis-1 et Sepsis-2 datant respectivement des recommandations 1991 et 2001 laissant ainsi une évolution possible en Sepsis-4. Les nouveaux critères retenus sont issus de l'analyse de nombreuses bases de données électroniques de santé, d'un vote des différentes sociétés professionnelles internationales et de l'approbation par les pairs. Cette nouvelle définition vise à faciliter la reconnaissance précoce et la gestion plus rapide des patients atteints de sepsis ou à risque de développer cette maladie. Elle prend en compte les nouvelles avancées patho-biologiques (en immunologie, biochimie et hémodynamique) ainsi que les dernières données épidémiologiques du sepsis. Par exemple, en immunologie il est maintenant établi que les deux réponses pro- et anti-inflammatoires sont impliquées tôt dans le développement de la maladie (Hotchkiss et al., 2013a).

Le sepsis est maintenant défini comme une dysfonction d'organe secondaire à une réponse inappropriée de l'hôte envers une infection (Singer et al., 2016). La notion de sepsis sévère est abandonnée. La sévérité de la défaillance d'organe est associée à un score appelé SOFA pour « Sequential Organ Failure Assessment ». Celui-ci corrèle avec une forte probabilité de décès. Le point zéro est supposé être le reflet de l'absence de dysfonction d'organe, aigue ou chronique préexistant. Parmi les patients hospitalisés pour une infection, le risque de mortalité est proche de 10% si le score SOFA est égal ou supérieur à 2. L'estimation de ce risque justifie une prise en charge rapide et adaptée des patients. Des critères simplifiés, utilisables hors service de réanimation sont proposés pour le dépistage rapide du risque de septicémie. C'est le SOFA rapide appelé « quick SOFA » (qSOFA). La présence de 2 critères du qSOFA identifie les patients

risquant d'avoir un mauvais pronostic et justifie un monitoring, un traitement spécifique et de prendre un avis en réanimation. Ces critères sont basés sur une pression artérielle systolique ≥ 100 mm Hg, une fréquence respiratoire ≥ 22 /mn et une confusion mentale (**tableau 2**) (Singer et al., 2016). Le qSOFA est moins robuste que le score SOFA utilisé en Unité de Soins Intensif (USI) mais à l'avantage de ne pas nécessiter de test en laboratoire et peut être évalué rapidement.

Critères du SOFA rapide (qSOFA)
Pression artérielle systolique ≥ 100 mm Hg
Fréquence respiratoire ≥ 22 /mn
Confusion mentale

Tableau 2 : Critères du dépistage rapide du sepsis, utilisé hors service de réanimation. D'après le consensus international Sepsis-3 (Singer et al., 2016).

Un qSOFA positif nécessite le calcul du score SOFA allant de 0 à 4 (**Figure 2**). Le score SOFA est calculé selon des critères basés sur la fréquence respiratoire ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$), la coagulation (Plaquette), le système cardiovasculaire (Dopamine, Epinéphrine, Norépinephrine) et nerveux central (Echelle de Glasgow) ainsi que sur le système rénal (Créatinine, Urine) et du foie (Bilirubine). Le groupe d'expert a établi qu'un score ≥ 2 ou une élévation ≥ 2 points était plus discriminant que les SIRS car plus étroitement lié au dysfonctionnement d'organe. Cependant, ce score a été développé pour prédire un risque de mortalité et non pour faire un réel diagnostic de sepsis. Une erreur de diagnostic reste possible car les patients ayant un SOFA ≥ 2 vont être traités comme des patients septiques alors qu'ils ne présentent pas d'infection. Singer et al. dans leur article Sepsis-3 (Singer et al., 2016) mettent en avant la notion de « *le patient a une dysfonction d'organe **donc** il est septique !* ». Les hémocultures des patients septiques ne sont positives que dans 30 à 40% des cas. Cela explique que la composante infectieuse de la maladie ne fait pas partie des critères et n'est que « suspectée » dans la nouvelle définition du sepsis.

Enfin, le « choc septique » est défini comme un sous-groupe du sepsis comportant d'importantes anomalies circulatoires et métaboliques ainsi qu'une mortalité intra-hospitalière d'environ 40%. L'association d'un sepsis, d'un besoin de drogues vasopressives pour maintenir une pression artérielle moyenne (PAM) ≥ 65 mm Hg et

d'une hyperlactémie (lactates > 2 mmol/l) malgré un remplissage adéquat définit le choc septique (**Figure 2**). L'utilisation de l'hyperlactémie dans les critères cliniques du choc septique est débattue. En effet, sa spécificité (seulement indicateur d'un stress cellulaire ou métabolique) ainsi que la non-disponibilité de la mesure du lactate dans certains milieux pauvres empêcherait le diagnostique.

Le comité reconnaît s'être concentré sur les patients adultes et qu'il serait nécessaire de développer des définitions similaires pour la pédiatrie en prenant en compte les variations physiologiques lié à l'âge.

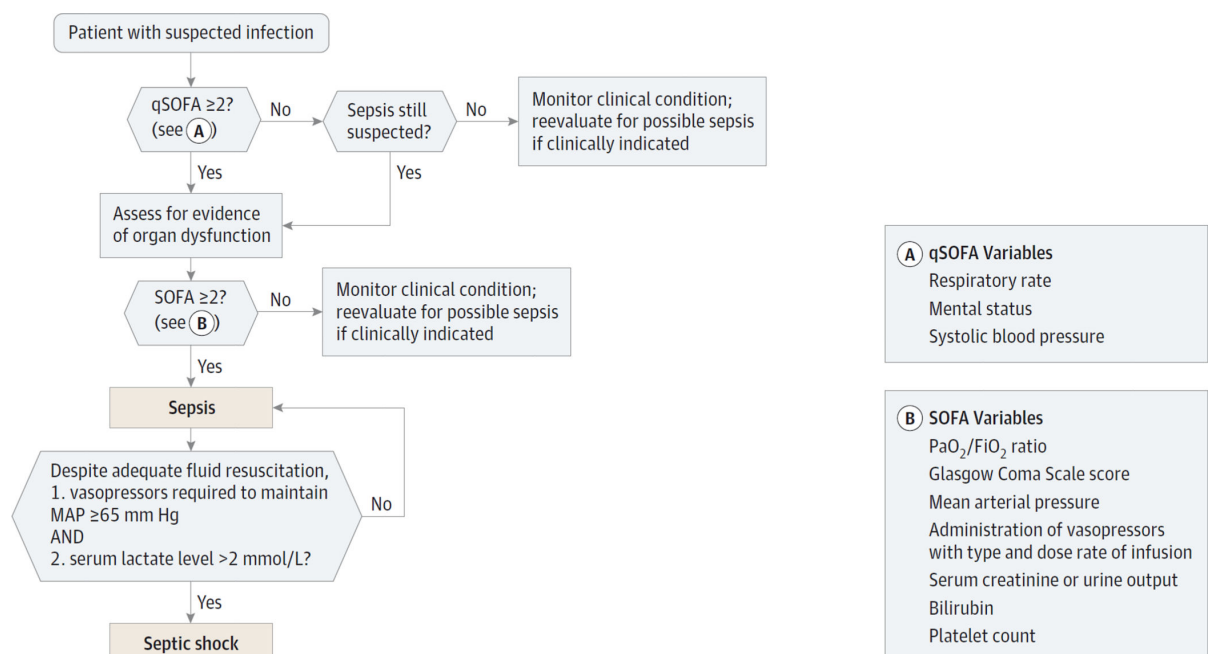


Figure 2 : Algorithme comportant les critères cliniques identifiant les patients atteints de septicémie ou de choc septique. D'après le consensus international Sepsis-3 (Singer et al., 2016).

Ces définitions et critères cliniques mis à jour visent à faciliter la détection de la maladie et devrait permettre une prise en charge plus précoce et rapide des patients. Ce nouveau visage du sepsis (Sepsis-3) doit encore faire ses preuves puisqu'il ne date que de 2016.

II. Epidémiologie

1. Les chiffres

Les données épidémiologiques du sepsis nécessitent l'analyse d'un grand nombre de données recueillies en USI et service de réanimation. Ces données concernent essentiellement le sepsis sévère et le choc septique mais vont prochainement évoluer avec l'apparition de la nouvelle définition du sepsis et de l'évolution des critères d'inclusions aux essais cliniques basés sur le score SOFA comme précédemment exposé.

Le sepsis est associé à une forte morbidité et mortalité avec 6 millions de décès chaque année dans le monde. Il représente à lui seul un coût de 24 milliards de dollars par an aux Etats-Unis (World Health Assembly et World Health Organisation 2017). De plus, les coûts de prise en charge de la maladie augmentent de 11,9% chaque années depuis 1997 (Hall et al., 2011). Le bilan mondial des données épidémiologiques du sepsis est très compliqué. Cela est dû aux différentes définitions et critères utilisés pour les études mais aussi par ce qu'un grand nombre de données recueillies sont nécessaires. Ainsi, les sources épidémiologiques les plus grandes et exhaustives sont issues des pays dit « riches » tel que les Etats-Unis ou l'Europe. Aux Etats-Unis, l'incidence annuelle du sepsis est estimée entre 300 et 1000 cas pour 100 000 habitants. Mais globalement les différentes études montrent une augmentation systématique du nombre de cas avec une mortalité qui décroît chaque année (**Figure 3 A et B**) (Gaieski et al., 2013; Kempker and Martin, 2016; Martin et al., 2003).

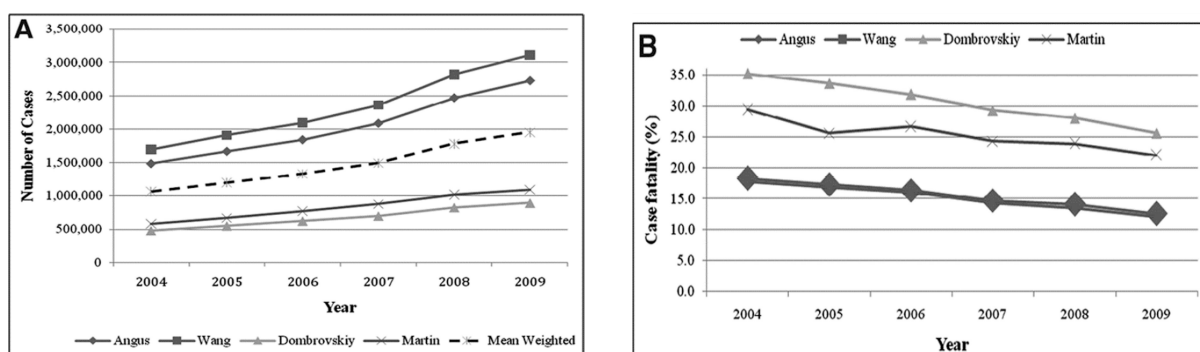


Figure 3 : A et B Comparaison des études épidémiologiques du sepsis sévère aux Etats-Unis, utilisant trois définitions différentes. (Gaieski et al., 2013)

En 2013, Martin et al montrent qu'un quart des patients qui développent un sepsis sévère meurent au cours de leur hospitalisation. Le choc septique est lui, associé à la mortalité la plus élevée, approchant les 50% aux Etats-Unis (Martin et al., 2003). En France, le nombre de cas de choc septique est passé de 8,2 pour 100 admissions en 1993 à 15,4 en 2010 et le nombre de décès est passé de 60,1% à 39,5% aux seins des services de réanimations (62% en 1997 à 48,7% en 2011 à l'Hôpital) (Quenot et al., 2015). L'augmentation des cas de septicémie pourrait s'expliquer par le vieillissement de la population, l'utilisation de plus en plus fréquente d'immunosuppresseurs, l'augmentation des transplantations et autres procédures invasives (Martin et al., 2003). La baisse de la mortalité en réanimation s'explique par la meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie, la meilleure prise en charges des patients, la large diffusion des recommandations internationales et enfin la meilleure identification de ces patients au sein des services d'urgences.

La septicémie ne touche pas que l'adulte. Elle est une des causes principales de décès chez les nouveaux-nés. D'après les statistiques sanitaires mondiales de 2011, 6% des décès chez les enfants de moins de 5 ans sont attribués au sepsis (3% pour la France et les USA, 2% pour l'Allemagne et entre 4 et 5 % pour le Gabon et Haïti). Le plus fort taux de décès atteint les 15% au Bangladesh (Rapport de OMS 2017). L'incidence de la maladie reste beaucoup plus élevée chez les prématurés, entre 8 (poids >1Kg/) et 26 (poids <1Kg) cas pour 1000 naissances de nourrissons prématurés avec une mortalité autour des 10% (Simonsen et al., 2014).

Mise à part la mortalité précoce due au sepsis (comprenant le sepsis sévère) et le choc septique, on observe également un fort taux de décès à moyen et long terme. Certains soutiennent que cette mortalité tardive est simplement le reflet d'une comorbidité sous-jacente des patients (Garland et al., 2014) alors que d'autres y voient une conséquence du sepsis. Quartin et al, montrent que le risque de décès reste fort pendant les 5 ans suivant un sepsis comparativement à des patients présentant les mêmes risques de comorbidités mais n'ayant pas eu de septicémie (Quartin et al., 1997). Une dernière étude menée sur des patients post-septique de 31 jours à 2 ans, montre que la mortalité tardive ne peut pas être expliquée par l'état de santé des patients avant leur septicémie. D'après cette étude, 40% des patients décèdent entre 30 jours et 2 ans après la résolution de l'infection contre 10 % pour les patients non septiques et/ou

ayant eu une inflammation stérile (Prescott et al., 2016). Si l'âge est un des facteurs lié à cette forte mortalité (Pavon et al., 2013; Angus et al., 2001; Quenot et al., 2013) il n'explique pas à lui seul les différences observées. Des études épidémiologiques supplémentaires sont nécessaires car la littérature reste pauvre concernant l'étude de cette mortalité tardive.

2. Etiologie

Dans le sepsis l'infection initiale peut toucher n'importe quel tissu ou organe et se propager à d'autres tissus/organes via la circulation sanguine. Les sites infectieux initiaux sont nombreux. Ils peuvent être dus à une pneumonie, une péritonite, une infection urinaire où encore suite à un acte hospitalier invasif. Différents germes, pathogènes ou non sont à l'origine de l'infection. La dernière étude Européenne sur la prévalence de l'infection en USI (European Prevalence of Infection in Intensive Care, EPIC II) (Vincent, 2009) montre une augmentation de l'incidence des organismes gram-positifs. Cependant ce sont encore les gram-négatifs que l'on retrouve le plus fréquemment lors des cultures réalisées sur les patients infectés. Angus et al. publient en 2014 les dernières données sur la fréquence et les types d'organismes retrouvés chez les patients et associés à une forte mortalité hospitalière (**Tableau 3**). Une analyse regroupant 510 études met en évidence une forte mortalité associée aux infections bactériennes Gram-négatives par rapport aux Gram-positives (Cohen et al., 2004). Ainsi, on retrouve 62,2% des infections d'origines bactériennes à Gram-négatives contre 46,8% à Gram-positives. Une prédominance des espèces *Pseudomonas* (19,9%) et *Escherichia Coli* (16%) est retrouvée dans les infections à Gram-négatives. Si les bactéries sont majoritairement retrouvées comme étant la cause du sepsis elles ne sont pour autant pas les seules. Quelques infections sont fongiques de type *Candida* et *Aspergillus* (17 % et 1,4% respectivement). On retrouve également des origines infectieuses parasitaires (0,7%) et issues d'autres organismes (3,9 %) (Mayr et al., 2014). Les organismes à l'origine de l'infection sont la plupart du temps bien connus mais la difficulté réside en leur détection. En effet, depuis 1999 il est montré que seulement un tiers des patients atteint de sepsis sévère ne présente jamais d'hémocultures positives (Rangel-Frausto, 1999).

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

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

Tableau 3 : Types d'organismes retrouvés dans les cultures positives chez les patients infectés et associés à un haut risque de mortalité à l'hôpital. (Angus et al., 2001).

Le taux de létalité de la maladie n'est pas forcément attribué à la virulence de l'organisme à l'origine de l'infection. Le contexte et le site infectieux entrent eux aussi en compte. Les voies respiratoires sont les plus touchées avec 33% des cas de sepsis (sous forme de pneumonie), 32% sont des infections génito-urinaires, 23% sont d'origine gastro-intestinales, 7% osseuses ou articulaires, 5% sont des infections de la peau ou des tissus mous et 3% touchent d'autres sites tel que le système nerveux central et cardiovasculaire (Esper et al., 2006; Moss, 2005). Les cas de sepsis de type pneumonie sont également associés au plus haut risque de mortalité (Moss, 2005). Les hommes montrent une plus forte susceptibilité à ce type d'infection que les femmes (36% contre 29%). Cependant, les femmes développent plus fréquemment des sepsis de type génito-urinaires (35% contre 27% pour les hommes). La proportion des cas de sepsis en fonction du sexe et du site de l'infection est illustrée dans la **Figure 4**.

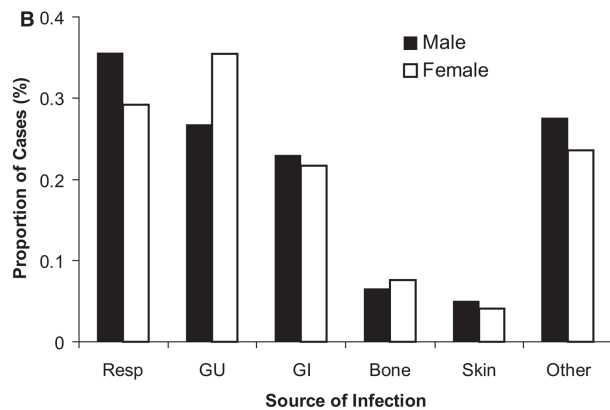


Figure 4: Distribution proportionnelle des sources infectieuses du sepsis entre hommes et femmes; Resp : voies respiratoires, GU : voies Génito-Urinaires, GI : voies Gastro-intestinales, Bone : Os, Skin : peau, Other : autres sources (Esper et al., 2006)

Plus globalement, la majorité des études mettent en avant une incidence de la maladie plus élevée pour les hommes que pour les femmes (Colbert et al., 2016; Guidet and Maury, 2013; Moss, 2005; Esper et al., 2006) (**Figure 5**). Les mécanismes qui sous-tendent cette différence n'ont pas encore été bien identifiés malgré une mise en évidence depuis plus d'une dizaine d'années. Cependant, il est fort probable que les hormones sexuelles soient capables de déclencher des réponses inflammatoires locales et systémiques différentes expliquant cette inégalité entre hommes et femmes. Plusieurs autres facteurs de risques du sepsis ont été identifiés. En effet, l'âge est un facteur de risque majeur. Hall et al. montrent qu'au-delà de 85 ans le taux d'hospitalisation pour septicémie est 30 fois plus élevé que pour la tranche d'âge < à 65 ans (Hall et al., 2011). La moyenne d'âge des patients atteints de sepsis entre 1995 et 2000 était de 60,8±13,7 ans (Martin et al., 2003). Certains facteurs de comorbidité ont également été identifiés. Ainsi, le cancer, la cirrhose, les broncho-pneumopathies, les maladies rénales, le diabète ou encore le VIH sont des facteurs de comorbidité maintenant bien identifiés. (Esper et al., 2006; Moss, 2005).

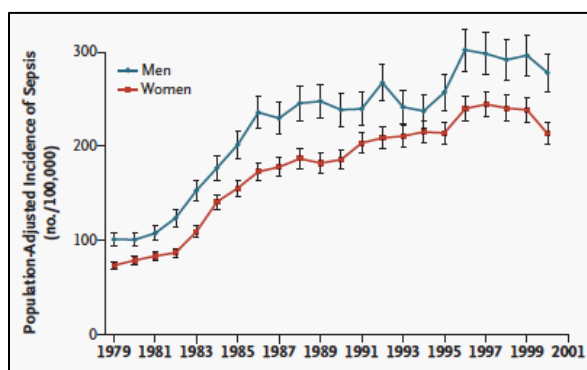


Figure 5 : Incidence du sepsis par sexe aux Etats-Unis entre 1979 et 2000 (Martin et al., 2003).

Les facteurs de risque ainsi que de comorbidité au sepsis sont sans doute multifactoriels. Ils incluent la source de l'infection et le site infectieux mais il faut aussi prendre en compte l'âge, le sexe, le polymorphisme génétique et les conditions sociales des patients. En effet, un accès aux soins difficiles et peu fréquents augmente sans doute l'incidence de la maladie dans certains cas.

Les études biologiques et cliniques visant à caractériser ces facteurs de risques sont cruciaux pour comprendre les mécanismes mis en jeu lors du développement de la maladie et ainsi améliorer la prise en charge et le traitement des patients.

III. Physiopathologie

La physiopathologie du sepsis, qui résulte de l'invasion de l'organisme par des agents infectieux (bactéries à Gram négatif et positif, champignons, virus) est complexe. L'infection déclenche des mécanismes complexes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans le but de contrôler l'envahissement de l'hôte par le pathogène et protéger les organes de toutes lésions. La réponse inflammatoire est caractérisée par la sécrétion d'un large éventail de molécules effectrices dont les cytokines par divers types cellulaires tels que les cellules endothéliales ou stromales mais aussi par les cellules du système immunitaire inné (Monocytes/Macrophages, Neutrophiles...). Ces dernières sont cruciales car elles coordonnent la mise en place des différents éléments du système immunitaire inné qui est la première ligne de défense contre les micro-organismes et initient la réponse immunitaire adaptative. Le sepsis est caractérisé par l'incapacité de l'organisme à réguler la réponse inflammatoire suite à une infection (Singer et al., 2016). Il est maintenant admis qu'au cours du sepsis, une réponse hyper-inflammatoire précoce peut conduire à la défaillance des organes et au choc septique. Cette phase est suivie d'une phase dite « immunosuppressive » ou « immunodysfonction » au cours de laquelle le patient est plus susceptible à une infection secondaire de type nosocomiale. La régulation de la réponse immunitaire innée est cruciale, qu'elle soit excessive ou insuffisante, les conséquences peuvent être importantes pour l'hôte infecté.

Dans ce chapitre nous nous intéresserons aux différents mécanismes physiopathologiques qui surviennent au cours du développement des deux phases qui caractérisent le sepsis.

1. Les différentes phases du sepsis

On a d'abord supposé que les caractéristiques cliniques du sepsis tel que la dysfonction d'organes était le résultat d'une inflammation massive due à la libération systémique de cytokines (concept des SIRS) et que celle-ci cède la place à un « syndrome de réponse anti-inflammatoire compensatoire » appelé CARS (Bone et al., 1997). Cependant, il est devenu évident que l'infection déclenche une réponse de l'hôte beaucoup plus complexe, variable et prolongée. La physiopathologie du sepsis se décrit en 2 phases. On observe une première phase précoce dite aiguë les premiers jours de la maladie (<7 jours). Cette phase se caractérise par une « tempête cytokinique » donnant une inflammation excessive. Cette inflammation excessive est à la base de lésions organiques multiples pouvant évoluer vers une défaillance multiviscérale (anomalie circulatoire, métabolique etc.) et provoquer le choc septique. Les patients survivants à la phase aiguë du sepsis peuvent évoluer vers un plateau de stagnation avec une lente récupération des dysfonctions d'organes. Cette phase est qualifiée de tardive (>7 jours) et est caractérisée par une altération du système immunitaire. On parle alors « d'immunosuppression » ou « d'immunodysfonction » ou encore « d'immunoparalysie ». A ce stade, un maintien du patient en USI est alors nécessaire avec des soins invasifs appropriés (ventilation mécanique, perfusion etc.). Si cette prise en charge est nécessaire, elle a pour contrepartie d'ouvrir la voie à des infections secondaires de type nosocomiales telles que les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. Ces infections secondaires couplées à un statut immunitaire déficient entraînent de nombreux décès tardifs dans la septicémie (**Figure 6**).

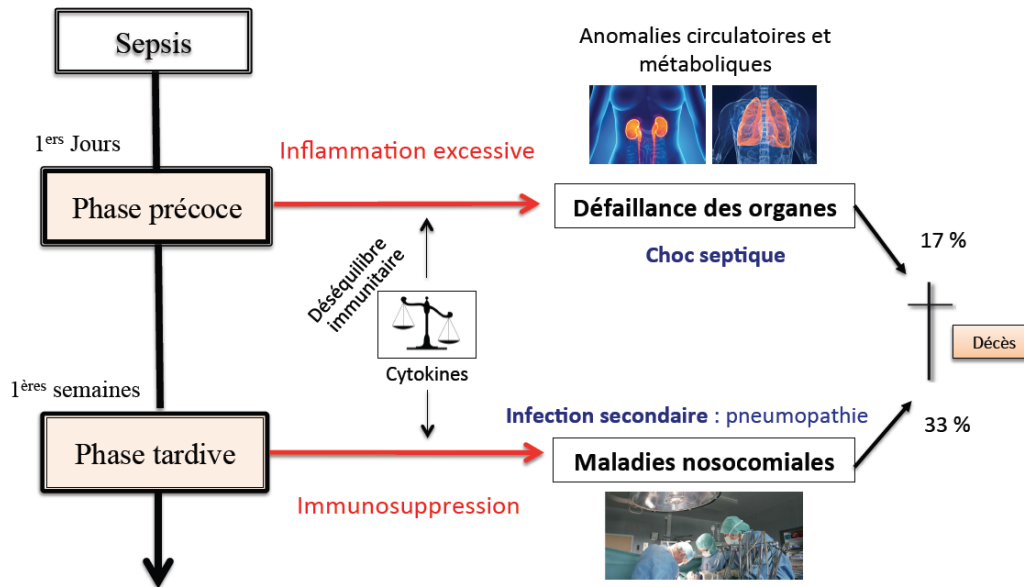


Figure 6 : Les phases cliniques et biologiques du développement de la septicémie.

2. Mise en jeu des réponses inflammatoires au cours du sepsis: les théories

Une fois la phase aiguë passée et/ou le choc septique résolu, certains patients restent sensibles à des infections secondaires souvent de type nosocomial. Cette seconde phase se caractérise par une « hypoactivité » ou une « paralysie » du système immunitaire conduisant à l'immunosuppression. Comme vu précédemment, des processus pro et anti-inflammatoires apparaissent rapidement après le début de l'infection avec une phase hyper-inflammatoire initiale et une phase immunosuppressive plus tardive. La réponse anti-inflammatoire a d'abord été considérée comme bénéfique. Elle permettrait le retour vers l'homéostasie et limiterait les dommages collatéraux provoqués par la réponse pro-inflammatoire. Lorsque la phase pro-inflammatoire est excessive elle entraîne la défaillance des organes et le décès des patients (phase aiguë) quelques jours après le début de la maladie (**Figure 7A**). La première phase peut être suivie par des mécanismes anti-inflammatoires fort, qui vont faire basculer le système immunitaire vers une immunosuppression et faciliter le développement des infections nosocomiales et/ou un décès plus tardif par l'activation de facteur de comorbidité (**Figure 7B**). La troisième réponse immunologique possible serait caractérisée par des phases oscillantes entre un état pro- et anti-inflammatoires.

La phase hyper-inflammatoire serait suivie par une phase hypo- inflammatoire avec le développement d'une infection secondaire comme précédemment. Celui-ci entrainerait à nouveau une phase hyper puis hypo-inflammatoire en chaine. Les patients peuvent alors décéder dans l'une des deux phases mais plus le sepsis se prolonge plus le patient est susceptible de développer une immunosuppression profonde (**Figure 7C**) (Hotchkiss et al., 2013b).

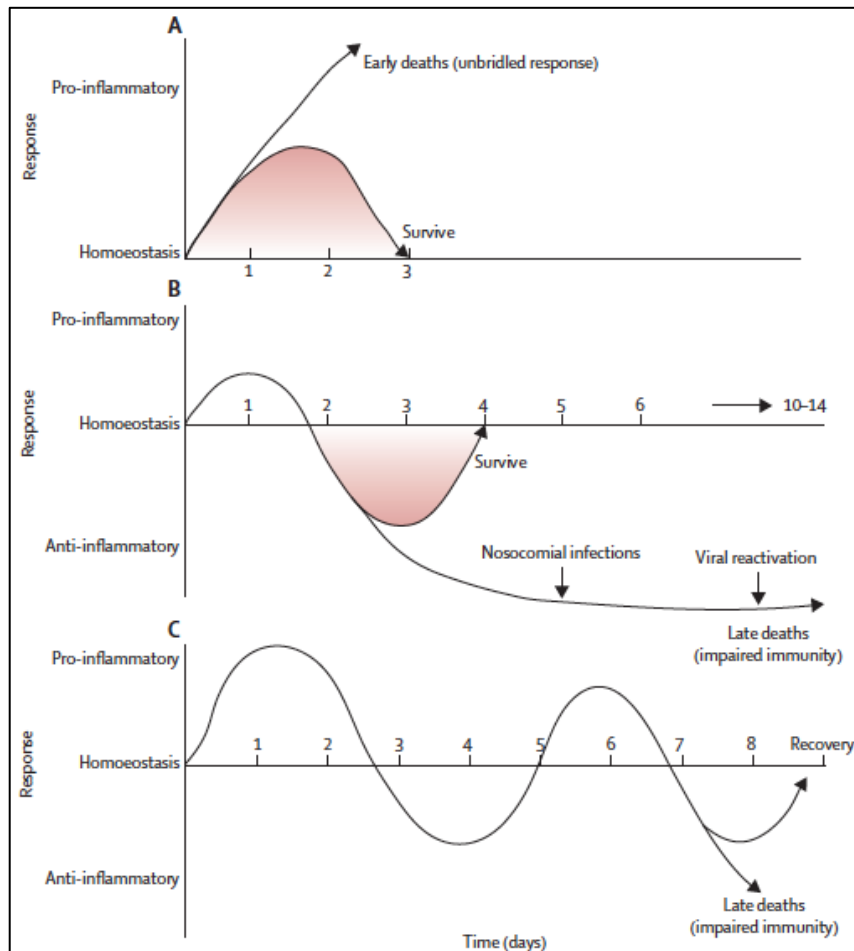


Figure 7 : Les potentiels réponses inflammatoires au cours du développement du sepsis. D'après (Hotchkiss et al., 2013a).

Xiao et al ont mis en évidence que des altérations de l'expression des gènes inflammatoires et anti-inflammatoires des leucocytes ainsi des gènes de l'immunité adaptative peuvent avoir lieu de façons simultanées. Si l'inflammation persiste elle entraine la réduction de l'expression des gènes qui régulent la réponse immunitaire adaptative pouvant être responsable de la morbidité et de la mortalité des patients (Xiao et al., 2011). Il est donc probable que les mécanismes d'actions pro et anti-

inflammatoires ne soient pas consécutifs et qu'un chevauchement voire une dysfonction simultanée est en fait lieu.

Il existe à l'heure actuelle deux modèles mettant en jeu la réponse innée et adaptative dans le développement de l'immunosuppression. Le 1^{er} modèle implique l'échec des systèmes immunitaires innée et adaptatif laissant entrer le patient dans un état d'immunosuppression sévère. Cet état ne leur permettrait pas d'éliminer l'infection et favoriserait les infections secondaires (**Figure 8A**). Soutenant cette théorie, des marqueurs de l'immunosuppression ont été identifiés post mortem au niveau de la rate et du poumon chez l'Homme. Ainsi, on observe une diminution de la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires, une augmentation de l'expression du récepteur inhibiteur PD1, une expansion des lymphocytes T régulateurs (Treg) et des cellules myéloïdes ainsi qu'une diminution de l'expression de l'HLA-DR (Boomer et al., 2011). De nombreuses études réalisées sur des modèles animaux ont également mis en évidence l'apparition de marqueurs (cellulaires ou moléculaires) de l'immunosuppression au cours du sepsis tardif.

Le 2^{ème} modèle explique le décès tardif des patients par l'activation précoce et persistante de l'immunité innée accompagnée de la suppression de l'immunité adaptative donnant l'immunosuppression (**Figure 8B**) (Hotchkiss et al., 2013a). Cette théorie est notamment soutenue par une étude pédiatrique. Celle-ci montre l'augmentation de l'expression certains gènes de l'immunité innée alors que ceux de l'immunité adaptative sont diminués (Wong, 2013).

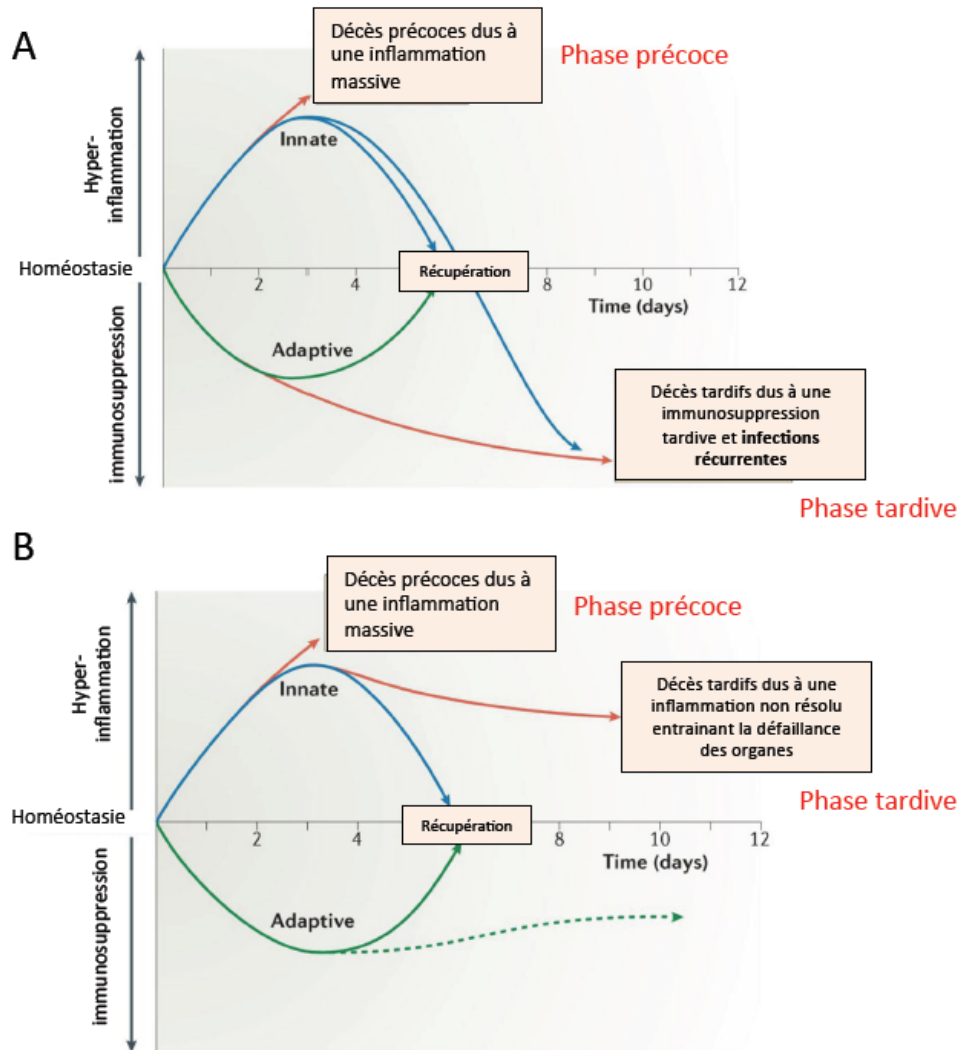


Figure 8 : Les différentes théories sur les dysfonctions immunitaires au cours du sepsis. D'après (Hotchkiss et al., 2013b).

Que ce soit chez l'Homme ou dans les modèles animaux, la littérature peut être contradictoire concernant les réponses immunitaires opérant durant un sepsis tardif. Il apparaît cependant clairement que la septicémie prolongée est principalement caractérisée par une immunosuppression systémique pouvant conduire à l'acquisition d'infections opportunistes. Les différentes hypothèses montrent qu'à l'heure actuelle tous les phénomènes et processus immunitaires menant à cet état immunosuppresseur ou d'immunoparalysie ne sont pas élucidés.

3. Mécanismes physiopathologiques cellulaires et moléculaires

La reconnaissance des motifs infectieux par le système immunitaire conduit au recrutement de leucocytes, à la synthèse locale de médiateurs et à la propagation du signal inflammatoire. Un dérèglement de cette homéostasie a lieu lors de la phase aiguë du sepsis causé par la synthèse accrue des médiateurs de l'inflammation que ce soit les médiateurs lipidiques, les cytokines et chimiokines tels que le TNF α , IL-1, IL-6, CCL2 ou encore CXCL-8. Au cours de cet état infectieux grave menant au choc septique, on observe une activation de nombreux types cellulaires (macrophages, leucocytes, plaquettes, cellules endothéliales, etc.) et systèmes humoraux (complément, coagulation, protéases). Cette activation entraîne la libération de médiateurs pro-inflammatoires qui sont responsables d'altérations cellulaires qui s'étendent au système vasculaire (**Figure 9**).

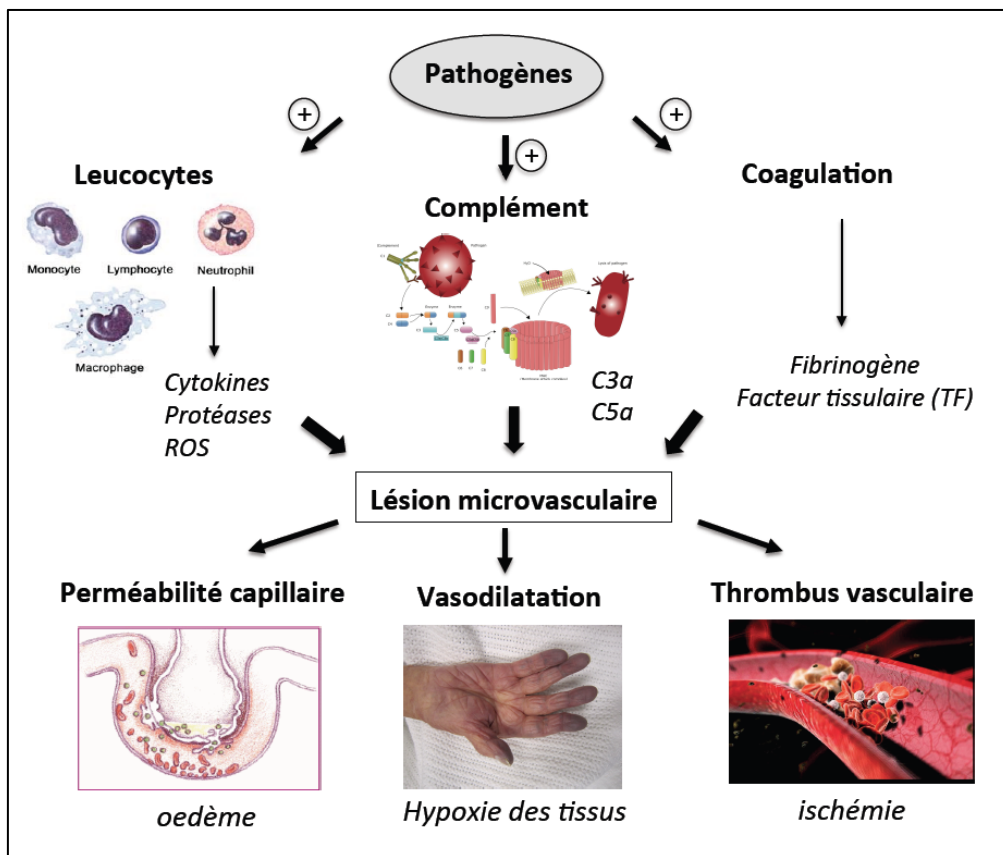


Figure 9 : Activation des systèmes cellulaires et humoraux au cours du choc septique.

a. Perturbation de l'hémostase

Fuite capillaire

Une augmentation de la perméabilité capillaire entre 6 et 24 heures après l'infection est observée. Celle-ci contribue alors au développement d'œdèmes pulmonaires (Ellman, 1984) ou encore à des lésions rénales aiguës (Wang et al., 2012). L'oxyde nitrique (NO) est un des produits issu d'une enzyme oxydoreductase appelé oxyde nitrique synthase (NOS). De façon plus générale, la forte production de NO au contact de l'anion superoxyde, forme un composé non radicalaire très oxydatif appelé le peroxy-nitrite. Les composés oxydatifs provoquent des dégâts cellulaires, touchant initialement l'endothélium vasculaire puis s'installent de façon systémique conduisant à la mort cellulaire puis à une dysfonction généralisée de l'ensemble d'un tissu. Une des conséquences cellulaires est l'apoptose et le relâchement des jonctions serrées des cellules endothéliales conduisant à la fuite capillaire (Siddall et al., 2017) et à l'œdème des tissus. Il a également été montré que la dégranulation des mastocytes et des basophiles suite à l'action des protéines C3a et C5a du complément conduit à la fuite capillaire (Ward, 2004).

Microcirculation

L'endothélium n'est pas le seul composant de la microcirculation à être altéré. Les cellules musculaires lisses qui tapissent les artérioles perdent leur sensibilité et leur tonus adrénergique (Price et al., 1999). Dans le poumon, une faible contractilité vasculaire des artérioles est décrite au cours du sepsis (McCormack et al., 2000). Ces différents facteurs entraînent une mauvaise distribution des débits sanguins régionaux donnant une altération globale de la microcirculation et l'apparition d'hypoxie tissulaire provoquant le dysfonctionnement de certains organes vitaux tels que le poumon, le rein, etc. (Tyagi et al., 2009). Ces altérations du système circulatoire peuvent être contrecarré avec l'utilisation de liquides de remplissages vasculaires et/ou de drogues vasoconstrictrices.

Coagulation

Au cours du sepsis précoce une forte activation de la coagulation est causée par une élévation de protéines pro-coagulantes (Facteur tissulaire) et une diminution des anticoagulants endogènes (protéine C). Ces deux composantes entraînent la formation

de thrombus vasculaires qui vont limiter le flux sanguin tissulaire et l'oxygénation cellulaire (Levi and van der Poll, 2005), participant également aux troubles du système circulatoire. Le traitement de la coagulation est complexe. Chez le rat il a été montré que le traitement avec de la protéine C activée (PCA) améliore les fonctions cardiovasculaires en modulant la balance cytokinique procoagulante et pro-inflammatoire (diminution de l'IL-1 et IL-6) et en diminuant l'interaction des leucocytes à l'endothélium au cours du choc septique (Nacira et al., 2009). De plus, un faible taux de protéine C chez les patients septiques est associé à la sévérité du dysfonctionnement des organes et peut donc être utilisé pour prédire la défaillance d'un organe (Shaw et al., 2011). Une étude clinique de 2001 montre elle aussi l'efficacité du traitement par la protéine C activée sur le sepsis sévère (Bernard et al., 2001). Cependant, cet article est vivement critiqué à cause de nombreux biais dans l'étude (modification en cours d'étude des critères d'éligibilité ou encore la suppression de centres investigateurs etc.). Des études complémentaires sont en cours afin d'établir le bénéfice/risque et la population cible du traitement par la PCA. D'autres traitements comme l'héparine n'ont également pas été montrés vitaux dans la prise en charge de la septicémie. Une récente théorie a vu le jour plaçant les mécanismes de coagulation comme étant un moyen de piéger les bactéries localement, améliorant leurs reconnaissances par les cellules immunitaires et évitant leurs propagations systémiques (Lipinska-Gediga, 2016). La modulation de la cascade de coagulation reste une thérapie potentielle contre le sepsis mais d'autres études doivent être réalisées afin de déterminer le moment le plus approprié pour le traitement au cours de l'infection.

b. Métabolisme oxydatif

Les perturbations de l'oxygénation cellulaire contribuent largement à la dysfonction d'organes. La libération en excès de NO, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ainsi que divers médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines au cours de la maladie peuvent agir directement ou indirectement sur la fonction mitochondriale et la production d'énergie (Rudiger et al., 2008). Ainsi, la dysfonction des organes induite par le sepsis peut être en partie due à un dysfonctionnement mitochondrial. Une étude a montré que l'amélioration progressive de la respiration mitochondriale est associée au

rétablissement de la fonction des organes chez les patients qui survivent à la septicémie (Brealey et al., 2002).

Le NO est également connu pour avoir un effet bactéricide, anti-tumoral et cytotoxique (Nathan, 1992). Chez l'homme, les macrophages et monocytes sont connus pour produire de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS ou NOS2 : isoforme de l'oxyde nitrique synthase) en condition infectieuse ou lors des maladies inflammatoires. Le rôle du NO produit par l'iNOS dans les monocytes/macrophages a été montré bénéfique sur l'élimination des bactéries grâce à son effet toxique direct (MacMicking et al., 1997). Mais son action va au-delà de ce simple effet toxique puisque lors d'une stimulation par le LPS la production de NO par les macrophages corrèle avec une activité phagocytaire plus forte. Cette dernière étant perdue lorsque qu'un inhibiteur de l'iNOS est ajouté (Tumer et al., 2007). L'effet du NO est donc double, sa production permet de lutter contre les envahisseurs microbiens mais il peut se retourner contre la cellule et provoquer des dégâts cellulaires dus à son instabilité comme vue précédemment.

Pour conclure, l'action concomitante de la synthèse de NO, de l'activation de la coagulation et des cellules endothéliales associées à une importante production de cytokines va conduire au recrutement de leucocytes activés par la circulation vers les tissus. Des agents chimiotactiques et des molécules d'adhésion conduisent ces cellules sur les sites infectieux afin d'éliminer les bactéries et les cellules apoptotiques. Ces leucocytes recrutés sont également connus pour produire des ROS et des cytokines inflammatoires en excès qui vont contribuer aux dégâts tissulaires.

4. Stratégies thérapeutiques

Le traitement du sepsis et du choc septique repose classiquement sur un traitement afin d'éliminer le foyer infectieux (antibiothérapie) et sur le traitement symptomatique des défaillances d'organes (remplissage vasculaire, catécholamines et corticoïdes). La prise en charge rapide des patients en USI est primordiale car chaque heure gagnée améliore les chances de survie. Malgré l'amélioration des connaissances de la physiopathologie du sepsis aucune nouvelle thérapie n'a vu le jour depuis plusieurs années. De nombreux essais cliniques ont été réalisés mais ceux-ci n'ont donné lieu à aucune mise sur le marché. Malgré cela, les recherches continuent et de nouveaux

essais cliniques visant à stimuler le système immunitaire (immunothérapie) au cours de la phase tardive sont en cours.

a. Prise en charge thérapeutique du sepsis

Antibiothérapie

La détection du foyer infectieux ainsi que le type de pathogènes mis en cause sont des paramètres importants afin d'adapter au mieux les traitements antibiotiques. La recherche de pathogènes peut se faire soit par des hémocultures, soit par des prélèvements sur le site infectieux quand celui-ci est identifié. La mise en place rapide d'un traitement antibiotique (dès la première 1h) est vue essentielle à la survie des patients (Rello et al., 2001). Généralement une couverture bactérienne à large spectre contre les germes gram-positifs et négatifs est initialement administrée. Celle-ci doit être réduite et adaptée en fonction des résultats de la culture et de l'antibiogramme. Les patients immunodéprimés peuvent également recevoir un traitement antifongique. Les recommandations internationales suggèrent une durée de 7 à 10 jours des traitements antibiotiques dans les infections graves de septicémie (Rhodes et al., 2017).

Remplissage vasculaire

Le remplissage vasculaire fait parti du traitement symptomatique de la septicémie et se fait en parallèle des antibiothérapies. L'hypovolémie est constante au cours du sepsis, le remplissage vasculaire est donc une étape obligatoire. Celui-ci permet d'augmenter le transport en oxygène, corrige l'hypotension artérielle et améliore le pronostic des patients. Le remplissage initial repose principalement sur les cristalloïdes et colloïdes de synthèse. Le cristalloïde isotonique (ex, solution physiologique à 0,9%) est préféré et doit être administré rapidement. Le but de ce traitement est de parvenir à une reperfusion des tissus sans provoquer un œdème pulmonaire par surcharge de liquide.

Les catécholamines

La persistance d'une pression artérielle effondrée malgré l'utilisation de liquides de remplissage vasculaire peut nécessiter l'introduction de catécholamines. Les catécholamines sont des drogues cardio-vasoactives dont les principales utilisées dans

le traitement du sepsis sont les inoconstricteurs tels que la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline. Les catécholamines ne sont théoriquement jamais indiquées dans un état de choc néanmoins dans des situations dramatiques, un vasoconstricteur comme la noradrénaline peut être associé au remplissage pendant une courte période pour passer un cap critique.

Les autres traitements

Une assistance respiratoire voire une ventilation mécanique peut être nécessaire en cas détresse respiratoire. La ventilation mécanique améliore l'oxygénation et réduit la demande en O₂ par la mise au repos des muscles respiratoires. La corticothérapie peut être bénéfique chez les patients qui restent hypotendus malgré le remplissage, les antibiotiques et les vasopresseurs. L'effet bénéfique de ce traitement à faible dose (moins de 300mg par jour) est établi, notamment en raison des effets bénéfiques anti-inflammatoires sur la défaillance d'organe (Rossi et al., 2009). Une mise en garde est faite sur l'usage de doses cumulatives élevées car celles-ci peuvent exercer des effets délétères notamment en augmentant le risque infectieux. L'ajout d'anticoagulants au traitement contre le sepsis reste lui très controversé (voir chapitre coagulation). Les dernières directives internationales sur la septicémie déconseillent même l'utilisation des anticoagulants tel que l'antithrombine ou l'héparine (Rhodes et al., 2017).

b. Les immunothérapies : une nouvelle approche

La prise en charge thérapeutique conventionnelle bien qu'efficace dans certains cas ne semble pas suffisante. La grande majorité des patients aujourd'hui survivent à la première phase du sepsis et vont rapidement présenter une immunosuppression guidée par l'immunité diminuée du patient. La prévention de l'immunosuppression ou le traitement de ce phénomène une fois qu'il survient est une priorité pour la recherche. Les principales avancées des essais cliniques sur les immunothérapies concernent l'étude du traitement par le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulation factor), par les cytokines immunostimulantes IL-7 et INF γ et le blocage des signaux de costimulation négatif PD-1 (liste non exhaustive).

GM-CSF - Le GM-CSF est une cytokine qui stimule les cellules souches à produire des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Les résultats des essais cliniques

sur l'administration du GM-CSF ont montré un rétablissement de l'expression de l'HLA-DR (marqueur de l'état immunosuppresseur), une réduction du nombre de jours sous ventilation des patients et des séjours plus courts en USI (Meisel et al., 2009). De plus, en pédiatrie le traitement a réduit le nombre d'infections nosocomiales (Hall et al., 2011). Le traitement par le GM-CSF apparaît comme étant bénéfique. Cependant, aucun avantage sur la mortalité des patients n'a été montré. D'autres études sont nécessaires et actuellement en cours.

IL-7 - L'immunosuppression au cours du sepsis se caractérise par une forte lymphopénie. L'IL-7 a été un candidat thérapeutique idéal puisque celui-ci est essentiel au développement des lymphocytes T et à leurs fonctions. Ainsi il a été montré que l'IL-7 était capable d'augmenter la capacité des cellules T à s'activer, bloquait l'apoptose de ces cellules, et qu'il augmentait l'expression des intégrines (aidant au recrutement des lymphocytes) (Hotchkiss et al., 2013a). La survie des souris a également été améliorée grâce à l'IL-7 (Unsinger et al., 2010). Ainsi, le traitement des patients est fortement envisageable notamment au cours de la phase immunosuppressive du sepsis.

INF γ - Une diminution de l'INF γ est observée au cours du sepsis alors que celle-ci est essentielle à l'activation de l'immunité innée. Le traitement des patients septiques par l'INF γ recombinante a montré une réversion de la diminution de l'HLA-DR sur les monocytes et a augmenté la survie des patients (Nalos et al., 2012). De plus, il a été largement montré que le traitement par INF γ diminuait le risque d'infection chez les patients souffrant de lésions sévères (Dries et al., 1994). Une étude clinique est en cours au Pays-Bas testant le réel impact de INF γ chez des patients septiques entrés dans la phase immunosuppressive.

PD1 - Le PD1 est une molécule de costimulation négative qui est connue notamment dans le cancer pour réduire la prolifération des lymphocytes et induire l'« exhaustion » de ces cellules. L'expression du PD1 et de son ligand le PDL1 est augmentée sur les monocytes et les lymphocytes T, soupçonnés de participer aux mécanismes immunosuppresseurs au cours du sepsis. Le blocage des signaux PD1 et PDL1 a montré une augmentation de la survie après un sepsis bactérien (Huang et al., 2009; Zhang et al., 2010) et fongique (Shindo et al., 2017) chez la souris. Les études précliniques semblent encourageantes et connaissant l'effet bénéfique des anti-PD1 et anti-PDL1 contre le cancer, ce traitement fait partie des nouvelles thérapies à explorer.

Même si les premières données sur les immunothérapies semblent prometteuses celles-ci doivent encore faire leurs preuves en clinique.

La physiologie du sepsis est compliquée et évolue en différentes phases impliquant des mécanismes immunitaires bien particuliers au cours du temps. Ainsi, réunir un échantillon de patients au même stade de la maladie semble compliqué et participe sans doute à l'échec de nombreux essais cliniques sur le sepsis. Il est impératif d'améliorer la connaissance des mécanismes physiopathologiques et la détection rapide de ceux-ci au cours de la maladie, afin d'établir des traitements plus ciblés et adaptés à chaque patient.

IV. Activation du système immunitaire

1. Activation du système immunitaire inné

Chez les vertébrés, l'invasion par des micro-organismes est initialement combattue par des mécanismes de défenses innés activés dans les minutes qui suivent l'infection. L'immunité innée constitue la première ligne de défense face à une infection et permet une réponse immune rapide et peu sélective. Celle-ci a été décrite pour la première fois en 1883 par Elie Metchnikoff grâce à la découverte des phagocytes et de la phagocytose. Cette théorie soutenue par le Dr Roux n'a obtenu l'approbation de ses pairs que plusieurs années plus tard et a été récompensée par le prix Nobel de médecine en 1908. Les déterminants antigéniques provenant de la dégradation des agents pathogènes par les cellules de l'immunité innée sont soit détruits soit présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aux cellules de l'immunité adaptative. Les CPA permettent alors la sélection des clones lymphocytaires ainsi que leur différenciation. L'immunité innée a donc la capacité d'orienter la réponse immunitaire adaptative. Outre sa capacité à reconnaître et à neutraliser les micro-organismes par la phagocytose, l'immunité innée induit également la libération de molécules comme celles du complexe de lyse du complément, des radicaux libres et contrôle l'expression de cytokines et des molécules de costimulation. L'activation du système immunitaire inné a donc une place centrale dans le développement de la septicémie.

a. Les récepteurs de l'immunité innée : les PRRs

Les principales cellules effectrices du système immunitaire inné sont les phagocytes (monocytes/macrophages, cellules dendritiques) et les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et certains lymphocytes (cellules Natural Killer). Ces cellules reconnaissent des motifs moléculaires conservés au sein de différents types de micro-organismes baptisés PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) identifiés pour la première fois par Charles Janeway (Janeway, 1989). Les PAMPs se caractérisent par les trois propriétés suivantes : ils ne sont pas présents sur les cellules de l'hôte, les motifs sont invariants et communs à de nombreux micro-organismes et sont essentiels à leur survie. Les PAMPs sont reconnus par des récepteurs appelés PRRs pour « pattern recognition receptor » et activent la réponse immunitaire (Xiao et al., 2011). La large capacité de reconnaissance des PRRs est augmentée par la diversité de leur localisation. Ainsi, les récepteurs de type Toll (Toll Like Receptors ou TLRs) et les récepteurs des lectines de type-C (C-Type Lectin Receptors ou CLR) surveillent le milieu extracellulaire et les compartiments endosomaux. Les récepteurs de type RIG-I (RIG-I-like receptors ou RLR) et de type NOD (NOD-like receptors ou NLR) détectent la présence de motifs microbiens ou de signaux de danger au sein du cytoplasme.

Les PRRs membranaires présents à la surface des cellules de l'immunité innée permettent de déclencher une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la transcription de gènes de l'inflammation. Ces récepteurs de type Toll (*Toll Like Receptors* ou TLRs) sont décrit pour la première fois chez la drosophile et ont un rôle essentiel dans la défense anti-infectieuse (Lemaitre et al., 1996). Ils diffèrent les uns des autres par leur spécificité pour un motif PAMP et les gènes cibles qu'ils peuvent induire. Ils sont exprimés à la surface des cellules de l'immunité innée mais aussi sur les lymphocyte B et T et sur les cellules ayant un contact avec le milieu extérieur (cellules épithéliales pulmonaires, cellules digestives, cellules de l'épiderme) (Gao et al., 2008). Chez les mammifères, une famille de 10 récepteurs Toll-like a été identifiée (**Table 4**). La voie de signalisation induite par les TLRs engage l'activation des facteurs de transcription NF- κ B qui régule l'expression des cytokines inflammatoires (Figure 10) telles que le TNF α , l'IL1 ou encore l'IL6 ainsi que les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 (Medzhitov et al., 1997).

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

Tableau 4 : Toll-likes receptor (TLRs) et les motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes associés (PAMPS) (Gao et al., 2008)

En 2002, Martinon F, Burns K et Tschopp J ont découvert un macrocomplexe moléculaire comportant un PRR nouveau et l'ont appelé inflammasome (Martino et al, 2002). L'inflammasome n'induit pas une réponse transcriptionnelle comme les TLRs mais entraîne spécifiquement l'activation d'une caspase inflammatoire, la caspase-1. Cette caspase permet le clivage protéolytique de procytokines telles que IL-1 β et l'IL-18 permettant leur sécrétion, et le déclenchement d'une mort cellulaire, la pyroptose (Bergsbaken et al, 2009). Les NLRs et les RLRs sont actuellement décrits comme les principaux déclencheurs de l'activation de l'inflammasome suite à la phagocytose des

microbes. A l'heure actuelle, sept NLRs ont été identifiés comme inducteurs de l'activation de l'inflammasome. L'inflammasome NLRP3 (ou cryopyrine) est le plus largement étudié et est impliqué dans la détection de nombreux signaux de danger (efflux de potassium, ATP, Cristaux, ADN bactérien etc...) (Shao et al., 2015). Son activation nécessite deux signaux. Le premier résulte de l'engagement d'un récepteur Toll-like qui via l'activation de NF- κ B favorise la transcription du NLRP3 et des procytokines IL-1 β et IL-18. Le second signal favorise l'oligomérisation des NLRP3, de la protéine ASC (apoptosis-associated speck-like protein) et de la caspase-1 formant ainsi le complexe de l'inflammasome. Ce complexe catalyse la procaspase-1 en caspase-1 ce qui contribue à la production et à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 matures. Trois modèles sont proposés pour décrire la deuxième étape et sont résumés dans la **Figure 10a**.

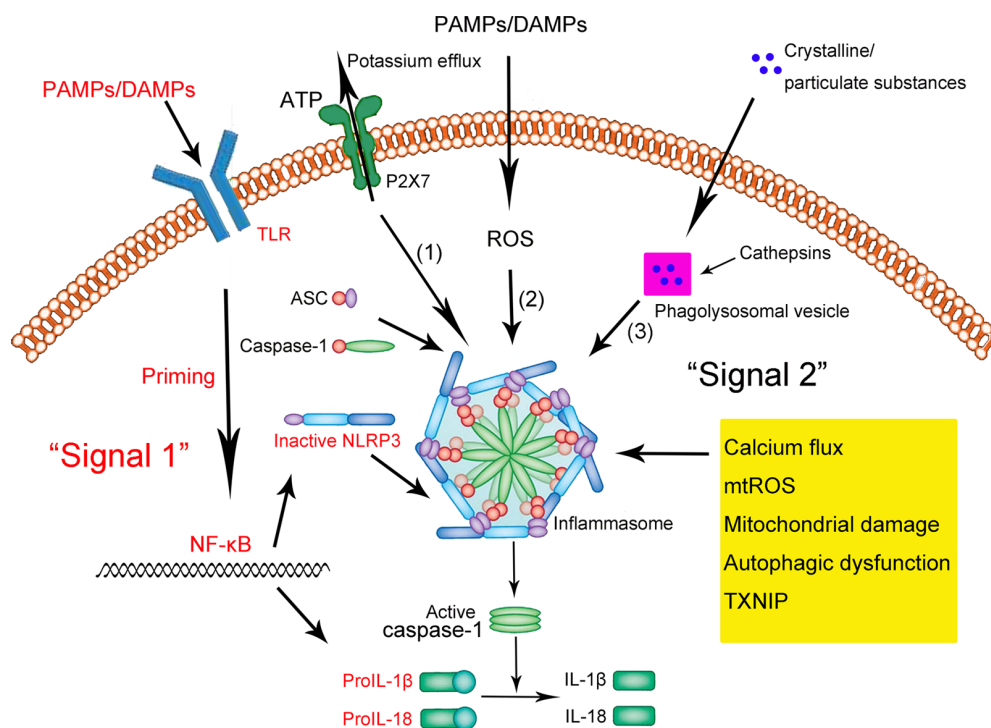


Figure 10a : Activation de l'inflammasome NLRP3. Le « Signal 1 » correspond à l'activation de la voie des TLRs. Le « signal 2 » permet la formation du complexe de l'inflammasome NLRP3. L'activation de ce complexe peut se faire par 3 voies : (1) la première voie implique la formation du complexe via l'ATP et un efflux de potassium. (2) la deuxième voie implique la génération de ROS via les PAMPs. (3) la troisième, implique la libération de contenu lysosomal comme la cathepsine B issue de la rupture lysosomale. D'autres facteurs et mécanismes sont impliqués dans l'assemblage et l'activation de ce complexe, ici listés en jaune. D'après (Shao et al., 2015).

L'importance de l'activation de l'inflammasome dans la lutte anti-infectieuse résulte de trois activités liées à la caspase-1 : (1) la pyroptose, qui permet la suppression des niches bactériennes intracellulaires, (2) la production d'IL-1 β , qui entraîne le recrutement des cellules inflammatoires au site de l'infection, et (3) la production d'IL-18 qui induit la cascade de l'IFN- γ et l'activation des mécanismes bactéricides (Dunne, 2011).

Implication des récepteurs Toll-like dans le sepsis

Les bactéries (Gram positives et négatives) sont les micro-organismes les plus retrouvés dans les infections conduisant à un état septique (avec une prévalence des Gram négatives). Les parois de ces bactéries sont constituées d'acides lipotéichoïques (TLA) pour les Gram+ ou d'une endotoxine également appelée lipopolysaccharide (LPS) pour les Gram-. Ces deux composants sont capables de se lier au TLR2 ou au TLR4 respectivement. Le LPS est couramment utilisé dans les modèles expérimentaux de choc septique depuis plusieurs années. Il est maintenant bien connu que son injection conduit aux signes cliniques et biologiques observés au cours du choc septique. Le LPS libéré dans l'organisme peut se fixer sur une protéine synthétisée par le foie la « LPS Binding Protein » (LBP) qui permet sa fixation au corécepteur CD14 et à la protéine MD2 s'associant au TLR4 (O'Neill, 2003). L'activation du TLR4 entraîne une signalisation en aval fonctionnant avec le facteur MyD88 et des sérine-thréonines kinases de la famille IRAK (Janssens and Beyaert, 2002) permettant l'activation de NF- κ B (**Figure 10b**).

L'importance de l'activation du TLR4 et/ou du TLR2 a été mise en évidence dans des modèles de sepsis polymicrobien murin en réalisant des ligatures et des ponctions caecales (CLP) ou grâce à l'injection de LPS. Meihong et al. ont montré que l'absence du TLR4 sur les hépatocytes augmentait la phagocytose du LPS par les macrophages du foie et conduisait à une plus faible mortalité des souris. A contrario, l'absence d'expression de ce récepteur sur les cellules myéloïdes (souris *Knock-out* pour le TLR4 conditionné par l'expression du lysosyme M, LysM-TLR4KO) entraîne un blocage complet de la phagocytose dans le foie et une mortalité accrue (Deng et al., 2013). Chez l'Homme, la mortalité semble être associée à diminution de l'expression du TLR2 et du CD14 sur les

monocytes ainsi qu'à une faible induction de cytokines (Schaaf et al., 2009). Le rôle des TLRs varie donc en fonction du type cellulaire sur lesquelles ils s'expriment.

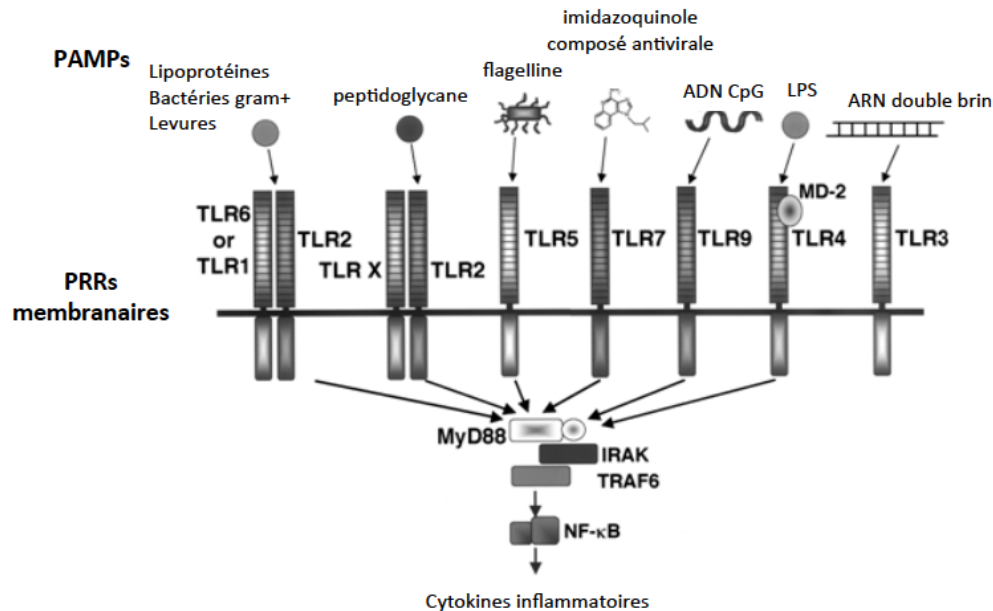


Figure 10b : Les différents TLRs et leurs ligands (Université de LAVAL)

Le rôle variable de ces récepteurs ne s'arrête pas à leur expression cellulaire. Ils peuvent aussi avoir des fonctions différentes en fonction de l'organe où il s'exprime ou encore du type d'infection. Ainsi, contrairement au foie, les souris déficientes en TLR4 (TLR4^{-/-}) montrent une diminution des dysfonctionnements cardiaques. L'expression du TLR4 aggraverait alors l'insuffisance cardiaque en favorisant la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'infiltration des neutrophiles dans le cœur (Zhou et al., 2018a). Étonnamment, le TLR4 en interaction avec le CD14 pourrait aussi être impliqué dans la défense immunitaire innée contre certains virus tel que le Virus Respiratoire Syncytial (VRS). L'infection par le VRS est en effet responsable d'infections pulmonaires plus prolongées et plus sévères chez les souris déficientes en TLR4 que chez les souris contrôles (Kurt-Jones et al., 2000). Pène et al. se sont intéressés à caractériser le rôle des TLR2, TLR4 et TLR5 dans un modèle d'infection pulmonaire secondaire (*P.aeruginosa*) au sepsis. Il est alors montré que seules les souris déficientes en TLR2 (TLR2^{-/-}) seraient capables de résister à une infection pulmonaire secondaire au sepsis (Pène et al., 2012).

Malgré une littérature hétérogène sur le rôle « bénéfique » ou « délétère » des récepteurs TLRs dans le sepsis, de nouvelles thérapies ciblant ces récepteurs et/ou leurs voies de signalisation ont récemment vu le jour. Ainsi, l'administration précoce d'anticorps anti-TLR2 ou anti-TLR4 accompagnée d'un traitement antibiotique a montré des effets bénéfiques dans le contexte d'une septicémie polymicrobienne de la cavité péritonéale chez la souris (Lima et al., 2015). L'inhibition de la voie de signalisation TLR4/MyD88 par un anticorps diminue l'effet du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) chez le rat en régulant l'activation de la réponse inflammatoire et des macrophages (Zhou et al., 2018c). Contrairement, aux études précliniques sur le rongeur, les résultats des premiers essais cliniques sont décevants. Le traitement par une molécule inhibitrice de TLR4 « TAK-242 » chez des patients atteints de septicémie en état de choc ou d'insuffisance respiratoire n'a pas significativement amélioré la survie par rapport aux patients non traités (Rice et al., 2010). Un essai clinique de phase 3 avec un antagoniste de MD2-TLR4 n'a lui aussi pas été montré comme bénéfique (Opal et al., 2013). Les différences observées entre les essais cliniques et précliniques peuvent être expliquées par la variation de certains facteurs comme l'âge. Dans la plupart des modèles de sepsis murin, les souris utilisées sont jeunes (entre 6 et 12 semaines) alors que les patients inclus dans les essais cliniques ont une moyenne d'âge de 65ans. De plus, chez la souris la bonne connaissance du modèle permet l'administration des traitements de façon plus précoce que chez l'Homme. Une prise en charge rapide à l'aide d'un dépistage fiable, ainsi que l'adaptation des traitements en fonction des organes touchés et du type d'infection permettrait peut-être de combler la différence entre les études précliniques et cliniques. Il est évident que la recherche préclinique doit continuer d'être menée sur différents modèles infectieux de septicémie et que des études doivent être réalisées à différents temps au cours du développement de la maladie.

Nous avons vu que les récepteurs de type Toll fonctionnent comme les premiers éléments moléculaires à répondre aux signaux de danger. Ils sont ainsi connus pour jouer un rôle central dans le combat contre les maladies infectieuses et inflammatoires. Cependant, les mécanismes d'inhibition des TLRs et/ou de leurs voies de signalisation apparaissent complexes et de nombreuses études sont encore nécessaires pour mieux les connaître et décrire leurs rôles respectifs dans la physiopathologie du sepsis (de la phase aiguë à la phase tardive).

Implication de l'inflammasome dans le sepsis

L'inflammasome conduit à l'activation de la caspase-1 qui elle-même active la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules myéloïdes (macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles) et les cellules épithéliales. L'activation dérégulée de l'inflammasome est impliquée dans plusieurs maladies comme le lupus ou encore la polyarthrite rhumatoïde. Les réponses immunitaires excessives induites par l'inflammasome peuvent exacerber les lésions tissulaires au cours du sepsis, sa modulation voire son inhibition ont montré une protection dans de nombreux modèles murins de sepsis. Ainsi, le déficit en NLRP3 a inhibé les réponses inflammatoires et amélioré la survie des souris septiques suite à une CLP (Lee et al., 2017). Les souris Knockout pour la caspase-1 ont montré une meilleure survie lors d'un choc endotoxique (Li et al., 1995) ou lors d'un sepsis bactérien (Sarkar et al., 2006). Sarkar et al, ont également rapporté que les souris déficientes en caspase-1 montraient une diminution du nombre de cellules B apoptotiques spléniques par rapport aux souris WT après un sepsis. Une autre étude récente a mis en évidence que l'administration orale de scutellarin (Flovinoïde) inhibait l'activation de la caspase-1, la pyroptose des macrophages et bloquait la sécrétion d'IL-1 β mature. Les souris septiques traitées ont montré une meilleure survie et une réduction de l'infiltration des cellules immunitaires dans le foie concordant avec la réduction des taux sériques d'IL-1 β (Liu et al., 2017).

L'inflammasome semble participer activement à la mise en place des réponses inflammatoires excessives au cours du sepsis. Toutes ces études nous indiquent que le blocage par des agents thérapeutiques ciblant les voies d'activation des inflammasomes (en particulier l'inflammasome NLRP3) conférerait des effets protecteurs contre l'inflammation systémique ayant lieu au cours d'un sepsis bactérien.

b. Rôle des cytokines

Le signal en aval engendré par l'interaction PAMP/TLRs déclenche notamment la translocation du facteur de transcription NF κ B et la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation. Les cellules inflammatoires sont la principale source d'agent pro-inflammatoires bien que les cellules endothéliales vasculaires en soient tout aussi capables. Les principales cytokines pro-inflammatoires sécrétées caractéristiques des

réponses précoces au cours du sepsis sont le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), les interleukines IL-1 β , IL-6 et la chimiokine CXCL-8. Le TNF α est détectable très rapidement 30min après l'infection, IL-1 après 3h et IL-6 seulement après 6h (Bellingan, 1999; Xiao et al., 2015). Le TNF α et l'IL-1 interagissent avec les cellules endothéliales vasculaires et stimulent la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF), la prostaglandine E (PGE) et de NO entraînant la vasodilatation, l'hypertension et le syndrome de dysfonction d'organes multiples (SDMO) (**Figure 11**). Elles sont aussi capables de stimuler l'expression des molécules d'adhérence par les cellules endothéliales et la synthèse de CXCL-8 par les monocytes activés, les cellules endothéliales, les kératinocytes et les fibroblastes (Jaber and Pereira, 1996). CXCL-8 possède une activité chimiotactique vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles (PNN) et des monocytes au niveau du site de l'infection. La forte production de CXCL-8 lors de l'infection stimule alors le relargage d'enzyme (tel que l'élastase) et des radicaux libres oxygénés qui en plus de leurs actions bactéricides conduisent à des lésions tissulaires (Mathelier-Fusade et al., 1990). Le taux d'IL-6 est également montré comme étant élevé chez les patients et dans des modèles de sepsis murins (Mera et al., 2011; Chiswick et al., 2015). Celui-ci est sécrété par les cellules T mais surtout par les macrophages. L'augmentation du taux d'IL-6 dans le plasma est associée à un haut risque de mortalité chez l'Homme et chez la souris lors du sepsis (Kellum et al., 2007; Chiswick et al., 2015). Cependant, le mécanisme précis associé à ce phénomène n'est pas encore clair et nécessiterait plus d'investigations.

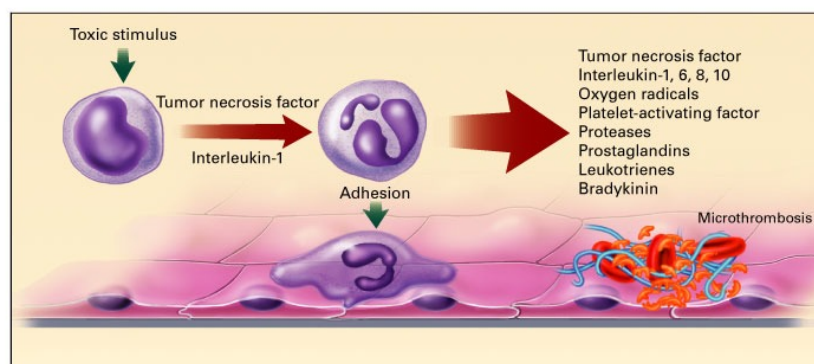


Figure 11 : Effet de l'IL-1 et du TNF α sur la physiopathologie du sepsis (Wheeler and Bernard, 1999).

La forte sécrétion de ces cytokines pro-inflammatoires que ce soit chez l'humain ou chez le rongeur est caractéristique la phase aiguë du sepsis menant au choc. Elles ne sont pour autant pas les seules à agir. En effet, ce relargage de cytokines pro-inflammatoires est accompagnée de l'augmentation d'inhibiteurs spécifiques des cytokines tel que le récepteur antagoniste à IL-1 (IL-1RA) ainsi que du récepteur au TNF soluble (TNFR). On observe également, une importante sécrétion de cytokines anti-inflammatoires dont les principales sont : TGF- β , IL-10 et IL-4 (Opal and DePalo, 2000). Les cytokines anti-inflammatoires et les récepteurs antagonistes aux cytokines inflammatoires sont vus comme les acteurs clés du basculement de la phase aiguë vers la phase tardive dite immunosuppressive. Une surproduction persistante d'IL-10 est associée à l'augmentation de la gravité de la maladie et un haut ratio IL-10 / TNF α est également associé à une mortalité plus forte (Gogos et al., 2018). IL-10 est produit par les monocytes, CD4+ Th2 et les cellules B et supprime la production du TNF α , IL-1, IL-6, GM-CSF et MIP-1 α et MIP-2 α (CHAUDHRY et al., 2015).

Globalement, les études ont montré qu'un déséquilibre des cytokines pro- et anti-inflammatoires produites pendant la septicémie peut jouer un rôle important dans la pathogenèse de la maladie. Le **tableau 5** donne une liste des principaux acteurs cytokiniques impliqués dans la physiopathologie de la maladie. La modulation de la sécrétion des cytokines par l'utilisation de corticostéroïdes semble être efficace lors du choc septique mais ne montre pas d'efficacité sur le sepsis sévère (Keh and Sprung, 2004). Le basculement du système immunitaire vers un état immunosuppressif est compliqué à appréhender. Ainsi les traitements visant à moduler l'inflammation restent envisageables mais ne se montrent pas toujours efficaces car le syndrome de dysfonction d'organe multiple (SDMO) évolue avec le temps.

Cytokine	Family	Cell origin	Function	Role in sepsis
Pro-inflammatory				
IL-1 β	IL-1	Macrophages, monocytes	Cell proliferation, differentiation, apoptosis	Unknown
IL-6	IL-6	T-cells, macrophages, endothelial cells	Cell growth, differentiation, cytokine production	Disease severity, mortality, biomarker
IL-8	CXC	Macrophages, epithelial cells, endothelial cells	Chemotaxis, angiogenesis	Mortality, biomarker
IL-12	IL-12	Dendritic cells, macrophages, B-cells	IFN- γ production, TNF- α production, Th1 differentiation	Unknown
IL-17	IL-17	Helper T-cells	Cytokine/chemokine production, anti-tumor immunity, autoimmunity	Controversial
IL-18	IL-1	Macrophages, monocytes, dendritic cells	IFN- γ production, anti-microbial immunity	Disease severity, biomarker
IFN- γ	IFN	T-Cells, NK cells, NKT cells	Anti-infection, anti-tumor immunity, autoimmunity	Unclear
GM-CSF	IL-4	T-Cells, macrophages, mast cells, endothelial cells, fibroblasts	Cell growth, survival, granulocyte development, monocyte development, autoimmunity	Unclear
TNF- α	TNF	Macrophage, CD4 T-cells, NK cells	Cytokine production, cell proliferation, apoptosis, anti-infection, tumor necrosis	Disease progress, survival, biomarker
Anti-inflammatory				
IL-1Ra	IL-1	Macrophages, monocytes, dendritic cells	IL-1 α inhibitor, IL-1 β inhibitor	Unknown
IL-4	IL-4	T-Cells, mast cells, basophils	Cell proliferation, Th2 differentiation	Unclear
IL-10	IL-10	Th2 cells, B-cells, monocytes	Potent inhibitor of pro-inflammatory cytokine production	Disease severity, mortality
IL-11	IL-6	Fibroblasts, neurons, epithelial cells	Induction of Th2 cytokines, inhibition of Th1 cytokine production	Unknown
IL-13	IL-4	Th2 Cells	Inhibitor of pro-inflammatory cytokine production	Unknown
TGF- β	TGF- β	Macrophages, T-cells	Proliferation, apoptosis, differentiation, migration, inhibition of pro-inflammatory cytokine production	Unclear

Tableau 5: Rôle des principales cytokines pro et anti-inflammatoires dans le sepsis (CHAUDHRY et al., 2015).

c. Effecteurs cellulaires

Les multiples médiateurs immuno-modulateurs ainsi que les diverses populations cellulaires de l'immunité innée activée en réponse à une agression initiale concourent au développement des dysfonctions d'organes au cours du sepsis. Leurs interactions et capacités à répondre à l'agression sont cruciales lors du choc septique et modulent également les processus plus tardifs qui mènent aux infections secondaires au sepsis.

Les cellules Natural Killer (NK)

Les cellules Natural Killer (NK) sont des lymphocytes de l'immunité innée et représentent seulement 4 à 15% des lymphocytes du sang. Elles participent aux réponses contre différents types d'infections de par leurs activités cytotoxiques directes mais aussi grâce à leurs productions de cytokines tel que l'IFN γ . Ces cellules sont aussi connues pour être engagées dans des interactions avec d'autres cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les monocytes / macrophages et les neutrophiles. Les NK sont majoritairement retrouvés dans les tissus et leur faible nombre dans le sang limite donc leur étude lors du sepsis chez l'Homme. C'est pour cela que la plupart des connaissances actuelles sur leurs rôles durant le développement de la maladie proviennent de modèles murins. Ainsi, lors d'un sepsis polymicrobien induit par CLP chez la souris, les NK amplifient les activités pro-inflammatoires des populations myéloïdes par la production IFN γ au niveau du péritoine. Les NK semblent participer la réponse hyper-inflammatoire et contribuent aux lésions tissulaires induites par cette inflammation (Etogo et al., 2008). Lors d'un choc septique provoqué par *Streptococcus pneumoniae* la déplétion des cellules NK augmente la survie des souris (Sherwood et al., 2004). Chez l'homme, la toxicité des NK peut être étudiée en mesurant le niveau circulant de granzyme A et B. Ainsi, une forte cytotoxicité corrèle avec une plus forte mortalité et l'augmentation des lésions organiques (Zeerleder et al., 2005). Lorsque la production IFN γ par les NK diminue chez les patients en sepsis prolongé, on observe souvent la réactivation du cytomégalovirus (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012). Cette diminution serait un des facteurs qui augmenterait l'incidence d'infections secondaires et participerait à la diminution de l'expression de l'HLA-DR sur les monocytes (Wesselkamper et al., 2008). Cependant, le nombre de NK retrouvé lors d'une infection septique pulmonaire n'a pas d'influence sur la lymphopénie, une des caractéristiques de la phase immunosuppressive (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2017).

Pour conclure, les cellules NK amplifieraient la réponse inflammatoire locale durant la phase précoce et leur dysfonctionnement global favoriserait les infections nosocomiales durant la phase tardive du sepsis. Même si la plupart des données convergent vers un rôle préjudiciable des cellules NK au cours de la septicémie, les données cliniques sont très hétérogènes et ne permettent pas des conclusions claires.

Les cellules dendritiques (DCs)

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigènes. Elles jouent donc un rôle important dans les réponses immunitaires en reliant le système immunitaire inné et adaptatif. Les DCs représentent seulement 0,2 à 0,5% des leucocytes sanguins. Elles sont majoritairement localisées au niveau des tissus. D'origine hématopoïétique (moelle osseuse), elles s'organisent en de nombreuses sous-populations qui se distinguent par leur morphologique, phénotypique (marqueurs membranaires), ontogénie et fonction. Les deux principales populations sont les DCs dites « classiques » et les DCs « non classiques ». Les DCs classiques expriment les marqueurs de surfaces CD11b, CD8 et CD103 et peuvent se différencier en deux sous-populations : les CD11b⁺ et les CD11b⁻. Les DCs CD11b⁺ sont connues pour jouer un rôle clé dans la présentation antigénique avec les lymphocytes CD4⁺ via l'expression du CMH II (Wu et al., 2017). Les DCs « non classiques » se subdivisent en trois groupes : les DCs plasmacytoides (pDCs pour « plasmacytoid DCs »), les DCs dérivées des monocytes (mDCs pour « monocytes-derived DCs ») et les cellules de Langerhans (CLs) qui sont les cellules dendritiques de la peau. Leurs fonctions chez la souris sont représentées dans le **tableau 6**.

Subsets	Sites	Transcriptional factors	Phenotypic markers	TLR expressions	Functions
cDC	Lymphoid organ	Irf4, Rbpj, Batf3, Irf8	CD11b, CD11c, CD172a, CD103, CD8 α , XCR1, Clec9a	TLR1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9	Antigen presentation, induction of antitumor responses, induction of Th2 T cell responses, migration, antigen cross presentation
pDC	Most organs	Tcf-4	CD11c, B220, Ly6C, Siglec-H	TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Antigen presentation, type I IFN production, tumor killing
moDC	Most organs	Unknown	CD11b, F4/80, Ly6c, CD206, CD64, MHC II, Mac-3/CD107b, Fc ϵ RI, CD115/GM-CSFR	TLR2, 3, 4, 7, 9	Antigen presentation, induction of antitumor responses, migration, production of TNF and NO, tumor rejection
LC	Skin	PU.1, ID2, Irf4, Irf8	CD36, CD1a, CD1c, CD207, HLA-DR, CD86	TLR1,3,6,7	Antigen presentation, radioresistance, adaptive immunity

cDC: classical DC; Irf4: interferon regulatory factor 4; Rbpj: recombination signal binding protein-J; Batf3: basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3; IFN: interferon; Irf8: IFN regulatory factor 8; CD: cluster of differentiation; XCR1: X-C motif chemokine receptor 1; Clec9a: C-type lectin domain family 9, member A; TLR: Toll-like receptor; Th2: T helper type 2; pDC: plasmacytoid DC; Tcf-4: transcription factor 4; Siglec-H: sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-h; moDC: monocyte-derived DC; MHC II: major histocompatibility complex class II; Fc ϵ RI: high-affinity immunoglobulin E receptor; GM-CSFR: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor; TNF: tumor necrosis factor; NO: nitric oxide; LC: Langerhans cell; ID2: inhibitor of DNA binding 2; HLA-DR: human leukocyte antigen DR.

Tableau 6: Rôle des principales cytokines pro et anti-inflammatoires dans le sepsis (Wu et al., 2017)

Au cours du sepsis précoce (choc septique et sepsis sévère), le nombre de DCs est fortement diminué principalement dû à leur forte apoptose ce qui corrèle avec la sévérité de la maladie (Guisset et al., 2007; Grimaldi et al., 2011; Fan et al., 2015). Après une stimulation microbienne, les DCs vont maturer et exprimer des molécules de surfaces telles que le CMH, CD40, CD80 et CD86. Les études menées chez l'Homme ont montré une diminution de l'expression de l'HLA de type DR par les DCs du sang périphérique. Cela s'accompagne d'une réduction du pourcentage de cellules CD83+ (marqueur de maturation) et CD86+ (marqueur de co-stimulation) au cours du sepsis sévère (Poehlmann et al., 2009). Chez la souris, les données sont plus hétérogènes. Les niveaux d'expression des CD40, CD86 et CMH II sont augmentés entre 15h et 36h après le début de la maladie mais ils varient en fonction du temps et de l'organe étudié (Flohé et al., 2006); Efron et al., 2004). La variation de l'expression ou la faible expression de ces molécules sur les DCs sont vues comme un indicateur du dysfonctionnement de ces cellules. Un grand nombre d'études ont rapporté que les DCs des patients septiques présentent une sécrétion de cytokines aberrantes. Ainsi, on observe une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β et IL-12) alors que les anti-inflammatoires (TGF- β et IL-10) sont augmentés (Flohé et al., 2006) Poehlmann et al., 2009; Benjamim, 2005). La capacité des DCs à stimuler les cellules T a également été étudiée. Ainsi, les DCs chargés en antigènes dirigent les lymphocytes T vers une réponse humorale (dite Th2) au cours du sepsis sévère (Wen et al., 2008; Pastille et al., 2011). Cette polarisation traduit un défaut d'engagement des lymphocytes T vers une immunité à médiation cellulaire (dite Th1) attendue pour lutter contre une infection. De plus, la co-culture de DCs dérivées des monocytes de patients septiques avec des cellules T naïves montre une augmentation du pourcentage d'expression du Foxp3 et un défaut de prolifération des cellules T (Faivre et al., 2012). Les cellules dendritiques participeraient donc à l'induction de l'état anergique des cellules T et à l'augmentation des Lymphocytes T régulateurs (Treg) au cours du sepsis. Chez la souris, 7 jours après un sepsis polymicrobien on observe un repeuplement des DCs du poumon. Ces cellules nouvellement présentes seraient à la base de cet état anergique d'après Benjamim et al (Benjamim, 2005) et corrobore avec l'étude de Faive et al. Il se peut que ce repeuplement soit donc dû à la différenciation des monocytes en DCs appelé mCD. Cependant, une étude a montré que les patients développant une infection secondaire au sepsis (favorisé par un état immunosuppresseur) ne montraient pas d'augmentation du

nombre de mDCs (Grimaldi et al., 2011).

Malgré quelques données contradictoires ou non concordantes, le dysfonctionnement des DCs (production de cytokines anti-inflammatoires, diminution de l'expression du HLA-DR) présentent quelques jours après le début de la maladie ainsi que leur capacité à orienter la réponse immune adaptative (orientation réponse T vers Th2 et augmentation des Treg) leur donnent un rôle important dans le basculement de la maladie vers l'état immunosuppresseif (**Figure 12**). Ainsi, le blocage des biomarqueurs et/ou des voies de signalisation des cellules dendritiques pourraient être des cibles thérapeutiques afin de réduire la mortalité liée au sepsis.

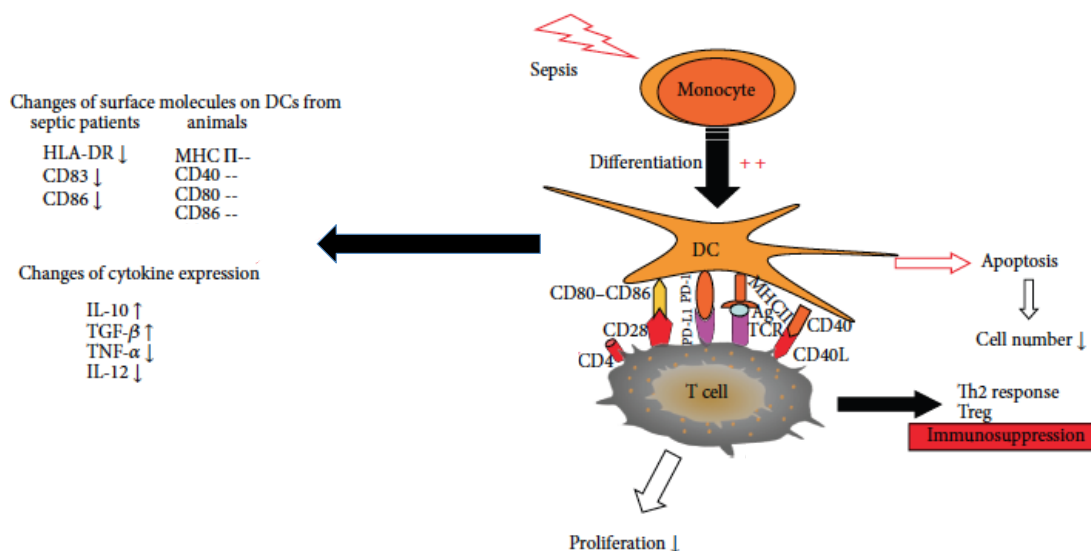


Figure 12: Effet du sepsis sur les fonctions des cellules dendritiques. D'après (Fan et al., 2015).

Les Neutrophiles

Les Neutrophiles ou granulocytes neutrophiles ou encore polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) sont des leucocytes issus de la maturation des myéloblastes. Chez l'Humain les PMN sont identifiés grâce à l'expression du marqueur de surface CD66b et chez la souris par l'expression du Ly6G. Leur noyau est formé de plusieurs lobes réunis par de fins étranglements, on parle de noyau plurilobé. Le cytoplasme contient de nombreux granules composés de plus de 700 protéines. Les PMN issus de la moelle osseuse se divisent en trois compartiments : Les cellules souches composées de cellules

souches hématopoïétiques et de progéniteurs pluripotents, le pool « mitotique » contenant les cellules en cours de différenciation (myéloblastes, promyélocytes, myélocytes) et le pool « post-mitotique » dont les métamyélocytes, les cellules en « band » et les neutrophiles matures. **Figure 13a.**

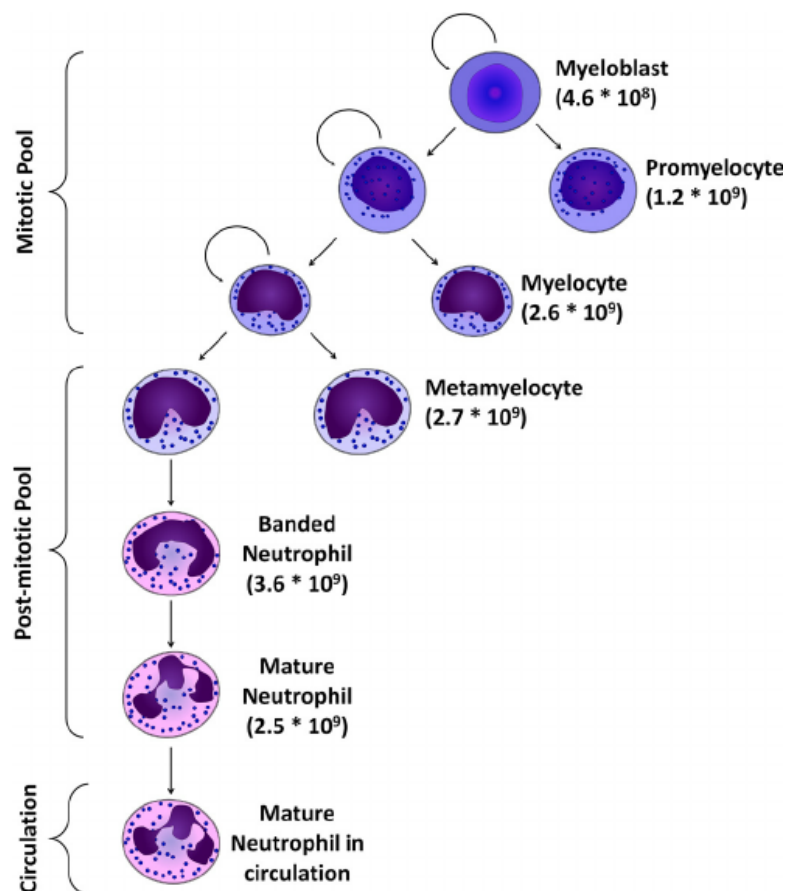


Figure 13a: Production de la lignée des neutrophiles dans la moelle osseuse. D'après (Tak et al., 2013)

Une fois arrivés à maturation les PMN sont relargués de la moelle osseuse vers le sang où ils représentent environ 65% des leucocytes chez l'Homme. Ceux-ci sortent rapidement de la moelle osseuse lors d'une réponse immunitaire et migrent du sang vers les foyers infectieux ou inflammatoires par chimiotactisme. La stimulation du CXCR4 par son ligand principal, le CXCL12, induit la rétention et le « homing » des PMN dans la moelle (Murphy et al., 2000). Le CXCL12 est exprimé de manière constitutive par les cellules stromales de la moelle osseuse (Shirozu et al., 1995) fournissant un signal clé pour les PMN. Par opposition, les chimiokines CXCL1 et CXCL2 entraînent leur libération

dans le sang via le récepteur CXCR2 (Chistiakov et al., 2018). La chimiokine CXCL8 a elle aussi une grande importance puisqu'elle intervient dans l'accumulation et l'activation des PMN sur le site infectieux ou inflammatoire. Ces fonctions sont médiées par la liaison à deux récepteurs de surface, le CXCR1 et le CXCR2 (Murphy et al., 2000).

En condition physiologique, les PMN circulants sondent les parois endothéliales des vaisseaux sanguins à la recherche de signes d'agression grâce à des mécanismes d'adhésion. Les cellules endothéliales activées présentent des sélectines permettant leur l'adhésion. Ceux-ci roulent (rolling) le long de l'endothélium en direction du gradient chimiotactique, puis une adhésion plus ferme à l'endothélium va permettre leur extravasation. Une fois dans les tissus les PMN commencent leurs actions antimicrobiennes suivant quatre phénomènes ; la phagocytose, l'explosion oxydative (production d'anion superoxyde), la dégranulation (enzymes lytique) et le relargage de substances intracellulaires (ADN, histones) formant des « Neutrophils extracellular traps » (NETs) (Nathan et al., 2006; Bardoel et al., 2014).

- **La phagocytose** : elle consiste en l'internalisation des micro-organismes ou de particules. Ce mécanisme est déclenché via la reconnaissance des PAMPs par les PRRs exprimés à la surface des PMN, par la liaison d'IgG par les FcR ou encore via le système du complément. Une fois internalisés, les pathogènes sont détruits par les ROS issus de la NADPH oxydase et par les protéines antimicrobiennes contenues dans les granules qui fusionnent avec le phagosome (Kennedy and DeLeo, 2009).
- **L'explosion oxydative (ROS)** : Les PMN stimulés activent leur NADPH oxydase entraînant la libération de ROS. Les ROS oxydent les protéines exogènes et endogènes ce qui conduit à la destruction des pathogènes mais aussi à l'altération des tissus de l'hôte.
- **La dégranulation** : La libération de granules entraîne la formation d'un milieu extracellulaire toxique pour les pathogènes. Ces granules peuvent également être libérés dans le phagosome afin d'éliminer le pathogène internalisé lors de la phagocytose. On distingue les granulations azurophiles (granules primaires), les spécifiques (granules secondaires) et

les granules contenant de la gélatinase (granules tertiaires).

- **Les NETs** : Les NETs sont des fibres de chromatines expulsées par les PMN permettant de limiter la dissémination des bactéries mais aussi de les détruire grâce à des molécules associées tel que les histones, la myéloperoxydase (MPO) et l'élastase (Brinkmann et al., 2004).

En condition infectieuse le recrutement et les mécanismes mis en place par des PMN sont vus essentiels à l'élimination des bactéries ou des champignons tel que *Staphylococcus aureus* ou encore *Candida albicans* (Robertson et al., 2008; Ermert et al., 2009). Les patients neutropéniques ont eux, une sensibilité accrue aux infections (Bouma et al., 2010; Patel and Gruber, 2015). La migration des PMN sur le site inflammatoire lors d'une infection semble donc avoir un rôle primordial. Cependant, l'activation excessive des PMN peut être à la base de nombreux troubles inflammatoires, et ainsi favoriser les épisodes d'asphyxie sévère de l'asthme, d'atteinte pulmonaire aiguë, de polyarthrite rhumatoïde et de choc septique (Jones et al., 2016). En effet, les PMN ne sont pas recrutés que sur le site infectieux. Ils s'accumulent aussi au niveau des organes vitaux tels que les poumons, les reins ou encore le cœur (Johnston et al., 1999; Souto et al., 2011). Cette invasion neutrophilique massive participe à la réponse hyper-inflammatoire de la phase précoce du sepsis. Les PMN sont alors séquestrés dans les capillaires ce qui va conduire à l'ischémie des tissus (van Eeden et al., 2000). De plus, la production des facteurs lytiques, et de cytokines pro-inflammatoires s'ajoute à l'inflammation systémique et conduit au dysfonctionnement multi-organique (Brown et al., 2006). Cependant, les études modulant le recrutement des PMN sont nombreuses et variées et mettent en évidence le rôle paradoxal des PMN notamment au cours du sepsis.

Au cours du sepsis, l'internalisation du récepteur au CXCL-8, le CXCR2, est associé à un défaut de migration des PMN sur le site infectieux (Paula-Neto et al., 2011; Rios-Santos et al., 2007). Ce défaut de recrutement entraîne un mauvais contrôle de l'infection et une faible survie chez l'homme et la souris (Sônego et al., 2014; Tavares-Murta et al., 2002). D'autres études ont mis en évidence une relation étroite entre la diminution de l'expression du CXCR2, la forte production de TNF α (Secher et al., 2009) et de NO (Rios-Santos et al., 2007) suite à l'activation des TLRs.

IL-17 est un médiateur puissant dans la régulation de l'inflammation en augmentant la production de chimiokines dans divers tissus pour recruter des monocytes (Shahrara et al., 2010) et des neutrophiles (Witowski et al., 2000) sur le site de l'inflammation. IL-17 et plus particulièrement IL-17A est produite par les cellules T (Yao et al., 1995) et peut entraîner des lésions tissulaires dans les maladies inflammatoires chroniques (Costa et al., 2010). Ainsi, au cours de l'infection par *M.tuberculosis*, le fort recrutement des neutrophiles peut à la fois exacerber la maladie comme avoir un effet protecteur. Le signal induisant ce recrutement a été montré comme dépendant de la production d'IL-17A par les cellules T à des temps tardifs dans la maladie. En effet, en réponse à IL-17A l'épithélium pulmonaire produit du CXCL1 et du CXCL5 ce qui entraîne le recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire (Lombard et al., 2016). Cependant, le rôle bénéfique ou non de l'IL-17 au cours de la tuberculose chez l'homme reste controversé. Cette controverse est également retrouvée dans l'étude du rôle de l'IL-17 au cours du sepsis. Plusieurs études suggèrent un rôle protecteur de l'IL-17 au cours du sepsis polymicrobien via le recrutement des PMN dans la cavité péritonéale, le contrôle de l'infection et la diminution de la réponse inflammatoire (Freitas et al., 2009). De plus, l'absence d'IL-17A (IL17A^{-/-}) entraînerait une augmentation de la mortalité des souris (Ogiku et al., 2012). A contrario, le rôle délétère de la production d'IL-17A par les cellules T $\gamma\delta$ a été mis en évidence chez la souris. Les auteurs montrent que IL-17A induit un niveau élevé de médiateurs pro-inflammatoires associés à une forte bactériémie et à l'infiltration des PMN dans le péritoine, entraînant une létalité accrue des souris au sepsis (Flierl et al., 2008; Li et al., 2012).

Certaines études montrent que le recrutement de ces PMN serait également sous le contrôle de l'axe chimiokinique CCL2/CCR2. Ainsi, chez l'Homme, le niveau d'expression du CCR2 sur les PMN est associé à la sévérité du sepsis. Chez la souris, selon Souto et al, l'absence du récepteur CCR2 améliore la survie en réduisant l'infiltration excessive des PMN (Souto et al., 2011). Cette étude chez la souris est surprenante car l'absence du récepteur CCR2 est plutôt associé à une diminution de la clairance bactérienne comme vu dans le péritoine des souris septiques (Gomes et al., 2013). De plus, et de façon plus générale, l'absence de CCL2/CCR2 (par délétion génétique ou blocage chimique) est néfaste dans de nombreux modèles infectieux (*L. monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *T.gondii*) (Grainger et al., 2013; Robben et al., 2005). Il

est possible que le récepteur CCR2 soit impliqué dans leur recrutement mais certaines données semblent contradictoires.

Les mécanismes conduisant au recrutement des PMN dans les organes en condition inflammatoire ne sont pas clairs et le rôle bénéfique ou délétère de celui-ci est soumis à controverse. La compréhension des phénomènes aboutissant au recrutement des PMN est cruciale et pourrait permettre de mettre au point à terme de nouvelles thérapies ciblant les PMN aux cours des infections septiques.

Une autre caractéristique importante des PMN est la formation de NETs, un réseau de fibres de chromatines associé à des peptides antimicrobiens et des enzymes tels que la myéloperoxydase (etc.) qui immobilisent et tuent les envahisseurs. La production de NETs entraîne en général un contrôle bactérien bénéfique pour l'hôte. Cependant, la formation excessive de ce réseau lors du sepsis contribue à l'altération des cellules endothéliales, aux lésions tissulaires (Clark et al., 2007) et à la perturbation des mécanismes de la coagulation (Delabranche et al., 2017). La **figure 13** résume le rôle des PMN lors de leurs migrations sur le site infectieux au cours du sepsis sévère.

L'augmentation du nombre des PMN immatures circulants est bien connue dans la physiopathologie du sepsis et fait partie des anciens critères SIRS (Bone et al., 1992). Les PMN immatures sont caractérisés par la faible expression du CD16 (CD16^{dim}) chez l'Humain et du Ly6G (Ly6G^{int}) chez la souris. Leurs noyaux sont en forme de bande ou en fer à cheval et sont connus sous le nom de cellule de bande (« Band cell » en anglais). Leur fonctionnalité a été évaluée chez la souris et l'Humain pendant le sepsis sévère, le choc septique ou encore lors de la réponse à une endotoxine (LPS). Ainsi, la capacité phagocytaire des PMN immatures est plus faible que celle des cellules matures (Taneja et al., 2008). Cela pourrait être dû à la diminution d'expression du récepteur Fc-gamma (CD16) des granulocytes « juvéniles » (Marois et al., 2011) et donc participer au mauvais contrôle de l'infection. De plus, une plus forte résistance à l'apoptose (observée ex-vivo) de ces cellules allongerait leur durée de vie (Drifte et al., 2013). L'allongement de leur vie peut être vue comme bénéfique afin de réaliser leurs fonctions immunes mais elle va aussi participer au maintien de l'inflammation et donc aux lésions tissulaires.

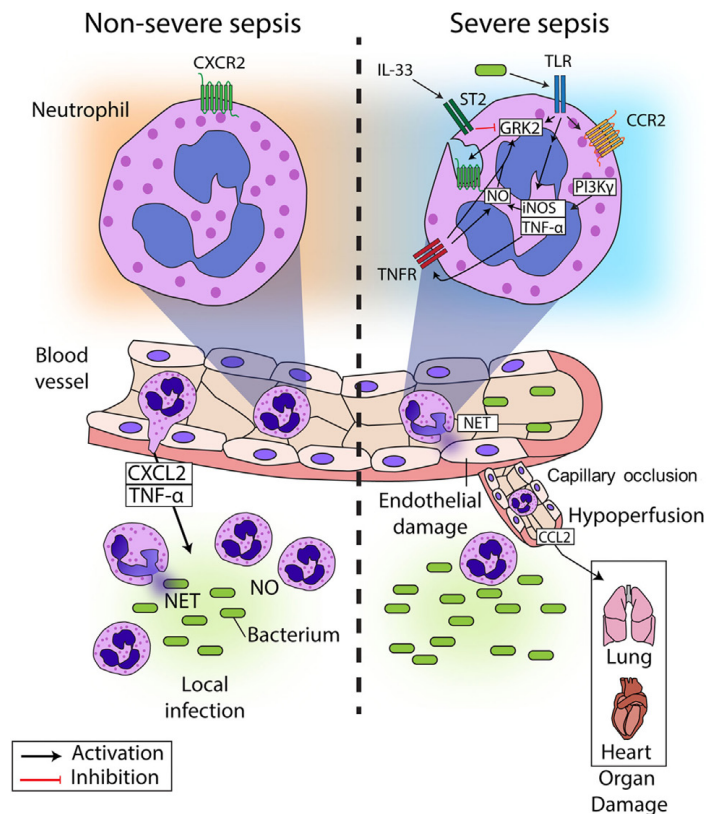


Figure 13b: Rôle des PMN lors de leurs migrations sur le site infectieux au cours du sepsis sévère. D'après (Sônego et al., 2016)

Drifte et al, montrent également une faible expression du récepteur CXCR2 sur les PMN immatures les mettant donc en cause dans le défaut de migration au niveau du site infectieux (abordé dans le paragraphe ci-dessus). Ainsi, la proportion de neutrophiles matures/immatures pourrait avoir un impact sur le contrôle de l'infection. Plusieurs équipes ont essayé d'augmenter le recrutement des PMN matures en utilisant des facteurs de croissance tel que le G-CSF ou le GM-CSF (Bo et al., 2011). Ces études n'ont montré aucun avantage sur la mortalité des patients. Il est possible que la non-spécificité de ces traitements envers les neutrophiles soit la cause de leur manque d'efficacité.

Les PMN représentent une source importante de production de médiateurs pro-inflammatoires telle que la myéloperoxydase (MPO) et des protéases (Hoesel et al., 2005). Cependant, des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β sont également produites par les PMN contribuant alors à la régulation immunitaire. Ainsi, l'augmentation du ratio pro-/anti-inflammatoire des cytokines produites favoriserait le basculement vers une réponse inflammatoire suppressive, correspondant à la phase

tardive du sepsis (Fang et al., 2015). Quelques études ont mis en évidence que l'altération des fonctions neutrophiliques (vue ci-dessus) pendant le sepsis favoriserait la survenue d'infections nosocomiales. Une forte concentration d'IL-10 plasmatique ainsi que la faible destruction intracellulaire des bactéries *S.aureus* par les PMN sont observées chez des patients en réanimation atteints d'une infection par rapport à des patients qui n'ont pas acquis d'infection (Stephan et al., 2002). Chez la souris, 4 jours après le déclenchement d'un sepsis polymicrobien, le faible nombre de PMN retrouvés dans la moelle osseuse et les lavages broncho-alvéolaires (BAL) corrèle avec une sensibilité accrue à une infection secondaire pulmonaire par *P. aeruginosa* (Delano et al., 2011). De plus, les PMN des souris septiques et des patients sont capables de déclencher l'apoptose des lymphocytes grâce à l'expression du ligand de mort cellulaire programmée 1 (PDL1) (Wang et al., 2015a). Cette étude montre également que le niveau d'expression du PDL1 par les PMN corrèle positivement avec la sévérité de la maladie. De la même façon que les cellules cancéreuses, les PMN seraient capables d'induire des mécanismes inhibiteurs envers le système adaptatif et ainsi favoriser les processus immunosuppresseurs pendant le sepsis. Il n'existe à ce jour que très peu d'études montrant le rôle de l'expression du PDL1 par les neutrophiles durant le sepsis. J'aborderai de façon plus exhaustive le rôle de l'expression de ce ligand sur les cellules myéloïdes et plus particulièrement sur les monocytes dans le Chapitre 2 – II.

Les études portant sur le rôle des PMN au cours du sepsis montrent une fonction altérée de ces cellules probablement due à la forte mobilisation de cellules immatures. Ainsi, leur migration, leur fonction antimicrobienne et la sécrétion des médiateurs de l'inflammation sont altérées et ne permettent pas le contrôle de l'infection. Ces phénomènes participent également au maintien de l'inflammation et donc aux lésions tissulaires acquises lors de la phase précoce. La forte dysfonction des PMN est également associée au basculement du système immunitaire vers un état pro-inflammatoire. Cet état va conduire à une immunosuppression/immunoparalysie de système immunitaire favorisant l'acquisition d'infection secondaire de type nosocomiale chez les patients septiques.

Les Cellules « MDSC »

Les MDSC (Myeloid derived suppressor cell) se composent de cellules progénitrices myéloïdes et de cellules myéloïdes immatures (IMs). Chez la souris les MDSC se caractérisent par la co-expression du marqueur Gr1 (Ly6C et Ly6G) et du CD11b. Chez l'humain elles se définissent comme CD14-CD11b⁺ ou de manière plus étroite comme des cellules exprimant le CD33 et dépourvues de l'expression des marqueurs des cellules myéloïdes et lymphoïdes matures tel que le HLA-DR. L'analyse morphologique montre que ces cellules sont composées d'un mélange de cellules myéloïdes de morphologie polynucléaire et mononucléaire (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Chez les individus sains les cellules immatures myéloïdes sont principalement localisées au niveau de la moelle osseuse et mûrissent au moment de leur sortie. En condition pathologique comme le cancer (Almand et al., 2001; Diaz-Montero et al., 2009) ou encore au cours des maladies infectieuses (*M.tuberculosis*, *L.monocytogenes*, *C.albicans* etc...) la différenciation des IMs en cellules matures est partiellement bloquée conduisant l'expansion de cette population (Mencacci et al., 2002; Sunderkötter et al., 2004). Les MDSC sont décrites pour avoir une activité suppressive sur la fonction des cellules T (CD4⁺ et CD8⁺), et induire l'expansion des lymphocytes T régulateurs contribuant à la régulation négative des réponses immunitaires.

De récentes études ont mis en évidence deux populations différentes de MDSC : les MDSC de type granulocytaire (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}) et ceux de type monocytaire (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high}) (Youn et al., 2008). Les capacités de ces deux types cellulaires à inhiber l'activité des cellules T sont également différentes. Les MDSC monocytaires produisent du NO et inhibent fortement la prolifération des lymphocytes T alors que les MDSC granulocytaires produisent de faibles niveaux de NO et n'ont pas d'action sur la prolifération des cellules T en condition infectieuse (Dietlin et al., 2007). Au cours du sepsis Delano et *al.* mettent en évidence que les cellules MDSC (Gr1⁺CD11b⁺) participent à la polarisation des cellules T en Th2 et à l'aggravation de la maladie (Delano et al., 2007). Cependant, plusieurs études ont montré que l'expansion des MDSC activées au cours du sepsis peut être protectrice (Noel et al., 2010; Sander et al., 2010). Leurs fonctions ne sont pas encore clairement établies au cours du sepsis, cela est probablement dû à l'hétérogénéité de cette population.

La distinction entre les populations myéloïdes matures tels que les monocytes et neutrophiles activés et les MDSC apparaît parfois compliquée et reste sujette à

confusion. Les cellules myéloïdes matures pourraient acquérir des fonctions inhibitrices ou perdre leurs états d'activations leur donnant une activité « suppressive » ou « non activatrice » du système immunitaire. De plus, il semble clair que les deux populations composant les MDSC (granulocytaires et monocytaires) n'ont pas la même fonction au cours de l'inflammation. Ainsi, la distinction systématique des deux populations ainsi qu'une évaluation de l'état d'immaturité paraissent importantes afin d'étudier les MDSC de façon plus pertinente au cours de la maladie.

La majorité de mon travail de thèse a consisté à étudier les populations monocytaires dans la physiopathologie du sepsis. Le chapitre 2 sera donc consacré aux rôles des monocytes dans la maladie.

2. Activation du système immunitaire adaptatif

La réaction inflammatoire initiale oriente le système immunitaire adaptatif vers une défense humorale ou cellulaire. Ce choix est dicté par les cellules de l'immunité innée à travers la détection de micro-organisme et la présentation d'antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et des molécules de co-stimulation. La réponse adaptative est ainsi mise en place plus tardivement que la réponse innée. Globalement, les lymphocytes T CD4⁺ (T auxiliaires) et CD8⁺ (T cytotoxiques) jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'activité phagocytaire antimicrobienne et cytotoxique des cellules de l'immunité innée. Les cellules B produisent des cytokines, présentent des antigènes aux lymphocytes T et se différencient en cellules productrices d'anticorps permettant d'augmenter l'opsonisation des bactéries et favoriser la phagocytose. Les réponses immunitaires innées et adaptatives agissent en interaction étroite dans la protection contre les agents pathogènes. Cette partie décrira les principaux acteurs cellulaires du système adaptatif mis en jeu lors de la septicémie.

Les lymphocytes CD4⁺ et les sous-populations Th

Très schématiquement, la réponse immunitaire adaptative se fait en plusieurs étapes. Les lymphocytes T CD4 sont activés via les récepteurs des cellules T (TCR) par des fragments antigéniques présentés par le CMH II exprimé par les CPAs. Une fois

activées, les cellules T CD4+ peuvent se différencier en plusieurs sous-populations : Th1, Th2, Th17, Th22, Th9, Tfh (Cellules T folliculaires) ou encore en Treg (T régulateurs) qui permettent différentes réponses immunitaires par leurs activations et productions spécifiques de cytokines (Gutcher and Becher, 2007) (**Figure 14**).

De nombreuses études ont montré un défaut du nombre de T CD4+ circulant au cours du développement du sepsis (Cabrera-Perez et al., 2014), une diminution qui est associée à une apoptose de ces cellules (Boomer et al., 2011). Ce phénomène d'apoptose est également retrouvé dans l'analyse post mortem de tissus tels que la rate et le colon et est accompagné d'une augmentation de l'activité de la caspase-3 chez des patients décédés du sepsis (Yuan et al., 2013).

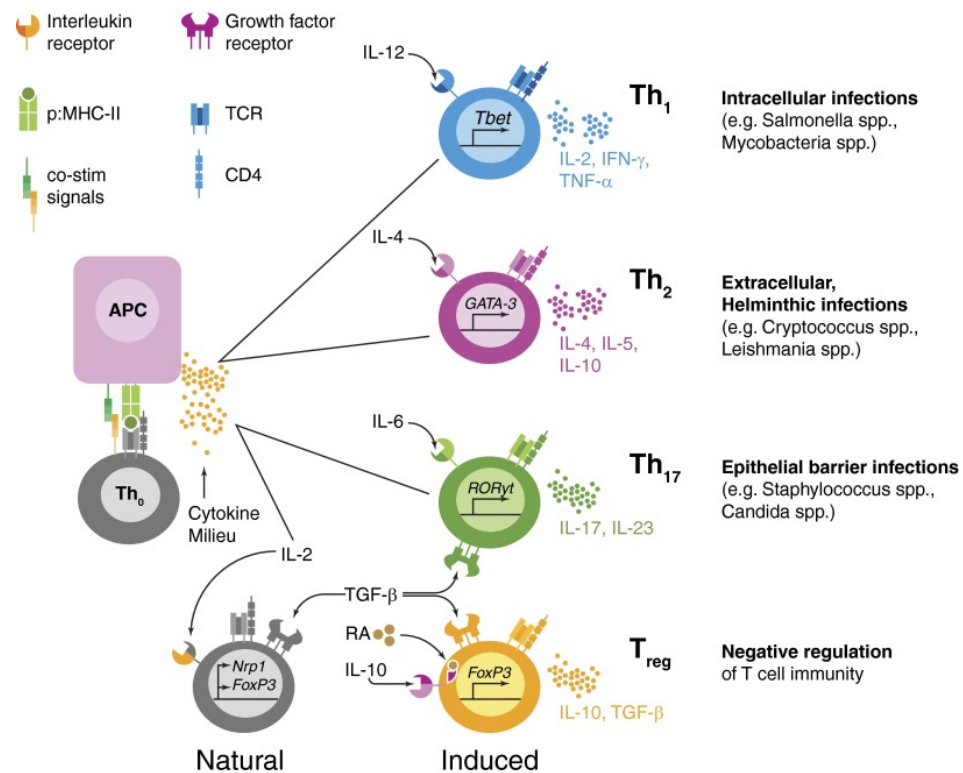


Figure 14: Réponses induites par la polarisation des cellules T CD4+ (Th0) après activation par les CPAs. D'après (Cabrera-Perez et al., 2014)

Parmi les CD4+ qui persistent, de nombreux facteurs (méthylation des histones, remodelage de la chromatine) qui régulent la différenciation des sous-populations lymphocytaires montrent une suppression des fonctions Th1 et Th2 (Cabrera-Perez et

al., 2014). La production de cytokines durant la phase précoce du sepsis peut avoir un effet sur la prédominance des populations Th. Ainsi, durant le sepsis sévère la polarisation de l'activité lymphocytaire serait plus orientée vers le type Th2 (Iwasaka and Noguchi, 2004). Les Th2 sont connues pour sécréter de IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 qui favorisent l'immunité humorale et peuvent mener à l'immunosuppression. Même si les réponses Th1 et Th2 sont globalement diminuées, l'équilibre Th1/Th2 est importante dans l'évolution de la maladie vers un statut immunosuppresseur ou immuno-incompétent du système immunitaire. Les autres sous populations Th peuvent également jouer un rôle important dans la physiopathologie du sepsis. Par exemple, un traitement par IL-17 augmente la réponse de type Th17 et ainsi réduire la mortalité liée à des infections secondaires chez des souris septiques (Thomson et al., 2017).

Chez l'Homme et dans des modèles animaux, la perte des lymphocytes T par apoptose ainsi que le dérèglement de leur polarisation sont des facteurs physiopathologiques critiques de l'immunosuppression et de la mortalité subséquente au sepsis. Ainsi, le dysfonctionnement des cellules T mis en évidence ici peut être assimilé à une anergie ou au phénomène de « T cell exhaustion ». Cet épuisement correspond à un état non fonctionnel des lymphocytes qui survient au cours d'infections chroniques mais également durant le cancer. Il empêche le contrôle optimal de l'infection et des tumeurs (Wherry, 2011) mais il peut servir de mécanisme de protection contre les lésions tissulaires lors d'une infection chronique (Cornberg et al., 2013). Les principaux facteurs impliqués dans ce mécanisme sont les suivants : 1- l'engagement prolongé du TCR, 2- l'engagement des signaux costimulateurs (CD80, CD86...) et/ou inhibiteurs (PD1, CTLA-4...), 3- la production de facteurs solubles tels que les cytokines anti-inflammatoires (IFN γ et IL-10) (Wherry and Kurachi, 2015) (**Figure 15**).

Au cours du sepsis sévère l'expression de la molécule de surface inhibitrice PD1 (Programmed cell death 1) et son ligand PDL1 (Programmed death Ligand 1) est augmenté sur les lymphocytes CD4⁺ par rapport aux CD4⁺ de donneurs sains ou de patients souffrant d'un trauma. Cette surexpression est associée à une diminution de la capacité proliférative des lymphocytes, une forte concentration d'IL-10 circulant et à l'augmentation de la fréquence des infections nosocomiales secondaires (Guignant et al., 2011).

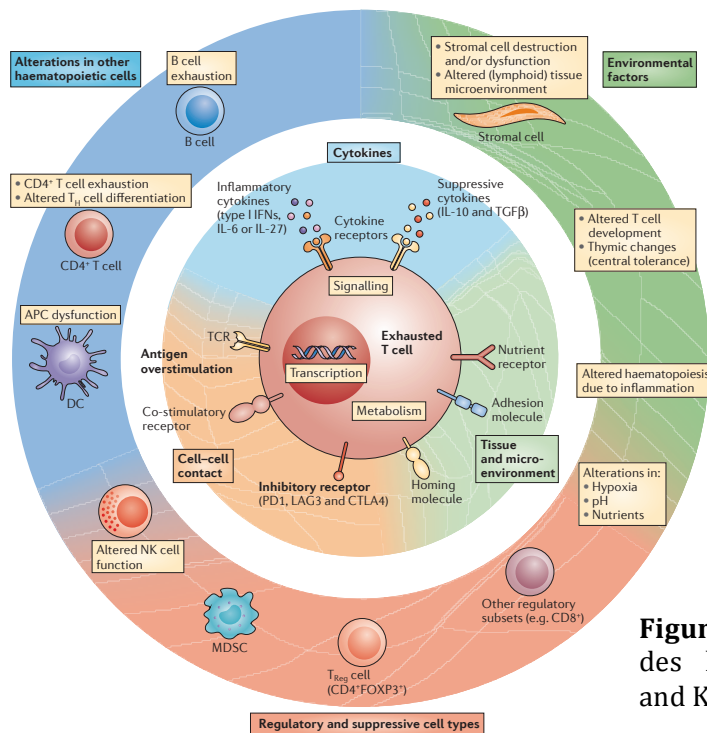


Figure 15: Mécanisme d'épuisement des lymphocytes. D'après (Wherry and Kurachi, 2015)

Une étude comparant la fonctionnalité des lymphocytes chez l'Homme et la souris montre une élévation prolongée de la sécrétion d'IL-6 dans le sérum concomitant à une altération de l'activation des CD4+ via une forte expression des protéines de surface PD-1 et CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4). L'expression des marqueurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4 caractérisent l'épuisement des lymphocytes T et sont associés à une plus forte mortalité chez la souris et chez l'homme. De plus, les patients ainsi que les souris âgés montrent un état d'épuisement lymphocytaire plus fort que les patients adultes ou les souris jeunes (Inoue et al., 2014). Il a également été montré dans de nombreuses études précliniques que les cellules myéloïdes (monocytes, macrophages, PMN et DC) exprimaient PDL1 et PDL2 au cours d'infections participant ainsi au phénotype de tolérance et à l'épuisement des lymphocytes (Zhang et al., 2010; Huang et al., 2014; McNab et al., 2011). Les lymphocytes CD8+ subissent également les effets de ce phénomène (Rodig et al., 2003).

Pour conclure, le sepsis se caractérise par une lymphopénie prédominante sur les lymphocytes CD4+. Les lymphocytes sont décrits comme étant dans un état anergique ou encore d'épuisement ne permettant pas une réponse immunitaire appropriée. De plus, leur dysfonctionnement participe à l'induction de l'état immunosuppresseur

favorisant les infections secondaires au sepsis. Cependant, l'étude du rôle des cellules T et B grâce à l'utilisation de souris déficientes des gènes activant la recombinaison ($Rag^{-/-}$) montre une survie identique aux souris WT après un sepsis polymicrobien. Les auteurs mettent en avant des mécanismes compensatoires capables de contre balancer les propriétés dites favorables ou défavorables des lymphocytes pendant le sepsis (Bosmann et al., 2011).

Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) $CD4+CD25+Foxp3+$ font parties des sous populations lymphocytaires $CD4+$. Ces cellules ont des propriétés suppressives importantes en inhibant l'activation et la prolifération des $CD4+$ et $CD8+$ et en participant au maintien de la tolérance immunitaire. Les Treg joueraient un rôle dans la pathogénèse du sepsis grâce à leurs fonctions suppressives envers la réponse immunitaire adaptative. Ainsi, certaines études ont montré une augmentation du pourcentage de Treg $CD4+CD25+$ circulant chez l'Homme (Monneret et al., 2003) comme chez la souris (Venet et al., 2004) corrélant avec un faible taux de survie. Il a été montré que l'augmentation de la proportion des Treg résulte en fait de la déplétion sélective des $CD4+CD25-$ et de la prolifération des $CD4+CD25+$ (Zou et al., 2014). La déplétion spécifique des Treg n'a pas montré d'effet sur la mortalité des souris septiques (Wisnoski et al., 2007; Hein et al., 2010). De plus, durant la phase tardive du sepsis et lors d'une infection secondaire pulmonaire par *P.aeruginosa* la déplétion des Treg n'aggrave pas la maladie en terme de mortalité et n'altère pas les niveaux de cytokines produites (Tatura et al., 2015). Ces résultats indiquent que les Treg n'auraient pas un rôle primordial dans la paralysie immunitaire au cours du sepsis tardif.

Les études restent là encore contradictoires. Le taux élevé des lymphocytes T régulateurs semble être dû à l'appauvrissement en $CD4+$ ce qui pourrait orienter le système immunitaire vers un profil immunosuppresseur. Cependant, une simple corrélation entre la proportion de ces cellules et l'augmentation de la mortalité ne suffit pas à établir le rôle réel des Treg au cours du sepsis. Certaines études chez la souris ont même montré l'inverse (Wisnoski et al., 2007; Hein et al., 2010). Il est donc pour le moment difficile de conclure sur le rôle positif ou délétère de ces cellules au cours de la maladie.

Les lymphocytes T non conventionnels

La grande majorité des lymphocytes T circulants sont dit conventionnels (de type $\alpha\beta$) et divisés en deux sous-groupes : les lymphocytes CD4 et CD8. Cependant, d'autres populations lymphocytaires existent telles que les cellules T « non-conventionnelles » même si moins nombreuses et moins connues. On les retrouve dans le sang, les épithéliums et les organes tels que le foie et les tissus inflammatoires. Les principaux types cellulaires sont, les cellules T invariantes associées à la muqueuse (MAIT), les cellules T gamma delta ($T\gamma\delta$) et les cellules T « Natural Killer » (NKT). Ces cellules émergent du thymus, sécrètent des cytokines et sont capables de cytolyse. Elles diffèrent des lymphocytes T classiques par le réarrangement limité de leur TCR ne leur permettant que la reconnaissance d'antigènes conservés non peptidiques et par leurs fonctions effectrices très rapides après leur activation. La détection de l'antigène non peptidique confère à l'organisme la capacité de répondre à une multitude de molécules étrangères ou du soi (produites par des agents pathogènes ou libérées par les tissus stressés)(Ivanov et al., 2014; Liuzzi et al., 2016). Leurs caractéristiques les placent à mi chemin entre l'immunité innée et acquise, on parle alors de lymphocytes de type « inné ». Il est maintenant de plus en plus clair que leur action joue un rôle important dans la résistance à l'infection, à la fonction anti-tumorale et dans la régulation immunitaire.

- **Les cellules MAIT**

Chez l'Homme, cette population représente 1% à 10% des lymphocytes T circulants. Les cellules MAIT expriment un récepteur T (TCR) semi-invariant composé d'une chaîne- α invariante s'associant à un nombre restreint de chaînes β . Celui-ci reconnaît des intermédiaires du métabolisme de la vitamine B2 (riboflavin) produites par certaines bactéries et levures. La présentation de ces antigènes non peptidiques aux MAIT se fait par le MR1, une molécule monomorphique apparentée au CMH de classe I (Tilloy et al., 1999; Treiner et al., 2003). Chez l'homme comme chez la souris les cellules MAIT sont principalement retrouvées dans les muqueuses (intestins et poumons) et les tissus lymphoïdes mais en plus petit nombre chez la souris (Martin et al., 2009). L'activation des MAIT par le MR1 en réponse à une infection conduit à la production d'INF- γ , TNF- α et IL-17 contribuant ainsi à la réponse inflammatoire antimicrobienne (Ivanov et al., 2014; Liuzzi et al., 2016). Les fonctions des cellules MAIT sont encore mal connues. Cependant, leur rôle a été quelque peu décrit dans l'infection (bactérienne et

fongique) (Gold and Lewinsohn, 2013; Le Bourhis et al., 2010) et l'auto-immunité (sclérose en plaque et arthrite)(Chiba et al., 2012; Croxford et al., 2006). Par exemple, les souris déficientes pour MR1 montrent un mauvais contrôle de la charge bactérienne dès les premiers jours dans le poumon après infection avec *M.bovis* BCG (Chua et al., 2012). De plus, les cellules sont capables de reconnaître et de tuer les cellules infectées telles que les DCs ou encore les cellules épithéliales dans un modèle infectieux par *M. tuberculosis* (Gold et al., 2010). Ces données montrent le rôle protecteur précoce des cellules MAIT lors des infections et font d'elles un candidat idéal pour le contrôle des infections de type septique.

Très peu d'études ont été réalisées au cours du sepsis, ce qui est sans doute dû à la découverte récente de ces cellules. Leur rôle au cours du sepsis a pourtant été mis en évidence dans une étude clinique publiée en 2013 (Grimaldi et al., 2014). Cette étude a montré une forte association entre les infections bactériennes (patients en sepsis sévère ou choc septique) et la chute du nombre des cellules MAIT dans le sang par rapport aux patients contrôles et aux autres lymphocytes non-conventionnels (NKT et $\gamma\delta$). De plus, une corrélation entre le faible nombre de cellules MAIT de façon prolongée (entre 1 et 4 jours) et le risque d'infection secondaire au sepsis a été mise en évidence. D'autres études seront nécessaires afin de déterminer si la diminution du nombre des cellules MAIT est la cause ou la conséquence de l'infection secondaire. De plus, la diminution précoce des MAIT observée pourrait être due à un phénomène d'apoptose suivant le modèle des lymphocytes conventionnels dans la maladie ou être due à leur migration/accumulation dans les tissus inflammatoires comme décrit dans certains modèles infectieux et maladies intestinales (Le Bourhis et al., 2010; Serriari et al., 2014). La molécule MR1 étant exprimée par les APCs (DCs et monocytes/macrophages) il est fortement probable de ces cellules soient impliquées dans l'activation des cellules MAIT au cours du sepsis. De nombreuses investigations seront nécessaires afin de comprendre le rôle des cellules MAIT dans le sepsis car il existe très peu de données à ce sujet actuellement.

- **Les cellules NKT**

Les cellules NKT sont faiblement représentées dans le sang chez l'Homme (entre 0,01 et 0,5% des cellules T circulantes). Chez la souris, la proportion des NKT est plus importante. Les NKT se divisent en deux principaux groupes : les NKT invariantes de

type I (iNKT) et les NKT variantes de type II (vNKT)(Godfrey et al., 2004). Leur activation se fait grâce à une molécule apparentée au CMH de classe I, le CD1d. Celui-ci fixe les glycolipides et antigènes lipidiques afin de les présenter et d'activer les cellules. La différence majeure entre les cellules NKT de type I et II réside dans les composants de leurs récepteurs TCR et dans le type de ligand reconnu (Leung and Harris, 2010; Trottein and Paget, 2018). Les iNKT sont capables de produire rapidement de nombreuses chimiokines et cytokines après leur activation (Matsuda et al., 2008). Certains de ces médiateurs permettront d'activer d'autres effecteurs cellulaires de l'immunité innée (monocytes/macrophages et neutrophiles). Les NKT sont connues pour être impliquées dans divers types de réponses immunitaires dont l'infection, l'allergie, l'auto-immunité et l'immunité anticancéreuse (Chiba and Miyake, 2014). Tout comme les cellules MAIT, les NKT participent à la réponse immunitaire de l'hôte lors de nombreuses infections de type pulmonaire. Cependant, elles peuvent avoir un rôle dual avec un effet protecteur ou délétère en fonction des agents pathogènes (Trottein and Paget, 2018).

Les iNKT sont des cellules régulatrices innées, qui peuvent moduler la réponse immunitaire. Leur rôle au cours du sepsis polymicrobien a donc été étudié avec intérêt. La réponse iNKT peut être déclenchée dans le sepsis par la libération de cytokines ayant lieu rapidement après le début de la maladie, par la présentation de lipides exogènes (issus des membranes bactériennes dégradées) ou encore de lipides endogènes (issus des lésions tissulaires) médiés par le CD1d (Szabo et al., 2015). L'activation de ces cellules provoque une forte libération IFN- γ , ce qui est important pour éliminer l'infection mais qui peut avoir des conséquences délétères. En effet, il a été mis en évidence que l'absence des cellules iNKT provoquait une diminution de l'IFN- γ ce qui avait pour conséquence de protéger les souris du choc endotoxique induit pas LPS (Ogasawara et al., 1998) et augmentait la survie des souris après un sepsis polymicrobien (Hu et al., 2009). De plus, l'activation des iNKT par l'injection de α -GalCer rend les souris plus sensibles au choc endotoxique (Ito et al., 2006). Heffernan et al, ont émis l'hypothèse que le sepsis induit la mobilisation des iNKT du foie vers le sang et la cavité péritonéale lieu de l'infection. Une fois sur le site infectieux les iNKT diminuent la capacité des macrophages locaux à phagocyter les bactéries et donc à éliminer l'infection (Heffernan et al., 2013). En effet, dans divers états pathologiques infectieux et non-infectieux, les cellules iNKT interagissent avec les cellules myéloïdes phagocytaires

altérant leurs fonctions (Lee et al., 2010; Wintermeyer et al., 2009). Au cours du sepsis, la mobilisation des iNKT a été montrée comme dépendante de la molécule régulatrice PD-1 exprimée par ces cellules après leur activation. Ainsi, les souris PD1^{-/-} présentaient une augmentation du nombre de cellules iNKT dans le foie sans affecter les autres compartiments cellulaires montrant un contrôle probable du PD-1 sur la migration de ces cellules (Fallon et al., 2017; Heffernan et al., 2013). Cependant, aucune relation directe entre la migration des iNKT, la clairance bactérienne et PD-1 n'a été établie. L'étude de l'expression du PD-1 sur les cellules iNKT n'en reste pas moins intéressante et mérite plus d'investigation.

Les vNKT sont elles peu étudiées dans le sepsis. L'activation précoce de ces cellules par le ligand Sulfatide a montré une protection partielle des souris septiques à *S.aureus*. Cette protection a été montrée spécifiquement liée à la présence des vNKT (Kwiecinski et al., 2013).

De façon générale, les études mettent en évidence un rôle pathogène des cellules iNKT dans le sepsis précoce, plaçant l' INF- γ comme le médiateur majeur des dommages causés par ces cellules au cours de la maladie. Les vNKT sont montrées comme protectrices au cours de la phase aiguë du sepsis. Le rôle opposé des deux sous-types de NKT pourrait définir un nouvel axe immunorégulateur impliqué dans la physiopathologie du sepsis. De plus, le rôle des NKT lors de la phase tardive du sepsis semble ne pas avoir été exploré.

- **Les cellules T $\gamma\delta$**

Les cellules T non-conventionnelles $\gamma\delta$ possèdent un TCR composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ qui les distingue des autres cellules T (TCR $\alpha\beta$). Elles représentent 2% à 10% des lymphocytes T circulants chez l'Homme et sont principalement retrouvées dans les épithéliums des muqueuses digestives et respiratoires (Holtmeier and Kabelitz, 2005). Elles peuvent être activées grâce à la reconnaissance des motifs PAMP via leurs TLRs, par une stimulation cytokinique (IL1 β , IL-23, IL-12) ou bien encore par la présentation d'antigènes reconnus par leur TCR (incluant les antigènes non peptidiques et les ligands induits par le stress) (Zhao et al., 2018). Les cellules $\gamma\delta$ exercent une fonction protectrice dans l'élimination des agents pathogènes, la réparation des tissus en produisant des cytokines (IFN- γ , IL-17), des chimiokines et des enzymes lytiques (Dieli

et al., 2001; Qin et al., 2009; Vantourout and Hayday, 2013). Il existe diverses sous-populations de cellules T $\gamma\delta$ possédant des caractéristiques biologiques différentes et jouant ainsi des rôles différents dans diverses maladies infectieuses.

Quelques études ont mis en évidence une forte diminution de la proportion de cellules $\gamma\delta$ dans le sang des patients septiques (Matsushima et al., 2004; Venet et al., 2005). Andreu-Ballester et al, ont associé cette diminution (en particulier pour les T $\gamma\delta$ CD3+CD56+) à la sévérité de la maladie et à la mortalité des patients (Andreu-Ballester et al., 2013). De façon concordante, les souris déficientes en cellules T $\gamma\delta$ ($\gamma\delta^{-/-}$) montrent des lésions tissulaires plus importantes et une mortalité accrue au sepsis (Chung et al., 2006; Tschöp et al., 2008). De plus, ces phénomènes sont accompagnés d'une diminution du nombre de cellules myéloïdes et d'une augmentation de la charge bactérienne au niveau du site infectieux, montrant l'implication de ces cellules dans la modulation de la réponse immunitaire. Une étude récente montre que les cellules T $\gamma\delta$ septiques produisent plus de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , IL-17) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF β) que les cellules des patients sains. Cependant, les cellules T $\gamma\delta$ ont montré une faible capacité à produire de IFN- γ après stimulation *ex vivo* par rapport aux cellules non septiques (Liao et al., 2017). Ce phénomène montre un vrai changement phénotypique de ces cellules au cours de la maladie.

Globalement, la diminution du nombre des cellules T $\gamma\delta$ ainsi que leur changement phénotypique suggèrent l'importance de ces cellules dans la défense de l'organisme contre l'infection et participent au mauvais pronostic du sepsis.

Chapitre 2 : Les Monocytes

I Monocytes et sous-populations monocytaires

Les monocytes (Mo) sont des phagocytes mononucléés issus de la lignée myéloïde. Au cours de l'homéostasie et de l'inflammation, les Mo issus de précurseurs de la moelle osseuse passent dans la circulation sanguine et sont recrutés au niveau des tissus où ils peuvent se différencier en macrophages et cellules dendritiques (Hu et al., 2009). Le recrutement des Mo est essentiel pour le contrôle des infections (bactériennes, virales ou encore fongiques) et contribue également à la pathogénèse des maladies inflammatoires et dégénératives (Serbina et al., 2008). Les Mo sont hétérogènes, on distingue trois sous-ensembles fonctionnels chez l'Homme et deux sous-ensembles chez la souris qui se différencient par leur taille, leur phénotype (**Figure 16**), et leurs fonctions. Reconnus pour leur rôle dans l'inflammation et la lutte contre les pathogènes, ils font partie des principaux acteurs de la réponse immunitaire innée au cours du sepsis précoce (phase aiguë) et tardif (phase immunosuppressive/immuno-incompétente).

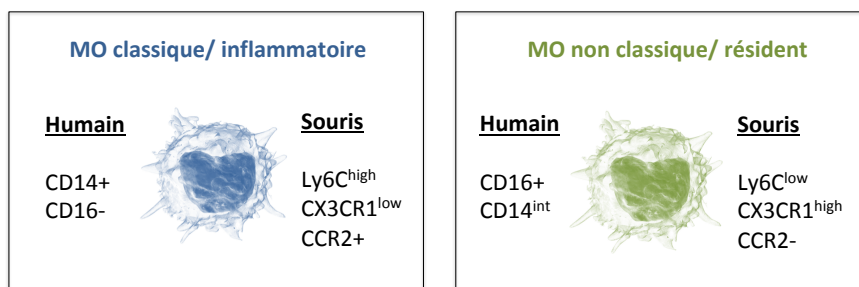


Figure 16: Phénotypes des sous-populations de monocytes chez l'homme et la souris.

1. Les monocytes humains

Les monocytes (Mo) humains représentent 5 à 10% des leucocytes circulants dans le sang. Il existe trois sous-groupes classés en fonction de l'expression des marqueurs CD14 (un composant du complexe récepteur reconnaissant le LPS) et CD16 (récepteur III de la fraction constante des d'immunoglobulines ou FcγRIII). On distingue les Mo dits classiques, non classiques et intermédiaires (**Figure 17**).

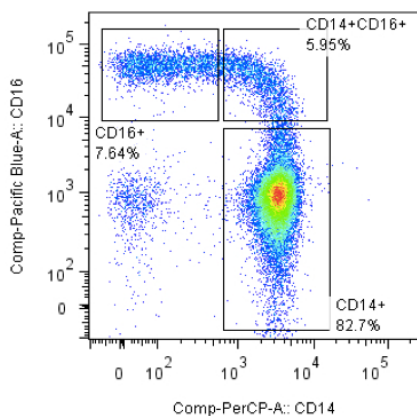


Figure 17: Sous-populations de monocytes chez l'Homme illustré par cytométrie en flux. D'après (Liu, 2011).

Monocytes classiques

Les Mo classiques sont plus nombreux puisqu'ils représentent 85% des Mo circulants. Ils se caractérisent par la forte expression du CD14 et une faible expression du CD16 (CD14⁺⁺CD16⁻). Ils expriment également d'autres marqueurs caractéristiques tels que certains récepteurs aux chimiokines (CX3CR1^{low}CCR2^{high}), mais aussi des L-selectines et intégrines tels que le CD62L et CD11b et le FcγRI (CD64). Les marqueurs de surfaces de ces cellules sont répertoriés dans le **Tableau 7**. Ils ont une forte capacité à développer une réponse cellulaire cytotoxique dépendante des anticorps (ADCC) mais ne produisent que de faibles quantités de cytokines pro-inflammatoires (Connor et al., 1990; Passlick et al., 1989). Ils sont connus pour être rapidement recrutés aux sites inflammatoires (Serbina and Pamer, 2006) et au niveau des lésions tissulaires (Zigmond et al., 2014).

Monocytes non classiques

Les Mo non classiques ne constituent que 10 % des Mo circulants et sont CD14⁺CD16⁺⁺. Cette sous-population montre une moindre activité phagocytaire mais une expression plus élevée d'HLA-DR faisant d'elles des bonnes présentatrices d'antigènes. A l'inverse des Mo classiques, les non classiques expriment un haut niveau du récepteur aux chimiokines CX3CR1 et un faible niveau de CCR2 (CX3CR1^{high} et CCR2^{low}). Les Mo non classiques CD16⁺ sont également mobilisés rapidement en condition inflammatoire aiguë comme lors du sepsis ou encore dans le cancer (Mukherjee et al., 2015; Saleh et al., 1995). Les marqueurs de surfaces de ces cellules sont répertoriés dans le **Tableau 7**.

	Murine Ly6C ⁺ monocytes	Murine CX3CR1 ⁺ monocytes	Human CD14 ⁺ monocytes	Human CD16 ⁺ monocytes
Monocyte markers				
CD11b	+	+	+	+
CD14	ND	ND	++	+/-
CD16 (FcγRIII)	ND	ND	-	+
CD115	+	+	ND	ND
F4/80	+	+	ND	ND
Gr-1 (Ly6C/Ly6G)	++	+/-	ND	ND
Ly6C	++	+/-	ND	ND
Ly6G	-	-	ND	ND
Chemokine receptors				
CCR1	ND	ND	+	-
CCR2	+	-	+	-
CCR4	ND	ND	+/-	-
CCR5	ND	ND	+/-	+/-
CCR7	ND	ND	+/-	-
CXCR1	ND	ND	+/-	-
CXCR2	ND	ND	+	-
CXCR4	ND	ND	+/-	+
CX3CR1	+/-	++	+/-	++
Other receptors and lineage markers				
7/4	+	-	ND	ND
CD4	ND	ND	+	+
CD11a	+	++	ND	ND
CD11c	-	+	+	+
CD31	+	+	+	+
CD32 (FcγRII)	ND	ND	+	++
CD33	ND	ND	++	+
CD43	-	+	++	+
CD49b	+	-	ND	ND
CD62L (L-selectin)	+	-	+	-
CD64 (FcγRI)	ND	ND	-	+
CD86	ND	ND	+	++
MHC class II	Inducible ^b	Inducible ^b	+	++
NK1.1	-	-	ND	ND
Scavenger receptor	ND	ND	+/-	+

Tableau 7: Marqueurs de surface des principaux monocytes circulants chez l'Homme et la souris. (-) indétectable, (+/-) marginal, (+) positif, (++) forte expression, par cytométrie en flux. D'après (Serbina et al., 2008).

Monocytes intermédiaires

Les Mo dits intermédiaires sont CD14⁺CD16⁺ et ne représentent que 5% des monocytes. Cette population initialement décrite comme un état intermédiaire des Mo classiques vers les non classiques (Palframan et al., 2001) montre des fonctions différentes des deux autres sous-populations (Zawada et al., 2011) et pourrait ainsi être une troisième sous-population. Ils expriment les Fc récepteurs CD64 et CD32 et possèdent une activité phagocytaire.

2. Les monocytes murins

Chez la souris, deux sous-populations ont été décrites. Elles représentent 2% des leucocytes circulants, une plus faible proportion par rapport à l'Homme. La classification des sous-populations monocytaires a été établie grâce à un modèle de souris pour lequel l'expression du gène CX3CR1 est révélée par la GFP (CX3CR1^{GFP/+}) (Jung et al., 2000). Ainsi, l'intensité de la GFP a permis de montrer une expression différentielle du CX3CR1 caractéristique de chaque sous-population (Palframan et al., 2001). En plus de l'expression du CX3CR1, Geissmann et al. décrivent pour la première fois des propriétés migratoires et des fonctions immunitaires différentes entre les deux sous-populations de Mo (Geissmann et al., 2003). L'expression du marqueur Ly6C et du récepteur au CCL2 (CCR2) caractérisent également les deux types de Mo. On distingue les monocytes Inflammatoires et les monocytes résidents (ou Mo patrouilleurs).

Monocytes inflammatoires

Les monocytes inflammatoires sont définis par l'expression forte du Ly6C, de CCR2 et une faible expression de CX3CR1 (Ly6C^{high} CCR2⁺ CX3CR1^{low}). Ils représentent 50% des Mo circulants et ont une courte durée de vie (demi-vie d'environ 20h). Le **Tableau 7** référence les différents marqueurs de surface de ces cellules. Comme les Mo classiques chez l'Homme, les Mo Ly6C^{high} sont rapidement recrutés sur les sites inflammatoires de façon CCR2 et CD62L dépendante. Suite à cette mobilisation, les Mo Ly6C^{high} exprimeraient le CD11c et le CMH II, migreraient vers les ganglions lymphatiques drainants où ils favoriseraient la prolifération des cellules T, suggérant une différenciation de ces Mo en cellules dendritiques (Geissmann et al., 2003). On a longtemps pensé qu'en condition inflammatoire, les Mo Ly6C^{high} quittent le sang et infiltrent les tissus pour se différencier en macrophages résidents ou cellules dendritiques (Serbina et al., 2003a; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Iijima et al., 2011). Cependant, l'étude de Jakubzick et al. montre que les Mo Ly6C^{high} extravasculaires auraient leurs propres fonctions de phagocytes mononuclées dans les tissus sans se différencier. Ainsi, la différenciation des Mo serait optionnelle et pas obligatoire (Jakubzick et al., 2013). On attribue également aux Mo Ly6C^{high} la faculté de pouvoir retourner dans la moelle osseuse pour se différencier en Mo résidents Ly6C^{low} (Tacke et al., 2006).

Monocytes résidents

Les monocytes résidents expriment faiblement le Ly6C et le CCR2 et fortement le CX3CR1 (Ly6C^{low} CCR2⁻ CX3CR1^{high}). Ils ont une durée de vie plus longue (entre 2 et 5 jours) et représentent 50% des Mo dans la circulation sanguine. Ils expriment fortement le facteur de transcription NR4a1 (facteur intervenant dans la différenciation monocytaire) (Hanna et al., 2011). Ces cellules montrent une forte expression du récepteur aux chimiokines CX3CR1 et de l'intégrine LFA-1 leur permettant de se déplacer le long de l'endothélium vasculaire. On dit qu'ils patrouillent le long des vaisseaux. Cette fonction participe donc à la surveillance et au nettoyage des vaisseaux (phagocytose des débris, cellules mortes, dépôts lipidiques...) (Carlin et al., 2013). Suite à des signaux de danger locaux, les Mo Ly6C^{low} facilitent le recrutement des PMN qui déclenchent une nécrose endothéliale, ensuite nettoyé par ces Mo (Auffray et al., 2007). Les Mo résidents sont également retrouvés dans les tissus périphériques en condition non inflammatoire. Comme les Ly6C^{high}, ils seraient capables de se différencier en DC *in vivo* et de participer à la reconstitution en macrophages tissulaires (Geissmann et al., 2003).

L'existence des Mo intermédiaires chez la souris n'est pas clairement établie. La population (Ly6C^{low}CCR2⁻CX3CR1^{high}) est plutôt perçue comme un stade transitoire dans la différenciation des Mo Ly6C^{high} en Ly6C^{low} (Tacke et al., 2006; Sunderkötter et al., 2004).

Comme vu ci-dessus, il existe des différences entre les Mo humain et murin. Chez l'Homme les Mo CD14⁺ sont majoritairement présents dans le sang alors que chez la souris les Ly6C^{high} et Ly6C^{low} sont retrouvés en proportion égale. Cependant, on peut identifier les Mo humain CD14⁺⁺ CD16⁻ (classique) et les CD14⁺CD16⁺⁺ (non classique) comme réciproquement proche des Mo inflammatoires et Mo résidents.

3. Développement des sous-populations monocytaires

Les Mo sont générés dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs granulocytaires/monocytaires (GMP) dérivés des progéniteurs myéloïdes communs (cMoP) provenant de la différenciation initiale des cellules souches hématopoïétiques

(HSC). Le développement des Mo dépend du facteur de croissance Csf-1 (aussi appelé M-CSF) et de son récepteur Csf-1R (CD115). Ainsi, les souris déficientes en Csf-1R ont un nombre très réduit de Mo circulants (Dai et al., 2002; Ryan et al., 2001). Les cMoP donnent naissance à des Mo immatures mais ne génèrent pas de DC ni de pDC (Hettinger et al., 2013). Les Mo immatures se multiplient tout en continuant leur différenciation. Lorsque la maturation cellulaire est suffisante, les Mo quittent la moelle osseuse et se retrouvent dans le sang. En condition inflammatoire chez la souris, les Mo peuvent également provenir de précurseurs de la rate. Le réservoir splénique compléterait dans certains cas la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse et permettrait un recrutement précoce de Mo au niveau du site inflammatoire (Shi and Pamer, 2011). S'il est maintenant clairement établi que dans la majorité des cas les Mo inflammatoires proviennent de précurseurs de la moelle osseuse, il existe différentes théories quand à l'origine des Mo résidents. Ainsi, ils pourraient être issus d'une lignée monocyttaire indépendante comme le propose Geissmann et al (Geissmann et al., 2003) ou encore n'être que issus de la différenciation des Ly6C^{high} en périphérie ou dans la moelle osseuse (Yona et al., 2013; Sunderkötter et al., 2004). Il n'est également pas improbable que les deux processus puissent avoir lieu en même temps ou de façon différentielle.

Nous avons vu que chez l'Homme comme chez la souris, les Mo sont constitués de plusieurs sous-populations fonctionnellement différentes. Ces cellules sont capables d'avoir leurs fonctions propres mais aussi de se différencier en DC et macrophages tissulaires suite à des signaux stimulateurs tels que les cytokines et/ou molécules microbiennes. La **Figure 18** résume l'origine et le déploiement des Mo dans les différents compartiments. Les Mo apparaissent comme ayant un rôle central dans l'inflammation et les maladies inflammatoires.

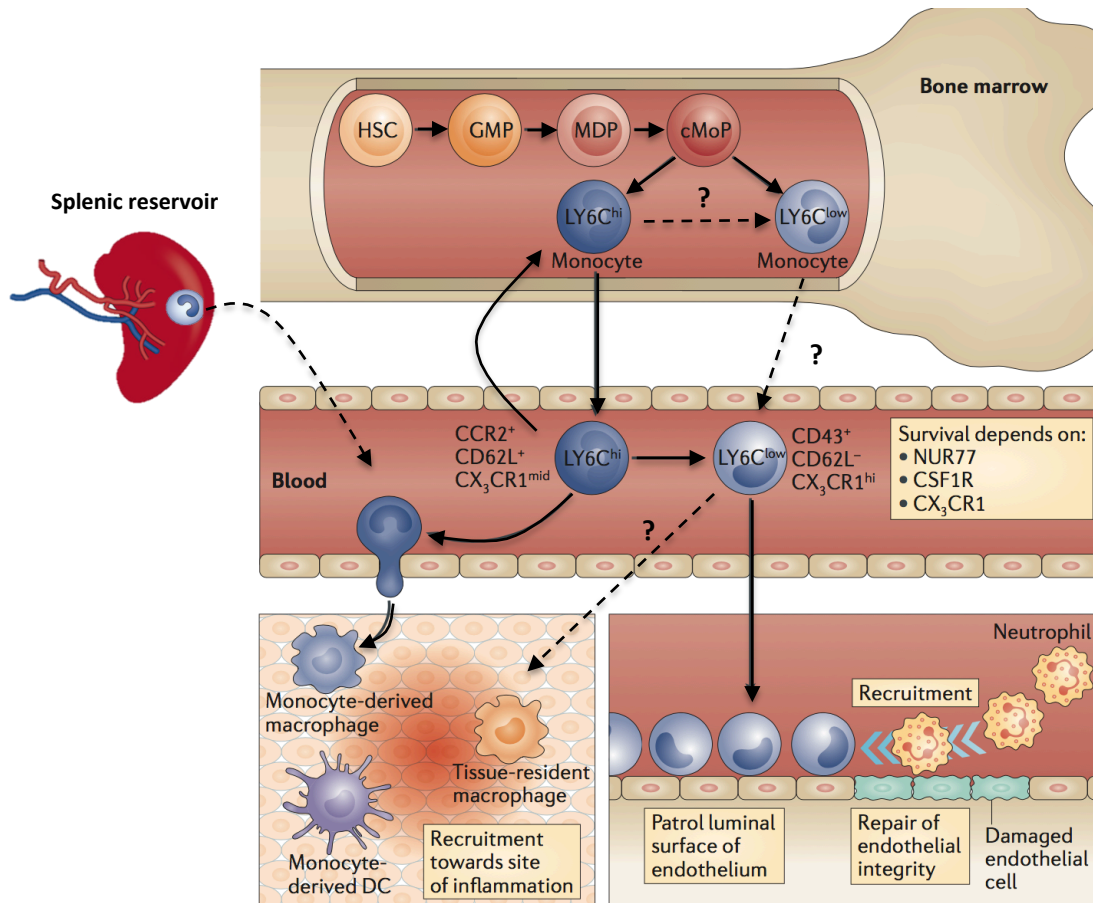


Figure 18 : Origine et déploiement monocytaires. Schéma modifié - d'après (Ginhoux et Jung ,2014) et (Shi et pamer ,2011). Les macrophages et précurseurs de cellules dendritiques (MDP) donnent naissance à des monocytes Ly6C^{high} dans la moelle osseuse qui peuvent servir d'intermédiaire pour la production de monocytes Ly6C^{low}. Les monocytes Ly6C^{high} sortent de la moelle osseuse de façon CCR2 dépendante et sont recrutés dans les tissus inflammatoires où ils vont pouvoir se différencier en macrophages ou cellules dendritiques dit dérivé des monocytes. Les Ly6C^{low} sont Hypothétiquement capables eux aussi de réaliser ce processus.

II. Fonctions associés aux monocytes dans les pathologies inflammatoires et infectieuses.

Les phagocytes mononuclées dont les monocytes, sont essentiels à la défense de l'hôte contre de nombreux pathogènes. Les Mo sont parmi les premiers à détecter les micro-organismes et à engager des fonctions immunes tels que la phagocytose, la sécrétions de molécules (pro et/ou anti-inflammatoires), la présentation antigénique et engagent également des mécanismes d'adhérences permettant leur recrutement.

1. Mobilisation/recrutement des monocytes

Le recrutement des Mo est décrit dans de nombreux modèles murins dans la lutte anti-microbienne (*Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* et *Cryptococcus neoformans*) ou virale (HIV) et est également retrouvé dans de nombreuses maladies inflammatoires non infectieuses (polyarthrite rhumatoïdes, athérosclérose, insuffisance hépatique aiguë et lésion rénale aiguë). Par exemple, après une infection par *L.monocytogenes* le recrutement des Mo au site inflammatoire est observé jusqu'à maximum 96h (North, 1970). Cette mobilisation monocyttaire a également lieu au cours du sepsis. Nous avons récemment publié que le nombre de Mo Ly6C^{high} augmente dans le sang et dans les reins 6h après induction d'un sepsis polymicrobien chez la souris. Ce phénomène est accompagné d'une diminution du nombre de ces cellules dans la moelle osseuse. Cela indique que seuls les Mo dit inflammatoires sortent rapidement de moelle osseuse pour passer dans le sang et être recrutés vers les tissus inflammatoires pendant la phase précoce du sepsis (Chousterman et al., 2016). De façon plus globale et moins spécifique, les Mo sont souvent étudiés dans le sepsis comme intégrés à une population plus large nommée « Cellules Suppressives dérivées des Myéloïdes » ou MDSC (Myeloid-derived suppressor cells). Les MDSC sont une population cellulaire hétérogène constituée de macrophages, monocytes, cellules dendritiques et granulocytes. Elles sont identifiées sur la base de l'expression du Gr1+ (anticorps dirigés contre Ly6C et Ly6G) et CD11b+ comme précédemment décrit. Ainsi, que ce soit dans un modèle d'endotoxémie chronique (administration de dose croissante de LPS) ou dans un sepsis polymicrobien (CLP), la proportion de cellules Gr1+CD11b+ augmente dans la rate, le sang, la moelles osseuse et les ganglions entre 3 et 15 jours (Landoni et al., 2016; McPeak et al., 2017; (Delano et al., 2011). D'après les auteurs ces cellules auraient déjà des capacités immunosuppressives (inhibition des cellules T) dans la moelle osseuse avant leur sortie. L'accumulation des MDSC conduit à la réduction de la survie des souris. Cependant, dans de nombreux modèles infectieux *L.monocytogenes* (Conlan and North, 1994) et *M.tuberculosis* (Peters et al., 2004) mais aussi pendant le sepsis (Chousterman et al., 2016; Delano et al., 2011), l'absence du récepteur CCR2 mène à la déplétion des granulocytes et des Mo au niveau des tissus et rend les souris moins résistantes à l'infection. Si le recrutement monocytaires (Ly6C^{high}) et plus globalement des cellules myéloïdes (MDSC) au niveau

des sites inflammatoires a lieu et est issu de la moelle osseuse les rôles respectifs des sous populations monocytaires au cours du sepsis précoce et tardif ne sont pas clairement établis.

Les Mo comme les autres leucocytes sont capables de migrer de la lumière du vaisseau sanguin vers les tissus endommagés ou infectés. Ce mécanisme d'extravasation fait intervenir une série d'interactions moléculaires entre les Mo et les cellules endothéliales. Les cytokines inflammatoires produites pendant l'inflammation activent l'endothélium et déclenchent l'expression de molécules d'adhésion tel que des sélectines (sélectines E et P), des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) et vasculaire (VCAM-1). Les Mo expriment à leur surface le ligand des sélectines de type P appelé PSGL-1 leur permettant ainsi de « rouler » le long de l'endothélium vasculaire. Les interactions ente les sélectines P et leurs ligands sont de nature relativement faibles. L'interaction des molécules VCAM-1 et ICAM-1 avec les intégrines VLA-4, LFA-1 (CD11a/CD18) et Mac-1 (CD11b/CD18) exprimées sur les Mo en condition inflammatoire provoque l'arrêt ou le rampement des cellules au niveau de sites spécifiques. L'adhésion forte des Mo est également coordonnée par les chimiokines de la famille C-C et C-X-C. Une fois arrêté, les Mo peuvent traversés entre ou au travers des cellules endothéliales, phénomène nommé transmigration (**Figure 19**) (Schenkel et al., 2004; Gerhardt and Ley, 2015).

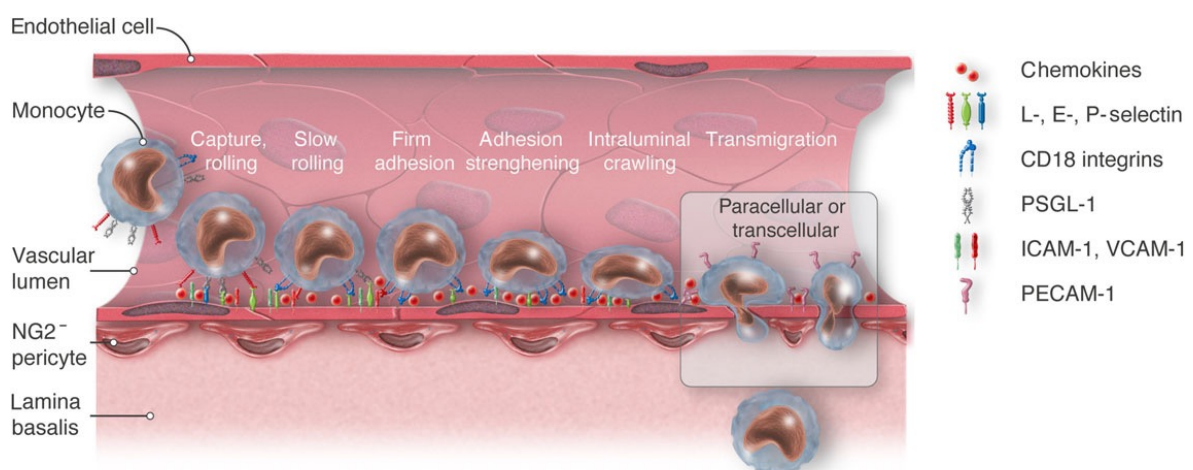


Figure 19 : Processus d'extravasation monocytaires. D'après (Gerhardt and Ley, 2015).

L'expression différentielle des intégrines par les Mo pourrait avoir un rôle crucial dans la mobilisation et l'extravasation des cellules au cours du sepsis. Deux études cliniques rapportent qu'il n'y a pas de différence d'expression du CD11b à la surface des Mo de patients septiques par rapport aux donneurs sains (Silva et al., 2014; Brunialti et al., 2006). Cependant, le blocage *in vivo* du CD11b au cours d'une endotoxémie par LPS et/ou d'un sepsis polymicrobien réduit la mortalité (Zhou et al., 2018b). La diminution de l'expression du CD11b sur les PMN et d'ICAM-1 sur les Mo est associée à un mauvais pronostic chez les patients septiques (Muller Kobold et al., 2000). Les données actuelles ne permettent donc pas de conclusion claire sur le rôle des intégrines exprimées par les Mo au cours du sepsis. Celui-ci est probablement dépend de la gravité de la maladie et de sa cinétique.

Le recrutement et la mobilité/margination des Mo mettent en jeu des mécanismes impliquant également les chimiokines et leurs récepteurs, un chapitre leur sera consacré (Chapitre 2 – IV).

2. Fonction antibactérienne des monocytes

Les populations monocytaires expriment à leurs surfaces de nombreux récepteurs permettant la reconnaissance de certains lipides et microorganismes (motifs PAMPs) (Voir chapitre I – IV). La reconnaissance des motifs PAMPs active les Mo, leur conférant d'une part, la capacité de produire des agents cytotoxiques tels que les ROS, le NO (via iNOS) mais également de nombreuses cytokines pro-inflammatoires ou encore des prostaglandines. Le NO est connu pour être principalement sécrété par les macrophages mais peut être également produit par les Mo Humains et murins bien que moins détectables (Weinberg et al., 1995). La production de iNOS par les Mo Ly6C^{high} activés ou en cours de différenciation en mDC est associée à une augmentation de la mort bactérienne (Serbina et al., 2003b). De plus, le NO produit par les Mo du péritoine après une infection par *T.gondii*, bloque la réplication des parasites *in vitro* (Ling et al., 2006). Il a été montré que les Mo des patients septiques produisent plus de NO et de ROS que les volontaires sains (Santos et al., 2012; Santos et al., 2016). La production de NO ou de iNOS est probablement due à l'activation des mécanismes de lutte antimicrobienne mais peut aussi participer aux lésions tissulaires au cours de la maladie comme vu précédemment (Chapitre 1 – Métabolisme oxydatif).

D'autre part, les Mo ont la faculté de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes présents dans la circulation sanguine ou dans les tissus. Au cours du sepsis la capacité phagocytaire des Mo est souvent étudiée *in vitro* notamment chez l'Homme. Ainsi, la mise en culture de Mo CD14+ issus de sang de cordon ou périphérique de nouveau nés septiques en présence de *E. coli* a permis de mettre en évidence une altération de la capacité phagocytaire des Mo « classiques » au cours du sepsis (Hallwirth et al., 2002). Chez la souris, Chiswick et al. montrent une diminution de clairance bactérienne dans le péritoine des souris dites « non survivantes » par rapport à celles qui ont survécu au sepsis polymicrobien (Chiswick et al., 2015). La phagocytose des cellules myéloïdes pourrait donc être utilisée pour prédire la mortalité. De plus, dans un modèle d'infection secondaire au sepsis par injection de *P.aeruginosa* après CLP, le nombre de bactéries retrouvées dans les lavages bronchoalvéolaires, et la rate est significativement plus élevée dans les souris septiques comparées aux souris contrôles sham infectées (Deng et al., 2017). L'incapacité des souris septiques à contrôler cette infection secondaire pourrait être caractéristique de l'état « immunosuppresseur » ou « immunoincompétent » de système immunitaire inné impliquant les Mo et les macrophages au cours du sepsis.

3. Sécrétion

Les Mo sécrètent de nombreux médiateurs et cytokines visant à contrôler l'infection mais pouvant également participer à l'exacerbation de l'inflammation. Les patients septiques comme précédemment exposé sont caractérisés par un dysfonctionnement progressif de l'hémostase. Chez la souris on observe une diminution des niveaux plasmatiques de prothrombine, facteur V et X et de la protéine C 6h après CLP. La déplétion des Mo montre une restauration des niveaux de ces facteurs dans le plasma (Wang et al., 2015b). Les Mo auraient donc un rôle central dans les mécanismes de coagulation pendant un sepsis abdominal. La sécrétion de certains facteurs par les Mo tel que HIF1 α connu comme facteur de l'hypoxie a été montrée comme ayant un rôle primordial dans le sepsis. En effet, l'étude des Mo circulants de patients septiques a mis en évidence un phénotype de « tolérance » à l'endotoxine contrôlé par l'expression de HIF1 α . HIF1 α induit la surexpression de IRAKM qui agit comme un régulateur négatif

des TLRs et induit la « tolérance » des Mo (Shalova et al., 2015). Ce mécanisme réduit les réponses immunes lorsque les Mo sont soumis à une seconde stimulation bactérienne.

De nombreuses études ont mis en évidence une altération de la capacité des Mo de patients septiques à sécréter des cytokines pro-inflammatoires après stimulation *in vitro* par le LPS, des agonistes aux TLRs ou encore par des bactéries (Biswas and Lopez-Collazo, 2009; Cavaillon and Adib-Conquy, 2006; Monneret et al., 2017; Santos et al., 2016). Ainsi, on observe une diminution des cytokines inflammatoires : TNF α , IL1-1 β et IL-6 dans la circulation sanguine. Ces cytokines jouent un rôle dans la phase précoce de l'endotoxémie et du sepsis. On sait aujourd'hui que l'IL-10 et l'IL-1RA (cytokine anti-inflammatoire) sont impliquées dans la désactivation des Mo observée au cours de la phase tardive du sepsis. Cependant, l'étude de la sécrétion des cytokines même spécifique à une population cellulaire est délicate car les résultats peuvent être très variables en fonction des modèles d'étude *in vivo* et *in vitro* et de la cinétique de l'étude. Quantifier des ratio de la sécrétion de cytokines pro/anti-inflammatoires paraît plus pertinent dans l'étude du sepsis. Par exemple, Fumeaux et al. ont observé que les Mo septiques ne produisent pas plus d'IL-10 que ceux d'un donneur sain alors que le ratio TNF α /IL-10 intracellulaire est altéré (Fumeaux et al., 2004).

4. Stimulation du système immunitaire adaptatif

Enfin, une autre des caractéristiques des monocytes est leur capacité à présenter des peptides antigéniques. Cela font d'eux des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) impliquant des mécanismes et signaux costimulateurs activateurs comme inhibiteurs.

a. Présentation antigénique et signaux costimulateurs

Les Mo comme les autres CPA sont capables d'exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) assurant ainsi la présentation de l'antigène aux lymphocytes T afin de les activer. Au cours du sepsis les Mo subissent une désactivation dont l'anomalie la plus caractéristique est la diminution de l'expression membranaire de HLA-DR (Monneret et al., 2004; van Dissel et al., 1998). Cette diminution implique un défaut de ces cellules à présenter les peptides antigéniques et donc à activer la réponse adaptative. Ce phénomène a une conséquence directe sur les lymphocytes T en favorisant une réponse de type anergique ou régulatrice. En effet, chez la souris, la faible

expression du CMH II par les cellules myéloïdes Gr1+ ne permettrait pas d'engager directement les réponses dépendantes des cellules T CD4+. En revanche, elles seraient capables de présenter un antigène par le CMH I (qui n'est pas affecté) et de supprimer les réponses IFN- γ dans les cellules T CD8+ (Delano et al., 2007). L'amplitude et la durée de la diminution d'expression de ce complexe de présentation antigénique sont maintenant largement corrélées au nombre et à l'intensité des défaillances d'organes (Rode et al., 1982; Hotchkiss et al., 2013a) mais également à l'augmentation du risque d'infections nosocomiales et de mortalité (Monneret et al., 2008).

Le signal déclenché par l'interaction entre TCR et le CMH II n'est pas suffisant pour l'activation complète du lymphocyte T. La costimulation apporte un signal supplémentaire requis pour dépasser l'état d'anergie et donc l'activation des cellules T. Les membres de la famille B7 et plus particulièrement le CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimé par les CPA costimentent tous deux l'activation et la survie des cellules T via le CD28. Cependant, l'interaction des protéines de surface CD80 et CD86 avec le CTLA-4 exprimé sur les lymphocytes T conduit à l'inhibition de l'activité des cellules T. Il existe également une interaction possible entre le CD80 et le PDL1 inhibitrice de la prolifération des cellules T (Butte et al., 2007) (**Figure 20**).

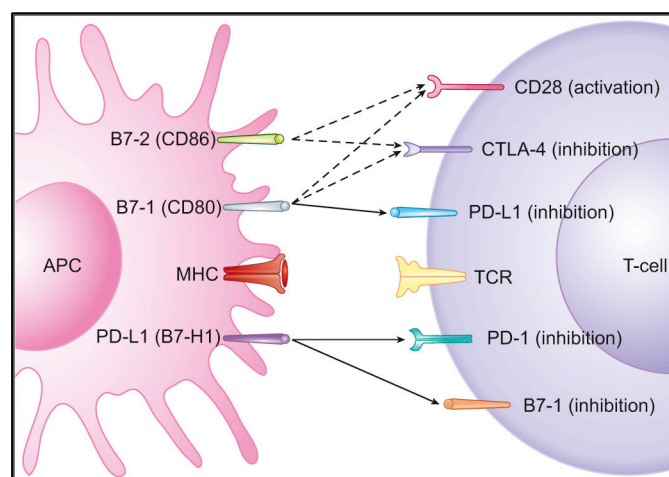


Figure 20 : Signaux costimulateurs et inhibiteurs des lymphocytes T. D'après (Rui Silva., 2015)

Au cours d'un sepsis murin (CLP), l'expression de CD80 est augmentée sur les Mo péritonéaux, spléniques et périphériques. L'expression du CD86 est diminuée dans le péritoine tandis que son expression est augmentée dans la rate et le sang périphérique (Flohé et al., 2006 ; (Nolan et al., 2008) Nolan et al., 2009). Ces variations suggèrent que

l'expression de CD80 et CD86 peut avoir des fonctions différentes en fonction de la localisation des Mo. L'inhibition de CD80/CD86 (pharmacologique ou génétique) montre une amélioration de la survie des souris septiques (Nolan et al., 2009). L'inhibition de CD80 seule, montre une plus forte amélioration de la survie par rapport au blocage de CD86 (Nolan et al., 2008). Chez l'Homme, le niveau élevé du CD80 est associé au choc septique ce qui suggère un effet négatif bien qu'il n'y ait pas d'association avec la survie. De plus, l'expression de CD86 est diminuée par rapport aux donneurs sains mais de façon intéressante les niveaux d'expressions les plus élevés sont retrouvés chez les survivants (Roger et al., 2009; Nolan et al., 2009).

Ces résultats montrent ainsi l'importance des molécules costimulatrices au cours de la physiopathologie du sepsis. Même si les mécanismes de régulations via ces molécules sont encore mal connus dans le sepsis elles restent néanmoins des cibles thérapeutiques.

b. Les immunes « checkpoints »

L'expression des récepteurs des « immunes checkpoints » comme PD1 (CD279), et son ligand PDL1 (B7-H1), CTLA-4 (CD152) et BTLA (CD272) augmente sur les cellules immunitaires pendant le cancer (Patel and Kurzrock, 2015), les infections (Lazar-Molnar et al., 2010; Rowe et al., 2008) et au cours du sepsis (Patil et al., 2017). Ces récepteurs sont supposés être les acteurs majeurs de la tolérance et de l'immunosuppression du système immunitaire. La **Figure 21** décrit les interactions inhibitrices des « immunes checkpoints » connues entre les CPA et les cellules T.

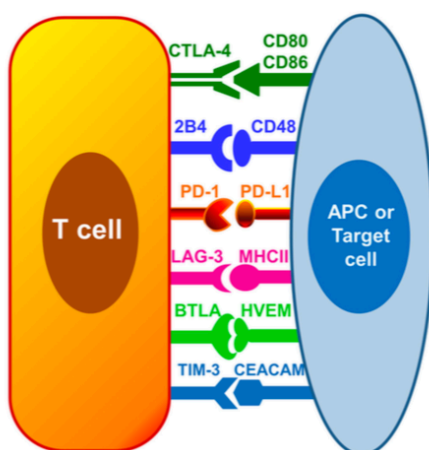


Figure 21 : « immune Checkpoints » entre les cellules T et les cellules présentatrices d'antigènes.

PD1 = programmed death cell, PD-L1 = Programmed death ligand-1, TCLA-4 = Cytotoxic T lymphocyte antigen-4, BTLA = B and T lymphocyte attenuator, HVEM = Herpes virus entry mediator, TIM-3 = T cell membrane protein-3, LAG-3 = Lymphocyte activation gene-3, CEACAM = carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule, MHC II = Major histocompatibility complex II. D'après (Patil et al.)

Depuis les années 2010, il a été montré que le PD1 et PDL1 peuvent être exprimés sur les lymphocytes CD4 et CD8, sur les Mo/macrophages, PMN, les NK mais aussi sur les cellules endothéliales et épithéliales bronchiques au cours du sepsis (Patil et al., 2017). Plus spécifiquement, des études ont montré une augmentation de l'expression de PD1/PDL1 sur les Mo chez la souris dans des modèles CLP (Zhang et al., 2010; Huang et al., 2014) et sur les Mo circulant chez l'humain (Guignant et al., 2011; Patera et al., 2016; Chang et al., 2014). Cette expression n'est cependant pas spécifique aux Mo puisqu'elle est retrouvée sur d'autres populations cellulaires tel que les cellules T, les macrophages et les DCs. Chez la souris, cette augmentation est corrélée à la déplétion des lymphocytes, une altération de la clairance bactérienne et la diminution de la survie des souris. Chez l'Homme, leur expression induit une diminution de la prolifération lymphocytaire et est corrélée à l'augmentation des infections nosocomiales pendant le sepsis. Le blocage des signaux PD1 ou PDL1 augmente la survie dans des modèles septiques bactériens (Huang et al., 2009; Zhang et al., 2010) et montre une réduction de la mortalité pendant une infection primaire et secondaire au sepsis par *C.albicans* (Chang et al., 2013; Shindo et al., 2017). Cependant, récemment Ferreira da Mota et al, ont publié que l'expression du PD1 et PDL1 par les monocytes est augmentée chez les patients septiques mais que l'expression est moins forte (comme celle du HLA-DR) chez les patients qui n'ont pas survécu à la maladie (Ferreira da Mota et al., 2017). Cette étude corrobore avec les études chez la souris dans des modèles infectieux à *M.tuberculosis* (Lazar-Molnar et al., 2010) et *L.monocytogenes* (Seo et al., 2008) qui montrent que le blocage ou la déficience de PD1 et/ou PDL1 affaiblit la défense antimicrobienne. PD1 et PDL1 pourraient donc être impliqués dans des mécanismes régulateurs permettant de lutter contre les infections. Même si l'expression de PD1 et PDL1 peut être vue comme des biomarqueurs du sepsis leurs rôles et fonctions au cours de la maladie et leurs expressions sur les Mo nécessitent plus d'investigation.

IV Réseau chimiokinique dans la migration des monocytes

Appartenant à la famille des cytokines, les chimiokines exercent des fonctions importantes de communication intercellulaire et sont spécialisées dans l'attraction des leucocytes. Plus de 50 chimiokines et 20 récepteurs distincts ont été identifiés chez l'homme pour coordonner la migration des leucocytes dans l'immunité et l'inflammation.

Outre ce rôle dans la défense de l'organisme, la migration cellulaire est un phénomène essentiel à l'homéostasie du système immunitaire mais également, et de façon plus globale dans le développement tissulaire et l'organogénèse (Schall and Proudfoot, 2011). Les chimiokines sont impliquées dans la pathogenèse de nombreuses maladies tel que les maladies inflammatoires chroniques (bronchopneumopathie chronique obstructive -BPCO, sepsis), mais aussi dans la cancérogenèse ainsi que dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde).

Dans ce chapitre, j'aborderai de façon globale la complexité du réseau chimiokinique et approfondirai l'étude des couples impliqués dans la migration des monocytes : CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1.

1. Les chimiokines et leurs récepteurs

a. Classification des chimiokines

Les chimiokines (CK) sont des petites molécules polypeptidiques de 71 à 130 acides aminés allant de 8 à 14KDa. Elles exercent leurs actions en se fixant sur un récepteur membranaire (RCK). La classification des CK se fait en fonction de leurs structures. Ainsi, l'emplacement des deux premiers résidus cystéines conservés en position N-terminale et le nombre d'acides aminés qui les sépare permet leur classement en quatre sous-familles : CC, CXC, CX3C et XC (Zlotnik and Yoshie, 2000). La **Figure 22** représente la nouvelle et l'ancienne nomenclature des chimiokines et leurs récepteurs associés.

Le recrutement des PMN et des Mo dans les tissus inflammatoires est principalement dirigé par deux sous-familles de chimiokines : les CXC caractérisées par l'intercalation d'un acide aminé entre les 2 premières cystéines et les CC caractérisées par la contiguïté de la première paire de cystéines qui la compose. Les CXC et CC sont nombreuses et comportent 17 et 27 membres respectivement. La sous-famille des CX3C ne comporte qu'un seul membre : le CX3CL1. Son action prédomine sur les Mo, macrophages et DCs chez l'homme comme chez la souris. La dernière sous famille XC comporte 2 membres : XCL1 et XCL2 et ont la particularité de n'avoir qu'une seule cystéine dans leurs portions initiales. Elles sont impliquées dans la mobilisation des lymphocytes T (Viola and Luster, 2008).

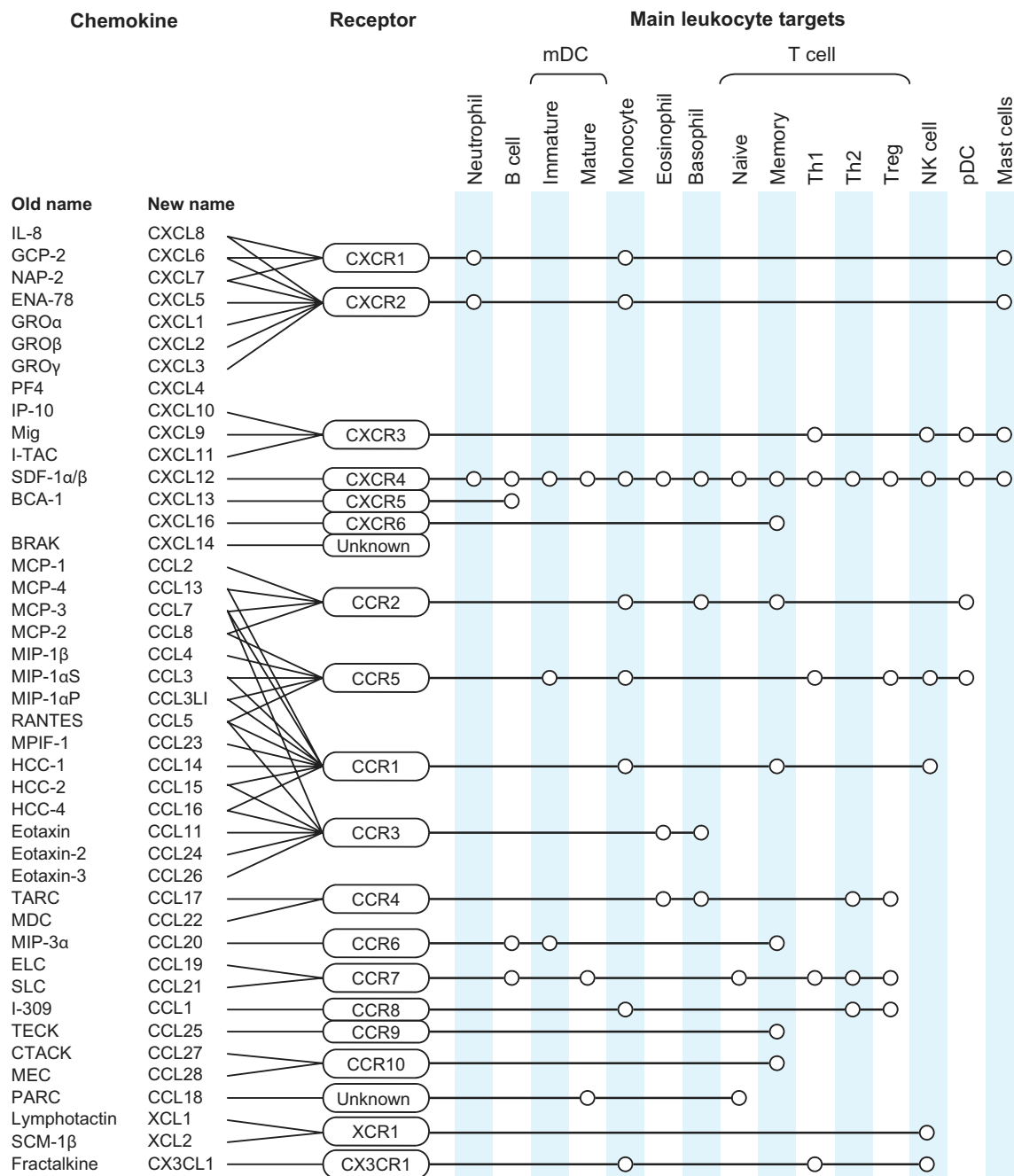


Figure 22 : Les chimiokines et leurs récepteurs . D'après (Viola and Luster, 2008)

b. Les récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines exercent leurs fonctions chimiotactiques en se liant aux récepteurs de chimiokines (RCK). Ces récepteurs comportent 7 domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G (RCPG). Les RCK sont classifiés en fonction des familles de chimiokines auxquelles ils se lient : CXCR, CCR, CX3CR, XCR. Ils

font entre 340 et 370 acides aminés et sont composés de 7 segments transmembranaires, d'un domaine N-terminal, de trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et d'un domaine C-terminal (**Figure 23**). Les domaines extracellulaires participent à la reconnaissance et à la liaison des ligands alors que les domaines intracellulaires sont impliqués dans la transduction du signal. Au sein d'une même sous-famille, une chimiokine peut se fixer à plusieurs récepteurs et un récepteur peut fixer différentes chimiokines (**Figure 22**).

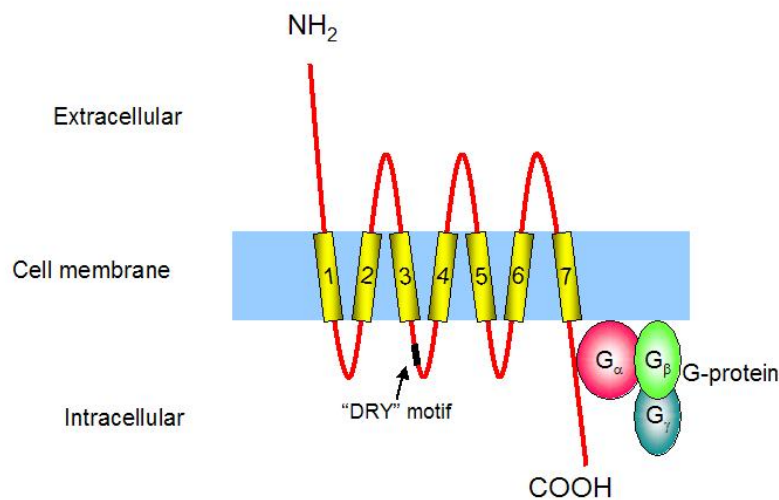


Figure 23 : Structure schématique d'un récepteur de chimiokines à 7 domaines transmembranaires, couplé aux protéines G.

c. Fonctions associées aux chimiokines

Certaines chimiokines jouent un rôle important dans les processus inflammatoires alors que d'autres sont importantes dans le trafic homéostatique des leucocytes vers les organes lymphoïdes primaires ou secondaires (Rossi and Zlotnik, 2000; Murphy et al., 2000). En condition homéostatique les CK sont produites au niveau des organes lymphoïdes de la peau et des muqueuses. Les chimiokines produites suite à un stress physiologique, sont sécrétées par les tissus et en particulier par les leucocytes qui s'y trouvent. Ces chimiokines vont permettre le recrutement des cellules immunitaires de la moelle osseuse vers le sang puis sur le site de l'inflammation. Elles vont participer à l'extravasation des cellules mais aussi à la migration orientée des cellules à l'intérieur du tissu (Griffith et al., 2014) (**Figure 24**).

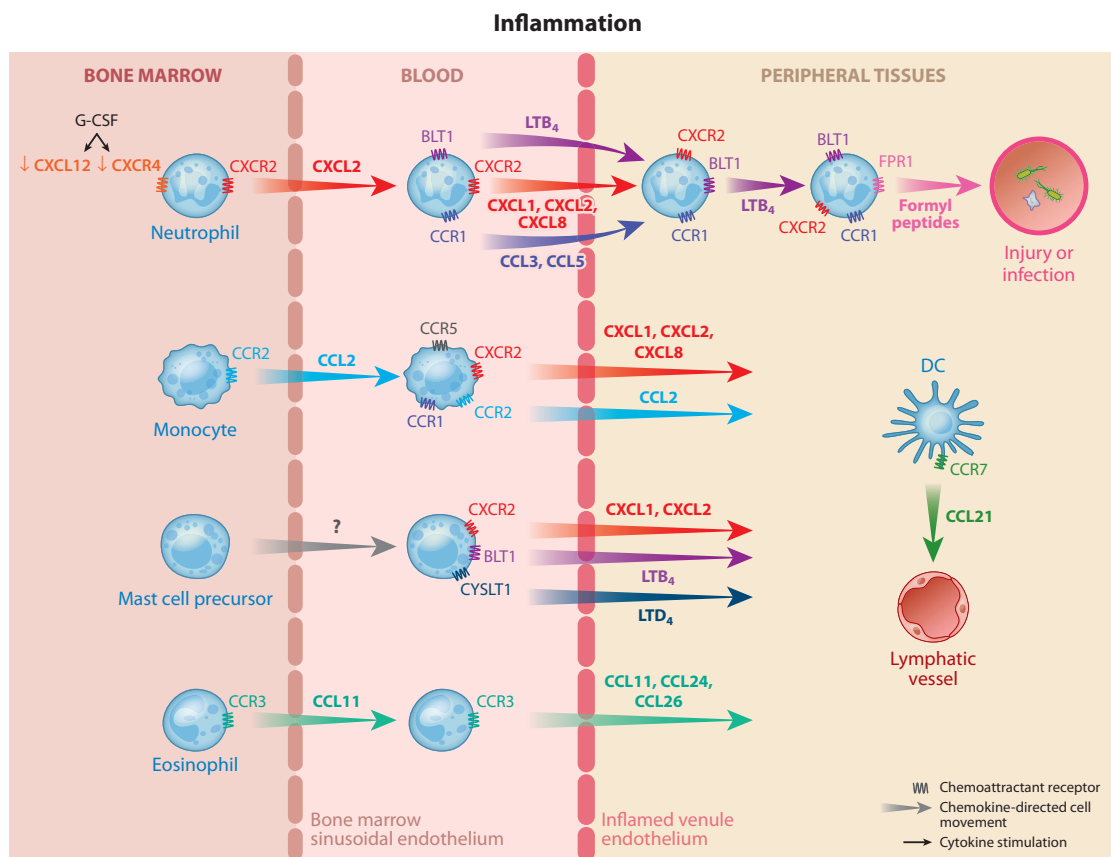


Figure 24 : Contrôle de l'immunité innée par la mobilisation des leucocytes via les chimiokines en condition inflammatoire. D'après (Griffith et al., 2014).

On sait maintenant que les PMN, les Mo et les lymphocytes B en développement sont retenus dans la moelle osseuse par le CXCL12. En présence d'une signalisation CXCR2 et en absence de signalisation CXCR4, les PMN sortent de la moelle osseuse pour rejoindre le sang. Les monocytes eux, passent dans le sang via une signalisation CCR2 et l'absence de signalisation CXCR4 (Shi and Pamer, 2011; Griffith et al., 2014). L'interaction CCL2/CCR2 est essentielle pour la migration des Mo $Ly6C^{high}$ CCR2⁺ dans les tissus périphériques durant l'inflammation (Deshmane et al., 2009; Huffnagle et al., 1995). Cependant, d'autres récepteurs aux chimiokines tels que le CCR1 et CCR5 jouent un rôle spécifique dans l'adhésion et la migration des Mo inflammatoires (Weber et al., 2001). Le couple CXCL8/CXCR2 est lui nécessaire à la forte adhésion des Mo à l'endothélium vasculaire dans un modèle d'athérosclérose (Gerszten et al., 1999).

Les CK sont également connues pour participer à la régulation positive et négative de la prolifération et de l'apoptose des progéniteurs myéloïdes (Broxmeyer, 2001). Par exemple, CCL3 (aussi connue sous le nom de MIP-1 α) a été montré comme

un inhibiteur de la myélopoïèse en supprimant le cycle cellulaire (Maze et al., 1992; Cooper et al., 1994). Il est également connu que la survie des cellules souches et progénitrices nécessite la présence de certaines cytokines et facteurs de croissance. En effet, l'absence de ces cytokines va déclencher la mort cellulaire par apoptose. Le couple CXCL12/CXCR4 régule la prolifération des cellules hématopoïétiques et serait capable de diminuer l'apoptose (Broxmeyer et al., 2003). D'autres chimiokines sont connues pour leur rôle anti-apoptotique. Le CX3CL1 a un effet anti-apoptotique puissant sur les Mo humains via un mécanisme impliquant la réduction du stress oxydatif (White et al., 2014).

Lors des pathologies inflammatoires, le rôle des CK ou RCK sur les Mo est multiple. La sécrétion des CK et/ou l'expression des RCK sur et par les Mo peuvent avoir un rôle bénéfique ou délétère en fonction des pathologies. L'étude du rôle et des fonctions impliquant les chimiokines et leurs récepteurs dans les pathologies semblent primordiales car elle permet l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. La suite de ce manuscrit décrira plus particulièrement les axes CX3CL1/CX3CR1 et CCL2/CCR2 et leurs implications dans la physiopathologie du sepsis.

2. Les principaux couples de chimiokines impliqués dans le recrutement des monocytes

a. L'axe CX3CL1/CX3CR1

La chimiokine CX3CL1 (motif CX3C), aussi appelée fractalkine est une molécule de 95 kDa composée d'un domaine chimiokinique, d'une queue riche en mucines permettant son oligomérisation et d'un domaine transmembranaire (**Figure 25a**). On retrouve également une forme soluble issue du clivage de la forme membranaire par les métalloprotéinases ADAM10 et ADAM17 (**Figure 25b**). CX3CL1 est exprimée par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules dendritiques, les neurones et les macrophages. La forme membranaire permet l'adhésion des cellules qui expriment son récepteur. La forme soluble, a elle, un rôle chimio-attractant (Bazan et al., 1997). Les cellules immunitaires qui expriment CX3CR1 sont : les monocytes, les macrophages, les cellules microgliales, les lymphocytes Th1, les CD8+ effecteurs/mémoires, les cellules NK et les DCs. Son expression sur les types

cellulaires est en fonction de l'organe et du tissu où se trouvent les cellules (Lee et al., 2018). Par exemple, dans l'intestin et le sang seuls les macrophages et monocytes expriment le CX3CR1 (Geissmann et al., 2003). Au-delà du recrutement cellulaire, le CX3CR1 augmente fortement l'affinité des intégrines avec les cellules, donnant ainsi une adhésion ferme des cellules à l'endothélium vasculaire (Goda et al., 2000). De plus, grâce à l'étude *in vivo* des fonctions des Mo sanguins, il a été montré que les MO Ly6C^{low} patrouillent les tissus sains par rampeement « crawling » sur l'endothélium des vaisseaux via des mécanismes CX3CR1 dépendants (Auffray et al., 2007).

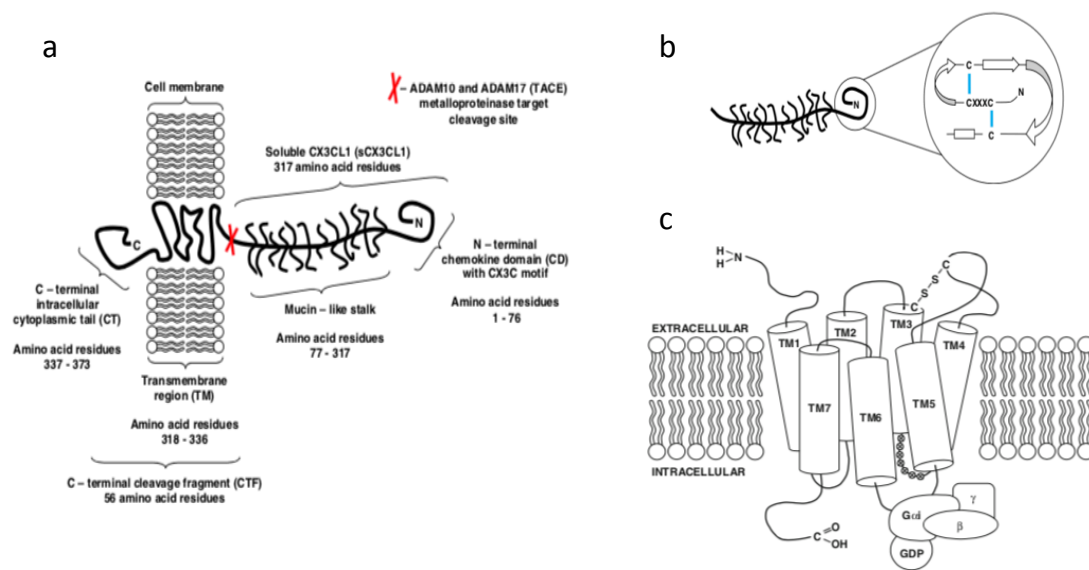


Figure 25 : Structure schématique des 2 formes du ligand CX3CL1 (fractalkine) et de leur récepteur CX3CR1 **a-** Forme membranaire du CX3CL1 et son site de clivage par les métalloprotéinases ADAM10 et ADAM7. **b-** Forme soluble du CX3CL1. **c-** Structure du récepteur CX3CR1.

La chimiokine CX3CL1 est fortement exprimée par les monocytes en condition inflammatoire ce qui suggère que le couple CX3CL1/CX3CR1 participe activement aux pathologies inflammatoires (Jones et al., 2010). Cet axe peut avoir un rôle bénéfique comme néfaste sur les mécanismes mettant en jeu le système immunitaire. Par exemple, l'expression du CX3CR1 est associée à la limitation de la fibrose du foie grâce au contrôle de la différenciation et de la survie intrahépatique des Mo (Bjerkeli et al., 2007). Par contre, dans un modèle de régénération musculaire chez la souris, l'absence du CX3CR1 augmente l'activité des phagocytes mononucléés et contrôle l'inflammation. Cibler l'axe

CX3CL1/CX3CR1 permettrait donc une meilleure régénération musculaire après lésions (Arnold et al., 2015). Le déficit en CX3CR1 a également été associé à la diminution de la taille des plaques d'athéromes (Combadière et al., 2003). De plus, notre équipe a mis en évidence que l'utilisation d'un antagoniste de CX3CR1 (F1) permettait de réduire la taille de ces plaques. Ce phénomène est corrélé à une diminution du nombre des Mo Ly6C^{high} circulant et de leurs capacités d'adhésion et de survie (Poupel et al., 2013). L'interaction CX3CL1-CX3CR1 contribue également à la pathogénèse des maladies pulmonaires comme l'asthme (El-Shazly et al., 2006) et l'emphysème (McComb et al., 2008). Par exemple, le recrutement des leucocytes CX3CR1⁺ médié par CX3CL1 contribue à l'accumulation de cellules inflammatoires dans les poumons et au développement de la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) (Hogg et al., 2004).

L'axe CX3CL1/CX3CR1 dans la physiopathologie du sepsis

Pachot et al. ont identifié que les patients survivants au sepsis avaient une plus forte expression de l'ARNm du CX3CR1 par rapport aux patients décédés, parmi un panel de 28 gènes (Pachot et al., 2006). Plus tard, ils ont décrit pour la première fois que l'expression du CX3CR1 (ARNm et protéine) était diminuée sur les Mo des patients en choc septique. N'excluant pas un éventuel effet des processus apoptotiques, les auteurs proposent que la diminution de l'expression du CX3CR1 serait le signe d'une désactivation des Mo au cours du choc septique. La diminution de l'expression de ce récepteur serait une nouvelle caractéristique de l'immunodépression au cours du sepsis (Pachot et al., 2008).

L'utilisation de souris déficientes pour le CX3CR1 (CX3CR1^{-/-} ou CX3CR1^{gfp/gfp}) permet d'étudier le rôle de ce récepteur dans la physiopathologie du sepsis. Ainsi, l'absence de ce récepteur réduit l'activité bactéricide des macrophages en altérant la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de iNOS augmentant ainsi la susceptibilité des souris à la maladie (Ishida et al., 2008). On observe également une augmentation des lésions tissulaires hépatiques (Ishida et al., 2008) et rénales (Chousterman et al., 2016) plus importante dans les souris CX3CR1^{-/-} lors du sepsis précoce (24h post CLP). Contrairement aux Mo dans l'étude de Pachot et al. les macrophages péritonéaux ne montrent pas une diminution de l'expression du gène CX3CR1 mais plutôt une augmentation 6h après infection (Ishida et al., 2008). Cette augmentation semble être maximale entre 6h et 24h et diminue progressivement

jusqu'à 7 jours après l'infection (Hogg et al., 2004). Cette diminution est expliquée par l'internalisation du récepteur via l'activation du TLR4. Ge et al. soutiennent également que l'internalisation du CX3CR1 ferait potentiellement parti des mécanismes de l'immunoparalysie. D'autres études semblent nécessaires afin de déterminer le rôle du CX3CR1 exprimé par les cellules myéloïdes dans l'immunoparalysie du sepsis tardif.

L'axe CX3CL1/CX3CR1 est connu pour participer aux recrutements des leucocytes sur les sites inflammatoires. L'absence de CX3CR1 ne montre pas de différence de recrutement des leucocytes dans la cavité péritonéale 24h et 48h après CLP (Ishida et al., 2008). Cependant, récemment notre équipe a publié que 4h après une endotoxémie par LPS ou lors d'un sepsis (CLP) le nombre de Mo inflammatoires Ly6C^{high} augmente dans la cavité péritonéale chez les souris déficientes en CX3CR1. Ce phénomène, s'accompagne d'un plus faible nombre de cellules en margination (cellules collées et/ou arrêtées à l'endothélium) dans les vaisseaux du péritoine par rapport aux souris WT. Cela suggère une rétention des Mo via le récepteur CX3CR1 dans le compartiment vasculaire des tissus inflammés (Hamon et al., 2016). De plus, nous avons également montré que le nombre de MO Ly6C^{high} était identique aux souris WT dans le sang et la moelle osseuse mais était réduit dans les reins 24h après CLP chez les souris KO (Chousterman et al., 2016). Le contrôle du recrutement cellulaire par CX3CR1 et plus particulièrement celui des MO inflammatoires au cours du sepsis ou d'un choc endotoxémique semble être compliqué à appréhender car varie beaucoup en fonction de l'organe et du temps.

b. L'axe CCL2/CCR2

La chimiokine CCL2 également appelée MCP-1 pour «Monocyte chemoattractant protein-1» fait partie de la famille des CC chimiokines. Elle fait 13kDa et est composée de 76 acides aminés chez l'Homme (Van Coillie et al., 1999). De nombreux types cellulaires produisent cette chimiokine : cellules endothéliales, fibroblastes, les cellules musculaires lisses, astrocytes, microglies et Mo/macrophages/DCs. Cependant, les Mo et macrophages sont la principale source de CCL2 (Yoshimura et al., 1989). L'interaction du CCL2 avec son récepteur CCR2 est responsable de la mobilisation des Mo (Ajuebor et al., 1998) mais aussi des lymphocytes T mémoires et des cellules NK.

Le rôle du couple CCL2-CCR2 a été mis en évidence dans diverses maladies

inflammatoires aiguës ou chroniques telles que l'infarctus du myocarde (Nahrendorf et al., 2007), les lésions musculaires (Arnold et al., 2007), la sclérose en plaque (Mahad and Ransohoff, 2003) ou encore la polyarthrite rhumatoïde (Gong et al., 1997). Un grand nombre d'études a également mis en valeur le rôle de l'axe CCL2/CCR2 au cours des infections. Ainsi, il a été montré que les souris dépourvues de CCR2 sont incapables de mobiliser les Mo inflammatoires du sang (Chen et al., 2005) et par conséquent sont très sensibles à la toxoplasmose aiguë lors d'une infection intrapéritonéale ou orale (Helk et al., 2013; Dunay et al., 2010). Ce phénomène est également observé dans des modèles d'infections à *Listeria monocytogenes* (Serbina and Pamer, 2006; Grainger et al., 2013), *Mycobacterium tuberculosis* (Robben et al., 2005; Antonelli et al., 2010) et *Aspergillus fumigatus* (Blease et al., 2000). Ces articles mettent en évidence le rôle essentiel du recrutement des Mo inflammatoires CCR2+ via la chimiokine CCL2 et montrent que l'absence de CCL2/CCR2 est délétère lors de ces infections.

Des données controversées laissent à supposer que les PMN pourraient exprimer CCR2 en condition inflammatoire et donc être sous la dépendance de CCL2 (Van Coillie et al., 1999). Maus et al. se sont penchés sur la question et ont étudié le recrutement des Mo et PMN via l'axe CCL2/CCR2 dans un modèle d'inflammation pulmonaire. Ainsi, ils ont montré que l'extravasation des Mo est régulée par un gradient intravasculaire-alvéolaire de CCL2, et que les PMN qui n'expriment pas CCR2 en condition basale et après stimulation LPS ne s'accumulent qu'en présence de CCL2. Les auteurs à l'aide de modèle de souris chimériques (par transfert de moelle osseuse de cellules CCR2^{-/-} vers WT et inversement) montrent que l'accumulation des PMN est en fait médiée par les monocytes CCR2+. Le trafic des Mo et des PMN en condition inflammatoire serait donc interdépendant (Maus et al., 2003; Wang et al., 2015b). Cette théorie expliquerait les résultats montrant un défaut de recrutement des monocytes et neutrophiles après infection par *Cryptococcus neoformans* (Huffnagle et al., 1995) et *Aspergillus fumigatus* (Blease et al., 2000) en absence de CCL2 et/ou CCR2. Le recrutement monocyttaire via l'axe CCL2/CCR2 semble d'une grande importance car il serait capable d'influencer d'autres populations cellulaires tel que les neutrophiles.

L'axe CCL2/CCR2 est connu pour son implication dans la réponse pro-inflammatoire (recrutement Mo inflammatoires) mais il a été montré récemment comme participant au contrôle de l'inflammation par son effet sur le recrutement des

lymphocytes T régulateurs (Loyher et al., 2016), la polarisation Th2 et la production IL-4 (Zhang et al., 2009). L'étude de Loyher et al. à laquelle j'ai participé, montre que l'augmentation de l'expression du CCR2 par les Treg après leur activation dans les ganglions pourrait leur permettre de migrer vers le site tumoral. La présence de cette nouvelle population de Treg CCR2+ dans le microenvironnement tumoral participerait à l'immunosuppression, à la tolérance et donc à la croissance tumorale (Loyher et al., 2016).

L'axe CCL2/CCR2 dans la physiopathologie du sepsis

L'étude clinique de patients septiques atteints du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) présentent un haut taux de CCL2 dans les lavages bronchoalvéolaires et celui-ci, est associé au recrutement massif des Mo et à la sévérité de la maladie (Rosseau et al., 2000). De plus, l'expression du CCR2 est augmentée sur les Mo de patients ayant déclaré un sepsis suite à de graves brûlures (Xiu et al., 2016). Cependant, chez la souris, le blocage de CCL2 ou CCR2 induit une sensibilité accrue au sepsis polymicrobien (Gomes et al., 2006). Ainsi, le blocage *in vivo* du récepteur CCR2 montre une augmentation de la production d'IL-10, une diminution de la clairance bactérienne, et une augmentation des lésions rénales. Le récepteur CCR2 jouerait un rôle dans le contrôle de la production d'IL-10 et donc dans l'immunosuppression au cours du sepsis (Gomes et al., 2013). Ces résultats corrélerent avec les nôtres montrent une augmentation des lésions des tubules rénaux chez les souris CCR2^{-/-} attribuées au déficit de recrutement des MO Ly6C^{high} (Chousterman et al., 2016). De plus, au cours de l'étude de la phase immunosuppressive du sepsis et dans un modèle d'infection secondaire par *L.monocytogenes* les souris CCR2^{-/-} et CCL2^{-/-} ont montré une mortalité accrue à l'infection secondaire par rapport aux souris WT. La réponse à *L.monocytogenes* après un sepsis est ici aussi dépendante du recrutement et de l'expansion des populations myéloïdes nécessitant la voie de signalisation CCL2/CCR2 (Delano et al., 2011). De façon contradictoire, certaines études font état du rôle pro-inflammatoire délétère du recrutement des cellules myéloïdes via l'axe CCL2/CCR2 au cours d'un choc endotoxémique par le LPS (Alves et al., 2013).

Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que l'inflammation générée par le LPS est aiguë et aseptique alors que l'inflammation induite par CLP (sepsis polymicrobien) est aiguë dans les premières heures et devient rapidement

chronique par la durée de celle-ci. Il est également possible que le contrôle de l'inflammation par l'axe CCL2/CCR2 soit nécessaire ou délétère en fonction de l'intensité de celle-ci.

Chapitre 3 : Objectif de la thèse

Le sepsis est défini comme une dysfonction d'organes secondaires à une réponse inappropriée de l'hôte envers une infection. Les réponses immunitaires au cours du sepsis sont caractérisées par une phase hyper-inflammatoire contrôlée par le système immunitaire inné au cours des premières heures de la maladie. L'inflammation excessive générée est décrite comme étant à la base de lésions organiques multiples pouvant évoluer vers une défaillance multiviscérale. La phase dite aiguë peut être suivie d'une phase qualifiée d'hypo-inflammatoire conduisant à une immunoparalysie prédisposant les patients à développer des infections secondaires de type nosocomial.

Les Mo sont des protagonistes clés des réponses inflammatoires. Ils ont un rôle ambivalent au cours de l'inflammation suite à l'agression d'un pathogène. Les données de la littérature sur la contribution des Mo aux mécanismes survenant au cours du sepsis sont encore incomplètes et méritent des études complémentaires.

Nous avons étudié le recrutement, la dynamique et le rôle des Mo au cours des mécanismes inflammatoires menant à l'insuffisance rénale aiguë durant la phase précoce du sepsis (**article 1**). Cette étude a donné lieu à un article publié dans *Journal of American society of Nephrology* en 2016 auquel j'ai pu activement participer et qui a posé les bases de mon travail de thèse. Ce dernier a consisté à déterminer le rôle des Mo au cours des mécanismes conduisant ou participant à l'acquisition d'infections nosocomiales pulmonaires durant la phase tardive du sepsis (**article 2**). Nos objectifs ont été de décrire d'une part dans quelle mesure les Mo participent à la réponse inflammatoire dans chaque phase de la maladie et d'autre part d'étudier l'implication des axes chimiokines CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 intervenant dans le recrutement et la mobilité des Mo.

Afin de répondre à nos problématiques, nous avons utilisé un modèle de sepsis murin. L'analyse transcriptomique d'échantillons de sang provenant de modèles murins ou de patients atteints de sepsis a montré des profils d'expression génique très comparables (Lambeck et al., 2012). Les modèles expérimentaux de sepsis semblent donc très bien reproduire la pathologie humaine comme l'atteste cette dernière étude. Il existe, à ce jour, différents modèles murins permettant de suivre l'évolution de la maladie et d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques. Les plus utilisés sont l'injection d'endotoxine telle que le Lipopolysaccharide (LPS) induisant une

inflammation stérile, l'infection bactérienne au niveau pulmonaire (pneumopathie) ou du système urinaire et surtout l'infection au niveau du péritoine (péritonite polymicrobienne) induit par ponction et ligature caecale (CLP). Les sepsis développés dans ces modèles ne sont pas identiques en terme de cinétique, de tableau clinique et de mortalité. Le modèle de ponction et ligature caecale reste le plus utilisé car il provoque une péritonite mimant celle des patients développant un sepsis d'origine digestive (comme fréquemment retrouvé). Contrairement au modèle LPS, l'inflammation générée par la CLP n'est pas stérile et conduit à une chronicité de la maladie proche du sepsis humain montrant également l'implication de mécanismes inflammatoires tardifs dans la maladie. La quantité de fèces libérées au cours des CLP est proportionnelle à la portion du caecum ligaturée. Ainsi, plus la ligature est proche de l'appendice caecale plus la quantité de fèces libéré sera faible. L'emplacement de la ligature est donc déterminant pour la létalité de la maladie.

Notre choix s'est donc porté sur l'utilisation des CLP pour induire des septicémies polymicrobiennes chez la souris. L'étude de la phase tardive du sepsis a été réalisée grâce à un modèle murin de sepsis polymicrobien dit sublétal compliqué par une infection secondaire pulmonaire bactérienne.

RESULTATS

Article 1

LY6^{high} Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism

Chousterman BG, Boissonnas A, Poupel L, Baudesson de Chanville C, Adam J, Tabibzadeh N, Licata F, Lukaszewicz AC, Lombès A, Deterre P, Payen D, Combadière C.

Article publié dans : Journal of the American Society of Nephrology (JASN) - 2016 Mar; 27(3):792-803.

Article 2

Late expansion of inflammatory monocytes in sepsis leads to defective immune responses following pulmonary second infection

Baudesson de Chanville C, Benjamin Glenn Chousterman, Pauline Hamon, Marie Laviron, Alexandre Boissonnasa nd Christophe Combadière.

Version préliminaire

Article 1: Ly6C^{high} Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism
J Am Soc Nephrol. 2016 Mar

Contexte de l'étude

Les monocytes sont parmi les premières cellules de l'immunité à détecter les micro-organismes. Ils contrôlent l'équilibre entre les processus inflammatoire et anti-inflammatoire au niveau des tissus suite à une infection. Ces cellules sont connues pour participer à la tempête cytokinique qui déclenche une réaction en chaîne conduisant aux lésions tissulaires et à la dysfonction des organes au cours de la phase aiguë du sepsis (Cohen, 2002). L'atteinte rénale aiguë (Acute Kidney Injury : AKI) est une conséquence du sepsis qui participe à la mortalité accrue des patients (Schrier and Wang, 2004). Des études ont précédemment montré que le sepsis était associé à l'infiltration des Mo (Lerolle et al., 2010) et à un fort taux de CX3CL1 au niveau rénal (Raspé et al., 2013). Le récepteur CX3CR1 est quant lui, montré comme protecteur des lésions tissulaires hépatiques au cours de la maladie (Ishida et al., 2008). Nous avons pensé que la mobilisation précoce des Mo impliquerait des mécanismes dépendants des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 et jouerait un rôle prépondérant dans l'AKI pendant le sepsis. Nous avons étudié, d'une part, le recrutement des Mo au niveau rénal quelques heures après le déclenchement d'un sepsis polymicrobien murin et d'autre part, leur dynamique *in situ*.

Le rôle de CX3CR1 et CCR2 lors de ces processus a été mis en évidence grâce à l'utilisation de souris génétiquement invalidées (Knock-Out) ou par l'utilisation d'un antagoniste (F1) du CX3CR1. Le recrutement et la dynamique cellulaire au niveau du rein ont été étudiés par cytométrie en flux et par microscopie biphotonique.

Principes expérimentaux

Sepsis polymicrobien :

Pour cette étude un modèle de sepsis polymicrobien murin induit par ligature et ponction caecale (CLP) a été utilisé. Ainsi, le caecum est isolé de la cavité abdominale, ligaturé à hauteur de 50%, puis percé à l'aide d'une aiguille et replacé dans l'abdomen. Pour chaque expérience des souris « contrôles opératoires » appelées sham sont réalisées. Le modèle de sepsis utilisé ici conduit à 50% de mortalité durant les 4 premiers jours après la chirurgie.

Modèles murins :

Nous avons utilisé des souris génétiquement modifiées *Csf1r-Gal4VP16/UAS-EGFP* (MacBlue) (Ovchinnikov et al., 2008), *Cx3cr1^{gfp/+}* (Jung et al., 2000) et *Ccr2^{-/-}*. Leurs croisements ont généré des souris MacBlueXCx3cr1^{gfp/+}, MacBlueXCx3cr1^{gfp/gfp}, MacBlueXCx3cr1^{gfp/+}X*Ccr2^{-/-}* ou MacBlueXCx3cr1^{gfp/+}X*Ccr2^{flp/-}*. L'expression de l'EGFP et/ou de l'EGFP permet de discriminer les sous-populations myéloïdes. Le phénotypage des cellules rénales a été réalisé par cytométrie en flux. Ainsi, les DCs interstitielles sont identifiées comme EGFP⁺EGFP^{neg} (fluorescence verte), et les Mo Ly6C^{low} et Ly6C^{high} comme EGFP⁺EGFP⁺ (fluorescence cyan) dans les souris MacBlueXCx3cr1^{gfp/+} et MacBlueXCx3cr1^{gfp/gfp}.

Microscopie Multiphotonique *in vivo* :

L'imagerie intravitale en temps réel par microscopie biphotonique permet d'observer la mobilité cellulaire dans un tissu pendant une longue période. Ici, les reins sont isolés de la cavité abdominale des souris anesthésiées afin de permettre l'imagerie d'une zone stable. La vascularisation est observable grâce à l'injection de tetramethylrhodamine-dextran. La mobilité cellulaire est mesurée toutes les 30 secondes avec 5 coupes en profondeur espacées de 3µm (Z stack) permettant une visualisation en 3D des cellules et des vaisseaux sanguins. L'analyse de la dynamique cellulaire a été réalisée sur 30 minutes d'enregistrement et nous a permis de caractériser 3 principales mobilités cellulaires : cellules circulantes, cellules en « crawling » (rampement) et cellules adhérentes. Ainsi, les cellules circulantes apparaissent sur une seule image, celles en « crawling » apparaissent sur plus de deux

images avec une vitesse estimée supérieure à 2µm/min et les cellules adhérentes ne présentent aucun mouvement de plus de 1µm entre deux images.

Principaux résultats

Recrutement et adhésion des monocytes Ly6C^{high} au niveau du réseau vasculaire rénal au cours de la phase précoce du sepsis.

Nous avons observé un fort recrutement des Mo Ly6C^{high} au niveau rénal concomitant à la réduction de leur nombre dans la moelle osseuse 6h après les CLP. L'analyse des cellules EGFP⁺ECFP⁺ montre que les Mo Ly6C^{high} chez les souris septiques représentent à eux seuls 90% des cellules contre seulement 60% chez les souris sham (**Figure 1C**). Cela nous indique que les cellules GFP⁺ECFP⁺ observées par microscopie biphotonique représentent majoritairement des Mo Ly6C^{high}. L'analyse de la dynamique des cellules montre que la proportion de Mo Ly6C^{high} circulants diminue et s'accompagne d'une augmentation des cellules en « crawling » (cellules rampantes) et adhérentes au niveau de l'endothélium vasculaire rénal (**Figure 1E**).

Les Mo inflammatoires sont recrutés dans le réseau vasculaire rénal très rapidement au cours de l'infection septique. De plus, ces cellules montrent une forte margination à l'endothélium vasculaire rénal par rapport aux Mo des souris contrôles sham.

Rôle protecteur des monocytes Ly6C^{high} via le récepteur CX3CR1

Afin de mieux comprendre le rôle des Mo Ly6C^{high} recrutés et marginés à l'endothélium, nous avons réalisé une analyse dynamique des Mo chez des souris déficientes pour le récepteur CX3CR1 ou CCR2, 6h après les CLP. Les souris Ccr2^{-/-} montrent un défaut de recrutement des Mo associé à une augmentation des lésions rénales. Alors qu'aucun changement du nombre de Mo n'est visible entre les souris Cx3cr1^{-/-} et les souris WT, une augmentation de la mortalité et des lésions rénales ont été mises en évidence. L'analyse de la mobilité des cellules Cx3cr1^{-/-} pendant le sepsis montre une perte de leur capacité d'adhésion à l'endothélium vasculaire (faible margination) avec une augmentation de la proportion des cellules circulantes par rapport aux souris WT (**Figure 2F**). Le transfert adoptif de Mo de la moelle osseuse

issue de souris WT dans des souris déficientes en CX3CR1 ou en CCR2 conduit à la diminution des lésions rénales (**Figure 3A et 3C**). De plus, ce transfert adoptif a permis une diminution de la mortalité des souris *Cx3cr1*^{-/-}. Par ailleurs, l'étude du polymorphisme de CX3CR1 chez l'Homme montre que l'allèle I249 a des propriétés pro-adhésives et qu'elle est associée à la réduction de l'incidence de l'AKI (**Figure 6C**).

Ces observations mettent en évidence le rôle protecteur des Mo inflammatoires envers les lésions rénales, très précocement au cours de la maladie. De plus, cette protection semble dépendante du récepteur CX3CR1 grâce à des mécanismes d'adhésion et donc à la margination des Mo à l'endothélium rénal.

Contrôle de l'environnement inflammatoire par les monocytes inflammatoires et le récepteur CX3CR1.

Notre équipe a développé une molécule antagoniste du CX3CR1 (F1) bloquant ainsi toute interaction avec son ligand CX3CL1 (soluble ou membranaire). De façon cohérente avec nos observations précédentes, l'injection de F1 empêche la margination des Mo et augmente les lésions tissulaires 6h après CLP. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet protecteur des Mo Ly6C^{high} nous avons quantifié la production des cytokines anti-inflammatoires (l'IL1-RA et TGFβ) et pro-inflammatoires (TNFα). Ainsi, le blocage du CX3CR1 par F1 diminue la production intracellulaire d'Il-1RA par les Mo Ly6C^{high} rénaux. On retrouve également une augmentation des transcrits TNFα et une diminution des transcrits TGFβ au niveau rénal 6h après CLP (**Figure 5**).

Le blocage de CX3CR1 augmente l'environnement pro-inflammatoire rénal au cours de la maladie. L'expression du CX3CR1 par les Mo, participe donc au contrôle de l'environnement inflammatoire.

Conclusion et perspectives

La cinétique des évènements inflammatoires opérant durant le développement du sepsis survient très rapidement. Nous avons mis en évidence que les Mo Ly6C^{high} ont un impact fort sur la morbidité et mortalité très tôt au cours du sepsis dans un modèle murin. Durant la phase aiguë, le recrutement des Mo a un rôle protecteur des tissus

rénaux grâce à leur mobilisation via l'axe CCL2/CCR2 et à leur capacité d'adhésion à l'endothélium vasculaire via le récepteur CX3CR1. L'imagerie du rein par microscopie biphotonique a permis de mettre en évidence une forte margination des Mo Ly6C^{high} à l'endothélium, excluant leur infiltration dans le parenchyme rénal entre 6h et 24h. Nos résultats montrent également que l'allèle I249 du CX3CR1 est associé à une moindre incidence sur l'AKI. Ainsi, le récepteur de chimiokines CX3CR1 est vu comme essentiel au maintien des mécanismes d'adhésion cellulaire et confère une protection précoce des tissus suite à l'agression septique. La visualisation et l'analyse du profil de mobilité des Mo seraient de bons marqueurs de leur état d'activation au cours du sepsis.

Nos travaux se limitent à l'étude de la pathogénèse rénale au cours du sepsis. L'impact de la modulation de CCR2 et CX3CR1 sur les autres organes tels que le poumon et le foie (également atteints au cours de la pathologie) mériterait d'être investigué afin de mettre en évidence un rôle plus systémique des Mo. L'étude du polymorphisme de CX3CR1 chez les patients septiques n'a pas permis de mettre en évidence une corrélation avec la mortalité des patients durant les 28 jours de l'étude. Il est possible que le nombre de patients soit insuffisant pour permettre de dégager une réelle différence. D'autre part, nous avons vu que les cellules marginées restent dans le réseau vasculaire par adhérence à l'endothélium sans engager de processus d'extravasation. Cependant, il est possible que la margination soit la première étape avant leur extravasation plus tardive dans les tissus. L'étude de la répartition des Mo dans les différents compartiments (vasculaire ou parenchymateux) tissulaire à des temps plus tardif au cours du sepsis reste à être exploré.

La baisse d'expression membranaire du CX3CR1 observée chez les patients septiques est associée à la sévérité de la maladie et est vue comme une des caractéristiques de l'immuno-suppression ou -dysfonction opérant plus tardivement au cours du sepsis (Pachot et al., 2008). Cependant, les mécanismes durant la phase tardive du sepsis menant à ces états sont encore mal connus.

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

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

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

ABSTRACT

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

J Am Soc Nephrol 27: 792–803, 2016. doi: 10.1681/ASN.2015010009

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

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

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

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

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

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

Copyright © 2016 by the American Society of Nephrology

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

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

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

RESULTS

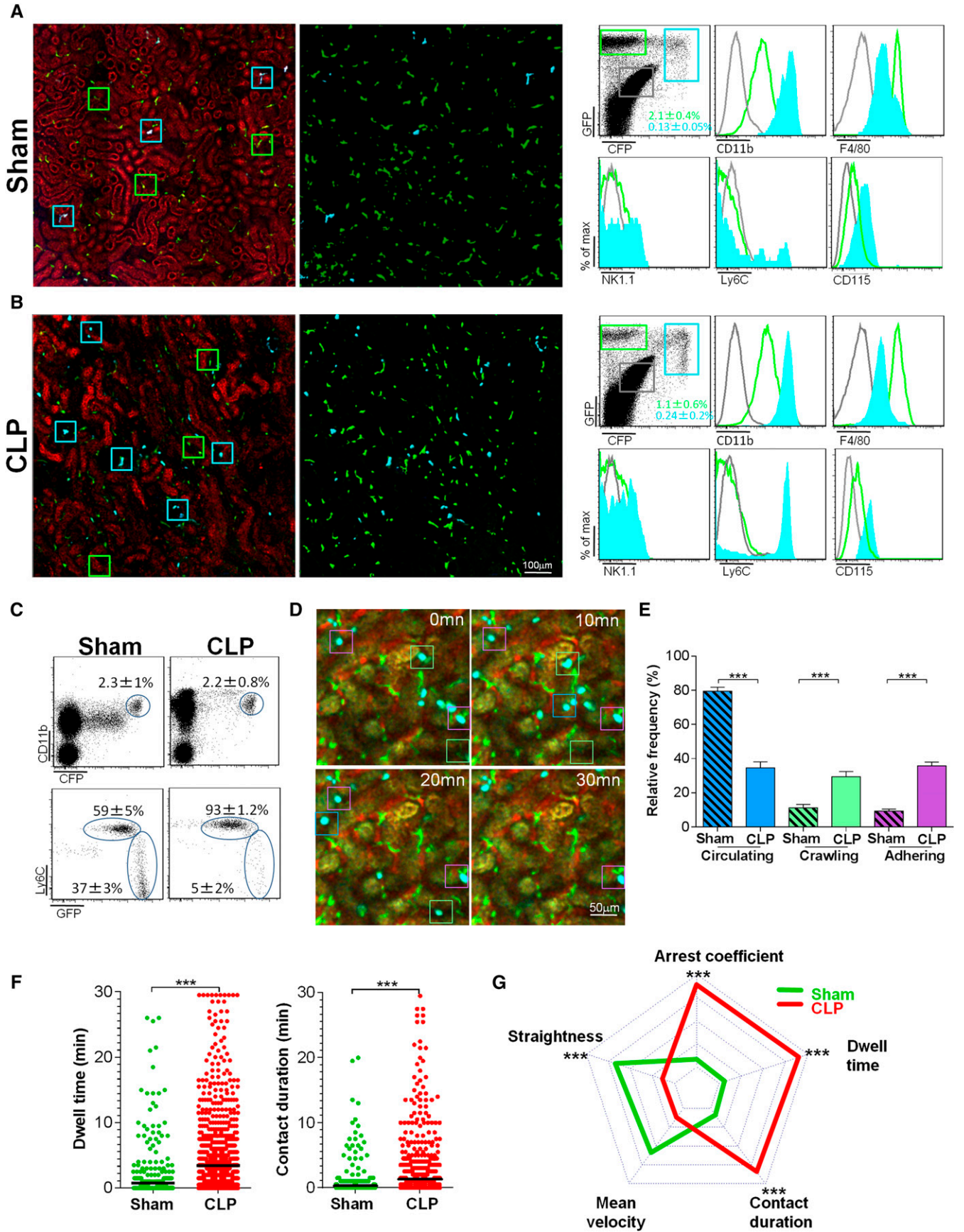
Ly6C^{high} Monocytes Exhibit Increased Adhesion to the Renal Endothelium during Sepsis

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

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

operated MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+} mice. In the MacBlue mouse,²⁰ all blood monocytes are strongly positive for enhanced cyan fluorescent protein (ECFP), whereas most tissue macrophages do not express the reporter protein.²¹ In contrast, renal DCs are CX3CR1⁺ and strongly express the green fluorescent protein (GFP) reporter.²² In the sham-operated group, two particular subsets of myeloid cells were distinguished in the renal cortex, according to their expression of GFP and/or ECFP: A dominant population of stellate GFP⁺ECFP^{neg} cells was evenly distributed throughout the tissue, while a few sparse GFP⁺ECFP⁺ cells were found (Figure 1A). GFP⁺ECFP^{neg} cells expressed high levels of F4/80 and low levels of CD11b, Ly6C, and CD115 and may correspond to renal interstitial DCs.^{18,19} The GFP⁺ECFP⁺ cell phenotypes were stellate or round in shape, were CD11b⁺CD115⁺F4/80^{low}, and expressed high or low levels of Ly6C (Figure 1A). Six hours after CLP, the number of GFP⁺ECFP^{neg} cells remained constant, and small, round intravascular GFP⁺ECFP⁺ cells (likely monocytes) accumulated in large numbers (Figure 1B). Of the blood ECFP⁺ cells in the sham-operated mice, 60% were CX3CR1^{low/dim}Ly6C^{high}, corresponding to the phenotype of inflammatory monocytes, and 40% were CX3CR1^{high}Ly6C^{low}, corresponding to the phenotype of patrolling monocytes. At 6 hours after CLP, >90% of the ECFP⁺ cells were Ly6C^{high} monocytes (Figure 1C). Time-lapse imaging of the kidneys of the sham-operated mice showed that numerous ECFP⁺ cells traveled through the cortex in the bloodstream, interacting very little with the endothelium, while the activity of renal DCs was strongly protrusive (Supplemental Movie 1). At 6 hours after CLP, renal DC behavior did not change, but the number of ECFP⁺ cells adhering to the luminal side of the vessel increased (Supplemental Movie 2). We defined three motility patterns of ECFP⁺ cells: circulating, crawling, and adhering (Figure 1D). Six hours after CLP, the proportion of circulating ECFP⁺ cells had fallen by >50%, while the proportion of crawling and adhering ECFP⁺ cells had increased above the levels in the sham-operated mice (Figure 1E). Mean dwell time and mean contact duration quadrupled (Figure 1F). Contact duration increased for ECFP⁺, but they were mainly released without any evidence of extravasation toward the kidney tissue.

Intravital imaging on CLP-operated MacBlue×*Cx3cr1*^{gfp/+}×*Ccr2*^{-/-} mice, defective for circulating Ly6C^{high} monocytes,²³ showed a near-complete abolition of the accumulation of ECFP⁺ adherent cells on the renal endothelium strongly suggests that they were Ly6C^{high} monocytes (Supplemental Movie 3). This phenotype was further confirmed by the intravital imaging of the combined *Cx3cr1*^{gfp/+}*Ccr2*^{gfp/+} mice, which showed that the adhering cells coexpressed red fluorescent protein (RFP) and GFP (Supplemental Movie 4). In *Ccr2*^{-/-} mice, Ly6C^{high} monocytes did not accumulate after CLP in blood or in the kidney. After CLP, Ly6C^{low} monocytes were more numerous in the blood of *Ccr2*^{-/-} mice than in wild-type (WT) mice, and their numbers were similar in the kidney for both groups (Supplemental Figure 2A). However, no ECFP⁺ cells adhering to the renal vascular wall were imaged in *Ccr2*^{-/-} mice, in contrast to WT mice (Supplemental Movie 3). Altogether these results indicate that Ly6C^{high}



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

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

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

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

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

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

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

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

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

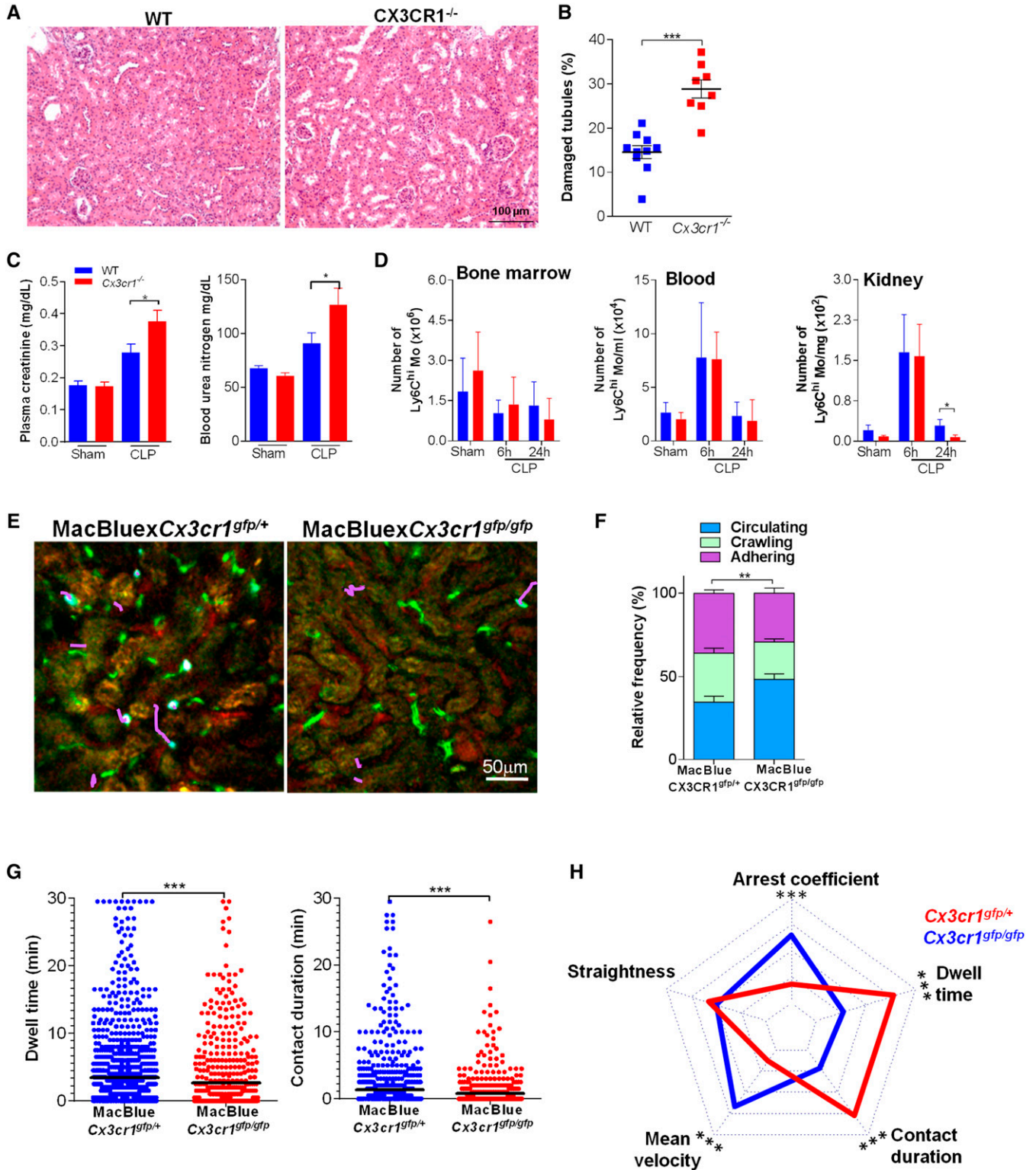


Figure 2. CX3CR1 promotes Ly6C^{high} monocyte adhesion and prevents renal damage during sepsis. (A) Photomicrographs and (B) quantification of kidney histologic lesions 24 hours after CLP in WT (blue) and *Cx3cr1*^{-/-} mice (red). Bars represent mean±SD (n=10 WT, n=8 *Cx3cr1*^{-/-}, from at least two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

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

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

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

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

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

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

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

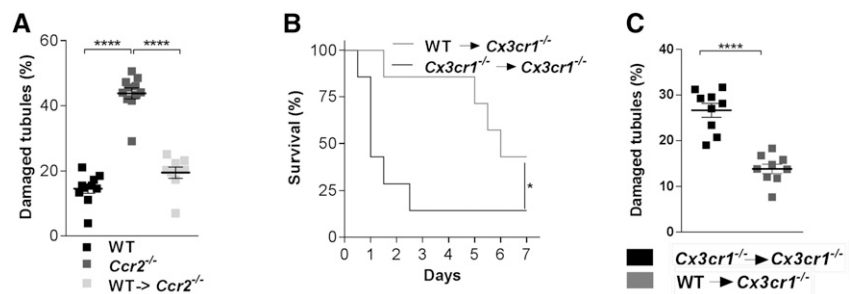


Figure 3. Bone marrow-derived monocytes protect against damage to kidney tissue during sepsis. (A) Quantification of kidney histologic lesions 24 hours after CLP in WT, *Ccr2*^{-/-} and *Ccr2*^{-/-} mice with adoptive transfer of WT bone marrow monocytes before surgery. Bars represent mean \pm SD ($n=10$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

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

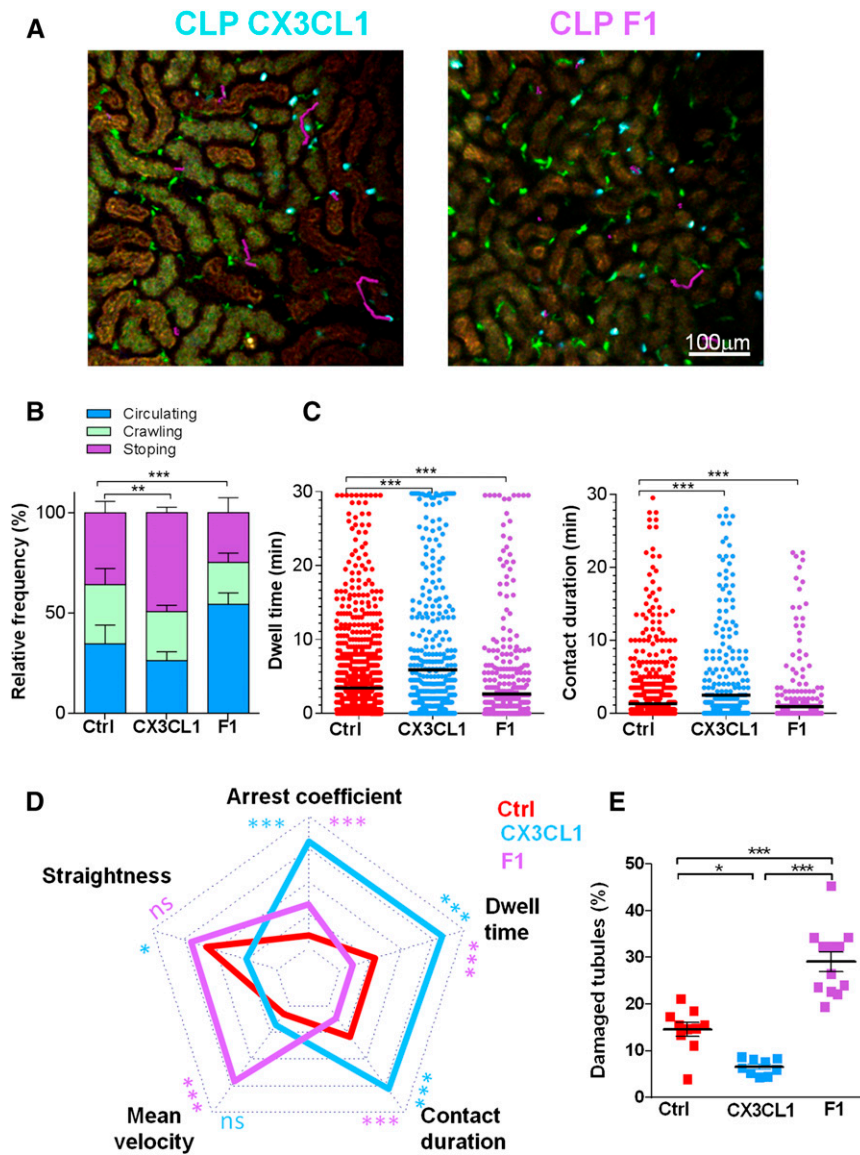


Figure 4. CX3CR1 activation controls Ly6C^{high} monocyte adherence and the outcome of CLP-mediated sepsis. (A) Two-photon laser scanning microscopic images with overlay of monocyte migratory tracks (pink) in kidney cortex of MacBlue×Cx3cr1^{gfp/+} mice treated with CX3CL1 or F1, 6 hours after CLP. ECFP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

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

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

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

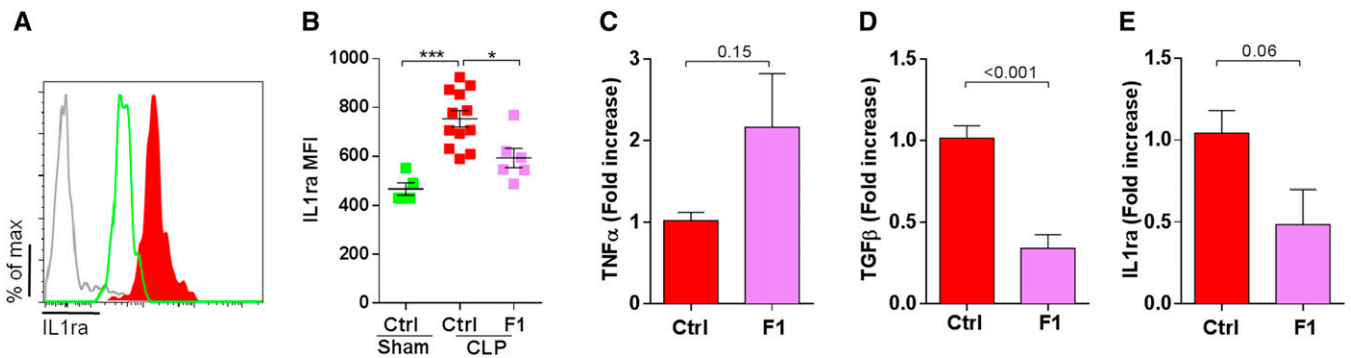


Figure 5. CX3CR1 blockade increases kidney inflammation and reduces IL-1ra production by Ly6C^{high} monocyte during sepsis. (A) Intracellular production of IL-1ra was evaluated by intracellular cytokine staining gated on CD11b⁺ Ly6G^{neg} NK1.1^{neg} Ly6C^{high} cells from sham-operated (green) and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

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

DISCUSSION

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

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

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

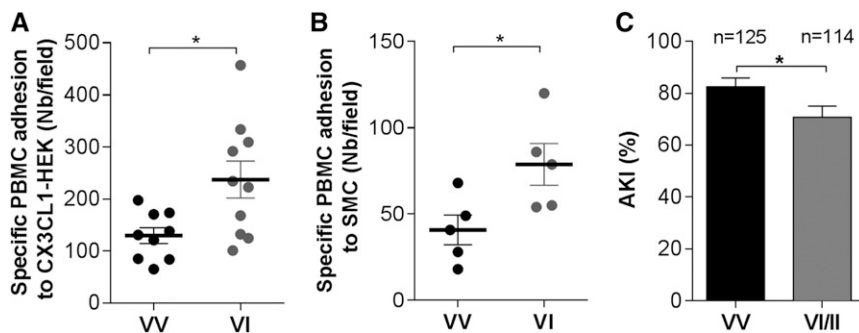


Figure 6. The proadhesive CX3CR1 I249 allele is associated with a reduced incidence of AKI in septic patients. PBMCs from individuals with CX3CR1 VV (black) or VI (gray) genotypes were assayed for adhesion with (A) CX3CL1-expressing HEK ($n=9$ –10 individuals) or (B) with adherent smooth muscle cells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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCISE METHODS

Experimental details are provided in the Supplemental Material.

Mice

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

Human Polymorphism Study

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

Polymicrobial Sepsis Induction

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

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

LPS Injection

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

Histologic Analysis

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

Flow Cytometry

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

Adoptive Transfer Experiments

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

Multiphoton Imaging

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

Statistical Analyses

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

DISCLOSURES

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

REFERENCES

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

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

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

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

Supplementary Online Material

Detailed Methods

Ethics Statement

For animal study

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

For human study

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

Mice. Male C57BL/6 mice were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, Saint Isle, France). $CX3CR1^{gfp/+}$ - $CCR2^{gfp/+}$ and $CCR2^{-/-}$ mice were kindly provided by Israel Charo (Gladstone Institute, San Francisco, USA)⁴⁷. $Cx3cr1^{-/-}$ C57BL/6 mice⁴⁸, $Cx3crR1^{gfp/+}$ and $Cx3cr1^{gfp/gfp}$ ⁴⁹, $Csf1r$ -Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue)⁵⁰, $MacBlue \times Cx3cr1^{gfp/+}$, $MacBlue \times Cx3cr1^{gfp/gfp}$ and $MacBlue \times Cx3cr1^{gfp/+}$ - $CCR2^{gfp/-}$ mice were bred in the Nouvelle Animalerie

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

Human cell preparation

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

Flow chamber adhesion of PBMC

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

inverted microscope (TE300, Nikon, France) equipped with a phase contrast 10x objective (Nikon, n.a. 0.25) and a cooled CCD camera (Sensicam, PCO, Kelheim, Germany). PBMC were incubated for 30 min at 37°C with 1 μ M 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) for labeling and resuspended in flow buffer (HBSS supplemented with, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 2 mg/ml BSA) at 2.10⁶ cells per ml. A syringe pump (PHD 2000; Harvard Apparatus, Les Ulis, France) drove 0.5 ml of cell suspension through the chamber at a wall shear stress of 1.5 dynes.cm⁻². Fluorescent images were recorded to count the adherent cells (excitation 450-500 nm, emission 510-560 nm, dichroic filter Q505lp, Chroma, Brattleboro, VT, USA). Specific adhesion to CX3CL1-HEK was calculated by subtracting the number of PBMCs adhering to the control HEK from the number of cells adhering to HEK-CX3CL1. Specific adhesion to activated SMC was calculated by subtracting the number of PBMCs adhering to the untreated SMC from the number of cells adhering to TNF α /IFN γ treated SMC.

Human Polymorphism study

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

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

Polymicrobial sepsis induction

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

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

Sterile inflammation model

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

Histological analysis

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

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

Mouse Cell preparation

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

Flow cytometry

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

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

qPCR

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

Adoptive transfer experiments

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

identical. Comparative adhesion of ECFP⁺ subset (WT phenotype) and ECFP⁺CMTMR⁺ subset (Cx3cr1^{-/-} phenotype) to the renal endothelium was measured by intravital imaging 6 h after the CLP. The number of ECFP⁺ and ECFP⁺CMTMR⁺ cells were calculated on static 3D images and normalized to the renal cortex volume and expressed as a percent of the number of Ly6C^{high} monocytes transferred. Fields were chosen when at least one adoptively transferred cell (ECFP⁺ or CMTMR/ECFP) was present. For kidney lesion measurement: bone marrow cells were extracted as previously described. Monocytes were negatively selected after removal of other cell types, with Ly6G, CD3, CD4, B220, DX5, and NK1.1 PE-labelled antibodies. Marked cells were then captured via a magnetic device for cell separation and anti-PE magnetic beads, according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). In all experimental conditions, mice were injected with 4-5×10⁶ monocytes just before the CLP procedure and monitored every 12 h for 7 days for survival or euthanized 24 h after the procedure for histological analysis.

Creatinine and urea quantifications

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

Multi-photon Imaging

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

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

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

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

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

Statistical analysis

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

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

Supplemental figure, table and video legends

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

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

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

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

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

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

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

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

Supplementary video 1

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

Supplementary video 2

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

Supplementary video 3

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

Supplementary video 4

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

Supplementary video 5

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

Supplementary video 6

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

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

Supplementary video 7

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

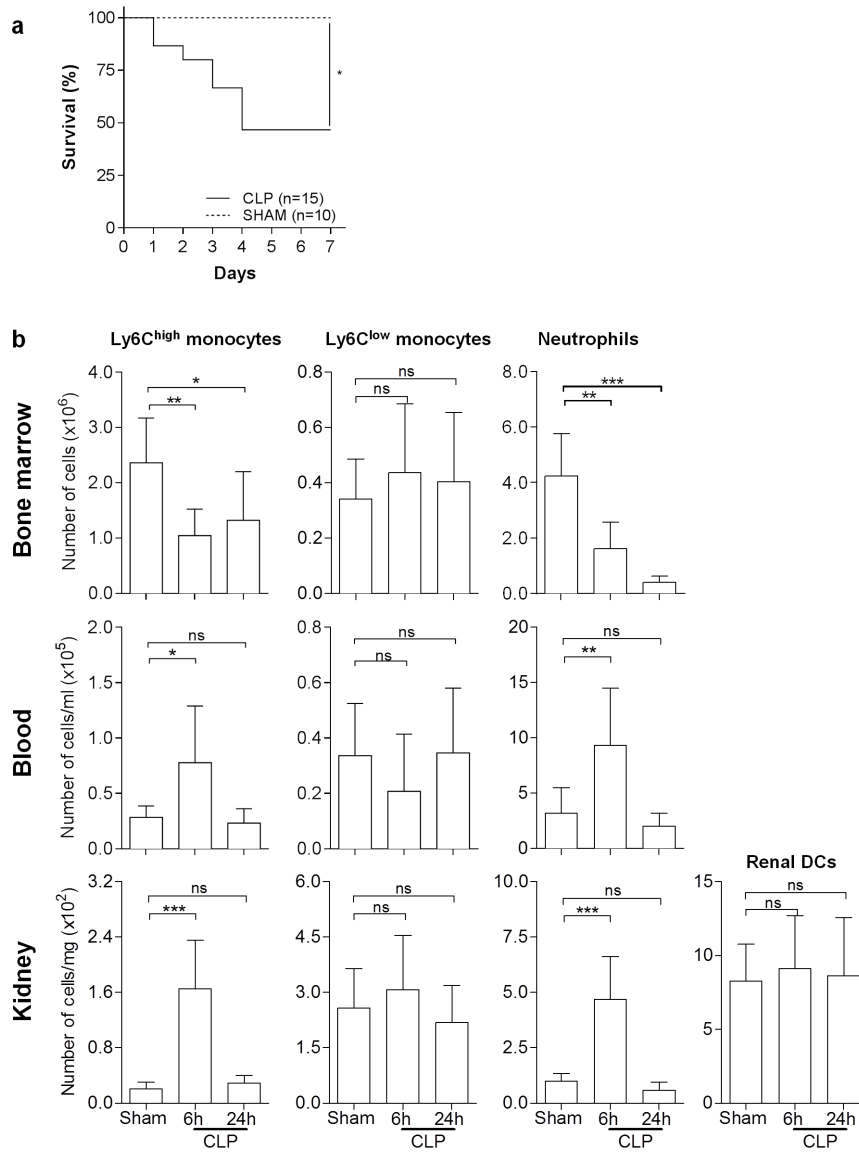


Figure S1 related to Figure 1. Effect of CLP on survival and myeloid cell mobilization

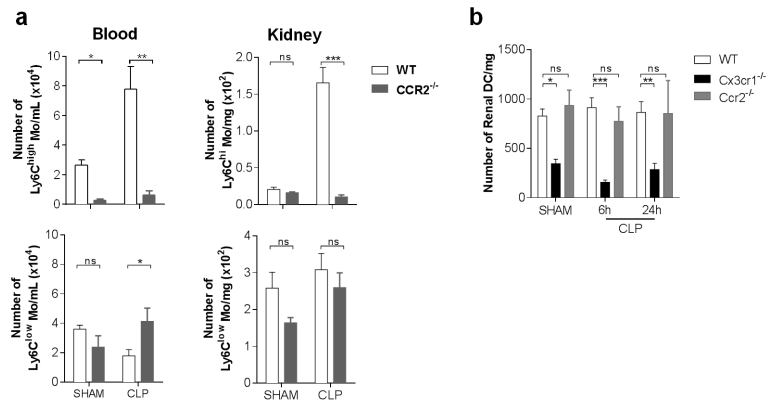


Figure S2 related to Figure 1 and 3. Comparative analysis of mononuclear phagocyte subsets in the mouse strains

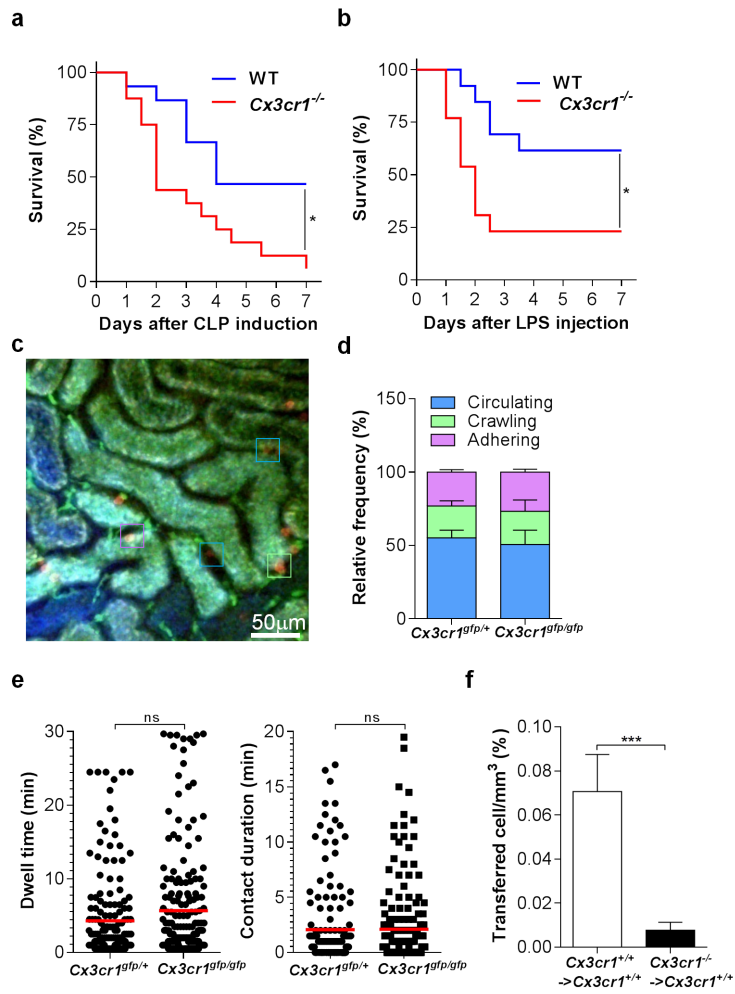


Figure S3 related to Figure 2. Role of CX3CR1 during polymicrobial sepsis

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

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

Article 2: Late expansion of inflammatory monocytes in sepsis leads to defective immune responses following pulmonary second infection.

Version préliminaire

Contexte de l'étude

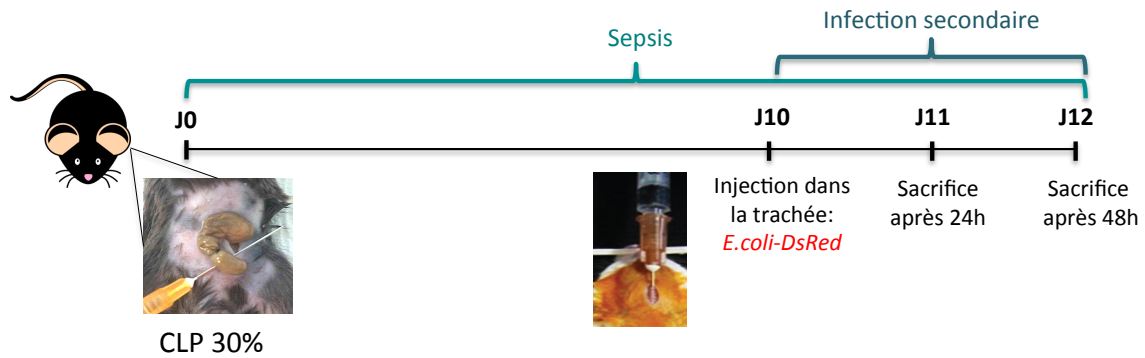
Les patients atteints de septicémie qui survivent au choc septique et à la défaillance des organes sont particulièrement sensibles aux infections nosocomiales caractéristiques de la phase tardive dite « immunosuppressive » de la maladie. Ces infections secondaires touchent principalement les voies respiratoires chez les patients hospitalisés en réanimation (pneumopathie acquise sous ventilation mécanique).

L'étude de l'atteinte rénale aiguë au cours du sepsis murin précoce montre un rôle protecteur des Mo inflammatoires via des mécanismes d'adhésion dépendants du récepteur de chimiokine CX3CR1. Si l'immunité innée est considérée comme prépondérante dans la phase aiguë du sepsis, on attribue plutôt une action de l'immunité adaptative dans le développement de l'immunosuppression. Cependant, le rôle des cellules de l'immunité innée et en particulier des Mo inflammatoires ainsi que les mécanismes impliqués menant à la phase « immunosuppressive », sont encore mal connus. Nous avons étudié la cinétique de recrutement, la localisation et la caractérisation phénotypique des Mo afin de déterminer leur rôle dans les processus inflammatoires tardifs et lors d'une infection bactérienne pulmonaire secondaire au sepsis.

Principes expérimentaux

Sepsis polymicrobien (CLP) et infection pulmonaire secondaire :

Cette étude a été réalisée comme précédemment à l'aide d'un modèle de sepsis polymicrobien murin (CLP). Pour cette étude, les CLP sont réalisées à 30% de la longueur du caecum afin d'atteindre une chirurgie sublétales proche des 10% de mortalité. Pour toutes les expériences, des souris « contrôles opératoires » dites sham sont utilisées. La seconde infection est réalisée 10 jours après les CLP afin de mimer une infection nosocomiale pulmonaire secondaire au sepsis. Les souris sont injectées par voie intratrachéale avec des bactéries *Escherichia coli* fluorescentes (*E. coli-DsRed*) ou avec du PBS stérile (contrôle), 24h et 48h avant leur sacrifice.



Modèles murins :

Les lignées de souris utilisées sont identiques à celles du précédent article.

Étude de l'infiltration des cellules pulmonaires:

Afin de distinguer les cellules marginées et/ou circulantes dans le compartiment vasculaire pulmonaire de celles présentes dans le parenchyme, nous avons réalisé des expériences dites de « blood/tissue partitioning » (Anderson et al., 2014; Rodero et al., 2015). Un anticorps anti-CD45 est injecté en intraveineux 2 minutes avant le sacrifice des souris de façon à marquer tous les leucocytes du réseau vasculaire (cellules CD45^{vivo+}). L'analyse des cellules CD45^{vivo+} et CD45^{vivo-} est réalisée par cytométrie en flux. L'utilisation de la microscopie biphotonique nous a permis de visualiser la localisation des Mo (EGFP⁺ECFP⁺) dans les différents compartiments pulmonaires après un sepsis tardif et lors d'une infection secondaire par *Escherichia coli*. La vascularisation est observable grâce à l'injection d'un anticorps anti-CD31 en intraveineux (spécifique des cellules endothéliales vasculaires) quelques minutes avant le prélèvement et l'imagerie des poumons.

Principaux résultats

Recrutement des monocytes Ly6C^{high} au niveau du réseau vasculaire du poumon au cours du sepsis tardif.

La cinétique de recrutement des Mo inflammatoires (Mo Ly6C^{high}), des Mo résidents (Mo Ly6C^{low}) et des PMN dans la moelle osseuse, la rate, le sang et les

poumons a été étudiée par cytométrie en flux après réalisation des CLP. Ainsi, nous avons observé une cinétique de recrutement des Mo Ly6C^{high} et des PMN en deux vagues. Un premier pic est observé entre 6h et 24h dans le poumon, suivi d'une diminution de leur nombre à 4 jours. Plus tard, à partir du 7ème jour, une accumulation systémique (poumons, foie, reins, moelle osseuse, rate et sang) de ces cellules est observée avec un pic à 10 jours (**Figure 1 b et c**).

L'utilisation de souris déficientes pour les récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 nous a permis de mettre en évidence que le recrutement tardif des Mo Ly6C^{high} était complètement altéré ou fortement impacté sans affecter le recrutement des autres populations myéloïdes telles que les PMN et les macrophages alvéolaires. La forte accumulation des Mo dans les organes tels que le poumon pourrait suggérer une infiltration cellulaire des tissus. De façon surprenante, grâce aux expériences de « blood/tissue partitioning » nous avons pu mettre en évidence que les Mo recrutés 10 jours post-CLP sont localisés à 96.3±8% dans le réseau vasculaire pulmonaire (**Figure 3 b et c**). L'imagerie 3D du poumon nous a permis de confirmer la localisation vasculaire des cellules. De plus, l'analyse par cytométrie en flux des Mo Ly6C^{high} a montré une forte diminution de l'expression des marqueurs d'activation cellulaire CMH-II et CX3CR1 chez les souris septiques par rapport aux sham.

La mobilisation tardive au niveau du réseau vasculaire pulmonaire des Mo inflammatoires au cours du sepsis est dépendante des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 et est caractérisée par des modifications phénotypiques cellulaires importantes.

Les monocytes Ly6C^{high} au cours du sepsis tardif sont immuno-incompétents face à une infection secondaire.

Afin de mettre en évidence le rôle des Mo Ly6C^{high} vasculaires accumulés dans le poumon une seconde infection a été réalisée. Ainsi, les souris sham et CLP ont été injectées en intratrachéale avec des bactéries *E. coli* fluorescentes (DS-Red) au moment du pic d'accumulation monocyttaire (J10). Suite à l'infection les souris septiques montrent une mortalité de l'ordre de 20% par rapport aux sham qui elles, résistent complètement à l'infection secondaire (**Figure 4a**). L'augmentation de la mortalité est associée à une augmentation du poids des poumons et à une diminution de la clairance

bactérienne. Cependant, l'absence de recrutement de Mo Ly6C^{high} chez les souris Ccr2^{-/-} corrèle avec une très forte mortalité de ces souris après la CLP de l'ordre de 46% et à la seconde infection avec 100% des survivantes à la CLP qui meurent. L'accumulation des Mo 10 jours après un sepsis polymicrobien est donc essentiel à la survie des souris mais celui-ci ne permet pas pour autant une protection des souris face à une infection secondaire pulmonaire.

48h après l'infection par *E. coli*, le recrutement des Mo Ly6C^{high} au niveau pulmonaire augmente chez les souris sham alors qu'aucun recrutement supplémentaire n'est visible chez les souris septiques. De plus, nous observons une infiltration des cellules dans le parenchyme pulmonaire entre 24h et 48h. Cependant, les Mo Ly6C^{high} des sham et des CLP infiltrent le parenchyme en proportion égale (**Figure 4d**).

L'étude du phénotype des Mo infiltrés par rapport aux cellules vasculaires du poumon a été réalisée 48h après l'infection secondaire. Ainsi, l'infection par *E. coli* des souris sham ou CLP conduit à une augmentation de l'intensité de fluorescence des marqueurs d'activation (CD64 et CMH-II), de co-stimulation (CD80 et CD86) et d'inhibition (PDL1) spécifiquement sur les Mo qui ont infiltré le parenchyme pulmonaire. Cependant, l'expression des marqueurs CMH-II, CD80, CD86 et PDL1 est fortement diminuée sur les Mo infiltrés septiques par rapport aux contrôles sham (**Figure 5a**).

Suite à l'infection des voies aériennes, les cellules qui infiltrent le parenchyme pulmonaire montrent des événements de phagocytose. Une diminution du nombre et de la proportion de Mo ly6C^{high} *E.coli*⁺ est observée chez les souris septiques par rapport aux souris contrôles sham (**Figure 5 d**).

Le défaut de phagocytose ainsi que la faible expression du CMH-II et des molécules de costimulation traduisent un défaut d'activation des Mo Ly6C^{high}. Leur faible immunogénicité limite sans doute l'induction de la réponse adaptative au cours du sepsis tardif.

Conclusion et perspectives

Les souris survivantes à la phase aiguë et au choc septique présentent un fort recrutement monocytaire de façon systémique 10 jours après le déclenchement de la maladie. Le recrutement des Mo Ly6C^{high} au niveau du réseau vasculaire pulmonaire est vu dépendant de phénomènes inflammatoires et est contrôlé par les récepteurs aux

chimiokines CCR2 et CX3CR1. Lors de l'infection secondaire, les Mo septiques montrent un défaut d'activation au niveau phénotypique et fonctionnel. Cet état d'activation est associé à une susceptibilité accrue des souris à la seconde infection. Ainsi, l'accumulation tardive des Mo inflammatoires serait caractéristique de la phase tardive du sepsis et participerait activement à la paralysie du système immunitaire.

Nous supposons que le dysfonctionnement des Mo inflammatoires recrutés tardivement au cours de la maladie soit étroitement relié à la mort des souris après la seconde infection. Afin de valider cette hypothèse, nous allons réaliser des transferts de Mo issus de souris sham ou septiques dans des souris *Ccr2*^{-/-} avant l'infection bactérienne pulmonaire. Ainsi, le repeuplement du poumon par des Mo « opérationnels » issus des sham devrait sauver les souris *Ccr2*^{-/-} de l'infection contrairement aux Mo septiques dit « dysfonctionnels ».

L'étude phénotypique des Mo au cours de la seconde infection s'est concentrée sur l'analyse de certains marqueurs cellulaires de surface par cytométrie en flux. Une analyse transcriptomique plus large permettrait de mieux caractériser le profil d'expression génique des Mo vasculaires et infiltrés au cours de la maladie. Dans notre étude les neutrophiles ont une cinétique de mobilisation proche de celle des Mo Ly6C^{high} sans être sous le contrôle des récepteurs CCR2 et CX3CR1. Cependant, certaines études montrent que le trafic des Mo et des PMN en condition inflammatoire serait interdépendant (Maus et al., 2003; Wang et al., 2015b). Les interactions monocytes/neutrophiles au cours du sepsis sont peu connues et mériteraient une étude approfondie.

Au cours de notre étude précédente, nous avons caractérisé le rôle protecteur des Mo lors de la phase aiguë du sepsis grâce à l'étude de leur mobilité au niveau rénal. Il serait intéressant de pouvoir quantifier la dynamique des Mo dans le poumon au cours du sepsis tardif et suite à une infection secondaire. Cependant, notre technique d'imagerie du poumon explanté ne nous permet pas cette étude car le flux sanguin est inexistant. La mise au point de l'imagerie *in vivo* du poumon sur souris anesthésiée nous permettrait cette quantification.

Late expansion of inflammatory monocytes in sepsis leads to defective immune responses following pulmonary second infection

Camille Baudesson de Chanville¹, Benjamin Glenn Chousterman², Pauline Hamon¹, Marie Laviron¹, Sandrine Barthelemy¹, Alexandre Boissonnas¹ and Christophe Combadière¹.

1 Sorbonne Université, Inserm, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Cimi-Paris, F-75013, Paris, France.

2 Inserm UMRS 1160, Département d'Anesthésie-Réanimation, Hôpitaux Universitaires Lariboisière-Saint-Louis, AP-HP, F-75010, Paris, France.

Corresponding author: christophe.combadiere@upmc.fr

Abstract

Sepsis is characterized by systemic inflammation leading to immune dysfunction, which can favor the emergence of secondary infections. Monocytes (Mo) have a crucial role in inflammatory responses and may be key regulators of sepsis-induced immune dysfunction. We investigated the impact of primary sepsis; first, on Mo mobilization in a murine polymicrobial infectious model (cecal ligation and puncture, CLP), and second, on Mo functions in a subsequent lung infection. We showed a two-steps myeloid cell redistribution in lung after CLP. The first wave occurred a few hours after surgery, lasted for 2-3 days and was associated with myeloid cell release from the bone marrow and the spleen. This was followed by a second wave of larger amplitude and of longer duration involving mainly inflammatory Mo (Ly6C^{high} Mo) and polymorphonuclear neutrophils (PMN). The late mobilization of Ly6C^{high} Mo was driven by inflammatory signals and controlled by the CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes. The Mo were found exclusively in the vascular compartment and displayed reduced expression of activation markers such as MHC II and CX3CR1. Compared to sham-operated mice, CLP-operated mice displayed increased mortality in response to a secondary *E. coli*-induced pneumonia associated with increased lung bacterial load and a defective cytokine environment. Ly6C^{high} Mo from septic mice showed limited activation capacity with reduced expression of co-stimulation markers and defective phagocytic activity compared to Mo from control mice. Our results indicate that primary sepsis led to two consecutive waves of Mo redistribution. The second myeloid

mobilization extended long after apparent clinical mouse recovery from primary sepsis, led to vascular trapping into the organs of Mo with limited activation capacity and impaired phagocytic functions. Our work contributes to the current model suggesting that a primary infection imprints myeloid cell location and functions for future secondary infections.

Introduction

The new international recommendations defined sepsis as life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection¹. Sepsis is the major cause of admission and death in the intensive care unit (ICU)². An initial hyper-inflammatory phase follows recognition of the pathogen and is progressively replaced by long-term immunosuppression leading to prolonged sensitivity to superinfections³. In the immunosuppressive phase a great number of deaths is due to the acquisition of secondary nosocomial infection^{4,5}. Indeed sepsis-induced immunosuppression may alter the mechanisms of pulmonary response and promote nosocomial pneumonia^{6,7}. Recent works have focused on a more complex understanding of how dysfunction in both the innate and adaptive systems may contribute to a poor outcome in sepsis. The late phase of sepsis is characterized by T cell exhaustion and a relative increase of regulatory T cells^{7,8}, a quantitative defect of dendritic cells^{9,10} and deactivation of monocytes, as evidenced by reduced expression of HLA-DR^{1,12} and antigen presentation¹³.

The immature myeloid cells accumulating after sepsis were termed myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and have immunosuppressive properties^{14,15}. The MDSC population consists of a mixture of myeloid cells such as granulocytes, monocytes, macrophages, and dendritic cells, with a potent ability to suppress T cell responses¹⁶. Characterization of MDSC is confusing because MDSCs produce a range of pro- and anti-inflammatory cytokines and often express increased levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), arginase, and ROS, all of which are important for innate immunity cell functions¹⁷. The present study examined the distinct role of immune cells in MDSC subset. Our previous work showed that inflammatory monocytes (Ly6C^{high} Mo) emigrate from the bone marrow and induce monocytosis accompanied within a few hours by enhanced CX3CR1-dependent adhesion to renal cortex endothelium. The protective role of inflammatory monocytes against the distant kidney damage caused by early sepsis inflammation was highlighted¹⁸. But the role

of inflammatory monocytes in late sepsis and immune responses leading to immunosuppression phase deserve more investigation.

The sepsis-induced immune defect has been described in various subsets of immune cells using murine lethal models. However, these models do not closely recapitulate the clinical setting of sepsis where mortality rate from sepsis is not as elevated. The long-term susceptibility of sepsis mice induced by sublethal cecal ligation and puncture (CLP) was investigated by inducing a secondary bacterial lung infection after sepsis. The kinetics of organ invasion by Ly6C^{high} Mo, Ly6C^{low} Mo and neutrophils (PMN) in long-lasting sepsis has been examined. Because, Lung vasculature represents a major site for monocyte margination after lipopolysaccharide (LPS) stimulation^{19,20}, we have studied the phenotype and functions of recruited pulmonary intravascular or parenchymal monocytes during sepsis and secondary infection.

Results

Polymicrobial sepsis induces a late expansion of inflammatory Mo and of polymorphonuclear neutrophils in the blood and organs.

We thought to further characterize the myeloid composition of the blood and some organs during sepsis by analyzing the proportion of inflammatory and resident Mo and polymorphonuclear neutrophils (PMN). We used a classical murine model of abdominal sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) that results in polymicrobial bacteremia and inflammation^{21 22}. In the chosen conditions, about 10% of the mice succumbed to sepsis in four days (supplementary Figure 1a). The myeloid distribution was analyzed by flow cytometry using a conventional gating strategy (Figure 1a). Few hours after sepsis induction (Figure 1b, left panels), Ly6C^{high} Mo number decreased in the bone marrow (BM; upper panels) and the spleen (upper middle panel) and remained low until day 5. During this period, Ly6C^{low} Mo number remained fairly constant in these tissues. Numbers of blood Ly6C^{high} and Ly6C^{low} Mo remained also stable for the first few days after sepsis (lower middle panel) whereas both Mo subpopulations first accumulated rapidly into the lungs (day 1-2; first wave) and returned to baseline by day 5 (lower panel). Seven days after CLP, the numbers of Ly6C^{high} Mo increased dramatically in all tissues; bone marrow (~twofold), blood (~fiftyfold), spleen (~threefold) and lungs (~twentyfold) peaking between 10 to 15 and returning back to sham values by day 50. Again, variations in the number of Ly6C^{low} Mo were modest at later time points (7-50 days) compared to that of Ly6C^{high} Mo. PMN underwent a kinetics of

mobilization similar to that of Ly6C^{high} Mo in all four studied tissues (Figure 1b, right panels). During this period, alveolar macrophage number dropped massively between 4 and 20 days (supplementary Figure 1b). Strong accumulation of both Ly6C^{high} Mo and PMN was also observed by day 10 in the kidneys (~fivefold and tenfold respectively) and in the liver (~fortyfold and thirtyfold respectively) (Figure 1c).

Globally, CLP induced two waves of accumulation of Ly6C^{high} Mo and PMN in lungs; an early and short wave associated with cell release from both the bone marrow and the spleen, and a late and long-lasting wave associated with cell amplification in the bone marrow, the spleen, the blood and organs such as the lung, the liver and the kidneys.

Late expansion of inflammatory Mo requires inflammatory pathways.

Expansion of both Mo and PMN in septic conditions is proposed to originate from bone marrow precursor²³ but in some conditions, spleen was shown to develop extra medullary myelopoiesis²⁴. After splenectomy (Figure 2a), CLP triggered an increase in Ly6C^{high} Mo number in all organs tested (blood, lungs and bone marrow) that is similar to that measured in non-splenectomized CLP-operated mice. These data indicate that spleen is dispensable in the CLP-elicited Mo expansion and suggest that this phenomenon may rely solely on the bone marrow. We thought to identify what drives Mo expansion after CLP. Because, both infections and inflammation are known to elicit changes in myelopoiesis and mobilization, CLP-operated mice were treated with antibiotic and/or anti-inflammatory drugs. The antibiotherapy with a broad-spectrum antibiotic treatment did not alter late expansion of inflammatory cells (Figure 2a), whereas combined anti-inflammatory + antibiotic treatment strongly reduced Ly6C^{high} Mo number in both blood and lungs. In contrast, PMN numbers were not statistically altered in these conditions (Figure sup 2a). In the bone marrow, neither Ly6C^{high} Mo nor PMN numbers were altered by combined antibiotic and anti-inflammatory treatment. These results led us to speculate that inflammation may elicit Mo expansion and that anti-inflammatory drugs may selectively prevent Mo mobilization from the bone marrow. We next thought to identify inflammatory chemokine receptors leading to inflammatory Mo mobilization (Figure 2b). As expected, we observed that sham-operated *Ccr2*^{-/-} or *Cx3cr1*^{-/-} mice displayed less Mo in the blood and lung^{20,25,26}. A modest Ly6C^{high} Mo accumulation was only observed in the bone marrow of sham-operated *Ccr2*^{-/-} mice and not in that of *Cx3cr1*^{-/-} mice. In septic mice, Mo late expansions were totally or partially reduced in the blood or the lungs of *Ccr2*^{-/-} or *Cx3cr1*^{-/-} mice, respectively, with no change in the BM compartment. Additionally, no change in BM, blood and lung PMN numbers were observed

in *Ccr2*^{-/-} nor in *Cx3cr1*^{-/-} mice compared to WT mice (Figure sup 2b). Moreover, ten days after CLP, the decreased number of alveolar macrophages is similar to WT mice (Figure sup 2c). Globally, CLP-induced inflammation may selectively elicit Mo expansion and mobilization using both CCR2 and CX3CR1-dependent pathways.

Late-expanded Mo remain intravascular in the lung of septic mice

Expansion of the bone marrow hematopoietic stem and progenitor cells after sepsis was previously characterized based on the expression of CD150 and CD135²³. But not much attention was given to the specific phenotype of Mo populations in the lung at later time points. Ten days after CLP (Figure 3a), MHC class II expression on Ly6C^{high} Mo was reduced by more than 50% as previously reported^{11,12}. CD64 and CD62L remained unchanged whereas CD11b was modestly increased. CX3CR1 expression was only reduced by 20% compared to sham-operated mice whereas GFP (expressed under the CX3CR1 promoter in *CX3CR1*^{gfp/+} mice) was severely reduced as reported²⁷. We suspected that the late expansion of lung Mo might lead to tissue infiltration. In order to further discriminate lung Mo from circulating Mo, we performed blood/tissue partitioning using *in vivo* CD45 labelling as reported by us²⁵ and others^{28,29}. The vast majority of blood and lung Mo either in sham- or CLP-operated mice were strongly positive for CD45 antibodies injected intravenously two minutes before the sacrifice (Figure 3b) indicating that the Mo were fully vascular and did not infiltrate tissue in septic mice. Similar results were obtained with Ly6C^{low} Mo (Figure sup 3a) and PMN (Figure sup 3b). Phenotypic analysis of late-expanded Mo in polymicrobial sepsis revealed that Ly6C^{high} Mo remained fully vascular and displayed reduced expression of cell activation markers such as MHC class II and CX3CR1. We previously used MacBlueXCx3cr1^{gfp/+} mice in multiphoton intravital imaging on lungs to distinguish Mo from resident macrophages²⁵. In order to better characterize lung Mo localization, we performed live imaging on explanted lungs of sham- and CLP-operated MacBlueXCx3cr1^{gfp/+} mice (Figure 3c). Immunofluorescence analysis showed few small cyan round-shaped Mo (ECFP⁺EGFP⁺) in the red-stained vasculature (upper left picture and 5X magnification below) escorted by larger round-shaped alveolar macrophages (also cyan but localized exclusively in the alveolar lumen) in the lung of sham-operated MacBlueXCx3cr1^{gfp/+} mice. Very rare green cells (resident macrophages) could be detected (none on the chosen field in figure 3c). In septic mice, Mo strongly accumulated in the lung compared to sham-operated mice (upper right picture and 5X magnification below). Most of the alveolar lumens were devoid of alveolar macrophages confirming flow cytometry data. In addition, this approach showed that

most, if not all, Mo that accumulated in the lung remained intravascular and did not infiltrate the stroma (see insert). Videomicroscopy identified two distinct dynamic behaviors; cells with ovoid shape were static whereas those with snake shape crawled along the microvessels (Figure sup 3c). Both flow cytometry and microscopy analyses revealed that in septic mice, inflammatory Mo invaded the lung but remained fully vascular and did not infiltrate lung (parenchyma and stroma) tissues nor alveolar space.

Primary sepsis undermines inflammatory responses to a secondary infection without altering Mo infiltration

Septic patients are at higher risk to develop secondary nosocomial infection ⁷. To determine whether mice are more susceptible to pneumonia after sublethal CLP, they were infected with *E. coli* by intratracheal injection (10 days post-CLP) and the survival rates of each group were evaluated (Figure 4a). Sham-operated mice were fully resistant to the second challenge whereas about 20% of CLP mice died during the first weeks. This excess of mortality was associated with an increased lung weight (Figure 4b) and bacterial lung load in bronchoalveolar lavage (BAL) (Figure 4c) from CLP mice 48 h after infection with *E.coli*. These results confirmed that sepsis triggers increased susceptibility and severity to secondary infections.

Because Mo recruitment is associated with disease severity in chronic inflammation ^{30,31} we used *Ccr2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{gfp/gfp} to study the impact of Mo mobilization in response to the secondary challenge. *Ccr2*^{-/-} mice were more susceptible to CLP with about 46% mortality by day 10 and succumbed rapidly to second infection with 100% of death by day 4 post-secondary infection (Figure 4a). *Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice also displayed increased mortality in both primary (20%) and secondary challenge (40%). Susceptibility to secondary infection was thus inversely proportional to the extent of Mo expansion with *Ccr2*^{-/-} mice highly susceptible to secondary infections displaying no late amplification after CLP and *Cx3cr1*^{gfp/gfp} mice less susceptible displaying a modest Mo expansion post CLP. We next determined whether myeloid cells that accumulate in the lung vasculature could be mobilized after *E. coli* infection (Figure 4d). In sham-operated mice, *E. coli* injection triggered a massive accumulation of vascular (CD45^{vivo}⁺) Ly6Chigh Mo and a strong tissue infiltration (CD45^{vivo}⁻) at 24h post *E. coli* infection. Total accumulation of Mo seemed to plateau by day 2 whereas Mo that infiltrated the lung still increased. As previously described in Figure 3, septic mice already displayed increased number of lung vascular Mo before the second challenge. After *E. coli* infection, no additional accumulation was detected and infiltration

was not significantly different from that of sham-operated mice. Surprisingly, even though septic mice exhibited an increased number of vascular Mo, those did not show any altered capacity to infiltrate into the lung tissue at 24 and 48 hr.

We then analyzed transcripts levels for chemokines and cytokines to identify potential defect leading to increased susceptibility and severity of septic mice to secondary infections (Figure 4e). Ten days after surgery, only CCL2 transcript levels remained statistically more abundant in the lung of CLP-operated mice compared to those of sham-operated mice. *E. coli* infection triggered a massive increase in transcript levels for CCL2, iNOS and IL-6, a very modest increase on IL-10 transcripts but totally abrogated IL-4 transcript expression. It had no effect on TGF β transcripts. Interestingly, lung of septic mice had less abundant transcripts for iNOS and IL-6 than sham-operated mice whereas CCL2 transcript levels were unaffected. Globally, the data indicate that increased susceptibility and severity of septic mice to secondary infections is associated with defective cytokine environment rather than with a defective infiltration.

In septic mice, infiltrated inflammatory Mo shows limited activation profile and displays defective phagocytic activity.

We next compared the activation phenotype of infiltrated and vascular Ly6C^{high} Mo in lungs 48 h after secondary infection in sham- and CLP-operated mice (Figure 5). Representative overlays (upper panels) and mean fluorescence intensity analysis (lower panels) reveal that in sham- or CLP-operated mice, all activation markers tested were more intensively expressed on infiltrated (CD45^{vivo}⁻) than on vascular (CD45^{vivo}⁺) Mo. However, both vascular and infiltrated Mo from septic mice displayed severely reduced expression of MHC-II and of the co-stimulation markers CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) and PDL-1 (B7-H1). Only CD64 expression was unaffected by CLP. Our results indicated that inflammatory Mo activation was severely hampered in the lung of septic mice compared to control mice.

Because the *E. coli* we used for the secondary infection were fluorescent, we thought to study phagocytic activity of Ly6C^{high} Mo. Figure 5b confirmed phagocytosis events using histological lung section from Cx3cr1^{gfp/+} mice 48 h after *E. coli* infection. Green myeloid cells (upper panel with 10X magnification in the lower panel) that were engaged in *E. coli* (red fluorescence) phagocytosis events appeared in yellow on merge pictures. Phagocytic Ly6C^{high} Mo were quantified by flow cytometry (Figure 5c). Twenty-four hours after *E. coli* infection, very few infiltrated Ly6C^{high} Mo (CD45^{vivo}⁻) were associated with *E. coli* staining (CD45^{vivo}⁻ *E. coli*⁺) in sham and CLP-operated mice (Figure 5c). At 48 h, many more

Ly6C^{high} Mo were infiltrated and positive for *E. coli* in both control and septic mice. Quantitative analysis (Figure 5d) indicated that *E. coli* phagocytosis by Ly6C^{high} Mo was reduced in septic mice compared to control mice, in both absolute numbers and percents. These results indicated that phagocytic activity of Mo is reduced during late sepsis.

Discussion

Improvement in sepsis treatments led to an increasing number of patients who survived to this life-threatening conditions. However, their survival is impaired by increased risk of recurrent infections, heart failure and additional debilitating conditions³². The Reasons for such deteriorations are multifactorial but post-septic impaired immune functions are suspected to have a major impact in patient health impairments. Here we used a sublethal polymicrobial sepsis murine model followed by bacterial *Escherichia Coli*-induced pneumonia to investigate the role of innate immune cells in late immunosuppression.

Our study revealed a two-steps myeloid cell redistribution after CLP; the first wave was associated with early acute clinical events (severe weight loss and death) and the second one appeared much later during recovery, with no obvious sign of disease. Indeed, CLP triggered an early and transitory mobilization of Mo and PMN in the lung. This was associated with cell release from both the bone marrow and the spleen into the blood. Later on, a long-lasting mobilization of Mo and PMN was associated with cell accumulation in all organs studied. This phenomenon was driven by inflammatory signals and was dependent on major chemokine axes controlling Mo deployment namely the CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes. Flow cytometry and microscopy analyses revealed that Mo remained strictly vascular and displayed reduced expression of activation markers such as MHC II and CX3CR1. Septic mice displayed increased mortality to a secondary challenge associated with a defective cytokine environment. Mo from septic mice showed limited activation capacity with reduced expression of costimulation markers and defective phagocytic activity. Globally, sepsis-induced inflammation led to the vascular accumulation of inflammatory Mo with impaired phagocytic functions leading to defective bacterial clearance and excessive mortality.

Studies have shown that inflammatory Mo are involved in controlling inflammation in gram-negative pneumonia and abdominal infections^{33–35}. In accordance with the protective role of Ly6C^{high} Mo during bacterial infections, our previous work showed the renoprotective

role played by Ly6C^{high} Mo during the early phase of sepsis¹⁸. However, the role of myeloid cells and in particularly Ly6C^{high} Mo in lung during late sepsis and the immunosuppression phase has not been described yet.

Previous works have already demonstrated a strong mobilization of myeloid cells CD11b⁺GR1⁺ in the blood and the bone marrow one-week post CLP³⁶. Here, we showed that late accumulation of myeloid cells mostly affected Ly6C^{high} Mo and PMN and to a much lesser extent the Ly6C^{low} Mo. This phenomenon was observed in the blood and several organs (if not all). These data indicated that even though mice had recovered from the acute infection and appeared healthy, the myeloid redistribution showed that at the cellular level, the mice were still affected by the primary bacterial exposure.

Inflammatory cells are described as possibly derived from myeloid precursors of the bone marrow or the spleen²⁴. In the model we chose, the late mobilization of myeloid cells after sepsis is proposed to originate only from the bone marrow and not from the spleen due to the fact that splenectomy had no impact on the extent and duration of this phenomenon. Mo expansion was measured in all organs tested. As the source of myeloid cells, we were expecting a decrease in bone marrow Mo and PMN numbers but the cellular egress from the bone marrow was probably compensated by a strong myelopoiesis. The cause of Mo and PMN expansion may result from a poor control of the bacterial infection and/or uncontrolled inflammatory environment. Anti-inflammatory treatment reduced the number of Ly6C^{high} Mo whereas broad spectrum antibiotherapy had no effect on Mo and PMN redistribution. Furthermore, in septic mice Mo late expansions was totally or partially reduced in the blood and the lung of CCR2- and CX3CR1-deficient mice, respectively. No change in treated or CCR2- or CX3CR1- deficient mice was observed concerning PMN, alveolar macrophages and CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes (data not show). We concluded that the inflammatory environment specifically supported Mo mobilization from bone marrow to the blood. With regard to PMN, it is possible that their recruitment depends on CXCL8/CXCR2 axis^{37,38}.

Although initially underestimated, the onset of severe immunosuppression in patients with sepsis is now a well-established phenomenon^{2,39}. Most patients now survive in the initial inflammatory phase because of timely administered antibiotics and efficient life-support systems but suffer from prolonged recurrent secondary infections^{7,40}. Understanding the kinetics of inflammatory events leading to immunosuppression and the acquisition of secondary infections is important for the development of therapeutic agents and their time point administration.

We have studied the phenotype and functions of recruited pulmonary intravascular or parenchymal Mo during sepsis and secondary infection. During the late phase of sepsis, recruited Mo and PMN are localized in the lung vasculature without infiltrating the lung parenchyma or stroma. Phenotypic characterization of the vascular Ly6C^{high} Mo in the lung of septic mice revealed decreased expression of MHC-II and CX3CR1, and increased expression of CD11b. A decrease in the expression of MHC-II and CX3CR1 has long been described and has been associated with defective Mo activation and sepsis severity^{41,42}. The increased expression of integrin CD11b is consistent with a margination of cells at the vascular endothelium⁴³. The vascular invasion was accompanied by increased fragility of septic mice to second infection by *E. coli* highlighting an immune dysfunction characteristic of the immunosuppressive phase. The absence of Ly6C^{high} Mo accumulation increased drastically the mortality in our model as seen in others infectious models^{33,44} indicating the essential role of Ly6C^{high} Mo against bacterial infections. However, the activation state of Ly6C^{high} Mo in septic WT mice does not seem sufficient to overcome secondary infectious challenges.

After secondary infection, the number of Ly6C^{high} Mo increased in the lung of sham-operated mice while no additional accumulation was detected in CLP mice. Cells infiltrated the lung in the same proportion in sham- and CLP-operated mice at 48h after the second challenge. Mo in septic mice displayed intact capacity to infiltrate into the lung. In addition, cytokine profiles of the lung environment showed an increase of CCL2 and IL-4 ARNm, ten days after sepsis. CCL2 is involved in Mo mobilization like previously showed and IL-4 was described to participate in T cell polarization towards a Th2 phenotype¹³. After secondary infection, transcript production for iNOS, IL-6 and IL-10 was increased while IL-4 was strongly reduced in sham and CLP-operated mice. The increase of CCL2 and IL-10 are specific of infectious but not of sepsis context. We observed a smaller increase of iNOS and IL-6 for septic mice compared to sham mice after the secondary infection. iNOS and IL-6 are involved in the phagocytic function of cells and in bacterial clearance like previously described^{45,46,47}. Thus, these molecules may participate to the impaired Mo functions and the increased mouse susceptibility to infection.

Phenotypic characterization of infiltrated and vascular Ly6C^{high} Mo after secondary infection showed major differences. First, the expression of activation or costimulation markers was specifically increased on infiltrated Ly6C^{high} Mo in sham and CLP mice. Second, the intensity of Mo activation measured with cell surface markers such as MHC-II, CD80,

CD86 and PDL1 was reduced on Mo from septic mice compared to that of sham mice. Wolk et al. showed that decreased expression of MHC-II and CD86 on Mo after LPS stimulation limited the ability to induce T-cell proliferation⁴⁸. In addition, immune tolerance during septic shock has been associated with abnormalities of the costimulatory pathways⁴⁹. Surprisingly, we identified a decrease in PDL1 expression on infiltrated septic Ly6C^{high} Mo compared to sham Mo. We did not observe any difference in PD1 expression on CD4+ and CD8+ lymphocytes (data not shown) for all studied groups. Nevertheless, blocking PD1 or PDL1 inhibitory signals is shown to be beneficial for survival in murine sepsis models^{50,51}. Expression of PD1 and PDL1 by Mo was increased in septic patients but more modestly in those who did not survive⁵². It is possible that a higher expression of PDL1 may be protective in the infectious context by fine regulation of the immune response. Our results indicate that an alteration of the costimulatory and regulatory pathways would participate in the immune tolerance during the late phase of sepsis.

Previous studies have shown a weakened lung bacterial clearance in two-hit models of sepsis^{53,36,54}. Here, we showed that *in vivo* phagocytosis by Ly6C^{high} Mo from septic mice was defective only in lung infiltrated cells. This functional defect correlates with a weak state of Mo activation and an unfavorable inflammatory environment.

In summary, the dual role of inflammatory monocytes was shown during late sepsis and the complication caused by a nosocomial infection. Indeed, this population of Mo is shown to be necessary to fight bacterial infection. However, the polymicrobial sepsis durably affects their main functions and increases susceptibility to late-onset secondary *E. coli* pneumonia.

Materials and methods

Mice

All experiments and protocols were approved by the local animal experimentation ethics committee. Specific pathogen-free C57BL/6 mice were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, Saint Isle, France). $Cc2^{-/-}$, $Cx3Cr1^{-/-}$ C57BL/6 mice, $Cx3cr1^{gfp/+}$ ⁵⁵ and $Cx3cr1^{gfp/gfp}$, $Csf1r$ -Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue)⁵⁶ $MacBlueXCx3cr1^{gfp/+}$ mice were bred in our animal facility. Age-matched mice (8-12 weeks old) were used for this study.

Polymicrobial Sepsis Induction

To induce sepsis, we conducted cecal ligation and puncture model⁵⁷. Mice underwent sham laparotomy (cecum was exteriorized and reinserted in the abdomen) or CLP induced by ligation of one third of the cecum and a double enterotomy created with a 25 gauge needle. A small amount of faecal materials was extruded after removing the needle and the cecum was put back in the abdomen. After surgery, the animals were injected with saline solution and buprenorphine for postoperative analgesia. For some experiments, 3.5mg/kg of Dexamethasone were injected intraperitoneally 24h after CLP and every 48h for 10 days. For antibiotic (Enrofloxacin), 10mg/kg were injected subcutaneously 24h after CLP and every 24h for 10 days.

Escherichia coli lung infection

The fluorescent *Escherichia coli* strain MG1655 $ykgH::pTet-dsRed$ (BGene Genetics, Grenoble, France) was grown overnight in Luria-Bertani (LB) broth, then transferred to fresh medium and grown for 4-5h to mid log phase. The OD_{600} was adjusted to give the appropriate desired inoculums, then centrifuged at 4000g for 15min. Cell pellets were resuspended in 30 μ l of sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) for each samples. To induce secondary *E. coli* lung infection, ten days after CLP, the trachea was exposed and 30 μ l of a bacterial suspension (5×10^7 cfu/mouse for survival or 10^7 cfu/mouse for all other studies) or sterile PBS were administered intratracheally to sham or CLP-operated mice 24h and 48h before sacrifice. This procedure is performed under anaesthesia by Ketamine/Xylazine mixture (100 and 10 mg/kg body weight, respectively).

Bronchoalveolar lavage (BAL)

BAL are performed on mice at 48h after the secondary lung injection and just after their sacrifice. The BAL (3ml of PBS) was diluted and plated on LB agar plates to obtain viable bacterial counts (cfu/BAL).

Cell isolation and preparation

Blood samples with heparin were directly stained with antibodies and erythrocytes were lysed with buffer containing 0.15M NH₄Cl, 0.01mM KHCO₃ and 0.1mM EDTA. BM cells were harvested by flushing out the thighbone with PBS. Lung, spleen, kidney and liver, were harvested and digested in RPMI medium (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 1mg/ml collagenase IV (Sigma Aldrich), 0, 1mg/ml DNase 1 (Roche) for 30 min at 37°C and dissociated through a 40-µm-pore cell strainer (Becton Dickinson, Rungis, France). Diluted suspension cells were incubated with 1µg/ml purified anti-CD16/32 (2.4G2, BD Biosciences) for 10mins at 4°C then surface staining was performed by additional 20 min incubation with appropriate dilution of the surface marker antibodies. Cell suspensions were washed once in FACS buffer (PBS 0.5% BSA 2mM EDTA) and analysed directly by flow cytometry.

Flow cytometry

The panel of antibodies comprised: anti-CD11b (M1/70), anti-Ly6C (AL21), anti-Ly6G (1A8), anti-NK1.1 (PK136), anti-CD11c (HL3), anti-I-A/I-E (M5/114.15.2), anti-SiglecF (E50-2440), anti-CX3CR1 (SA011F11), anti-CD64 (X54-5/7.1), anti-CD80 (16-10A1), anti-CD86 (GL1) and anti-PDL1 (MIH5). Flow cytometry acquisition was performed on the flow cytometer FACS LSRFortessa X-20® (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with DIVA® Flow Cytometry software and data were analysed with FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, Or, USA). Absolute numbers were calculated by adding to each vial a fixed number (10,000) of non-fluorescent 10-µm polybead® carbocylate microspheres (Polysciences, Niles, IL, USA) according to the formula: No. Cells = (No. acquired cells x 10,000)/(No. acquired beads) x dilution factor of cells.

Blood/tissue partitioning

Intravascular CD45 labelling was performed as previously described^{25,28}. Mice were injected intravenously with 2 µg of anti-CD45 (clone 30-F11). Two minutes after injection, blood was

drawn and mice were sacrificed. Harvested organs were bathed in a large volume of PBS. CD45 labelled cells in all tissues were considered to be intravascular (CD45^{vivo+}) and unlabelled cells (CD45^{vivo-}) were considered to be parenchymal.

In vivo phagocytosis

A total of 10⁷ cfu/mouse of DS-Red fluorescent *Escherichia coli* were intratracheally injected 10 days after sham and CLP operated mice (as described previously). Phagocytosis by lung cells was analysed 24 and 48 h after infection by flow cytometry. The fluorescence of phagocytic cells is also observed in histological sections. For every *in vivo* phagocytosis, control mice were injected with sterile PBS under the same experimental conditions.

Data presentation and statistical analysis

The data are presented as mean ± SEM of the indicated number of experiments. Group were compared with Prism software (Graphpad). Statistical analyses were performed using two-tailed Student's *t*-test for two-group comparisons, or one-way ANOVA test for multiple-group comparison: * for p < 0.05; ** for p < 0.01; *** for p < 0.001; **** for p < 0.0001. Kaplan-Meier survival curves were compared with a log-rank test P<0.05 was considered statistically significant.

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Lungs were harvested 48h after the *E. coli* lung infection ten days post CLP. Cells were isolated as described above. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) according to manufacturer's instructions. RNA concentration was determined by absorption at 260 nm. cDNA synthesis was performed with SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Polymerase chain reaction was performed on an ABI prism 7300 using Power SYBR Green PCR Master Mix (Life technologie). GAPDH was used as control gene. Primers for iNOS: F-CCAAGCCCTCACCTACTTCC ; R-CTCTGAGGGCTGACACAAGG, IL-4 : F- CCATATCCACGGATGCGACA ; R- AAGCCCGAAAGAGTCTCTGC, IL-10 : F-GCTCTTACTGACTGGCATGAG ; R- CGCAGCTCTAGGAGCATGTG, IL-6 : F-CGGCCTTCCTACTTCACAA ; R- GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA.

Multi-photon Imaging

Freshly explanted lungs were immobilized in an imaging chamber perfused with oxygenated (95% O₂ plus 5% CO₂) RPMI medium containing 10% FCS. The local temperature was monitored and maintained at 37°C. For some experiments, 10 µg of anti-CD31 (AF647; clone 390) were injected intravenously 2 min before euthanasia. The Two-Photon Laser Scanning Microscopy (TPLSM) set-up used was a Zeiss 7MP (Carl Zeiss, Germany) coupled to a Ti:Sapphire Crystal multiphoton laser (Coherent ChameleonU, CA, USA) which provides 140fs pulses of NIR light, selectively tunable between 680nm and 1050nm and an optical parametric oscillator (OPO-MPX, Coherent) selectively tunable between 1050 and 1600nm. The system included a set of external non-descanned detectors in reflection with a combination of a LP-600nm followed by LP-462nm and LP-500nm dichroic mirrors to split the light and collect the ECFP with a 480/40nm emission filter, EGFP with a 525/50nm emission filter. The excitation wavelength was 870nm for the NLO beam and 1100nm for the OPO beam. Cell motility was measured every 30s by 5 consecutive 3µm z spacing stacks (total 12µm thickness) using a plan apochromat x20 water immersion objective.

Figure legends

Figure 1: Polymicrobial sepsis induces a late expansion of inflammatory monocytes and polymorphonuclear neutrophils in blood and organs.

a- Representative flow cytometry gating strategy for myeloid subsets in the lung : Eosinophils (Eosino), Alveolar Macrophages (AM), Polymorphonuclear Neutrophils (PMN), Monocytes (Mo), Inflammatory Monocytes (Ly6C^{high} Mo), Patrolling Monocytes (Ly6C^{low} Mo). **b-** Numbers of Ly6C^{high}, Ly6C^{low} Mo and PMN in the bone marrow, spleen, blood and lung as determined by flow cytometry at different time points after CLP. The time zero was defined based on the cell number obtained in sham-operated mice. Each time point represents at least three independent experiments run with 6 to 12 mice. **c-** Numbers of Ly6C^{high} Mo and PMN in the liver (left panel) and the kidney (right panel), 10 days after sham- (white) and CLP-operated (grey) mice. Values represent the mean and standard error of the mean of 6 mice per group from two independent experiments.

Figure 2: Late expansion of inflammatory monocytes requires inflammatory pathways.

a- Numbers of Ly6C^{high} monocytes in the blood, lung and bone marrow determined by flow cytometry in sham and septic mice, 10 days after CLP and treatments. Splenectomies were performed few minutes before the CLP. Antibiotic and Dexamethasone treatments were injected 24h after CLP. Values represent the mean and standard error of the mean of 10 mice per group from two independent experiments **b-** Numbers of Ly6C^{high} Mo in the blood, lung and bone marrow determined by flow cytometry, 10 days after sham- and CLP-operated WT (n=10), *Ccr2*^{-/-} (n=6) and *Cx3cr1*^{-/-} (n=8) mice from at least two independent experiments.

Figure 3: Expanded inflammatory monocytes remain intravascular in the lung

a- Overlay of flow cytometric surface marker expression gated on Ly6C^{high} Mo in the lung of sham- (black line) and CLP-operated (dotted line) mice, 10 days after CLP. Histograms represent mean fluorescence intensity (MFI) of surface marker expression: MHC-II, CD64, CD11b, CD62L, CX3CR1. Values represent the mean and standard error of the mean of 15 sham- and 12 CLP-operated mice from three repeated experiments. The GFP fluorescent reporter of *Cx3cr1* expression was performed on 9 sham- and 9 CLP-operated *Cx3cr1*^{gfp/+} mice. **b-** Representative overlaid dot plots of *in vivo* CD45 staining (blue) gated on blood

(upper panels) and lung (lower panels) of Ly6C^{high} Mo. Background staining shown in black was measured in not injected mice with the anti-CD45. **c-** Representative images of two-photon microscopy of explanted lungs from sham- or CLP-operated MacBlueXCx3cr1^{gfp/+} mice. Lung vasculature is visualized using anti-CD31 staining (red) and monocytes were observed using ECFP and EGFP reporters. Insert represents a 5x zoom showing a few alveolar macrophage (AM) in alveolar lumen (Black space) in sham and intravascular monocytes (Mo) in a CLP-operated mouse.

Figure 4: Primary sepsis limits inflammatory responses to a secondary infection without altering monocyte infiltration

a- Survival of sham- or CLP-operated Cx3cr1^{gfp/+}, Cx3cr1^{gfp/gfp} and Ccr2^{-/-} mice with intratracheal injection of *Escherichia coli* on day 10 after surgery. The survival study was carried out on 25 mice for Cx3cr1^{gfp/+}, 25 for Cx3cr1^{gfp/gfp}, and 15 mice for Ccr2^{-/-}. **b-** Total lung weight of sham- and CLP-operated mice at 48h after *E. coli* secondary infection. **c-** Bacterial colonization of bronchoalveolar lavages (BAL) from sham- and CLP-operated mice at 48h after *E. coli* secondary infection. **d-** The left panels shows the gating of lung infiltrated Ly6C^{high} monocytes from sham- and CLP-operated mice after *E. coli* infection. The histogram represents the total numbers of Ly6C^{high} monocytes per mg of lung from sham- or CLP-operated mice, 24h and 48h after *E. coli* infection or PBS injection. Black bars represents the CD45^{vivo}⁻ infiltrated cells and grey bars are CD45^{vivo}⁺ vascular cells. Values represent the mean and standard error of the mean of 8-10 mice per group. **e-** mRNA levels in lung cells measured by qPCR compared to sham-operated mice.

Figure 5: infiltrated inflammatory monocytes show limited activation profile and displays defective phagocytic activity.

a- Overlay of flow cytometric surface marker expression gated on lung vascular (CD45^{vivo}⁺) and infiltrated (CD45^{vivo}⁻) Ly6C^{high} monocytes in sham- (thick black lines) and CLP- (thin black line) operated mice, 48 h post *E. coli* infection. Mean fluorescence intensity (MFI) of surface markers CD64, CMH II, CD80, CD86 and PDL1 on infiltrated CD45^{vivo}⁻ (light grey) or vascular CD45^{vivo}⁺ (dark grey) Ly6C^{high} monocytes in the lungs of sham (thick black lines) and CLP (thin black line) mice 48 h after second infection. **b-** Upper panel represents pictures of lung cryosections from Cx3cr1^{gfp/+} mice 48h after second infection with *E. coli*. Mononuclear phagocytes cells are GFP⁺ (green in the left panel), *E. coli* are DS-Red⁺ (red in the middle panel) and cell nucleus are stained with DAPI (grey). Pictures were overlaid in the

right panel with *E. coli*-associated phagocytes shown in yellow. Lower panel represents 10x magnified pictures. **c-** Dot plot showing Ly6C^{high} Mo in lung from sham- (upper panels) and CLP- (lower panels) operated mice after PBS (left panels) or 24 h (middle panels) and 48 h (right panels) post *E. coli*. Quadrant 1 represents vascular non-phagocytic cells (CD45^{vivo}⁺ *E. coli*⁻), quadrant 2 identifies infiltrated non-phagocytic cells (CD45^{vivo}⁻ *E. coli*⁻) and quadrant 3 represents the infiltrated phagocytic monocytes (CD45^{vivo}⁻ *E. coli*⁺) in lung. **d-** Proportions and numbers of lung infiltrated phagocytic Ly6C^{high} Mo at 24 or 48 h post *E. coli* pulmonary infection in sham- and CLP-operated mice (n=8 mice from three repeated experiments).

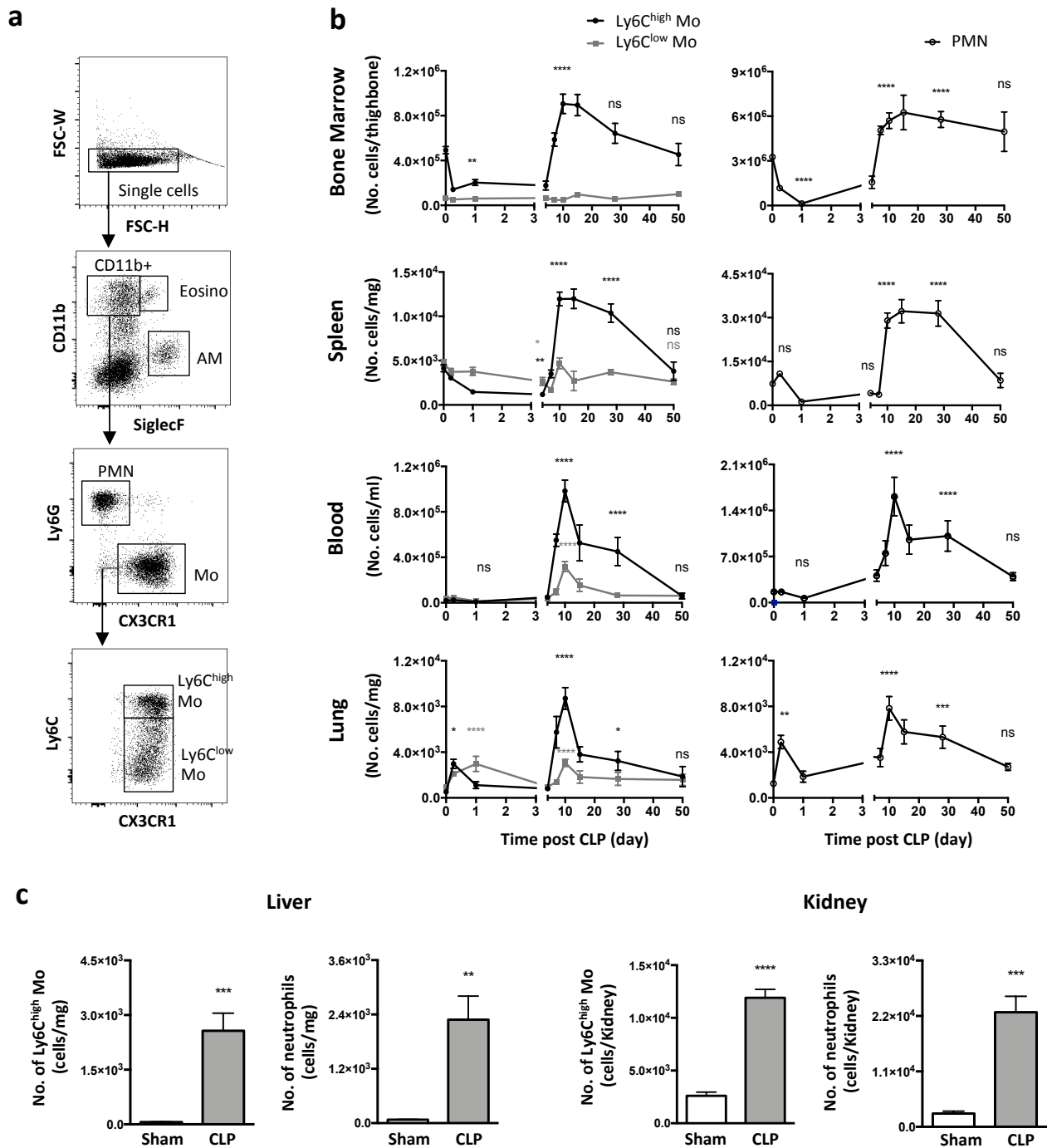
References

1. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801 (2016).
2. Angus, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 29, 1303–1310 (2001).
3. Hutchins, N. A., Unsinger, J., Hotchkiss, R. S. & Ayala, A. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol. Med.* 20, 224–233 (2014).
4. Torgersen, C. *et al.* Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth. Analg.* 108, 1841–1847 (2009).
5. Otto, G. P. *et al.* The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit. Care Lond. Engl.* 15, R183 (2011).
6. Landelle, C. *et al.* Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* 36, 1859–1866 (2010).
7. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* 13, 260–268 (2013).
8. Angus, D. C. & Opal, S. Immunosuppression and Secondary Infection in Sepsis: Part, Not All, of the Story. *JAMA* 315, 1457–1459 (2016).
9. Pene, F. *et al.* Dendritic Cells Modulate Lung Response to *Pseudomonas aeruginosa* in a Murine Model of Sepsis-Induced Immune Dysfunction. *J. Immunol.* 181, 8513–8520 (2008).
10. Fan, X., Liu, Z., Jin, H., Yan, J. & Liang, H. Alterations of Dendritic Cells in Sepsis: Featured Role in Immunoparalysis. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–10 (2015).
11. Venet, F. *et al.* Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit. Care Med.* 35, 1910–1917 (2007).
12. Livingston, D. H., Appel, S. H., Wellhausen, S. R., Sonnenfeld, G. & Polk, H. C. Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* 123, 1309–1312 (1988).
13. Delano, M. J. *et al.* MyD88-dependent expansion of an immature GR-1⁺ CD11b⁺ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* 204, 1463–1474 (2007).
14. van der Poll, T. Myeloid-derived Suppressor Cells in Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196, 256–258 (2017).
15. Delano, M. J. *et al.* Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 195–202 (2011).
16. Tamadaho, R. S. E., Hoerauf, A. & Layland, L. E. Immunomodulatory effects of myeloid-derived suppressor cells in diseases: Role in cancer and infections. *Immunobiology* 223, 432–442 (2018).
17. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174 (2009).
18. Chousterman, B. G. *et al.* Ly6Chigh Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 792–803 (2016).
19. Charavaryamath, C., Janardhan, K. S., Caldwell, S. & Singh, B. Pulmonary intravascular monocytes/macrophages in a rat model of sepsis. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288, 1259–1271 (2006).
20. Hamon, P. *et al.* CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. *Blood* 127, 2016 (2016).
21. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 4, 31–36 (2009).
22. Chousterman, B. G. *et al.* Ly6Chigh Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27, 792–803 (2016).
23. Scumpia, P. O. *et al.* Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 2247–2251 (2010).
24. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–774 (2011).
25. Rodero, M. P. *et al.* Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *Elife* 4, e07847 (2015).
26. Yona, S. *et al.* Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91 (2013).
27. Pachot, A. *et al.* Decreased Expression of the Fractalkine Receptor CX3CR1 on Circulating Monocytes as New Feature of Sepsis-Induced Immunosuppression. *J. Immunol.* 180, 6421–6429 (2008).

28. Anderson, K. G. *et al.* Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat. Protoc.* 9, 209–222 (2014).
29. Girgis, N. M. *et al.* Ly6Chigh Monocytes Become Alternatively Activated Macrophages in Schistosome Granulomas with Help from CD4+ Cells. *PLoS Pathog.* 10, e1004080 (2014).
30. Combadière, C. *et al.* Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1649–1657 (2008).
31. Brilha, S., Wysoczanski, R., Whittington, A. M., Friedland, J. S. & Porter, J. C. Monocyte Adhesion, Migration, and Extracellular Matrix Breakdown Are Regulated by Integrin $\alpha V\beta 3$ in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J. Immunol.* 199, 982–991 (2017).
32. Prescott, H. C., Osterholzer, J. J., Langa, K. M., Angus, D. C. & Iwashyna, T. J. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ* i2375 (2016). doi:10.1136/bmj.i2375
33. Grainger, J. R. *et al.* Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nat. Med.* 19, 713–721 (2013).
34. Winter, C. *et al.* Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 5828–5838 (2007).
35. Dunay, I. R. *et al.* Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306–317 (2008).
36. Delano, M. J. *et al.* Sepsis Induces Early Alterations in Innate Immunity That Impact Mortality to Secondary Infection. *J. Immunol.* 186, 195–202 (2011).
37. Cummings, C. J. *et al.* Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 2341–2346 (1999).
38. Reutershan, J. *et al.* Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J. Clin. Invest.* 116, 695–702 (2006).
39. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348, 1546–1554 (2003).
40. Gotts, J. E. & Matthay, M. A. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* i1585 (2016). doi:10.1136/bmj.i1585
41. Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. & Lepape, A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med. Camb. Mass* 14, 64–78 (2008).
42. Ge, X.-Y. *et al.* TLR4-dependent internalization of CX3CR1 aggravates sepsis-induced immunoparalysis. *Am. J. Transl. Res.* 8, 5696 (2016).
43. Solovjov, D. A., Pluskota, E. & Plow, E. F. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J. Biol. Chem.* 280, 1336–1345 (2005).
44. Antonelli, L. R. V. *et al.* Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *J. Clin. Invest.* 120, 1674–1682 (2010).
45. Yang, M.-L. *et al.* IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. *Sci. Rep.* 7, 43829 (2017).
46. MacMicking, J., Xie, Q. & Nathan, C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350 (1997).
47. Serbina, N. V. *et al.* Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity* 19, 891–901 (2003).
48. Wolk, K., Döcke, W. D., von Baehr, V., Volk, H. D. & Sabat, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 96, 218–223 (2000).
49. Roger, P.-M. *et al.* Enhanced T-cell apoptosis in human septic shock is associated with alteration of the costimulatory pathway. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 28, 575–584 (2009).
50. Huang, X. *et al.* PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6303–6308 (2009).
51. Zhang, Y. *et al.* PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit. Care* 14, R220 (2010).
52. Ferreira da Mota, N. V. *et al.* Immunophenotyping of Monocytes During Human Sepsis Shows Impairment in Antigen Presentation: A Shift Toward Nonclassical Differentiation and Upregulation of Fc γ R1-Receptor. *SHOCK* 1 (2017). doi:10.1097/SHK.0000000000001078
53. Deng, D. *et al.* Systematic investigation on the turning point of over-inflammation to immunosuppression in CLP mice model and their characteristics. *Int. Immunopharmacol.* 42, 49–58 (2017).
54. Chen, W. *et al.* Ethyl pyruvate reverses development of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during sepsis-induced immunosuppression. *Int. Immunopharmacol.* 52, 61–69 (2017).

55. Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4106–4114 (2000).
56. Ovchinnikov, D. A. *et al.* Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J. Leukoc. Biol.* 83, 430–433 (2008).
57. Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A. & Ward, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat. Protoc.* 4, 31–36 (2009).

Figures



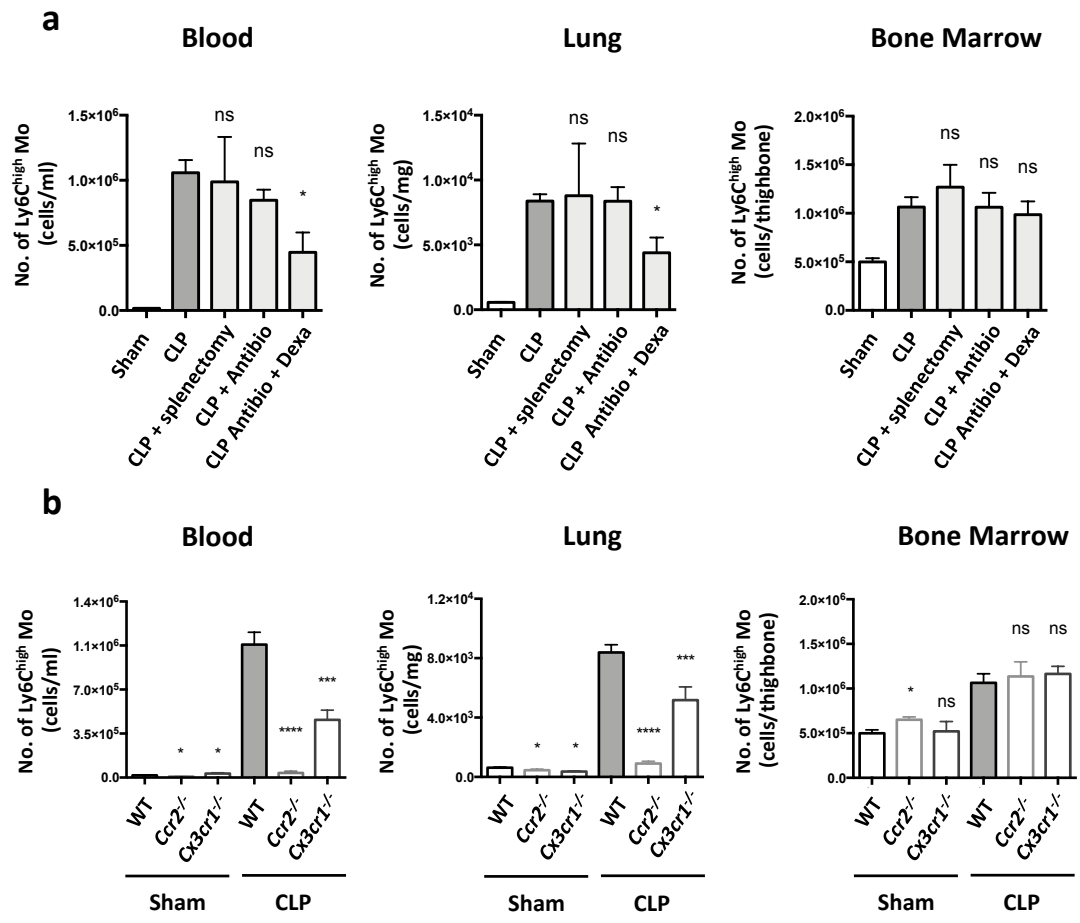


Figure 2: Late expansion of inflammatory Mo requires inflammatory pathways.

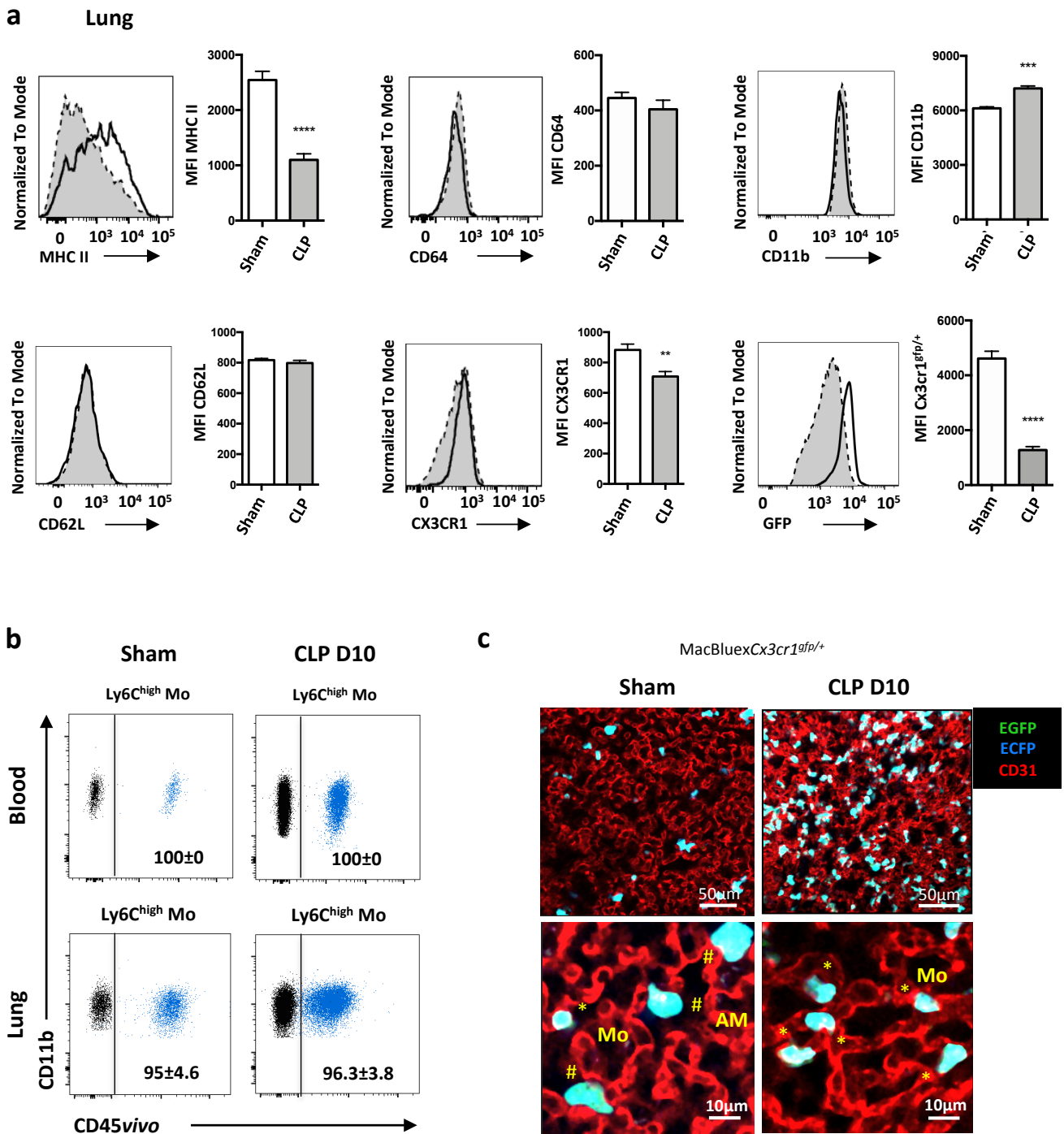


Figure 3: Late-expanded Mo remain intravascular in the lung of septic mice.

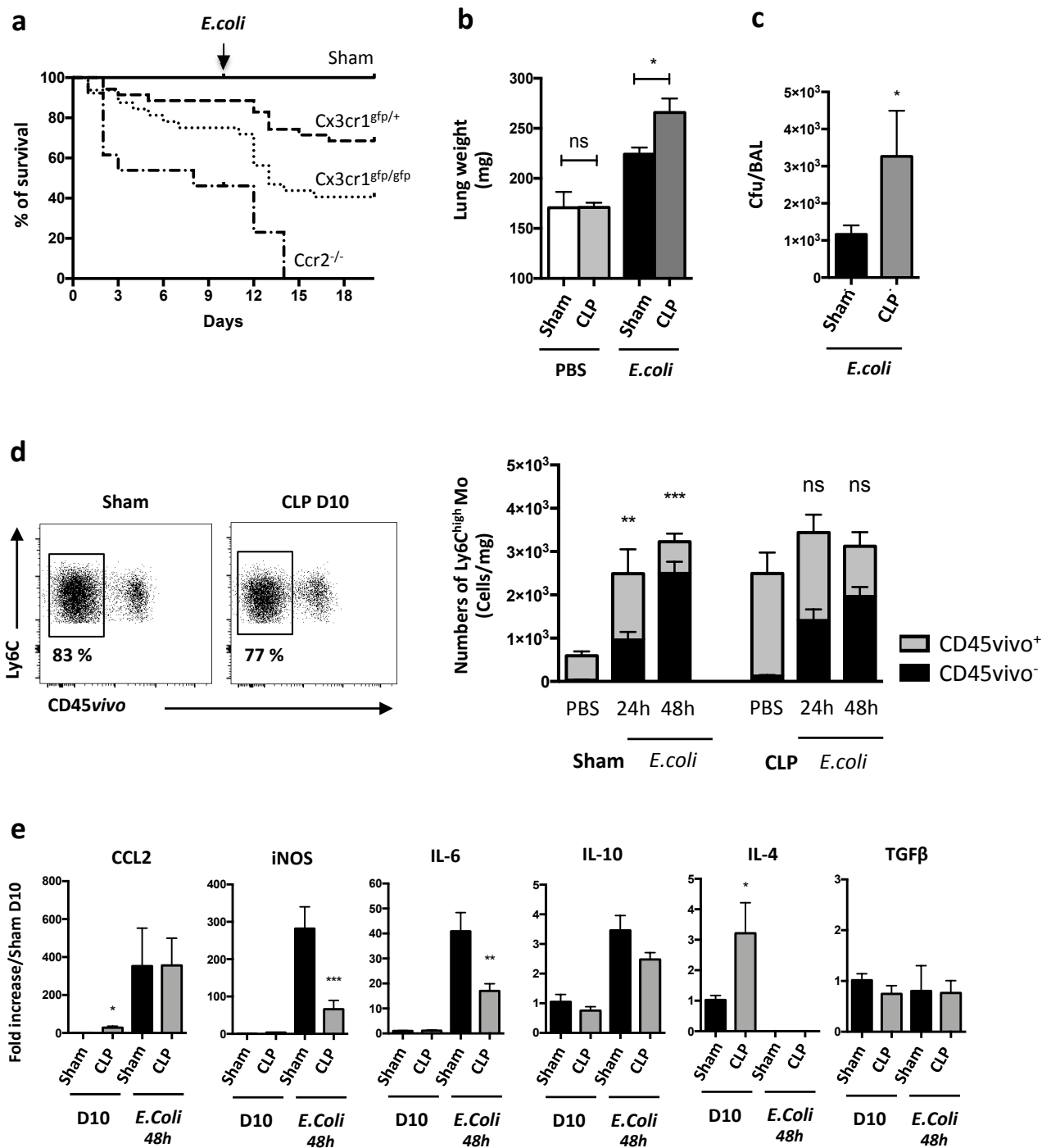


Figure 4: Primary sepsis undermines inflammatory responses to a secondary infection without altering Mo infiltration.

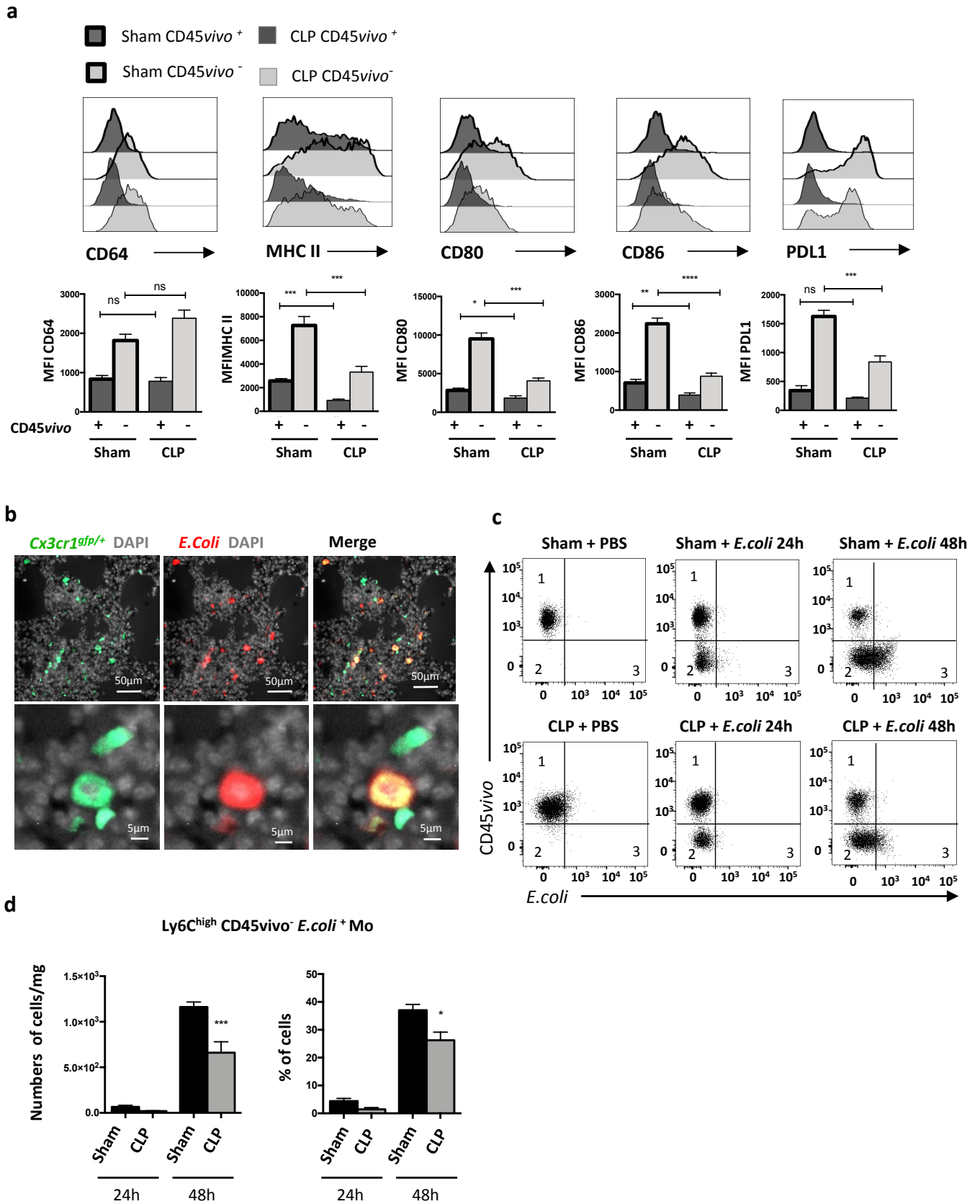


Figure 5: In septic mice, infiltrated inflammatory Mo shows limited activation profile and displays defective phagocytic activity.

Supplemental Figure Legends

Figure sup 1: Effect of polymicrobial sepsis in survival and kinetics of alveolar macrophage numbers.

a- Survival of sham- or CLP-operated $Cx3cr1^{gfp/+}$ mice. **b-** Numbers of alveolar macrophages (AM) in the lungs as determined by flow cytometry at different time points after CLP.

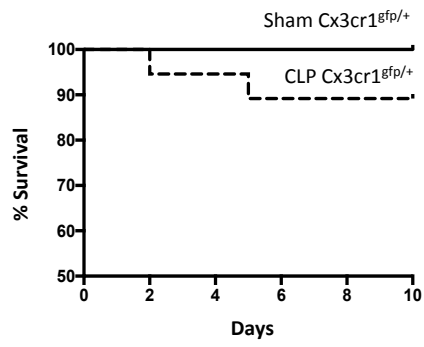
Figure sup 2: Neutrophils (PMN) and alveolar macrophages (AM) numbers are not impacted by treatments and CX3CR1 or CCR2 deletion.

a- Numbers of PMN in the blood, lung and bone marrow determined by flow cytometry in sham and septic mice, 10 days after CLP and treatments. Values represent the mean and standard error of the mean of 10 mice per group from two independent experiments. **b-c** Numbers of PMN (**b**) or AM (**c**) in the different tissues determined by flow cytometry, 10 days after sham- and CLP-operated WT (n=10), $Ccr2^{-/-}$ (n=6) and $Cx3cr1^{-/-}$ (n=8) mice from at least two independent experiments.

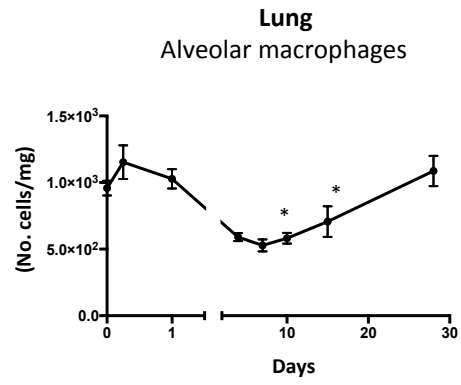
Figure sup 3: Late-expanded myeloid cells remain intravascular in the lung of septic mice.

a-b- Proportion of infiltrated Ly6Clow Mo (**a**) or PMN (**b**) in the lungs, 10 days after CLP. **c-** Time series two-photon laser scanning microscopy, pictures with overlaid tracks of Mo motility in explanted lungs from CLP-operated MacBlueX $Cx3cr1^{gfp/+}$ mice.

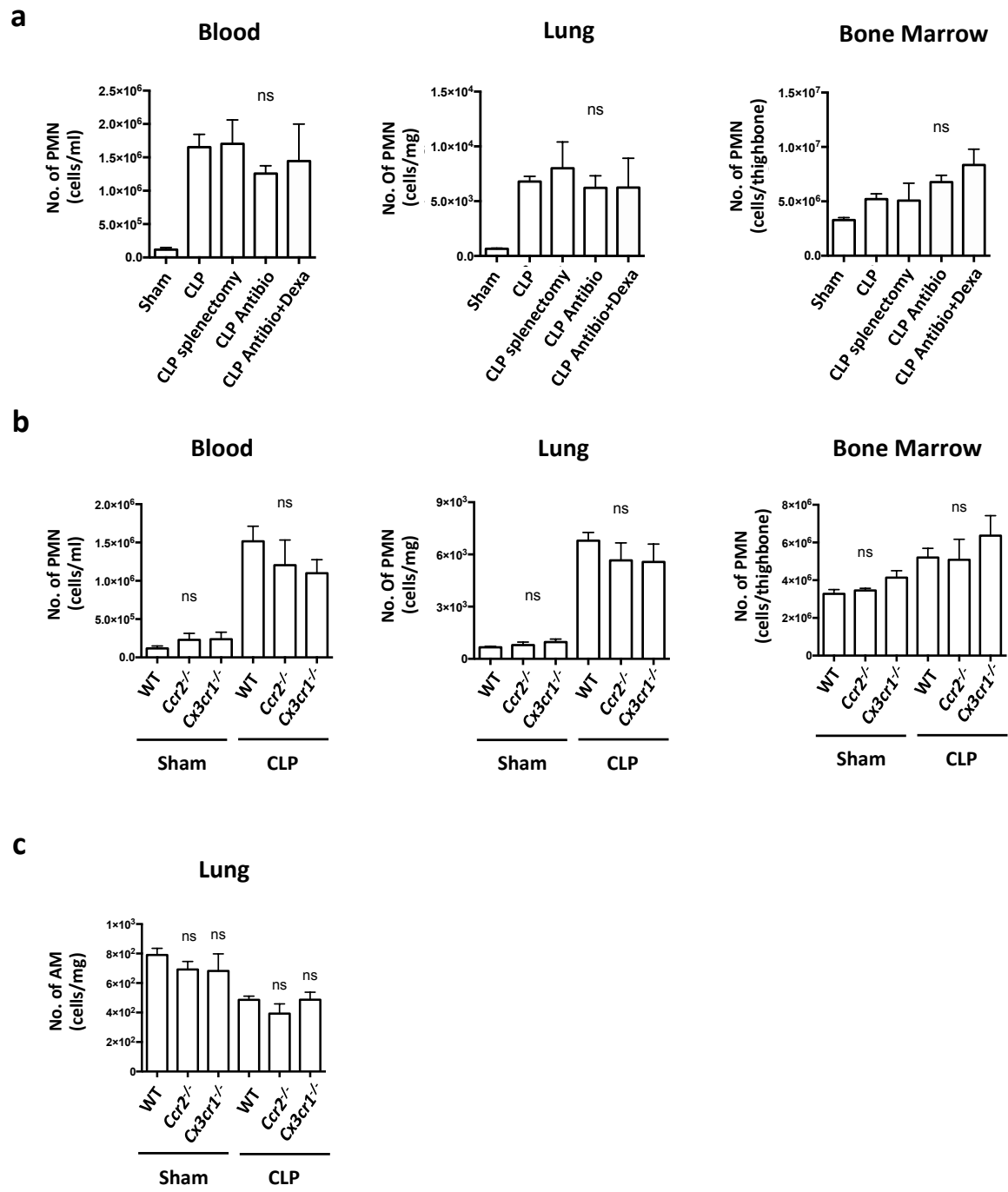
a



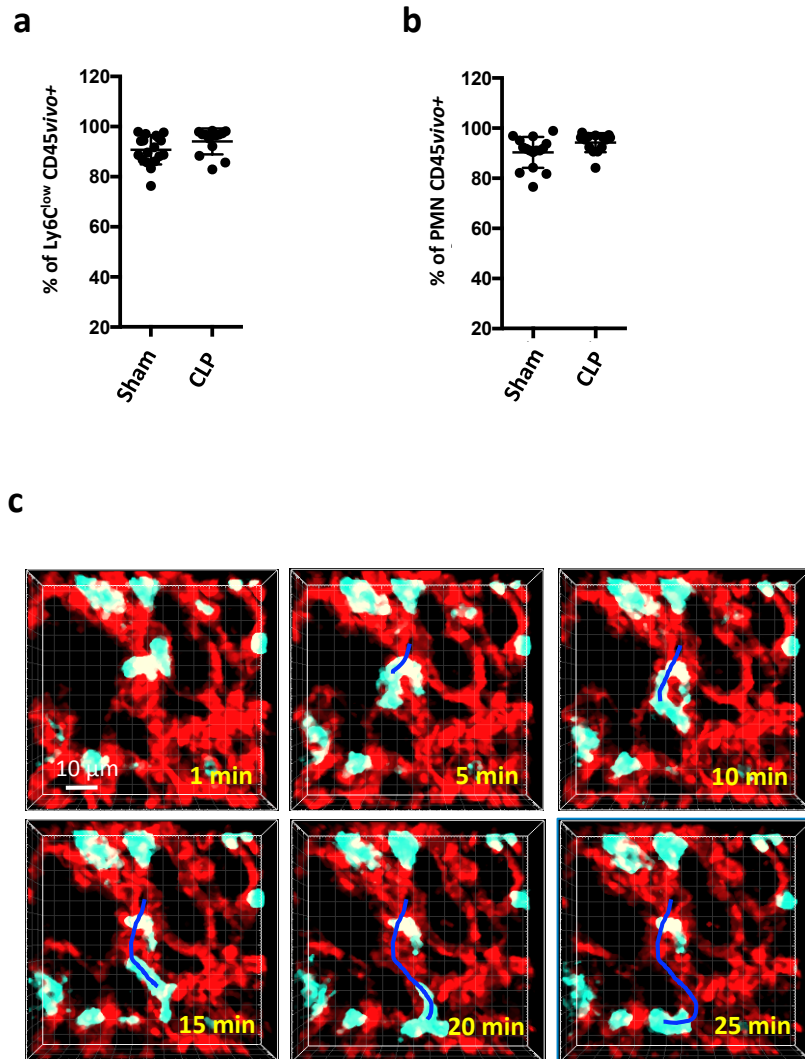
b



Supplementary Figure 1: Effect of polymicrobial sepsis on survival and kinetics of alveolar macrophage numbers.



Supplementary Figure 2: Neutrophils (PMN) and alveolar macrophages (AM) numbers are not impacted by treatments and CX3CR1 or CCR2 deletion.



Supplementary Figure 3: Late-expanded myeloid cells remain intravascular in the lung of septic mice.

TRAVAUX ANNEXES

Article 3 : « CX3CR1-dependant endothelial margination modulates LY6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice»

Blood -2017 Mar 9;129(10):1296-1307

Hamon P, Loyher PL, Baudesson de Chanville C, Licata F, Combadière C, Boissonnas A.

Van Furth a décrit l'existence de différents compartiments cellulaires dans les années 80. Ainsi, dans la moelle osseuse on distingue les Mo marginés, les Mo circulants et les Mo médullaires. Les cellules marginées se distinguent des cellules circulantes du sang grâce à leur capacité d'adhésion à l'endothélium vasculaire. Le rôle et la fonction des Mo marginés sont peu connus en raison de la difficulté à les identifier. Dans cette étude, l'imagerie intravitale a permis d'étudier la dynamique des Mo marginés présents dans le réseau vasculaire de la moelle osseuse en condition inflammatoire. De plus, l'impact des axes chimiokines CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 sur la mobilité des Mo a également été évalué. Nous avons montré que les Mo Ly6C^{high} et Ly6C^{low} sont rapidement libérés de la moelle osseuse et recrutés vers le système vasculaire du péritoine après une inflammation péritonéale induite par LPS ou après CLP. Les Mo marginent grâce à des mécanismes d'adhésion impliquant le récepteur au chimiokine CX3CR1. Nous avons observé une plus forte infiltration des Mo Ly6C^{high} dans la cavité péritonéale chez des souris déficientes en CX3CR1. Cependant, les interactions entre CX3CR1 et CX3CL1 ne sont pas essentielles pour l'extravasation transendothéliale des Mo. En résumé, ce travail nous a permis de montrer que CX3CR1 conditionne l'adhérence et la rétention des Mo aux vaisseaux, permettant ainsi la surveillance des tissus.

IMMUNOBIOLOGY

CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6C^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice

Pauline Hamon, Pierre-Louis Loyher, Camille Baudesson de Chanville, Fabrice Licata, Christophe Combadière, and Alexandre Boissonnas

Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM UMR 1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Paris, France

Key Points

- Blood monocytes are distributed between a marginated and a circulating pool.
- CX3CR1 regulates inflammatory monocyte residence into the blood vasculature during inflammation.

Two subsets of blood monocytes are commonly described in mice and humans: the classical inflammatory monocytes, which are rapidly mobilized upon inflammation in a CC-chemokine receptor 2–dependent manner, and the nonclassical blood resident monocyte subset that patrols the intraluminal side of the endothelium. Old reports suggest that blood monocytes are distributed into circulating and marginating pools, but no direct evidence of the latter has been obtained so far. Using a combination of in vivo real-time imaging and blood/tissue partitioning by intravascular staining of leukocytes, we showed that both inflammatory and resident monocytes are retained in the bone marrow vasculature, representing an important reservoir of marginated monocytes. Upon lipopolysaccharide or cecal ligation and puncture–induced peritonitis, these marginated cells are rapidly released and recruited to the peritoneum membrane lumen vasculature where they reside through CX3C-chemokine receptor 1 (CX3CR1)–dependent adherence. At a later time point, inflammatory monocytes infiltrate the spleen parenchyma but remain

mainly intravascular in the vicinity of the lungs and the peritoneum. Our results show that this monocyte deployment is controlled by a CX3CR1-dependent balance between marginating and circulating monocytes and highlight that tissue infiltration is not a mandatory fate for inflammatory monocytes. (*Blood*. 2017;129(10):1296-1307)

Introduction

Monocytes (Mo) are circulating cells implicated in the steady-state immune surveillance and in the initiation of inflammation.¹ They derive from bone marrow (BM) precursors and constitutively egress toward the bloodstream, where they differentiate into 2 functional classes, in both mice and humans. In the mouse, circulating classical or inflammatory monocytes are short lived,² express high levels of Ly6C and the chemokine receptor, CCR2, but also express intermediate levels of the CX3C-chemokine receptor 1 (CX3CR1). Inflammatory monocytes are precursors of longer-lived patrolling monocytes that lack Ly6C and CCR2 but express higher CX3CR1.³ BM parenchyma and spleen are known to be the main reservoirs of monocytes,^{4,5} rapidly available upon inflammation. Monocyte mobilization from the BM is CCR2 dependent in the steady state as well as under inflammatory conditions.^{6,7} Beyond the role of CX3CR1 in Ly6C^{low}-Mo survival,⁸ the membrane-anchored form of the CX3CL1 provides a potent adhesion molecule^{9,10} that contributes to slowing down monocyte egress from the marrow during myeloablative recovery.¹¹

It has been suggested that monocytes are distributed between a circulating pool and a marginating pool,¹² the latter representing up to 60% of the peripheral reservoir and defined by cells in direct

interaction with the endothelium. The nature and function of marginated monocytes are not defined due to their poor accessibility. Furthermore, very little is known about the mechanism that governs this equilibrium. Intravital imaging approaches have brought experimental evidence of the presence of patrolling Ly6C^{low}-Mo¹ that crawls along the luminal side of the vessels in a CD11a-dependent manner and participates in steady-state immune surveillance. Upon inflammatory stimuli, Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo are recruited in large numbers to carry out specific effector functions.¹³ Lung microvasculature represents a major site for monocyte margination after lipopolysaccharide (LPS) stimulation and during sepsis.¹⁴⁻¹⁶ The spleen represents another major source of monocytes. Direct visualization of the splenic monocyte reservoir was assessed, and the subcapsular red pulp identified was as their main site of residence.⁴

Herein, we used intravital imaging approach and in vivo intravascular leukocyte staining to identify and characterize the behavior of the marginating pool of monocytes in different vascular niches, in steady state and in the course of peritonitis. Our results indicate a key role of CX3CR1 in the equilibrium between vascular retention and extravasation of blood monocytes and thus in the regulation of monocyte deployment toward the periphery.

Submitted 4 August 2016; accepted 16 December 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 23 December 2016; DOI 10.1182/blood-2016-08-732164.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2017 by The American Society of Hematology

Methods

Mice

C57Bl6 mice were purchased from Elevage Janvier (Le Genest, Saint Isle, France). *Cx3cr1*-EGFP-Kin (*Cx3cr1*^{egfp/+}),¹⁷ *Csf1r*-Gal4VP16/UAS-ECFP (MacBlue),¹⁸ and *Ccr2*^{-/-} mice were intercrossed to generate MacBlue×*Cx3cr1*^{egfp/+}, MacBlue×*Cx3cr1*^{egfp/egfp}, or MacBlue×*Cx3cr1*^{egfp/+}×*Ccr2*^{-/-} mouse strains and bred at Pitié-Salpêtrière animal facility.

Peritonitis models

For low-dose LPS-mediated peritonitis, mice were administered intraperitoneally with or without 100 ng/kg LPS in phosphate-buffered saline (PBS). For cecal ligation and puncture (CLP)-induced peritonitis, mice were operated as previously performed.¹⁹ In some experiments, 50 µg of CX3CR1 antagonist (F1) antagonist²⁰ was injected IV into sterile PBS concomitantly with LPS injection or immediately and 3.5 hours after CLP.

Blood/tissue partitioning

Intravascular CD45 labeling was performed as previously described.²¹⁻²³ Mice were injected IV with 1 µg of anti-CD45 (clone 30-F11). Two minutes after injection, blood was drawn and mice were sacrificed. Lungs and spleen were harvested and bathed in a large volume of PBS. CD45-labeled cells in all tissues were considered to be intravascular and CD45⁻ cells were considered to be parenchymal.

Flow cytometry

Flow cytometry acquisition was performed on the fluorescence-activated cell sorter (FACS) LSRFortessa X-20 (BD, Franklin Lakes, NJ) with DIVA Flow Cytometry software, and data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Blood was drawn via retro-orbital puncture with heparin and directly stained with antibodies. After staining, erythrocytes were lysed with buffer containing 0.15 M NH₄Cl, 0.01 mM KHCO₃, and 0.1 mM EDTA and resuspended in FACS buffer containing PBS 0.5% bovine serum albumin EDTA 2 mM. BM cells were harvested by flushing out the tibia with PBS. Peritoneal fluids were collected by peritoneal lavage with 5 mL of ice-cold FACS buffer. Lungs and spleen were harvested and digested in RPMI 1640 medium (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) with 1 mg/mL collagenase IV (Sigma) for 30 minutes at 37°C and dissociated through a 40-µm pore cell strainer (Becton Dickinson, Rungis, France). One-tenth of the cell suspension was incubated with 1 µg/mL purified anti-CD16/32 (2.4G2; BD Biosciences) for 10 minutes at 4°C, and then surface staining was performed by an additional 20-minute incubation with appropriate dilution of the surface marker antibodies. Cells were then washed once in FACS buffer. For chemokine binding assays, after surface staining, cells were incubated with 100 nM *m*-Fractalkine (Alexa-647; Almac, Edinburgh, Scotland) for 45 minutes at 37°C. Cell suspensions were washed once in FACS buffer and analyzed directly by flow cytometry. CX3CL1-A647 binding specificity was controlled on CX3CR1-deficient mice.

Immunofluorescence of the peritoneal membrane

After intraperitoneal lavage, a minimum of 2 cm² of abdominal muscle tissue including the peritoneal membrane was cut on both sides of the linea alba and was directly laid on a microscope coverslip to image the inner side of the parietal sheet of the peritoneum. Large wide field images along the linea alba were recorded with an inverted Zeiss Axio Z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using Zen software. Enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) and enhanced green fluorescent protein (EGFP) signals were acquired using an ExBP 475/40, EmBP 530/50 for EGFP and an ExBP 436/25, EmBP 480/40 for ECFP light cube filters. Cell quantification was performed by counting the number of ECFP⁺ cells at the interface between the muscular aponeurosis and the linea alba using ImageJ software (National Institutes of Health).

Results

Intravital imaging reveals a marginated pool of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in BM vasculature

Intravital multiphoton microscopy provides a unique opportunity to understand spatiotemporal distribution of monocytes in their physiological environment. We tracked medullar monocytes of the skull BM using the previously described MacBlue×*Cx3cr1*^{egfp/+} transgenic mouse.²³ We and others previously showed that the MacBlue transgene is mainly expressed by monocyte-derived cells, whereas it is relatively absent from tissue-resident macrophages except Langerhans cells, microglia, and alveolar macrophages.^{11,23,24} A combination of high-molecular-weight Rhodamin-Dextran IV injection and second harmonic generation (SHG) signal collected from the bone matrix discriminated the vasculature from the parenchymal niches of the BM (Figure 1A). ECFP⁺ cells were distributed in both compartments, whereas EGFP⁺ cells were only located in the parenchymal areas. Flow cytometric analysis confirmed that >90% of BM and 53% of blood ECFP^{bright} cells were CX3CR1^{low}Ly6C^{high}-Mo (CD11b⁺F4/80⁺Ly6G^{neg}NK1.1^{neg}Ly6C^{high}CX3CR1^{low}), and the remaining ECFP^{bright} cells represented CX3CR1^{high}Ly6C^{low} monocytes/macrophages (supplemental Figure 1A, available on the Blood Web site). In the BM sinusoids, we defined circulating monocytes that can be detected in a single picture of the movies, rolling monocytes that are slowed down in the lumen of the vessels, and marginated monocytes either crawling with amoeboid-like shape or completely arrested in the lumen of the vasculature (Figure 1B; supplemental Video 1).

We next compared the behavior of the marginated monocytes in wild-type (WT), *Ccr2*^{-/-}, and *Cx3cr1*^{-/-} mutant mice. In *Ccr2*^{-/-} mice, ECFP⁺ cells in the sinusoids were visually less frequent than in WT mice (supplemental Videos 1 and 2), and the remaining cells were mostly arrested (Figure 1C). In contrast, the proportion of arrested cells was significantly reduced in *Cx3cr1*^{-/-} compared with WT mice with an increased proportion of circulating and rolling cells (Figure 1C; supplemental Videos 1 and 2). Accordingly, the distribution of the cell mean velocity among arrested, crawling, and rolling cells showed an increased proportion of cells with high velocity (>6 µm/min) in *Cx3cr1*^{-/-} mice compared with WT mice (Figure 1D).

To further characterize the nature of the cells present in the vasculature of the BM, we performed blood/tissue partitioning by in vivo CD45 staining.²¹ This approach allowed the discrimination between circulating monocytes, collected by blood drawing, CD45⁺ BM-intravascular monocytes, including marginated and circulating subsets, and CD45⁻ BM-parenchymal monocytes isolated from BM extraction (Figure 1E schema). One hundred percent of circulating cells were labeled after intravascular staining (Figure 1E left). In steady-state BM, both Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo were labeled by the anti-CD45 antibody with a lower MFI compared with circulating monocytes, showing a reduced accessibility of the antibody to the cells in accordance with cell margination to the endothelium (Figure 1E right). The numbers of these intravascular BM monocytes (CD45 in vivo⁺ cells) in 1 tibia of WT mice were 8159 ± 7737 for Ly6C^{high}-Mo and 6758 ± 6687 for Ly6C^{low}-Mo (Figure 1F). The ratio of in vivo CD45⁺Ly6C^{high}/Ly6C^{low}-Mo in the BM (45 ± 18.4%) was similar to the ratio in the bloodstream (45.7% ± 19.6%), suggesting no preferential margination in the BM sinusoids of 1 subset to the other (data not shown). As expected in *Ccr2*^{-/-} mice, the number of intravascular BM Ly6C^{high}-Mo but not that of Ly6C^{low}-Mo was significantly reduced compared with WT. In *Cx3cr1*^{-/-} mice, only

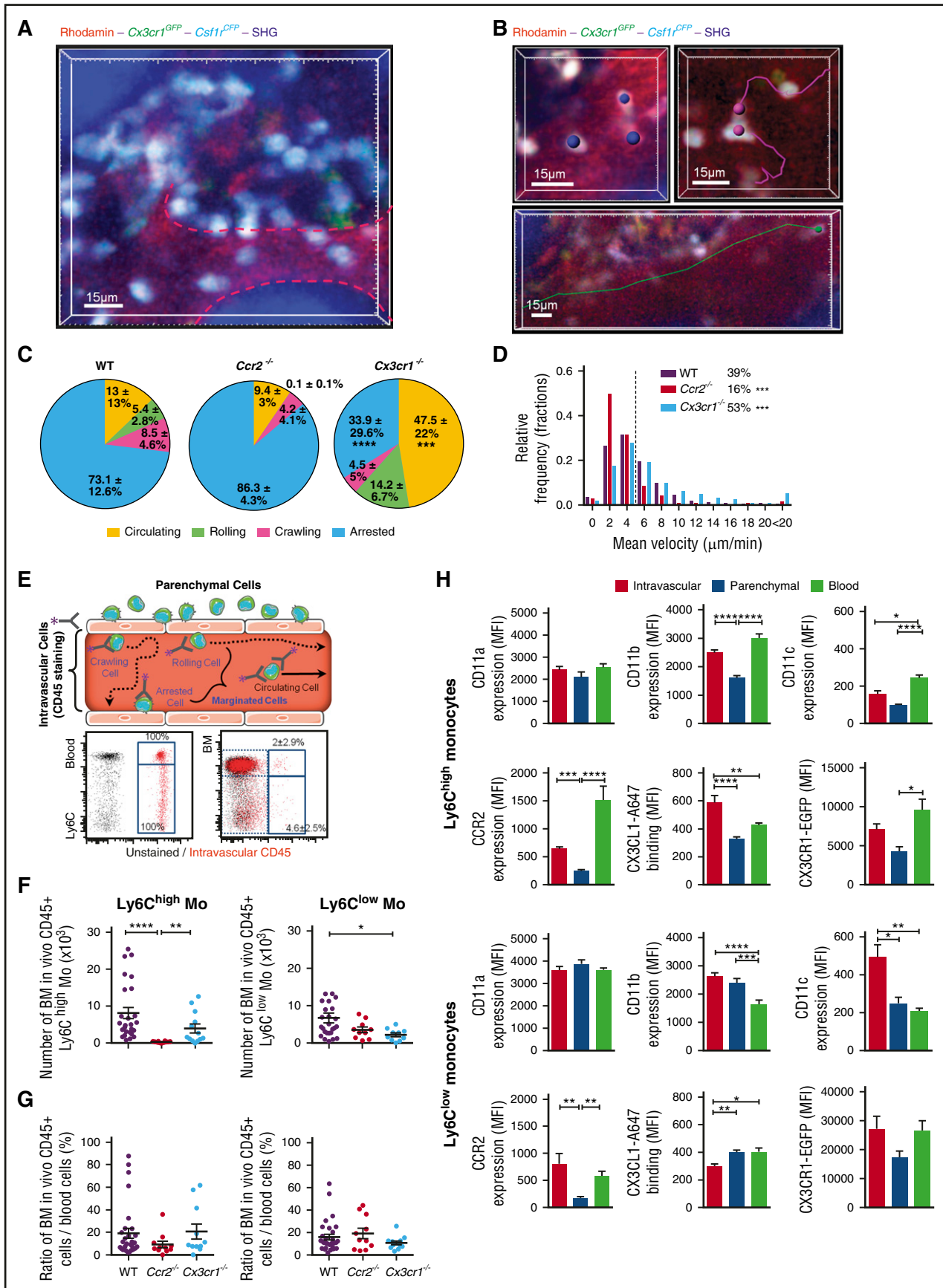


Figure 1.

the number of BM-intravascular Ly6C^{low}-Mo was significantly reduced (Figure 1F). Assuming a total blood volume of 2 mL, we estimated that BM-intravascular CD45⁺Ly6C^{high}-Mo from only 1 thighbone represented up to 19.1% ± 23.9% (median = 9.3%) of the total circulating Ly6C^{high}-Mo and BM-intravascular CD45⁺Ly6C^{low}-Mo represented 15.9% ± 13.9% (median = 10.8%) of the total circulating Ly6C^{low}-Mo (Figure 1G). Considering the numerous other BM niches, this very high concentration of CD45⁺ BM-intravascular monocytes further argues for a specific monocyte enrichment in BM sinusoids. To provide further insights on the origin of marginating monocytes, we performed intravital imaging on parabionts. One month after parabiosis between C57Bl6 (host) and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* (donor) mice, marginated ECFP⁺ monocytes from the donor were detected in the blood vasculature of the host BM as well as within the parenchymal niches (supplemental Figure 1B-C). Flow cytometry confirmed that 66.8% ± 22% of the donor ECFP⁺ monocytes were Ly6C^{high}, arguing that inflammatory monocytes can constitutively exchange between the vasculature and the BM parenchyma (supplemental Figure 1D). In *Ccr2^{-/-}* and *Cx3cr1^{-/-}* mice, the ratio of BM-intravascular to circulating Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo numbers were similar compared with WT mice, suggesting that the margination is in direct correlation with the level of circulating cell at steady state (Figure 1G).

We next investigated whether the BM-intravascular/marginated monocytes expressed differential levels of the CD11 integrins and chemokine receptors (Figure 1H) compared with peripheral blood circulating and BM-parenchymal monocytes. BM-intravascular (CD45⁺) and circulating Ly6C^{high}-Mo expressed similar levels of the integrins CD11b and CD11a. BM-intravascular (CD45⁺) Ly6C^{high}-Mo expressed reduced levels of CD11c and CCR2. Despite expression of the CX3CR1 reporter EGFP was lower, CX3CL1 binding was higher in BM-intravascular compared with peripheral circulating Ly6C^{high}-Mo. CD11b, CCR2, and CX3CR1 levels were increased in the intravascular (CD45⁺) fraction of the BM compared with the parenchymal (CD45⁻) pool. BM-intravascular Ly6C^{low}-Mo displayed increased expression of CD11b, CD11c, and CCR2 compared with its circulating counterpart but reduced level of functional CX3CR1. These different phenotypes further confirm that the BM-intravascular and peripheral circulating monocytes represent distinct pools.

We concluded that in steady-state conditions, both Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo generate a consequent marginating pool in the BM sinusoids. This reservoir is abrogated in the absence of CCR2, and its behavior depends on CX3CR1-mediated adherence to the endothelium lumen.

CCR2 and CX3CR1 control BM parenchymal and vascular monocyte release following intraperitoneal LPS injection

We next investigated the behavior of this marginating pool upon inflammation. Toll-like receptor stimulation using LPS mimics

pathogen infection and permits study of the cell mobilization mechanism in a dose-dependent manner.⁵ Ly6C^{high}-Mo are rapidly released from the BM until 3 hours after intraperitoneal injection of LPS (100 ng/kg) (Figure 2A). At 4 hours, the number of Ly6C^{high}-Mo recovered in the BM suggests a rehoming of mobilized cells from the blood. Neutrophils followed the same mobilization profile as Ly6C^{high}-Mo in the BM, but the number of Ly6C^{low}-Mo in the BM was barely affected by LPS challenge (Figure 2A). Surprisingly, within the first hour, the number of both circulating Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo dropped by 88% ($6.5 \pm 6.1 \times 10^4$ to $0.74 \pm 1.2 \times 10^4$) and 81% ($6.1 \pm 13.6 \times 10^4$ to $1.1 \pm 1.2 \times 10^4$), respectively (Figure 2B). The monocytopenia at 1 hour was specific as neutrophils showed an almost mirrored mobilization kinetic in the blood. Reduced margination in BM sinusoids was also observed at 1 hour for Ly6C^{high}-Mo (57% reduction of in vivo CD45⁺ cells, from $8.2 \pm 7.7 \times 10^3$ to $3.5 \pm 3.4 \times 10^3$, $P = .04$) and to a smaller extent for Ly6C^{low}-Mo (Figure 2C). In contrast, BM-intravascular neutrophils tended to increase at 1 hour in accordance with their massive accumulation in the bloodstream (Figure 2C). The number of blood circulating Ly6C^{high}-Mo was recovered 3 hours post challenge and accumulated by fourfold ($14.9 \pm 14.2 \times 10^4$) after 4 hours according to BM release. Circulating Ly6C^{low}-Mo recovered only 4 hours after challenge, reaching approximately their number at steady state ($8.3 \pm 20.2 \times 10^4$) (Figure 2B). Circulating neutrophil numbers doubled in 1 hour and returned to basal levels at 3 hours after LPS injection. By 4 hours, the margination of both BM-intravascular Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo recovered (Figure 2C) but did not increase with the monocytosis and thus represented only 4.4% ± 3.6% (median = 3.3%) and 11.3% ± 8.3% (median = 8.6%), respectively, of the circulating monocytes of the peripheral blood (data not shown), arguing for a preferential release of Ly6C^{high}-Mo into the bloodstream. The sequential monocytopenia and monocytosis phases were observed in WT and *Cx3cr1^{-/-}* mice with a slight accumulation of circulating Ly6C^{high}-Mo in CX3CR1-deficient mice compared with WT mice (supplemental Figure 2A). As expected, the Ly6C^{high} monocytosis was abrogated in *Ccr2^{-/-}* mice (supplemental Figure 2A). Circulating Ly6C^{low}-Mo recovery 4 hours after LPS stimulation was not affected in both *Cx3cr1^{-/-}* and *Ccr2^{-/-}* mice (supplemental Figure 2A). Intravital imaging of the skull BM confirmed that marginating ECFP⁺ monocytes were cleared from the sinusoids in WT mice and recovered with time (Figure 2D; supplemental Video 3). In *Ccr2^{-/-}* mice, no accumulation of marginating ECFP⁺ cells was observed in the BM vasculature after LPS injection (Figure 2D-E; supplemental Video 3). In CX3CR1-deficient mice, an increased accumulation of BM-intravascular cells compared with WT mice was observed after 1 hour, and even greater numbers accumulated later on (Figure 2D-E; supplemental Video 3). The ratio of crawling to rolling cells increased rapidly after LPS treatment in WT mice (Figure 2F). The mean velocity first dropped down between 60 and 150 minutes after LPS stimulation due to rapid release of the fastest

Figure 1. Intravital imaging reveals a marginated pool of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in BM vasculature. (A) Representative 3-dimensional (3D) 2-photon laser scanning microscopy (3D-TPLSM) pictures showing medullar monocytes in the parenchymal and vascular BM compartments of the skull in MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mice (original magnification ×573). (B) Representative tracks of vascular monocytes displaying arrested (blue; original magnification ×620), crawling (pink; original magnification ×546), and rolling (green; original magnification ×300) behaviors. Vasculature is labeled with 2-MDa Rhodamin-Dextran (red), and bone matrix is identified by SHG (blue). (C) Pie graphs represent the relative proportion of the different monocyte behaviors in each mouse strain (percent ± standard deviation [SD] from 3 to 5 independent experiments are indicated). (D) Relative frequency distribution of vascular monocyte mean velocity (data are pooled from at least 3 independent experiments; percent indicates the proportion of cells faster than 6 μm/min for each mouse strain, and Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed. Statistical significance between the 2 mutants and WT mice is indicated). (E) Scheme illustrates cell behavior and intravascular staining in the BM sinusoids. Representative dot plot showing CD45 intravascular staining (red) overlaid with noninjected control mouse (black) in the blood and the BM. (F) Quantification of the blood/tissue partitioning of monocyte subsets in the different mouse strains. (G) Graphs represent the ratio of intravascular medullar monocytes in 1 thighbone to the total number of circulating monocytes. Black bars represent mean ± standard error of the mean (SEM). (Mice are pooled from at least 3 independent experiments; median is indicated in black, and Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparison test is performed.) (H) Bar graphs show the respective marker expression (as mean fluorescence intensity [MFI]) on intravascular BM monocytes (CD45⁺ cells after in vivo staining), parenchymal BM monocytes (CD45⁻ after in vivo staining), and blood monocytes (CD45⁺ cells from the blood) in WT mice. (Bars represent mean ± SEM. n = 12-14 mice out of 2 to 3 independent experiments; Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed.) * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, **** $P < .0001$.

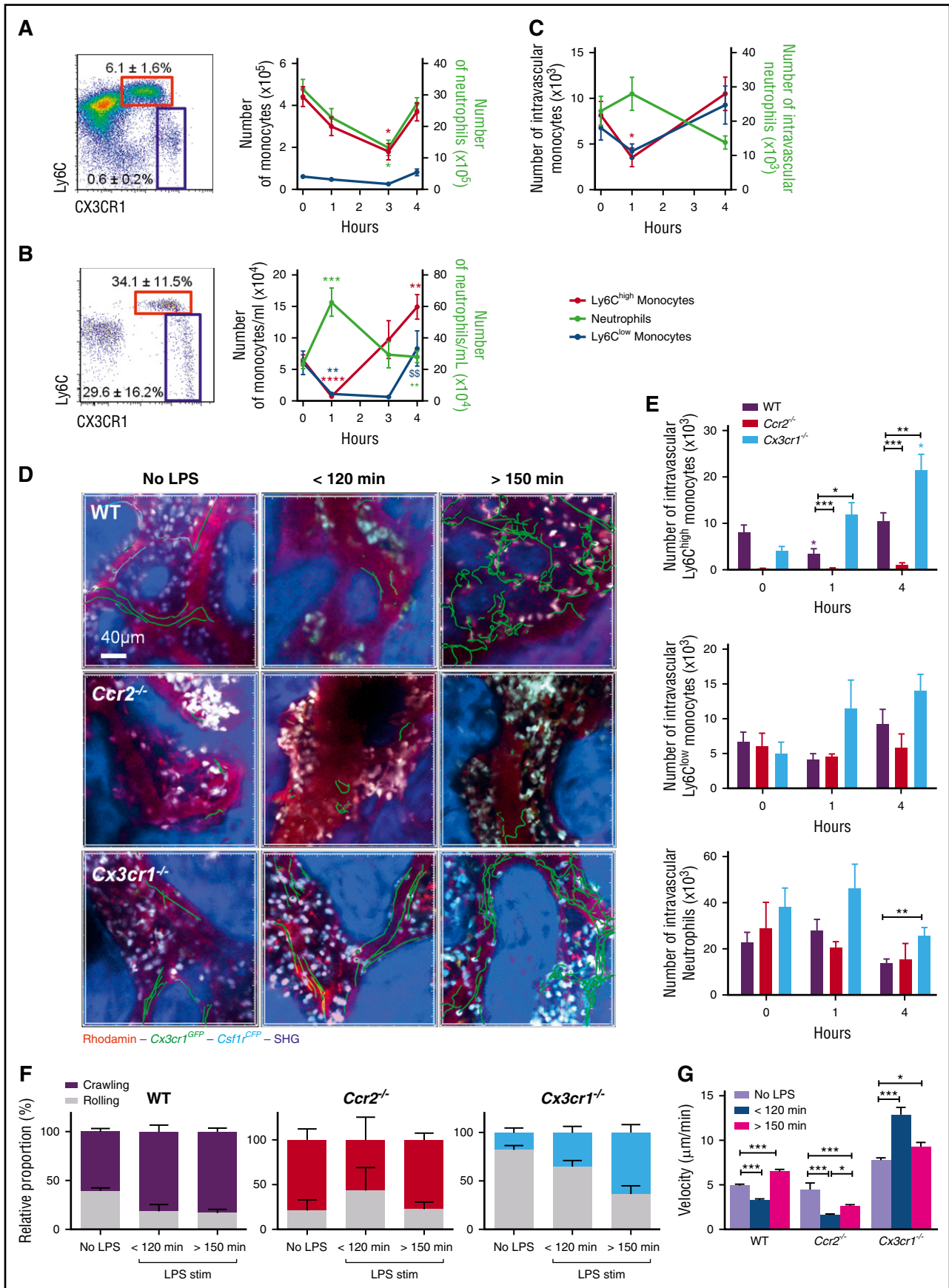


Figure 2.

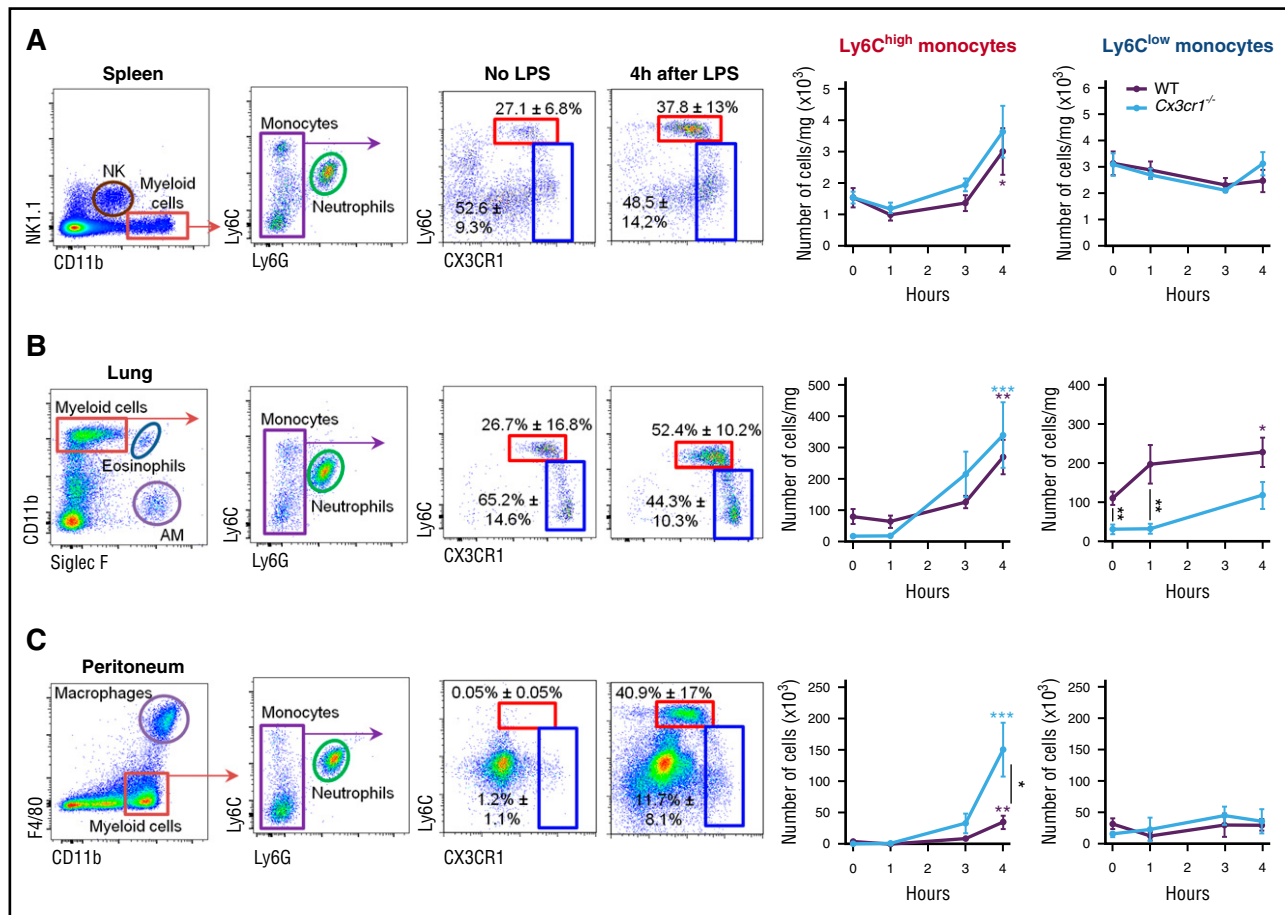


Figure 3. CX3CR1 reduces Ly6C^{high} monocyte release toward the peritoneal cavity during LPS-mediated peritonitis. Kinetics of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocyte mobilization in the spleen (A), the lungs (B), and the peritoneal cavity (C) after intraperitoneal injection of 100 ng/kg LPS in MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* (WT) and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice (*Cx3cr1^{-/-}*). Representative dot plots show the gating strategy to define Ly6C^{high} (red gate) and Ly6C^{low} monocytes (blue gate); percent ± SD are depicted. Graphs represent mean ± SEM of the absolute number per milligram of spleen or lungs and in total after peritoneal cavity lavage (n = 8-13 mice per group and per time point from at least 3 independent experiments). Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test is performed; the significance for each time point compared with untreated mice [t0] are indicated in colored *. Significance between mouse strains are indicated by black * for each time point, and Mann-Whitney test is performed). **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001. AM, alveolar macrophages; NK, natural killer cells.

cells and increased above basal level after 150 minutes (Figure 2G). No change in the behavior of the few ECFP⁺ monocytes present in the BM sinusoids of *Ccr2^{-/-}* mice was observed, except a strong reduction in their mean velocity at early time points that persisted over time (Figure 2F-G). In *Cx3cr1^{-/-}* mice, the change in the ratio between crawling and rolling cells after LPS stimulation was delayed and reduced compared with WT mice (Figure 2F). Moreover, the mean velocity of *Cx3cr1^{-/-}* ECFP⁺ cells was much higher at all time points compared with WT mice (Figure 2G). Following LPS challenge,

parenchymal ECFP⁺ cells increased their mean velocity and straightness in accordance with the parenchymal mobilization and release toward the vasculature (supplemental Figure 2B; supplemental Video 4). This acceleration was not observed in *Ccr2^{-/-}* parenchymal ECFP⁺ cells but strongly increased in the absence of CX3CR1 (supplemental Figure 2B). Our results showed that CCR2 and CX3CR1 tightly regulate medullar monocyte release by controlling both parenchymal egress and the strength of vascular margination.

Figure 2. CCR2 and CX3CR1 control BM parenchymal and vascular monocyte release following intraperitoneal LPS injection. Kinetics of Ly6C^{high} (red), Ly6C^{low} monocytes (blue), and Ly6G⁺ neutrophils (green) mobilization in the BM (A) and the blood (B) after intraperitoneal injection of 100 ng/kg LPS in MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice. Dot plots are gated on CD11b⁺ NK1.1⁻ Ly6G⁻ cells (percent ± SD of the gated populations are indicated). (C) Graph shows the quantification of BM CD45⁺ monocytes and neutrophils after intravascular staining (for all graphs, data represent mean ± SEM of absolute numbers of each subset per thighbone or per milliliter of blood quantified by flow cytometry [n = 6-12 mice for each time point out of 3 independent experiments]; Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test is performed. Only the significance for each time point compared with untreated mice [t0] is indicated). (D) Representative 3D-TPLSM images of the skull BM from MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}*, MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* *Ccr2^{-/-}*, and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice at different time points before and after LPS injection (original magnification ×115). Track paths of vascular ECFP⁺ cells are represented in green. BM sinusoids are labeled by Rhodamin-Dextran (red); bone matrix is detected by SHG (blue), and monocytes are in white/cyan. (E) Flow cytometry quantification of BM CD45⁺ monocytes and neutrophils after intravascular staining in WT, *CCR2^{-/-}*, and *CX3CR1^{-/-}* mice bars represent mean ± SEM from 6-12 different mice per time point out of at least 3 independent experiments. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test is performed. The significance for each time point compared with untreated mice [t0] is indicated by colored *. Significance compared to 1 h is indicated by colored \$\$ (*P* < .01). Significance between mouse strains is indicated by black * for each time point; Mann-Whitney test is performed. **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001; *****P* < .0001). (F) Quantification of the relative proportion in the number of crawling and rolling monocytes in BM sinusoids. Bars represent mean ± SEM calculated from 2 to 5 different mice per group. (G) Mean velocity of ECFP⁺ vascular cells in the BM upon LPS injection (data are pooled from at least 3 different mice per group and per time point. One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's multiple comparison tests is performed).

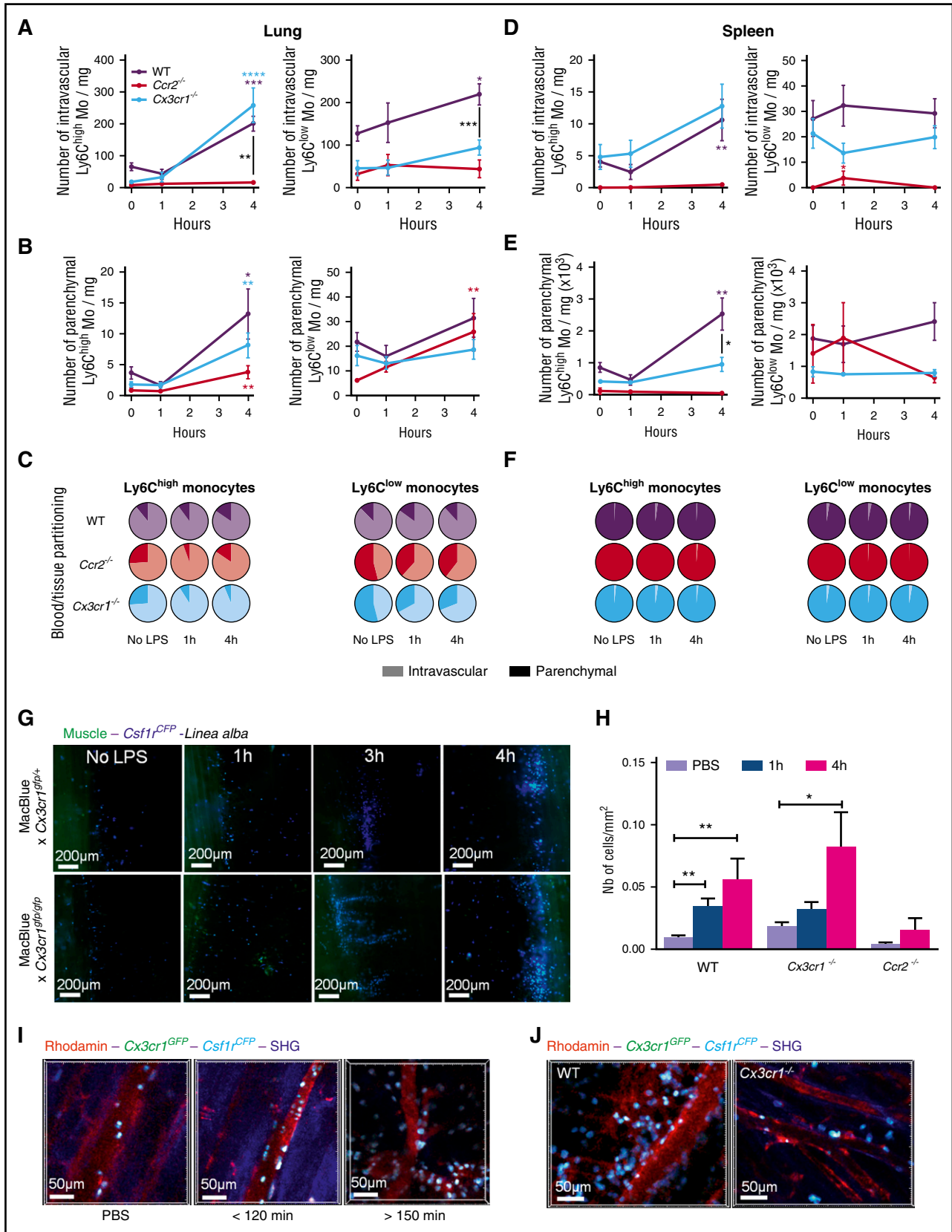


Figure 4. CCR2 and CX3CR1 control monocyte compartmentalization during inflammation. Blood/tissue partitioning of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in the lungs (A-C) and the spleen (D-F) are determined by in vivo CD45 intravascular staining in the different mouse strains after intraperitoneal injection of 100 ng/kg LPS in WT, CCR2-, and CX3CR1-deficient mice. (A,D) Graphs represent mean ± SEM of the absolute number per milligram of tissue of intravascular (CD45⁺) monocytes. (B,E) Graphs represent mean ± SEM of the absolute number of parenchymal (CD45⁻) monocytes. (C,F) Pie graphs represent the relative proportion of parenchymal (dark) and intravascular (clear) monocytes in indicated mouse strains and tissue for all graphs, n = 6-14 mice per group and per time point from at least 2 independent experiments.

CX3CR1 reduces Ly6C^{high} monocyte release toward the peritoneal cavity during LPS-mediated peritonitis

We next evaluated whether the reduced margination of CX3CR1-deficient Ly6C^{high}-Mo in the BM vasculature could have an impact on their systemic distribution.

A slight but nonsignificant reduction of Ly6C^{high}-Mo number was observed in the spleen of WT mice 1 hour after LPS injection; however, Ly6C^{high}-Mo recovered after 3 hours and further accumulated at 4 hours compared with basal value. CX3CR1 deficiency did not affect the kinetic of monocyte mobilization in the spleen (Figure 3A). The number of Ly6C^{low}-Mo in the spleen slightly diminished over time (Figure 3A). In steady-state lungs, the number of both Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo was impaired in *Cx3cr1*^{-/-} mice as previously observed.²³ One hour after LPS stimulation, Ly6C^{high}-Mo numbers remained stable but strongly accumulated at 4 hours (Figure 3B). In contrast, Ly6C^{low}-Mo accumulation was weaker. Accumulation of both Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo subsets was observed in the absence of CX3CR1; however, Ly6C^{low}-Mo did not reach the level of WT mice, suggesting an important role of CX3CR1 in the homing or survival of Ly6C^{low}-Mo in the lungs (Figure 3B).

Surprisingly, in the absence of CX3CR1, Ly6C^{high}-Mo accumulated by fourfold in the peritoneal cavity 4 hours after LPS treatment compared with WT monocytes. In contrast, Ly6C^{low}-Mo numbers displayed nonsignificant variation after LPS stimulation in both mouse strains (Figure 3C).

We concluded that CX3CR1 controls Ly6C^{high}-Mo accumulation into the peritoneal cavity upon LPS stimulation.

CCR2 and CX3CR1 control monocyte blood/tissue partitioning during inflammation

We speculated that strong accumulation of Ly6C^{high}-Mo in the peritoneal cavity of CX3CR1-deficient mice could be due to a defect in their margination to the endothelium of tissue vasculatures. We previously showed that the majority of lung monocytes were trapped in the microcapillaries and in direct contact with blood and airways.²³ Blood/tissue partitioning confirmed that >90% of the lung tissue monocytes are trapped in the lung capillaries and are still labeled by in vivo CD45 staining even 4 hours after LPS stimulation (Figure 4A-C). CX3CR1 deficiency did not affect the trapping of Ly6C^{high}-Mo after LPS stimulation but affected the Ly6C^{low}-Mo, resulting in a higher proportion of parenchymal cells (Figure 4A,C). Few Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo infiltrated the lungs even at 4 hours after LPS treatment (Figure 4B-C). As a control, lung-intravascular Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo did not accumulate in *Ccr2*^{-/-} mice, but the low Ly6C^{low}-Mo infiltration was still similar to WT mice (Figure 4A-C). In contrast to the lungs, the proportion of intravascular (in vivo CD45⁺) monocytes in the splenic reservoir was minor (Figure 4C,F). Spleen-intravascular Ly6C^{high}-Mo were similar in WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice (Figure 4D); however, the splenic extravasation was slightly reduced at steady state but further significantly impaired at 4 hours in CX3CR1-

deficient mice ($P = .01$) (Figure 4E). The Ly6C^{high}-Mo defect in *Ccr2*^{-/-} mice was conserved in the 2 spleen compartments (Figure 4D-E). The number of spleen-intravascular Ly6C^{low}-Mo remained unchanged over time, and no significant infiltration into the spleen was observed in all mouse strains. Overall, the ratio between spleen-intravascular and spleen-parenchymal monocyte subsets was conserved over time (Figure 4F).

In order to exclude that monocyte accumulation in the peritoneal cavity of *Cx3cr1*^{-/-} mice could be due to a defect in their adherence to the peritoneal membrane, we performed histological analysis by fluorescent microscopy on fresh tissue of the inner side parietal sheet of the peritoneum along the linea alba (white line) from MacBlue×*Cx3cr1*^{sfip/+} and MacBlue×*Cx3cr1*^{sfip/gfp} mice (Figure 4G). ECFP⁺ cell accumulation was detectable as early as 1 hour after LPS treatment. By 3 to 4 hours after LPS injection, numerous dense clusters of ECFP⁺ monocytes accumulated along the linea alba (Figure 4H). Monocyte accumulation was similar in WT and CX3CR1-deficient mice, and as expected, completely abrogated in *Ccr2*^{-/-} mice (Figure 4H). Intravital imaging of the parietal sheet vasculature confirmed that circulating monocytes within the first hour following LPS injection margined locally in the vascular lumen and strongly accumulated over time (Figure 4I; supplemental Video 5). In *Cx3cr1*^{-/-} mice, this margination was almost completely abrogated and was associated with the massive accumulation in the peritoneal cavity (Figure 4J; supplemental Video 6). Our results show that inflammatory monocytes can reside in the vascular lumen of inflamed tissues and that extravasation is not a mandatory fate for monocytes.

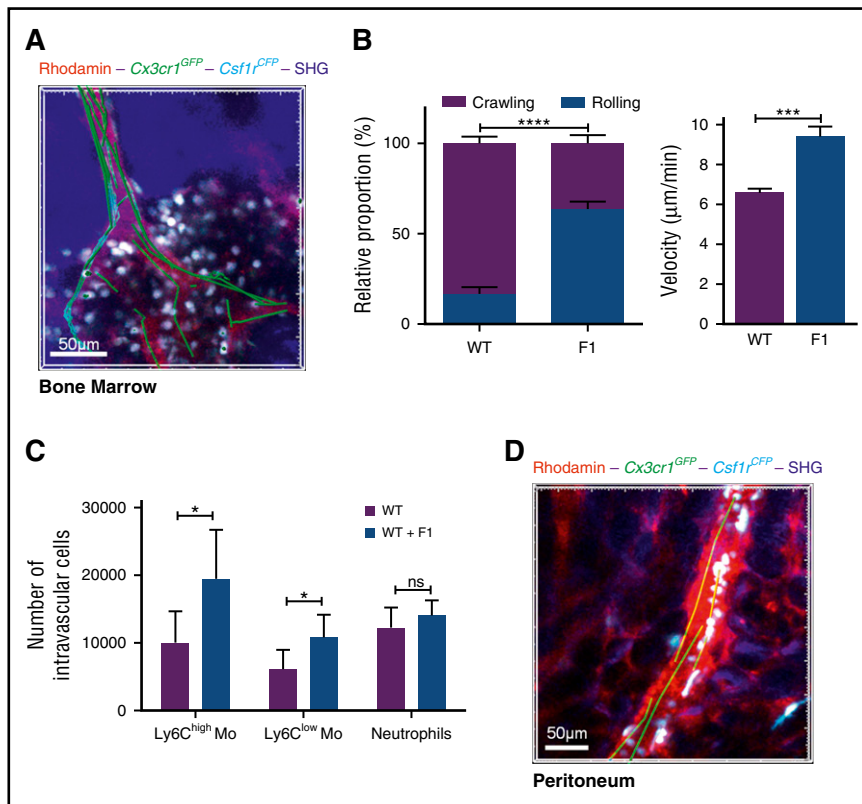
CX3CR1 blockade induces systemic monocyte demargination

We previously showed that the F1²⁰ blocks monocyte CX3CR1-mediated monocyte adherence.¹¹ We used F1 to confirm that monocyte margination is CX3CR1 dependent and exclude potential mouse strain-associated effects. CX3CR1 blockade with F1 reduced monocyte adherence to BM endothelium 4 hours after LPS treatment, increased their mean velocity (Figure 5A-B; supplemental Video 7), and increased the number of BM-intravascular as well as circulating Ly6C^{high}-Mo compared with WT mice (Figure 5C). Monocyte margination in the proximal blood vessels of the peritoneum was also lost in F1-treated mice (Figure 5D; supplemental Video 7).

CX3CR1-dependent Ly6C^{high}-monocyte margination control monocyte deployment during CLP-induced peritonitis

We next investigated whether similar observation could be done after CLP, a more severe and clinically relevant model of sepsis. CLP induced an increased monocyte and neutrophil margination within 4 hours compared with sham-operated mice in the BM, the lungs, and the spleen (Figure 6A). BM margination was observed by real-time imaging on CLP-operated MacBlue×*Cx3cr1*^{sfip/+} mice (Figure 6B). F1 treatment led to reduced adherence of monocytes as depicted by increased velocity and straightness (Figure 6C). Monocyte margination in the peritoneal vasculature after CLP was also severely impaired

Figure 4 (continued) Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed, and the significance for each time point compared with untreated mice [t0] is indicated in colored *. Significances between mouse strains are indicated by black * for each time point. Mann-Whitney test is performed. (G) Representative fluorescent wide field pictures of the inner side of the parietal sheet of the peritoneal membrane (green autofluorescence) at different time point after LPS injection in MacBlue×*Cx3cr1*^{sfip/+} and MacBlue×*Cx3cr1*^{sfip/gfp} mice show ECFP⁺ monocytes (cyan) accumulation along the linea alba (dark area; original magnification ×20). (H) Quantification of monocyte accumulation along the linea alba in the different mouse strains (n = 3-8 mice in each group, Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparisons test is performed for each strain). * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$. (I) Representative time-lapse in vivo 3D images of the peritoneal membrane vasculature in MacBlue×*Cx3cr1*^{sfip/+} shows monocyte accumulation, adhering to the endothelium at different time points after LPS injection (original magnification ×20). Vessels are labeled by Rhodamin-Dextran injection prior to imaging session (red). SHG shows conjunctive tissue of the peritoneal membrane. (J) Comparative 3D-TPLSM images showing monocyte accumulation in the peritoneal vasculature 4 hours after LPS injection in MacBlue×*Cx3cr1*^{sfip/+} (WT) and MacBlue×*Cx3cr1*^{sfip/gfp} mice (*Cx3cr1*^{-/-}) (original magnification ×106).



by F1 treatment (Figure 6D; supplemental Video 8). Finally, this F1-mediated demargination selectively affected Ly6C^{high}-monocyte distribution between the lungs and the peritoneal cavity, with a preferential relocation from the lungs toward the peritoneum compared with untreated CLP-operated mice (Figure 6E). We conclude that CX3CR1 is a key regulator of monocyte deployment during sepsis.

Discussion

Blood vessels have a central role in the regulation of monocyte distribution in steady state and in pathological conditions. Surprisingly, our knowledge of cell behavior in the vasculature is very limited as it is never considered a tissue of residency for leukocytes. Moreover, the characterization of blood cells is restricted to the circulating cells that are harvested from blood draw, cells adhering/marginating to the endothelial lumen being barely accessible. Three decades ago, considering the rate of BM production and the frequency of monocytes into the blood, despite a lack of experimental evidences, van Furth and Sluiter already suspected that blood monocytes might be distributed into a circulating and a marginating pool.¹² The frequency of patrolling monocytes identified by Auffray et al may represent approximately one-third of the total Ly6C^{low}-Mo pool of the vasculature,^{1,25} but this may not account for the pool of marginated cells estimated by van Furth. We combined intravital imaging and blood/tissue partitioning using intravascular leukocyte labeling to demonstrate that a massive pool of vascular monocytes is marginated in the BM sinusoids at steady state. These marginated monocytes include Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo subsets in similar proportions. We extrapolated that in 1 thighbone the number of marginated cells represented ~20% of the number of circulating Ly6C^{high}-Mo. Considering all the BM niches and the lung

capillaries that we have previously shown to sequester monocytes,²³ the proportion of marginated monocytes in the total vasculature of the body is increasingly being realized to be a major source of monocytes, as suggested by van Furth.¹² Interestingly, despite its role as a monocyte reservoir,⁴ the spleen vasculature does not represent an important site of monocyte margination, confirming that monocytes are stocked in the parenchymal red pulp.

Patrolling activity of Ly6C^{low}-Mo in the peritoneal vasculature was previously described to be dependent of the integrin CD11a lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1).¹ We compared the expression of the 3 integrins CD11a, b, and c between marginated and circulating monocytes but found no major difference in Ly6C^{high}-Mo, but did discover increased CD11b and CD11c expression between circulating and marginated Ly6C^{low}-Mo. CD11a neutralization using a specific antibody led to an almost complete depletion of both circulating and marginated monocyte subsets (data not shown). We thus could not conclude on a specific role of CD11a in monocyte margination. CX3CR1 has also been shown to be involved in the patrolling activity of Ly6C^{low}-Mo.^{1,25,26} So far, the CX3CR1 expression on the 2 mouse monocyte subsets has been evaluated based on the EGFP expression in the knock-in *Cx3cr1^{gfp/+}*. We compared on Ly6C^{high}-Mo and Ly6C^{low}-Mo the functional expression of CX3CR1 using CX3CL1-AF647 binding with EGFP expression reflecting transcriptional activity of *Cx3cr1* promoter. Although EGFP level was lower on Ly6C^{high}-Mo compared with Ly6C^{low}-Mo, we found similar specific binding of the chemokine on both blood subsets, suggesting that the role of CX3CR1 on Ly6C^{high} could have been underestimated so far. Indeed, we observed that BM-intravascular Ly6C^{high}-Mo displayed even more CX3CL1 binding than their circulating counterparts. This result was in accordance with a role of CX3CR1 in the adherence of Ly6C^{high}-Mo in the BM vasculature. Chemokine binding confers high sensitivity due to its strong affinity for the receptor and intracellular accumulation with

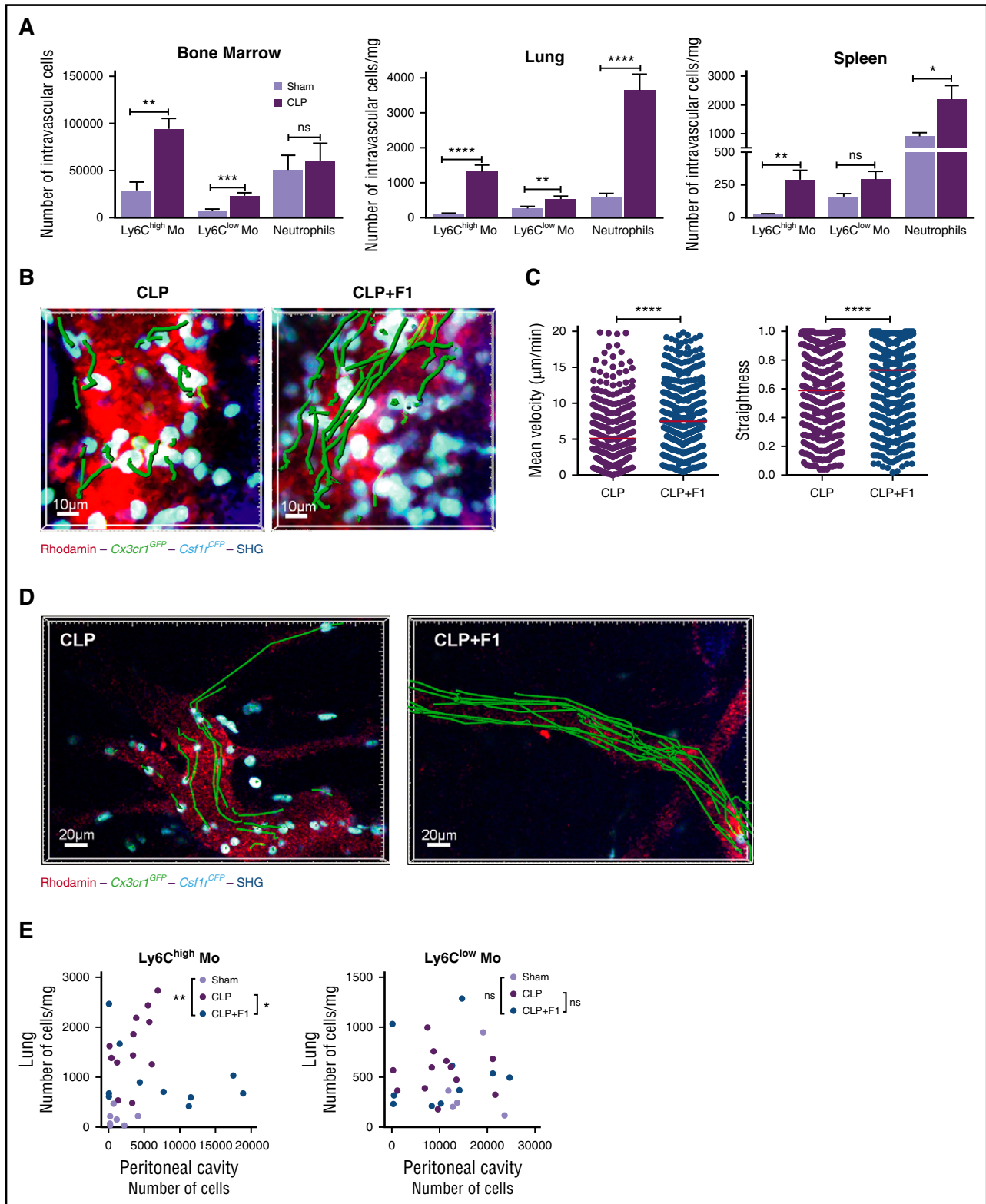


Figure 6. CX3CR1-dependent Ly6C^{high}-monocyte margination controls monocyte deployment during CLP-induced peritonitis. (A) Quantification by flow cytometry of BM, lung, and spleen-intravascular Ly6C^{high}, Ly6C^{low} monocytes, and neutrophils in Sham and CLP-operated after in vivo CD45 intravascular staining (bars represent mean ± SEM from 7 to 11 different mice per time point out of 3 to 4 independent experiments; Mann-Whitney test is performed). **P* < .05; ***P* < .01; ****P* < .001; *****P* < .0001. (B) 3D-TPLSM images of the skull BM from MacBlue × Cx3cr1^{GFP/+} 4 hours after CLP treated or not with the F1 (50 μg injected intraperitoneally) (original magnification ×440). Representative track paths are represented in green. (C) Quantification of monocyte mean velocity and straightness in the vascular lumen of the BM sinusoids from MacBlue × Cx3cr1^{GFP/+} mice treated or not with CX3CR1 antagonism (F1) 4 hours after CLP (median is indicated in red. Data are pooled from different movies out of 3 different mice. Mann-Whitney test is performed; *****P* < .0001). (D) In vivo 3D-TPLSM image of the peritoneal vasculature showing ECFP⁺ monocyte adherence to endothelium 4 hours after CLP in the presence or not of F1 (original magnification ×230). Representative track paths are represented in green (see supplemental Video 8). (E) Scatter plots show the distribution of the absolute number of Ly6C^{high} and Ly6C^{low} monocytes in the lung versus the peritoneal cavity in Sham, CLP, and CLP treated with F1 4 hours after operation. Statistical differences in the distribution have been measured by a 2-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison tests.

receptor turnover; this observation points out that EGFP expression does not purely reflect functional CX3CR1 expression on monocyte subsets and thus requires caution for future interpretations. Similar margination was not observed in steady-state peritoneum, suggesting that Ly6C^{high} adherence to the endothelium might be different considering the anatomical locality of the vessels. Within the first hour following low-dose LPS injection in the peritoneal cavity, a drastic monocytopenia occurred. This diminution was previously observed by Shi et al in the same model of peritonitis but was not examined.⁵ In contrast, the number of circulating neutrophils increased by threefold in the meantime. Interestingly, in lungs and spleen, Ly6C^{high}-Mo numbers tended to diminish at 1 hour after LPS challenge. Accumulation of Ly6C^{high}-Mo was only observed in the peritoneal membrane vasculature by in vivo imaging, suggesting a rapid relocalization of the marginated monocyte niches toward the peritoneal membrane. We thus demonstrated that BM marginated monocytes are the first released cells and (together with circulating monocytes) the most rapidly mobilized cells toward the inflammatory site. What regulates the relative proportion between circulating and marginated monocytes is unclear. High doses of LPS were shown to increase the sequestration in vascular beds,^{27,28} which as a consequence reduces the proportion of circulating cells.⁵

The expected outcome of cell margination is to undergo extravasation toward the inflammatory site through sequential expression of adherent selectin and integrins.^{29,30} More surprisingly, we observed that CX3CR1 expression participated in the retention of inflammatory monocytes into the endothelial lumen. This important observation led us to conclude that inflammatory monocyte infiltration into the inflamed tissue is not a mandatory fate and that blood retention might have regulatory function. In the course of cecal ligation and puncture-induced sepsis, we reported that CX3CR1-dependent Ly6C^{high}-Mo adherence to the renal endothelium exerts a protective effect against kidney injuries.¹⁹ Herein, we extended the role of CX3CR1 in the systemic distribution of Ly6C^{high}-Mo during the early phase of acute inflammation. It is likely that monocyte adherence to the endothelium is an important feature of the compensatory anti-inflammatory response syndrome,^{31,32} through interleukin-1 receptor alpha release for instance,¹⁹ and through the cleaning of amyloid β ,³³ dead cells, and potential pathogens in the vasculature.²⁵ Margination was still increased at day 7 in CLP-operated mice, suggesting that the regulation between marginated and circulating cells is not only a feature of acute inflammation (data not shown). In addition, we previously showed that F1 antagonist treatment can limit the development of atherosclerotic plaques by reducing monocyte

adherence, which, by contrast, demonstrate a deleterious effect of CX3CR1-dependent monocyte margination in a chronic disease.³⁴

Our results provide novel insights into the regulation of monocyte fate and deployment in steady-state or inflammatory conditions and, more specifically, into the role of CX3CR1 expression by the Ly6C^{high}-Mo subset. Regulating the CX3CR1/CX3CL1 axis represents an interesting approach to regulate the recruitment of inflammatory cells and modulate the outcome of the inflammatory response.

Acknowledgments

The authors thank Andrew J. Hutton for English editing of the manuscript and M. P. Rodero and C. Auffray for helpful discussions and the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière for assistance with the 2-photon microscope and the animal facility "Nouvelle Animalerie Commune." The research leading to these results has received funding from INSERM, from Centre National de la Recherche Scientifique, from Université Pierre et Marie Curie, from Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe labélisée," from "Agence Nationale de la Recherche," project CMOS (CX3CR1 expression on monocytes during sepsis) 2015 (ANR-EMMA-050). P.H. was supported by the "Ligue Contre le Cancer."

Authorship

Contribution: P.H. designed, performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript; P.-L.L., F.L., and C.B.d.C. performed some experiments; C.C. designed research and wrote the manuscript; A.B. supervised the study, designed and performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: A.B., 0000-0002-7770-7210.

Correspondence: Alexandre Boissonnas, INSERM U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France; e-mail: alexandre.boissonnas@upmc.fr.

References

- Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666-670.
- Yona S, Kim KW, Wolf Y, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis [published correction appears in *Immunity*. 2013; 38(5):1073-1079]. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.
- Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 2004;172(7):4410-4417.
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009;325(5940):612-616.
- Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, et al. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2011;34(4):590-601.
- Tsou CL, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117(4):902-909.
- Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7(3):311-317.
- Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009;113(4):963-972.
- Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, et al. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*. 2001; 276(41):37993-38001.
- Hermand P, Pincet F, Carvalho S, et al. Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain. *J Biol Chem*. 2008; 283(44):30225-30234.
- Jacquelin S, Licata F, Dorgham K, et al. CX3CR1 reduces Ly6C^{high}-monocyte motility within and release from the bone marrow after chemotherapy in mice. *Blood*. 2013;122(5):674-683.
- van Furth R, Sluiter W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J Exp Med*. 1986;163(2):474-479.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-774.
- Doherty DE, Downey GP, Schwab B III, Elson E, Worthen GS. Lipopolysaccharide-induced monocyte retention in the lung. Role of monocyte stiffness, actin assembly, and CD18-dependent adherence. *J Immunol*. 1994;153(1):241-255.

15. O'Dea KP, Young AJ, Yamamoto H, Robotham JL, Brennan FM, Takata M. Lung-marginated monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(9):1119-1127.
16. Charavaryamath C, Janardhan KS, Caldwell S, Singh B. Pulmonary intravascular monocytes/macrophages in a rat model of sepsis. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288(12):1259-1271.
17. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*. 2000;20(11):4106-4114.
18. Ovchinnikov DA, van Zuylen WJ, DeBats CE, Alexander KA, Kellie S, Hume DA. Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J Leukoc Biol*. 2008;83(2):430-433.
19. Chousterman BG, Boissonnas A, Poupel L, et al. Ly6Chigh monocytes protect against kidney damage during sepsis via a CX3CR1-dependent adhesion mechanism. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(3):792-803.
20. Dorgham K, Ghadiri A, Hermand P, et al. An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol*. 2009;86(4):903-911.
21. Anderson KG, Mayer-Barber K, Sung H, et al. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat Protoc*. 2014;9(1):209-222.
22. Girgis NM, Gundra UM, Ward LN, Cabrera M, Frevert U, Loke P. Ly6C(high) monocytes become alternatively activated macrophages in schistosoma granulomas with help from CD4+ cells. *PLoS Pathog*. 2014;10(6):e1004080.
23. Rodero MP, Poupel L, Loyher PL, et al. Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *eLife*. 2015;4:e07847.
24. Sauter KA, Pridans C, Sehgal A, et al. The MacBlue binary transgene (csf1r-gal4VP16/UAS-ECFP) provides a novel marker for visualisation of subsets of monocytes, macrophages and dendritic cells and responsiveness to CSF1 administration. *PLoS One*. 2014;9(8):e105429.
25. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. 2013;153(2):362-375.
26. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(6):1306-1316.
27. Andonegui G, Bonder CS, Green F, et al. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest*. 2003;111(7):1011-1020.
28. Andonegui G, Zhou H, Bullard D, et al. Mice that exclusively express TLR4 on endothelial cells can efficiently clear a lethal systemic Gram-negative bacterial infection. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1921-1930.
29. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood*. 2009;114(21):4613-4623.
30. Zuchtriegel G, Uhl B, Hessenauer ME, et al. Spatiotemporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes in the acute inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(4):899-910.
31. Petit-Bertron AF, Fitting C, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10. *J Leukoc Biol*. 2003;73(1):145-154.
32. Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost*. 2009;101(1):36-47.
33. Michaud JP, Bellavance MA, Préfontaine P, Rivest S. Real-time in vivo imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. *Cell Reports*. 2013;5(3):646-653.
34. Poupel L, Boissonnas A, Hermand P, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(10):2297-2305.



blood[®]

2017 129: 1296-1307

doi:10.1182/blood-2016-08-732164 originally published
online December 23, 2016

CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6C^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice

Pauline Hamon, Pierre-Louis Loyher, Camille Baudesson de Chanville, Fabrice Licata, Christophe Combadière and Alexandre Boissonnas

Updated information and services can be found at:

<http://www.bloodjournal.org/content/129/10/1296.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Immunobiology and Immunotherapy](#) (5603 articles)

[Phagocytes, Granulocytes, and Myelopoiesis](#) (659 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://www.bloodjournal.org/site/subscriptions/index.xhtml>

CX3CR1-dependent endothelial margination regulates Ly6C^{high} monocyte systemic deployment upon inflammation in mice

Pauline Hamon, Pierre-Louis Loyher, Camille Baudesson de Chanville, Fabrice Licata,
Christophe Combadière and Alexandre Boissonnas^{1*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06 UMR_S1135, Institut universitaire de cancérologie (IUC), Inserm U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013, Paris, France.

Running title: CX3CR1 regulates blood monocyte margination

*** Corresponding author:**

Alexandre Boissonnas

e-mail: alexandre.boissonnas@upmc.fr

CIMI U1135 91 Bd de l'hôpital 75013 Paris, France

Tel: +33140779840 fax: +33140779734

Supplemental Data

Supplemental Methods

Ethical statement

All experiment protocols were approved by the French animal experimentation and ethics committee and validated by “Service Protection et Santé Animales, Environnement” with the number A-75-2065 for LPS experiments and A-75-1315 for parabiosis and A751320 for Cecal ligation and puncture experiments. Sample sizes were chosen to assure reproducibility of the experiments and according to the 3Rs of animal ethic regulation.

Parabiosis

C57Bl6 female host parabions were generated with MacBlue x *Cx3cr1^{gfp/+}* females and analyzed after one month of parabiosis. Blood T cell chimerism was tested after 2 weeks and was between 40-60% as previously described {Rodero, 2015 #910}. All mice were used between 8 and 12 weeks old.

Flow cytometry

The panel of antibodies used was: anti-CD11b (clone M1/70), anti-Ly6C (clone AL-21), anti-Ly6G (clone 1A8), anti-NK1.1 (clone PK136), F4/80 (clone BM8), anti-IAb (clone AF6-120.1), anti-CD11c (clone HL3), anti-Siglec F (clone E50-2440), anti-CD45 (clone 30-F11), anti-CD64 (clone X54-5/7.1) (Pharmingen, BD Bioscience).

Calculation of absolute number was performed by adding to each vial a fixed number (10.000) of nonfluorescent 10µm polybead®carboxylate microspheres (Polysciences, Niles, IL, USA) according to the formula: Nb of cells = (Nb of acquired cells x 10.000) / (Nb of acquired beads).

Number of cells obtained for each sample was normalized to the whole thighbone, per mg of tissue and per mL of blood.

Multi-photon Imaging

Intravital imaging was performed on mouse calvaria bone tissues according to the published protocol {Hamon, 2015 #909}. For the peritoneum vasculature imaging, mice were anesthetized with Isofluran 2.5% vaporized in a 70/30 mixture of O₂/N₂O. Peritoneum cavity was opened along the white line and the left flap was immobilized with a homemade support and covered with a coverslip to observe the inner side of the parietal sheet. Skin vasculature of the ear was imaged using a homemade support. Mouse temperature was monitored and maintained at 37°C. Peritoneum and skin vasculatures were defined using intravenous injection of 2MDa tetramethylrhodamine-Dextran (Invitrogen) prior to the imaging session. For CX3CR1 pharmacological blockade, concomitantly with LPS injection, 50µg of F1 antagonist {Dorgham, 2009 #305} was injected intravenously.

The Two-Photon Laser Scanning Microscopy (TPLSM) set-up used was a Zeiss LSM 710 NLO multiphoton microscope (Carl Zeiss, Germany) coupled to a Ti:Sapphire Crystal laser (Coherent ChameleonU, CA, USA) which provides 140fs pulses of NIR light, selectively tunable between 680nm and 1080nm and an acousto-optic modulator to control laser power. The system included three external non-descanned detectors in reflection which allow the simultaneous record of three fluorescent channels using a combination of 2 dichroic mirrors (565nm and 690nm) with 565/610, 500/550 bandpass filters and 485 lowpass filter. The excitation wavelength was 870nm. For bone marrow and peritoneum membrane imaging, cell motility was measured every 30s by 5 consecutive 3µm z spacing stacks (total 12µm thickness) using a plan apochromat x20 (NA = 1) water immersion objective. For skin vasculature, 1 single image was recorded every 10s.

ECFP⁺ cells were monitored over time with 3-dimensional automatic tracking and manual correction with Imaris software (Bitplane, Zurich, Switzerland). Cells that could not be tracked for more than 2min were not considered. Cells localized at the bone surface were not considered. Velocity and straightness were determined using Imaris. The track straightness corresponds to the ratio of the distance between the initial and the final positions of each cell to the total distance covered by the same cell. Cells in the bone marrow vasculature were manually monitored from the collected videos. Cell behavior was classified into three distinct types. i) Arrested cells that display no significant displacement over time. ii) Rolling cells with a round shape moving straight forward and following the blood flow without making arrest and iii) crawling cells that migrate slowly on the endothelium with an ameboid-like shape. The cell numbers were normalized to the time and the volume of the vasculature calculated from our 3D videos using image J software. Cell acceleration is represented by the fold increase in cell velocity after LPS treatment and is determined by normalizing cell mean velocities at different time points to the global mean velocity before treatment. The acquisition and analysis protocols for all experimental conditions to be compared were identical.

Statistical Analysis

All statistical analysis were performed with Graphpad Prism. Each sample values were first tested for Gaussian distribution by D'Agostino & Pearson omnibus normality test.

Accordingly, multigroup analysis of variances were performed, one-way or two-way anova tests followed by Bonferroni post tests for Gaussian distribution or Kruskal Wallis followed by Dunn's multiple comparison for non-Gaussian distribution. For simple comparison analysis, student t test was performed to compare parametric distribution and Mann-Whitney for non-parametric distribution. Symbols used *, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.001, **** p<0.0001, ns=not significant).

Supplementary Video Legends

Video 1: Intravascular monocyte behaviours in steady state skull bone marrow of WT mice

Montage of time-lapse 3D live imaging movies shows ECFP⁺ cell behaviours in the bone marrow sinusoids of MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mice (WT). Prior to imaging, mice were injected with 250µg of 2MDa rhodamine dextran in order to distinguish bone marrow sinusoids (red). The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, vessels are in red, and the SHG signal indicate bone matrix (blue). Representative track paths are displayed (green).

Video 2: Intravascular monocyte behaviours in steady state skull bone marrow of CCR2- and CX3CR1-deficient mice

Montage of time-lapse 3D live imaging movies shows ECFP⁺ cell behaviours in the bone marrow sinusoids of MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+} Ccr2^{-/-}* mice (*Ccr2^{-/-}*) and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice (*Cx3cr1^{-/-}*). Prior to imaging, mice were injected with 250µg of 2MDa rhodamine dextran in order to distinguish bone marrow sinusoids (red). The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, vessels are in red, and the SHG signal indicate bone matrix (blue). Representative track paths are displayed (green).

Video 3: Intravascular monocyte behaviours before and after LPS injection in skull bone marrow sinusoids

Montage of time-lapse live imaging movies shows ECFP⁺ cell behaviours in the skull bone marrow tissue of MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}*, MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+} Ccr2^{-/-}* and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice before and after LPS injection. Mice were injected with 2MDa rhodamine dextran in order to distinguish bone marrow sinusoids (red). The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, bone matrix is visualized by SHG (blue). Representative track paths are displayed (green).

Video 4: Parenchymal monocyte behaviours before and after LPS injection in skull bone marrow sinusoids

Montage of time-lapse live imaging movies shows parenchymal ECFP⁺ cell behaviours in the skull bone marrow tissue of MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mice before and after LPS injection. Mice were injected with 2MDa rhodamine dextran in order to distinguish bone marrow sinusoids (red) from the parenchyma. The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, bone matrix is visualized by SHG (blue). Representative track paths are displayed (yellow).

Video 5: Intravascular monocyte behaviours before and after LPS injection in peritoneal membrane vasculature of WT mice

Montage of time-lapse live imaging movies shows ECFP⁺ cell behaviours in the peritoneal membrane vasculature of MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mice before and after LPS injection. Mice were injected with 2MDa rhodamine dextran in order to distinguish vessels (red). The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, conjunctive tissue is visualized by SHG (blue).

Video 6: Comparative intravascular monocyte behaviours after LPS injection in peritoneal membrane vasculature between WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice

Montage of time-lapse live imaging movies shows ECFP⁺ cell behaviours in the peritoneal membrane tissue of MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* and MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/gfp}* mice 3h after LPS injection. Mice were injected with 2MDa rhodamine dextran in order to distinguish vessels (red). The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, conjunctive tissue is visualized by SHG (blue).

Video 7: Intravascular monocyte behaviours after LPS injection and CX3CR1 inhibition in skull bone marrow sinusoids and peritoneal membrane vasculature of WT mice

Montage of time-lapse live imaging movies shows ECFP⁺ cell behaviours in the skull bone marrow tissue and the peritoneal membrane tissue of MacBlue×*Cx3cr1^{gfp/+}* mice 3h after LPS and CX3CR1 antagonist (F1) i.v. injection. Mice were injected with 2 MDa rhodamine

dextran in order to distinguish vessels (red). The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, bone matrix and conjunctive tissue are visualized by SHG (blue).

Video 8: Comparative intravascular monocyte behaviours after CLP-induced peritonitis with or without CX3CR1 inhibition in peritoneal membrane vasculature of WT mice

Montage of time-lapse live imaging movies shows ECFP⁺ cell behaviours in the peritoneal membrane tissue of MacBlue×*Cx3cr1^{sfp/+}* mice 4h after CLP-induced peritonitis and CX3CR1 antagonist (F1) i.v. injection. Mice were injected with 2 MDa rhodamine dextran in order to distinguish vessels (red). The ECFP signal is in cyan, the EGFP signal in green, conjunctive tissue is visualized by SHG (blue). Representative track paths are displayed (green).

Supplementary Figures legends

Figure S1: Phenotype and origin of circulating and BM-intravascular ECFP⁺ cells

(A) Histogram plots show surface expression of the indicated markers gated on ECFP^{bright} EGFP^{low} cells (red gate) and ECFP^{bright} EGFP^{high} cells (blue gate) from the bone marrow (upper panels) and the blood (lower panels) of a MacBlue x *Cx3cr1^{gfp/+}* mouse. Full minus one staining controls are indicated in grey. (B) TPLSM images show distinct monocyte behaviors in the bone marrow parenchyma and vasculature in C57Bl6 host parabiont with MacBlue x *Cx3cr1^{gfp/+}* mouse. Representative track paths are represented in green. Vasculature is in red and bone matrix in blue. (C) Bars represent the quantification of the mean velocity of parenchymal and vascular monocyte in the C57Bl6 parabiont host (Bars represent mean±SEM, data are pooled from 6 different parabionts, Mann-Whitney test is performed, **** p<0.0001). (D) Dot plot shows the relative proportion of monocyte subsets in the BM of C57Bl6 host mice (Percent mean±SD from 4 parabionts are indicated).

Figure S2: Medullar monocyte mobilization in CCR2 and CX3CR1 deficient mice

(A) Quantification of Ly6C^{high} (left) Ly6C^{low} monocytes (right) mobilization in the blood after intraperitoneal injection of 100ng/kg LPS in WT (purple), CCR2- (orange) and CX3CR1-deficient mice (turquoise) (data represent mean±SEM of absolute numbers per mL of blood quantified by flow cytometry from at least 8 mice per group for each time point out of a minimum of 3 independent experiments, Kruskal-Wallis with Dunn's multicomparison tests are performed, only the significance for each time point compared to untreated mice (t0) are indicated). (B) Mean velocity (upper panels) and straightness (lower panels) of bone marrow parenchymal ECFP⁺ cells in the different mouse strains before and at different time point after LPS injection (**see video 4**) (data of different movies are pooled from at least three different

mice per group and per time point. Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison tests are performed). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.

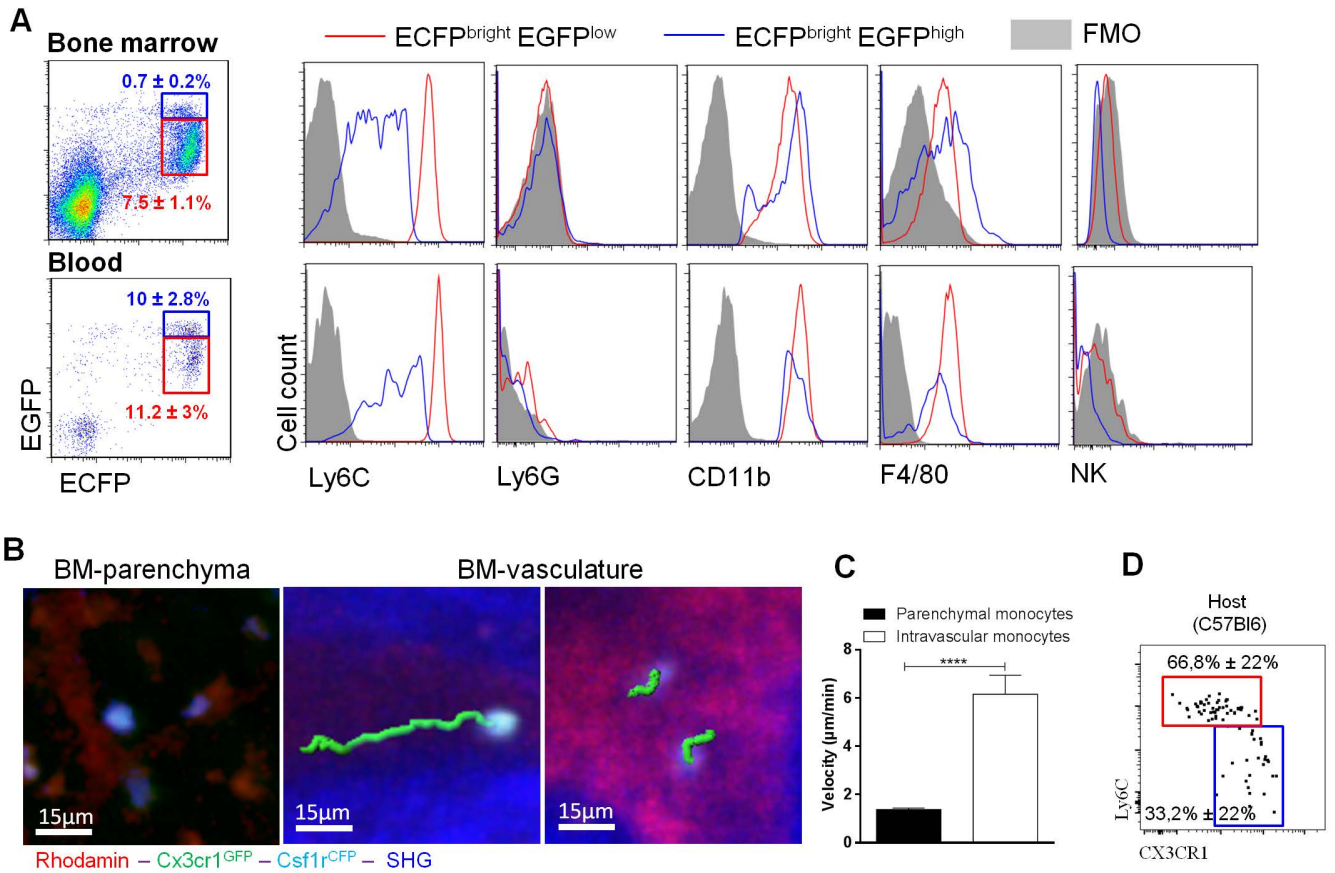


Figure S1: Phenotype and origin of circulating and BM-intravascular ECFP⁺ cells

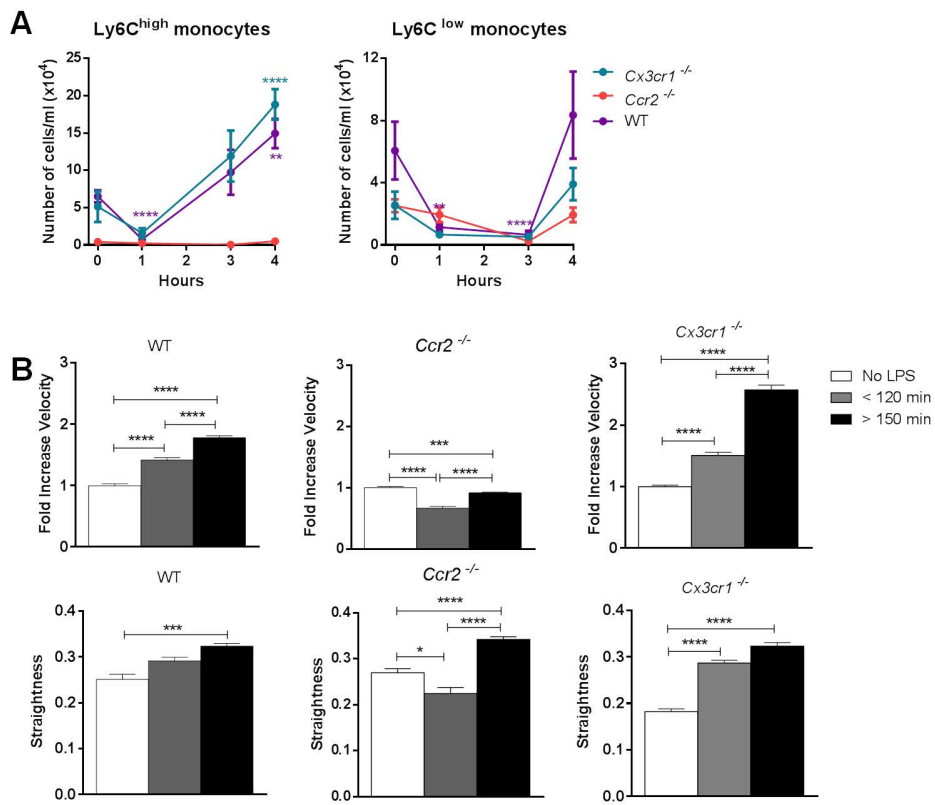


Figure S2: Bone marrow parenchymal monocyte mobilization in CCR2 and CX3CR1 deficient mice

Article 4 : « CX3CR1 deficiency promotes muscle repair and regeneration by enhancing macrophage ApoE production »

Nat Commun. 2015; 6 :8972

Arnold L, Perrin H, de Chanville CB, Saclier M, Hermand P, Poupel L, Guyon E, Licata F, Carpentier W, Vilar J, Mounier R, Chazaud B, Benhabiles N, Boissonnas A, Combadiere B, Combadiere C

Les lésions musculaires déclenchent une inflammation dans laquelle les phagocytes mononuclés sont cruciaux pour la régénération tissulaire. L'interaction des axes chimiokiniques CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 guidant l'infiltration des phagocytes dans les muscles est encore mal connue. Cette étude montre que l'absence du récepteur CX3CR1 favorise la régénération musculaire et permet la restauration de la fonction phagocytaire des macrophages. A contrario, les souris déficientes en CCL2 présentent une très faible capacité à réparer les fibres musculaires endommagées. L'étude transcriptomique des phagocytes mononuclés du muscle a montré une forte expression de l'apolipoprotéine E (ApoE) chez les souris ayant une régénération musculaire efficace. Le traitement par ApoE a amélioré la phagocytose des macrophages *in vitro* ainsi que la régénération musculaire des souris *Ccl2^{-/-}*. Les phagocytes mononuclés des souris déficientes en CX3CR1 surexpriment la protéine ApoE stimulant la phagocytose des macrophages et réduisant les réponses inflammatoires. Cette étude montre que l'axe CX3CL1/CX3CR1 est une cible thérapeutique qui permettrait d'améliorer les fonctions des phagocytes mononucléaires, de contrôler l'inflammation et ainsi d'augmenter la régénération musculaire après lésions.

ARTICLE

Received 8 Jul 2015 | Accepted 21 Oct 2015 | Published 3 Dec 2015

DOI: 10.1038/ncomms9972

OPEN

CX3CR1 deficiency promotes muscle repair and regeneration by enhancing macrophage ApoE production

Ludovic Arnold^{1,*}, Hélène Perrin^{1,*}, Camille Baudesson de Chanville¹, Marielle Saclier^{2,3,4}, Patricia Hermand¹, Lucie Poupel¹, Elodie Guyon¹, Fabrice Licata¹, Wassila Carpentier⁵, José Vilar⁶, R emi Mounier^{2,3,4}, B enedicte Chazaud^{2,3,4}, Nora Benhabiles⁷, Alexandre Boissonnas¹, B ehazine Combadiere¹ & Christophe Combadiere¹

Muscle injury triggers inflammation in which infiltrating mononuclear phagocytes are crucial for tissue regeneration. The interaction of the CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axis that guides phagocyte infiltration is incompletely understood. Here, we show that CX3CR1 deficiency promotes muscle repair and rescues *Ccl2*^{-/-} mice from impaired muscle regeneration as a result of altered macrophage function, not infiltration. Transcriptomic analysis of muscle mononuclear phagocytes reveals that Apolipoprotein E (ApoE) is upregulated in mice with efficient regeneration. ApoE treatment enhances phagocytosis by mononuclear phagocytes *in vitro*, and restores phagocytic activity and muscle regeneration in *Ccl2*^{-/-} mice. Because CX3CR1 deficiency may compensate for defective CCL2-dependant monocyte recruitment by modulating ApoE-dependent macrophage phagocytic activity, targeting CX3CR1 expressed by macrophages might be a powerful therapeutic approach to improve muscle regeneration.

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm, U1135, CNRS, ERL 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France. ²Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 Rue Méchain, F-75014 Paris, France. ³CNRS, UMR8104, 22 Rue Méchain, F-75014 Paris, France. ⁴University of Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, F-75006 Paris, France. ⁵Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Plateforme Post-Génomique de la Pitié-Salpêtrière (P3S), UMS2 Omique, INSERM US029, 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France. ⁶Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire (PARCC) - HEGP, 56 Rue Leblanc, F-75015 Paris, France. ⁷CEA, List institute CEA Saclay, Digit eo Labs, PC192, F-91191 Gif-sur-Yvette, Cedex, France. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.C. (email: christophe.combadiere@upmc.fr).

Monocytes are key players during trauma and inflammation, whereas tissue-resident macrophages have an important role during tissue homeostasis and the resolution of inflammation. However, it is not well established how monocytes and macrophages contribute to both protective/regenerative features and deleterious pathogenic processes. Therefore, defining the molecular and cellular processes that enhance, limit or resolve inflammation may lead to useful therapy. Muscle damage induces massive macrophage infiltration at the injury site, and macrophages are essential for muscle regeneration^{1–4}. Indeed, partial depletion of mononuclear phagocytes impairs muscle regeneration, whereas reconstitution of myeloid lineage restores regeneration^{2,5,6}. We previously showed that injured skeletal muscle recruits monocytes exhibiting inflammatory profiles that operate phagocytosis and rapidly convert to anti-inflammatory mononuclear phagocytes³. Aside from removing necrotic muscle debris, macrophages promote myogenic cell growth and differentiation by releasing growth factors and cytokines^{7,8}, protect myogenic cells from apoptosis⁹ and participate in restoring perfusion by promoting collateral artery formation and angiogenesis¹⁰. In mice, infiltrating macrophages differentiate from circulating inflammatory Ly6C^{high} monocytes that co-express CCR2 and CX3CR1, two important chemokine receptors involved in monocyte motility^{2,3,11}. In mice lacking CCR2 (*Ccr2*^{-/-}) or its cognate ligand (*Ccl2*^{-/-}), muscle regeneration and macrophage infiltration are impaired, and macrophage activation is modified^{5,6,12–16}. By contrast, the role of CX3CR1 in muscle healing has not been defined yet, despite its importance in monocyte recruitment^{17,18}, macrophage polarization^{19–22}, cell survival^{20,23} and angiogenesis^{24,25}.

In the skeletal muscle, recent works indicated that CX3CR1-negative resident macrophages localized in the normal epimysium/perimysium behave as sensors of pathological events, whereas exudate CX3CR1-expressing mononuclear phagocytes may provide immediate inflammatory response in the injured muscle and longstanding immune surveillance until full muscle restoration²⁶. CX3CR1 is not recognized as a key molecule in resident macrophage ontogeny, although it plays a key role in kidney dendritic cells, brain microglial cells and intestinal macrophages colonization^{27–29}. Few studies indicate that the survival of monocytes and tissue macrophages may rely on CX3CR1 as shown within the atherosclerotic plaques³⁰ and in the liver²⁰. More recently, CX3CR1 was identified as a regulator of renal macrophage proliferation³¹.

Chemokine (CX3C motif) ligand 1 (CX3CL1) also known as fractalkine or neurotactin is the only known member of the CX3C class of chemokines. It is unique because (i) it is expressed both as a membrane-bound and a soluble form and (ii) it binds specifically to its receptor CX3CR1. It is expressed by human and murine primary myoblasts in culture^{32,33}. Whether the CX3CR1/CX3CL1 axis is involved in muscle healing through the recruitment of circulating monocytes or the activation of macrophages, and whether its relation to the CCL2/CCR2 axis is unequivocal, as in atherosclerosis^{18,34}, or ambiguous, as in age-related macular degeneration (AMD)³⁵, remains to be understood.

In this study, we investigate muscle regeneration and mononuclear phagocyte recruitment in a notexin-induced muscle injury model by comparing C57Bl/6 (wild type, WT), *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice. We show that CX3CR1 deficiency promotes muscle repair and rescues *Ccl2*^{-/-} mice from impaired muscle regeneration. These phenomena result not from altered mononuclear phagocyte infiltration in *Cx3cr1*^{-/-} mice but from functional modifications. Transcriptomic analysis were performed to compare

muscle mononuclear phagocyte subsets between mice with efficient regeneration (WT, *Cx3cr1*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice) and those with poor recovery (*Ccl2*^{-/-} mice). Among genes differentially expressed, Apolipoprotein E (*ApoE*) transcripts are downregulated in *Ccl2*^{-/-} mononuclear phagocyte subsets. Both ApoE administration and ApoE-proficient bone marrow (BM) transfer restore muscle regeneration in *Ccl2*^{-/-} mice. CX3CR1-ApoE-deficient BM transfer did not rescue CCL2-delayed muscle regeneration as effectively as CX3CR1-deficient ApoE-proficient transfer. Finally, ApoE enhances *in vitro* phagocytosis by macrophages, restores phagocytic activity in *Ccl2*^{-/-} mice, and its deficiency leads to incomplete necrotic myofiber removal. Our results suggest that targeting CX3CR1 expressed by mononuclear phagocytes might be useful in alleviating inflammation and promoting muscle regeneration after trauma.

Results

CX3CR1 deficiency promotes muscle healing after injury. We used a mouse model of notexin-induced muscle injury to analyse the muscle reparative process and mononuclear phagocyte recruitment. We show that CX3CR1 (Supplementary Fig. 1a,b) and its ligand CX3CL1 (Supplementary Fig. 1c) are both expressed during muscle regeneration with a maximum reached at day 4. Concomitantly, CCL2 was secreted at days 1 and 4 post injury (Supplementary Fig. 1d). To understand the roles of these chemokines and their functional relationship during muscle repair, we compared muscle regeneration events and mononuclear phagocyte recruitment between C57Bl/6 (WT), *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice. Notexin induced muscle necrosis (day 1, data not shown), which was followed by leukocyte infiltration (day 4), regenerating myofiber formation (day 10) and myofiber growth (day 21; Fig. 1a). Consistent with published data¹⁶, muscle regeneration was impaired in *Ccl2*^{-/-} mice compared with WT mice and was characterized by delays in necrotic fibre removal and myofiber regeneration (Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 2), a smaller cross-sectional area (CSA) of regenerating myofibers (Fig. 1c), more intermuscular adipocytes (Fig. 1d), calcification (Fig. 1e) and fibrosis (Fig. 1f), as well as decreased neovascularization (Fig. 1g). CX3CR1 deficiency improved muscle regeneration: *Cx3cr1*^{-/-} mice had fewer necrotic and more regenerating myofibers on day 4 (Fig. 1a,b and Supplementary Fig. 2), higher myofiber CSA on days 10 and 21 post injury (Fig. 1c) and reduced intermuscular calcification (Fig. 1e). Strikingly, muscle regeneration in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice was better than in *Ccl2*^{-/-} mice and similar to that of WT mice for all the indicators studied; it thus enhanced the muscle regeneration improvement driven by the CX3CR1 deficiency (Fig. 1 and Supplementary Fig. 2). These results were unexpected, as CX3CR1 deficiency usually causes severe disorders in various inflammatory models, associated with cell death³⁶, fibrosis development²⁰, delayed wound healing and neovascularization^{24,25}. The observation of the rescued phenotype in both male and female double-deficient mice (Supplementary Fig. 3) but not in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccr2*^{-/-} compared with *Ccr2*^{-/-} mice (Supplementary Fig. 4) suggests that a minimum level of monocyte infiltration is required to compensate for the muscle regeneration impairment (monocyte recruitment is more severely impaired in *Ccr2*^{-/-} than *Ccl2*^{-/-} mice¹²). CX3CR1 deficiency thus appears to promote muscle repair and rescue *Ccl2*^{-/-} mice from impaired muscle regeneration.

CCL2 but not CX3CR1 deficiency alters macrophage infiltration. To identify the cellular origin of the muscle regeneration rescue

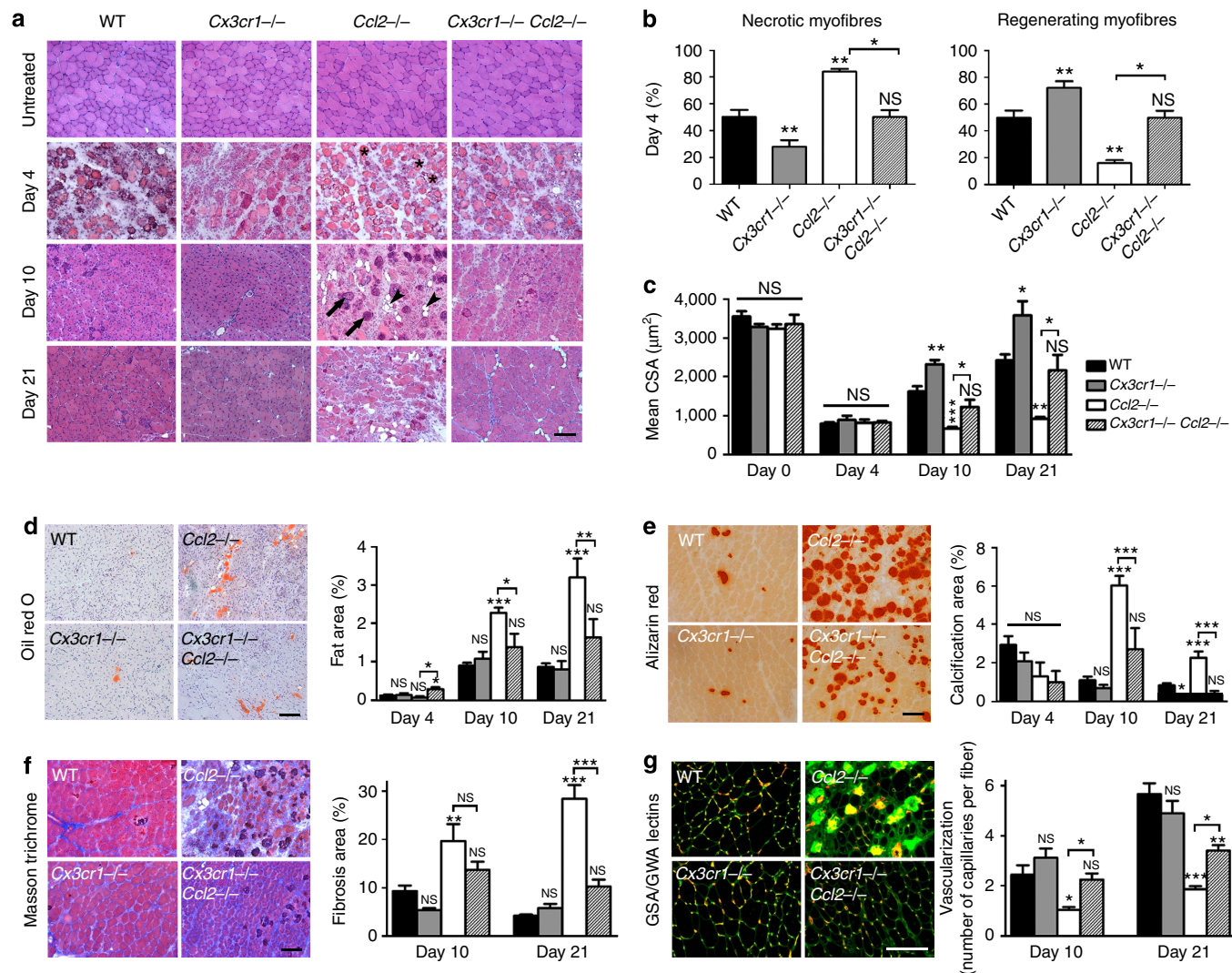


Figure 1 | CX3CR1 deficiency promotes and rescues *Ccl2*^{-/-} muscle healing after injury. Muscle regeneration was assessed after notexin injury in WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice on days 4, 10 and 21 post injury. **(a)** Haematoxylin/eosin staining of uninjured and regenerating muscle ($\times 100$ magnification, scale bar, 100 μm). Arrows indicate dense violet structures corresponding to calcified myofibers, and arrowheads mark intermuscular adipocytes (transparent monovacuolar cells). **(b)** Quantification of regeneration on day 4 post injury assessed by the percentage of necrotic (infiltrated or not) and regenerating (basophilic + centrally nucleated) myofibers, expressed as a percentage of the total number of myofibers. **(c)** Quantification of the mean cross-sectional area (CSA) of regenerating myofibers, by image J software. **(d)** Oil Red O staining of lipids within intermuscular adipocytes, **(e)** Alizarin Red staining of calcified myofibers, **(f)** Masson Trichrome staining of connective tissue and quantification of the different areas, by setting appropriate thresholds on image J software. Fat, calcification and fibrosis are expressed as percentages of the total injured area (between 60 and 90% of total muscle surface) and results are a mean of three different muscle cross-sections taken at each end and the middle of the muscle. **(d, e and f:** scale bar, 100 μm). **(g)** Vascularization was quantified on muscle cross-sections stained with wheat germ/*Griffonia simplicifolia* agglutinin (scale bar, 50 μm). Data are mean + s.e.m. of six mice per strain, which represent two distinct experiments. NS, not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ for each knock-out strain versus WT and for *Ccl2*^{-/-} versus *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice.

observed in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice, we performed BM transplantation experiments in sub-lethally irradiated *Ccl2*^{-/-} mice. The control graft produced strongly improved muscle regeneration on day 10 post injury, characterized by increased regenerating myofiber CSA and decreased intermuscular fat accumulation and calcification (Fig. 2a). BM transfer from *Cx3cr1*^{-/-} mice amplified muscle regeneration rescue and increased the regenerating myofiber CSA. This indicates that the muscle regeneration improvement observed in *Cx3cr1*^{-/-} mice relied on BM-derived cells.

As both CX3CR1 and CCL2 are involved in mononuclear phagocyte trafficking, we hypothesized that modulation of mononuclear phagocyte recruitment in the injured muscle might account for the improved regeneration in *Cx3cr1*^{-/-} mice and

rescue of *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice. We assessed mononuclear phagocyte infiltration throughout the injured muscle by flow cytometry (Fig. 2b) and identified four distinct populations (subsets 1–4) expressing typical mononuclear phagocyte phenotypic markers ($\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^- \text{NK1.1}^- \text{F4/80}^+ \text{Mgl1}^+$; Fig. 2b and Supplementary Fig. 5). Subset 1 ($\text{F4/80}^{\text{low}} \text{Ly6C}^{\text{high}}$) has bean-shaped nuclei and may correspond to infiltrating $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ blood monocytes. Subset 2 ($\text{F4/80}^{\text{low}} \text{Ly6C}^{\text{low}}$) expressed dendritic cell markers, such as CD11c and IAb (major histocompatibility complex molecules-class II), and CD64 (Fc γ RI) at lower levels than the other three subsets. Cells from subsets 3 and 4 were larger and had typical macrophage morphology; subset 3 ($\text{F4/80}^{\text{high}} \text{Ly6C}^{\text{low}} \text{Mgl1}^{\text{low}}$) expressed lower levels of M2-type macrophage markers (such as

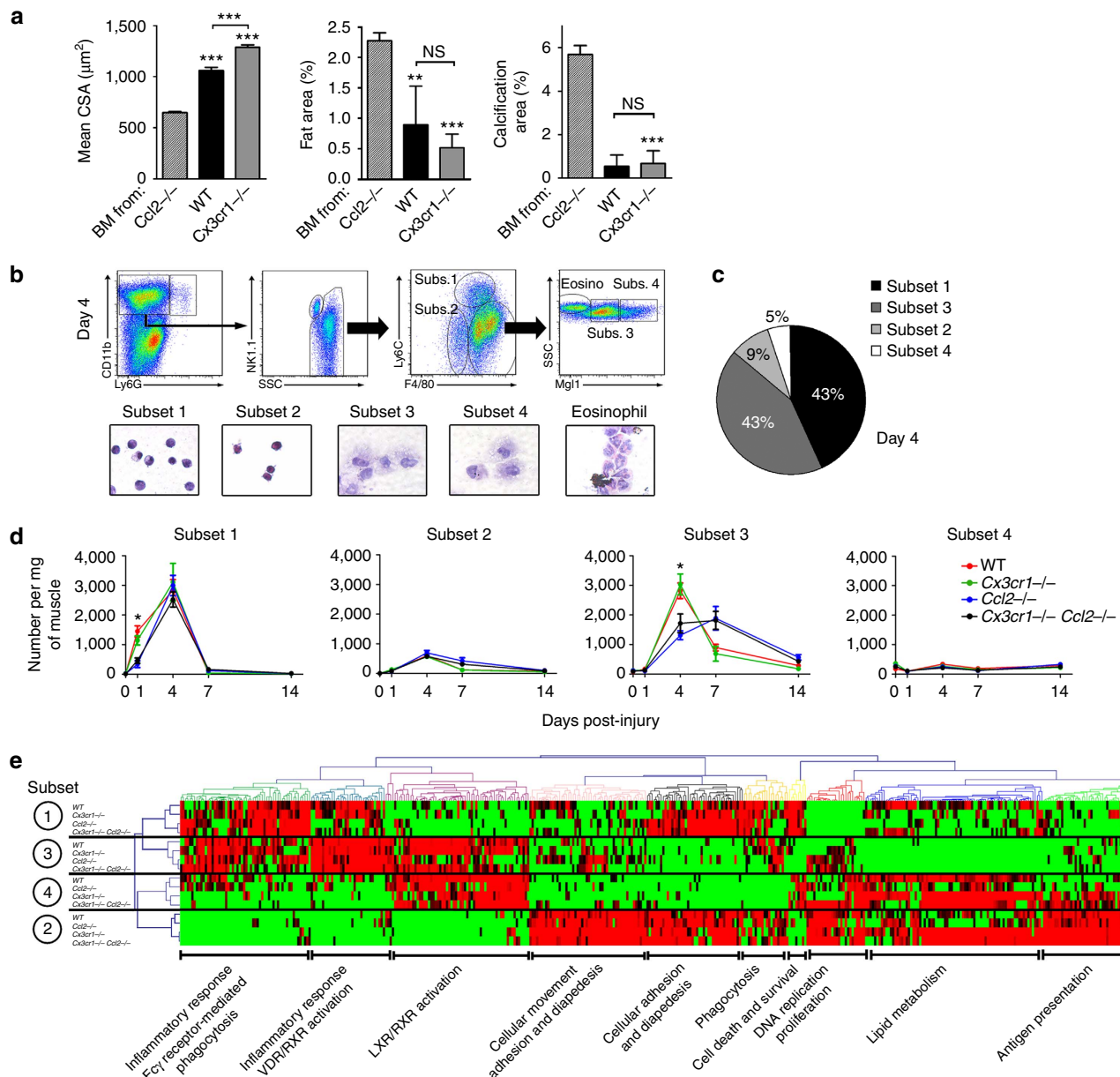


Figure 2 | CCL2 but not CX3CR1 deficiency affects macrophage recruitment in muscle. (a) Analysis of muscle regeneration in chimeric *Ccl2*^{-/-} mice engrafted with bone marrow from *Ccl2*^{-/-}, WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice, by measuring the mean regenerating myofiber CSA and the areas of intermuscular adipocyte and of calcified myofibers on day 10 post injury. ****P* < 0.001 for *Ccl2*^{-/-} mice engrafted with bone marrow from WT or *Cx3cr1*^{-/-} mice versus *Ccl2*^{-/-} mice engrafted with *Ccl2*^{-/-} bone marrow. Data are mean of a single experiment + s.e.m. of three mice per strain. (b) Gating strategy for macrophages on day 4 post injury. Macrophages expressed CD11b, F4/80 and Mgl1 but not Ly6G or NK1.1. Four subsets of cells corresponding to this phenotype were identified; a subset of CD11b⁺ F4/80⁺ Ly6C^{low} Mgl1⁻ cells, with morphology typical of eosinophils, was excluded from the analysis. (c) Proportion of each macrophage subset on day 4 post injury. (d) Kinetics of the four macrophage subsets during muscle regeneration in WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice. **P* < 0.05 for *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} strains versus WT. Data are mean of two to four distinct experiments ± s.e.m. of at least six mice per strain per time point. (e) The four macrophage subsets from injured muscle were sorted by flow cytometry on day 4 post injury according to the gating strategy described in (b). RNA from one cell-sorting experiment, representing a pool of three mice per strain, was amplified and hybridized on the Illumina whole mouse genome oligo microarrays (WG6). Hierarchical clustered heat map of macrophage subsets 1, 2, 3 and 4 based on the gene expression of ten different clusters. Red: increased expression, green: decreased expression.

Mgl1 and CD206) than subset 4 (F4/80^{high} Ly6C^{low} Mgl1^{high}; Fig. 2b and Supplementary Fig. 5). Cells from subsets 1 and 3 were the main mononuclear phagocyte subsets (about 86%) in muscle at the peak of inflammation, on day 4 post injury (Fig. 2c). In a previous study², we showed that Ly6C^{high} monocytes in the muscle are recruited from the blood and are non-dividing cells. They switched their phenotype to Ly6C^{low} mononuclear

phagocytes and actively proliferated *in situ*, contributing to the large amount of mononuclear phagocytes observed in the muscle at day 4 post injury.

Subset 1 was found in significantly lower numbers on day 1 (70% reduction, *P* < 0.0006) as was subset 3 on day 4 (48% reduction, *P* < 0.0001) in injured muscles from *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} compared with WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice

(Fig. 2d). This finding confirms that monocyte/macrophage recruitment requires CCL2 (ref. 12). Conversely, CCL2 and CX3CR1 deficiency did not or only slightly affected the proportions of subsets 2 and 4. The greater impairment of the recruitment of subsets 1 and 3 in the injured muscle of *Ccr2*^{-/-} mice (Supplementary Fig. 6) suggests that their presence in the lesion is necessary for the CX3CR1-dependent compensatory effect. Strikingly, the infiltration kinetics of all mononuclear phagocyte subsets of *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice, as for WT and *Cx3cr1*^{-/-} mice, were superimposable (Fig. 2d) despite strongly different pathophysiological conditions. The apparent lack of association between the muscle regeneration rescue observed in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice and any change in the number of monocytes infiltrating/macrophages proliferating in the injured muscle suggests that the process allowing muscle recovery in *Cx3cr1*^{-/-} mice may be related to mononuclear phagocyte functions. We next investigated the role of BM-derived macrophages from the various mice strains regarding myogenic precursor cells (MPCs) using *in vitro* assays. No differences were observed in MPC proliferation or fusion (Supplementary Fig. 7). Neither CX3CR1 nor CCR2 were detected on satellite cells¹³, on myoblasts or on regenerating myofibers (data not shown).

To address more globally the mononuclear phagocyte functions that may promote muscle regeneration, we performed a genome-wide microarray analysis of the four mononuclear phagocyte subsets from WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} muscles on day 4 post injury (GSE73473). One-way analysis of variance analysis identified 434 genes ($P < 0.05$) that distinguished the four subsets (Fig. 2e). Using hierarchical clustering and pathway analysis, we identified 10 clusters that confirmed the original identity and functions of each subset. Because muscle regeneration was not rescued in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccr2*^{-/-} mice (Supplementary Fig. 4) and muscle infiltration of subsets 1 and 3 was fully abrogated only in *Ccr2*^{-/-} mice (Supplementary Fig. 5), we postulated that these subsets were mainly responsible for this rescued phenotype and sought to identify in them the genes that promote healing.

ApoE production is adversely regulated by CCL2 and CX3CR1.

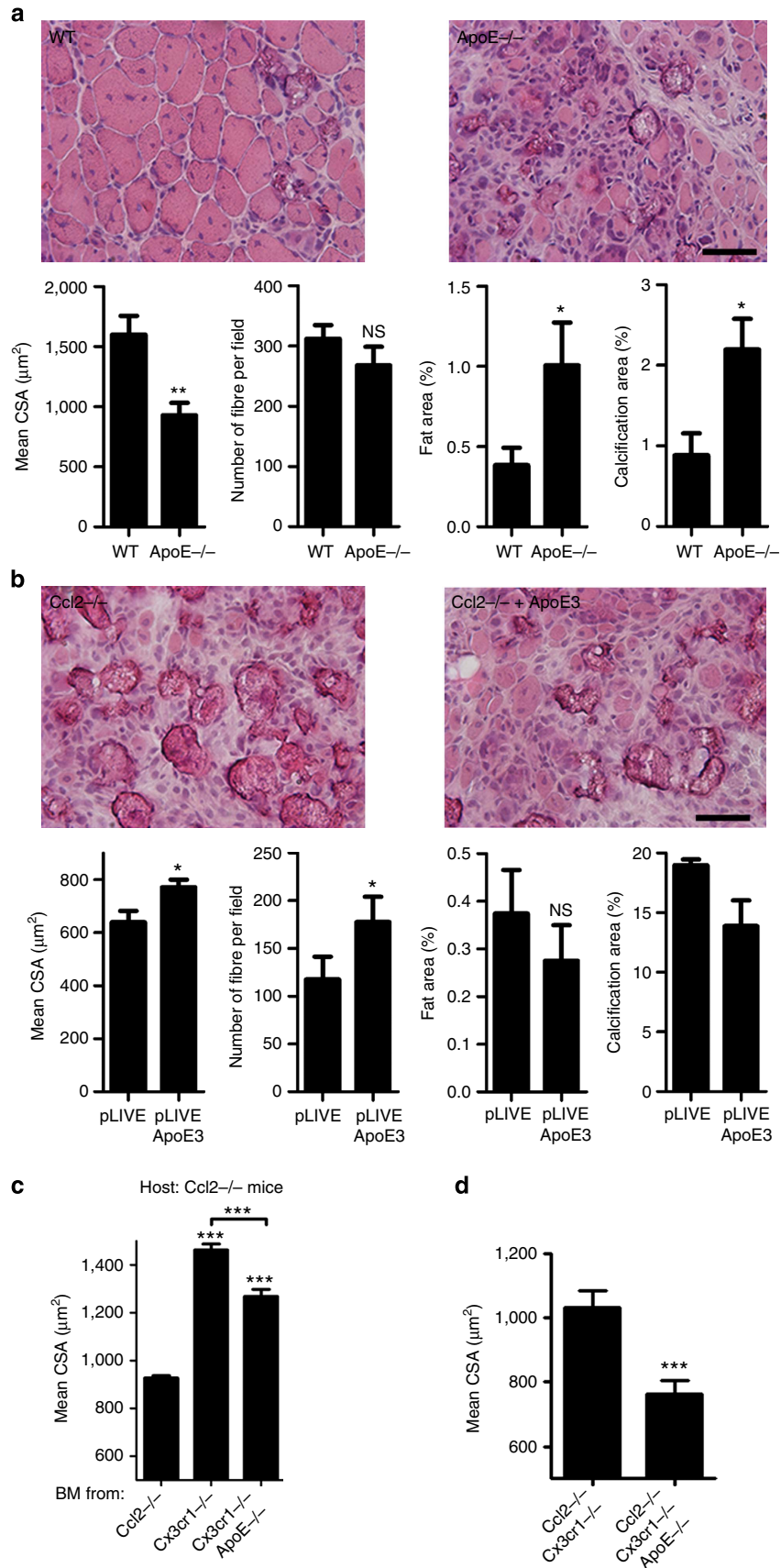
Comparison of the mononuclear phagocyte transcriptomic profiles from mice with poor regenerative abilities (*Ccl2*^{-/-}) and from mice with effective muscle healing (WT, *Cx3cr1*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-}) identified 22 and 17 genes significantly differentially expressed in mononuclear phagocyte subsets 1 and 3, respectively (Fig. 3a,b). Among them, only ApoE transcripts were downregulated in both *Ccl2*^{-/-} subsets 1 and 3. We confirmed severely lower ApoE expression in macrophages isolated from injured muscle of *Ccl2*^{-/-} mice at both RNA (Fig. 3c) and protein levels (Fig. 3d,e and Supplementary Fig. 8). In accordance with the microarray data, ApoE expression was restored in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice. Moreover, we found a higher expression of ApoE in mononuclear phagocytes from CX3CR1-deficient compared with CX3CR1-proficient mice (Fig. 3c–e). We also showed that addition of CX3CL1 on WT macrophages *in vitro* suppressed ApoE expression by about 30%, without affecting CCL2 expression (Fig. 3f). These results reveal that CX3CL1/CX3CR1 axis is also directly involved in the regulation of ApoE expression.

Interestingly, most of the dysregulated genes in mononuclear phagocytes from *Ccl2*^{-/-} versus WT, *Cx3cr1*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice can be linked in a network in which ApoE is central and related to inflammatory response, endocytosis signalling and the LXR/RXR activation pathway involved in the regulation of inflammation and lipid metabolism³⁷ (Fig. 3g).

We previously published a functional link between ApoE and CX3CR1 in AMD³⁸. Sub-retinal macrophages in AMD patients as well as in sub-retinal inflammation observed in *Cx3cr1*^{-/-} mice express high levels of ApoE. Previous studies indicate that ApoE is an immunomodulatory agent that polarizes macrophages in a M2 anti-inflammatory phenotype³⁹. We previously showed that M2 macrophages are associated with myofiber growth and myoblast differentiation and fusion³. In addition, ApoE can suppress the pro-inflammatory response mediated by microbial stimuli *in vivo*^{40,41}. Furthermore, the delay in skeletal muscle healing in *ApoE*^{-/-} mice following hindlimb ischaemia-reperfusion⁴² suggests that this gene plays a major role in the muscle regeneration process.

ApoE favours phagocytosis and muscle regeneration. Histological analysis of injured muscle from *ApoE*^{-/-} mice 10 days after injury revealed strongly impaired muscle regeneration, with a markedly lower CSA of regenerating myofiber and increased intermuscular fat and calcification (Fig. 4a). These results are consistent with previous reports that *ApoE*^{-/-} mice develop calcification and accumulate lipid-filled foam cells within atheromatous plaque when fed a high-fat diet^{43,44}. Using hydrodynamic-based *in vivo* transfection, we next showed that systemic expression of human ApoE3 improved muscle repair in *Ccl2*^{-/-} mice (Fig. 4b). In addition, *Cx3cr1*^{-/-} *ApoE*^{-/-} bone-marrow transfer in irradiated *Ccl2*^{-/-} mice did not promote myofiber growth as effectively as *Cx3cr1*^{-/-} bone-marrow transfer (+33% myofiber CSA versus +58%; Fig. 4c). We also observed high reduction of myofiber growth in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} *ApoE*^{-/-} mice compared with *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice (Fig. 4d). These results demonstrate that the impairment of muscle regeneration in *Ccl2*^{-/-} mice depends at least partially on the inability of muscle mononuclear phagocytes to produce enough ApoE and that CX3CR1 deficiency promotes and rescues *Ccl2*^{-/-} muscle healing by regulating ApoE production by macrophages.

Because macrophage phagocytic activity is impaired in *ApoE*^{-/-} (Supplementary Fig. 9) and improved in *Cx3cr1*^{-/-} mice^{21,45}, we hypothesized that improved muscle regeneration in *Cx3cr1*^{-/-} mice and rescue in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice might be linked to increased phagocytosis, and indeed we measured more phagocytic activity in muscles from *Cx3cr1*^{-/-} compared with WT mice (Fig. 5a). The better necrotic myofiber removal in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} compared with *Ccl2*^{-/-} mice (for an equivalent number of infiltrated mononuclear phagocytes) suggests that CX3CR1-deficient mononuclear phagocytes have higher phagocytic activity. *Ex vivo* experiments confirmed that muscle macrophages from *Cx3cr1*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice engulfed fluorescent microspheres more effectively than those from *Ccl2*^{-/-} animals (Fig. 5b). Moreover, addition of exogenous APOE3 improved both phagocytic activity of *Ccl2*^{-/-} muscle macrophages *in vitro* (Fig. 5c) and necrotic myofiber removal in *Ccl2*^{-/-} mice (Fig. 5d). Addition of CCL2 restored phagocytic activity of *Ccl2*^{-/-} macrophages (Fig. 5e, right panel) but not that of WT and *Cx3cr1*^{-/-} macrophages. A reduction in WT macrophage phagocytic capacity was observed after incubation with CX3CL1 (Fig. 5e, left panel). Finally, the addition of CX3CL1 and CCL2 on WT macrophage-enriched muscular cell suspensions triggered similar expression of molecules involved in inflammatory response such as IL-1 β , IL-1RA (IL-1 receptor antagonist) and iNOS (inducible nitric oxide synthase; Fig. 5f). Altogether, our results suggest that impaired muscle healing in *Ccl2*^{-/-} mice is linked to decreases in monocyte/macrophage recruitment and function, notably phagocytosis.



the number of Ly6C^{low} and Ly6C^{high} monocytes (Supplementary Fig. 10). Because Ly6C^{low} blood monocytes have no role in the muscle regeneration process^{3,46}, their lack may not impair this process. Few groups including Saederup *et al.*⁴⁷ and our group¹⁸ have shown additive or synergistic effects of CCR2 and CX3CR1 axis on monocyte recruitment or macrophage accumulation. CCR2 and CX3CR1 axis may also lead to the opposite effect, and more specifically CX3CR1 deficiency may promote CCR2-dependent microglial cell accumulation in the retina³⁵. Here we could not detect any changes in monocyte recruitment or in macrophage accumulation consistently with our previous work showing that monocyte recruitment in the injured muscle was exclusively dependent on CCR2 axis³. In these conditions, CX3CR1 may only affect macrophage functions, not monocyte recruitment or macrophage proliferation.

CX3CR1 is an essential pleiotropic chemokine receptor involved in various biological functions, including cell chemotaxis, apoptosis, cell activation/polarization, organ development and neovascularization. Its deficiency is considered deleterious in a large variety of acute inflammatory responses where it exacerbates inflammation^{20,24,36}. In chronic diseases, such as atherosclerosis, CX3CR1 deficiency also limits monocyte recruitment and macrophage accumulation at inflammatory sites leading to reduced atherosclerosis^{18,48,49}. In contrast, CX3CR1 presence is somewhat protective in AMD⁵⁰. The role of CX3CR1 appears to be different depending on the inflammatory model. Our results show for the first time that CX3CR1 deficiency can improve wound healing in an acute injury model without affecting monocyte recruitment or macrophage accumulation. In the mdx mice, a chronic model of muscle injury (a murine model for Duchenne muscular dystrophy), previous studies using gene expression microarrays have demonstrated that dystrophic muscles are characterized by an inflammatory ‘molecular signature’^{51,52}, in which CC chemokines are prominent and among which CCL2 and its receptor CCR2 are highly expressed^{53,54}. There is no evidence of CX3CR1/CX3CL1 expression in this context and the role of CX3CR1 has not yet been investigated. In a previous work⁹, we showed that four molecular systems including CX3CR1/CX3CL1 are involved in MPC apoptosis inhibition driven by macrophages *in vivo* and *in vitro*. Although apoptosis induction is fairly easy to achieve *in vitro* (through the incubation with various pro-apoptotic drugs), the MPC apoptosis events *in vivo* are rather rare, with apoptotic MPC representing only a very small number of cells in the myoblast population. In contrast, phagocytosis events during muscle repair are ubiquitous, and it is more likely that macrophages will engulf apoptotic MPC *in vivo* than protect them through the CX3CR1/CX3CL1 molecular system.

Figure 6 summarizes the main findings of the work and proposes a model of action of macrophages in muscle regeneration via ApoE production. We demonstrated that CX3CR1 deficiency is associated with increased removal of necrotic myofibers, as it is with the phagocytosis of amyloid-beta deposits in the brain of a murine model of Alzheimer’s disease²¹. Similarly, CX3CR1-deficient mononuclear phagocytes overexpressed ApoE protein,

which is known to stimulate macrophage phagocytosis and dampen inflammatory response^{39,45}. Moreover, a recent study³⁸ demonstrated a link between ApoE and CX3CR1 in AMD. Sub-retinal macrophages in AMD patients as well as in sub-retinal inflammation observed in *Cx3cr1*^{-/-} mice express high levels of ApoE. In addition, ApoE deletion in *Cx3cr1*^{-/-} mice prevents pathogenic- and stress-induced subretinal macrophage accumulation. Here we showed that the exogenous administration of ApoE enhanced CCL2-deficient mononuclear phagocyte phagocytic activity. These results suggest that defective CCL2-dependent monocyte recruitment may be compensated by CX3CR1 deficiency through the modulation of ApoE-dependent macrophage phagocytic activity. Therefore, therapeutic intervention to improve mononuclear phagocyte functions by targeting the CX3CR1 chemokine axis might control inflammation and enhance muscle regeneration in response to injury.

Methods

Mice. Experiments were conducted on adult female and male mice (8–16 weeks old) of the following strains (all on a C57Bl/6J genetic background): C57Bl/6J (WT; purchased from Janvier), *Cx3cr1*^{-/-} (ref. 55), *Ccl2*^{-/-} (#004434, JAX), *Ccr2*^{-/-} (#004999, JAX), *ApoE*^{-/-} (#002052, JAX), *Cx3cr1*^{gfp/+} (#008451, JAX) were intercrossed to obtain *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-}, *Cx3cr1*^{-/-} *ApoE*^{-/-}, *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} *ApoE*^{-/-} and *CX3CR1*^{gfp/gfp} *ApoE*^{-/-} as described in ref. 18. Mice were bred and maintained in our specific pathogen-free animal facility according to institutional guidelines and used according to the French legislation (no. A-75-1315). All experiment protocols were approved by the local ethics committee and validated by the Service Protection et Santé Animales, Environnement (no. A-75-2065).

Muscle injury. Muscle injury was caused by intramuscular injection of 10 μ l of notexin (25 μ g ml⁻¹ in PBS; Latoxan) into the tibialis anterior (TA) muscle. Muscle and fascia were harvested together for analysis at different time points post injury (1, 4, 7, 10, 14, 21 days). In some experiments, a pLIVE plasmid encoding for human ApoE3 was injected into mouse tail veins 6 h before muscle injury.

Histological analysis. TA muscles were removed, snap frozen in nitrogen-chilled isopentane and kept at -80 °C until use for histological analysis. Cryosections of 7 μ m thick were prepared for various types of histological staining. Muscle regeneration was analysed quantitatively for the entire injured area (between 60 and 90% of the entire muscle). The percentages of necrotic and regenerating myofibers as well as the CSA of the regenerating myofibers, an established indicator, were quantified on haematoxylin/eosin-stained muscle sections recorded with an Olympus BX51 at $\times 10$ magnification, connected to an evolution VF camera (medicaCybernetics). We used image J software to count three fields always chosen in the same overall injured area (representing 660 \pm 150 myofibers) for at least six different mice analysed per time point. Regenerating myofiber density was assessed in the same fields and is expressed as the number of regenerating myofibers per field. Phagocytosis was assessed on day 4 post injury on muscle cross-sections stained with haematoxylin/eosin by counting the ratio of infiltrated to non-infiltrated necrotic myofibers. Vascularization was quantified on muscle cross-sections stained with wheat germ/*Griffonia simplicifolia* agglutinin. We counted 8 \pm 1 fields (at $\times 20$ magnification) chosen randomly over the entire injured area and representing 485 \pm 160 myofibers, in three different mice. Areas of fat, calcification and fibrosis were evaluated over the entire injured area of three muscle cross-sections at levels spaced 900 μ m apart, stained, respectively, with Oil Red O, Alizarin Red and Masson Trichrome and recorded with a Nikon AZ100 microscope connected to a DS-Ri1 camera (Nikon). Appropriate thresholds were set with image J software to evaluate these areas. Each parameter was studied on days 4 (except fibrosis), 10 and 21 post injury in at least six different mice.

Isolation of leukocytes and macrophages from muscle. Mice were flushed with 10 ml of PBS to remove blood. Muscles and fascia were weighed together, minced

Figure 4 | Macrophage ApoE production improves skeletal muscle regeneration. (a) Analysis of muscle regeneration of *ApoE*^{-/-} ($n = 11$) versus WT mice ($n = 7$) on day 10 post injury, by measurement of mean CSA of regenerating myofibers, myofiber density and areas of fat and calcification. Data are mean + s.e.m. of two distinct experiments. (b) Analysis on day 10 post injury of muscle regeneration in *Ccl2*^{-/-} mice, transfected ($n = 3$) or not ($n = 3$) with a pLIVE plasmid encoding for human ApoE3, by measurement of mean CSA of regenerating myofibers, myofiber density and areas of fat and calcification. In this experimental system, systemic expression of ApoE3 was detected for at least 8 days after transfection (data not shown). Data are mean + s.e.m. of a single experiment. Scale bar, 100 μ m. (c) Analysis of muscle regeneration in chimeric *Ccl2*^{-/-} mice engrafted with *Ccl2*^{-/-} ($n = 5$), *Cx3cr1*^{-/-} ($n = 5$) or *Cx3cr1*^{-/-} *ApoE*^{-/-} ($n = 4$) bone marrow, by measurement of the mean CSA of regenerating myofibers on day 21 post injury. (d) Analysis of muscle regeneration in *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice ($n = 4$) and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} *ApoE*^{-/-} mice ($n = 4$). Data are mean + s.e.m.; NS, not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

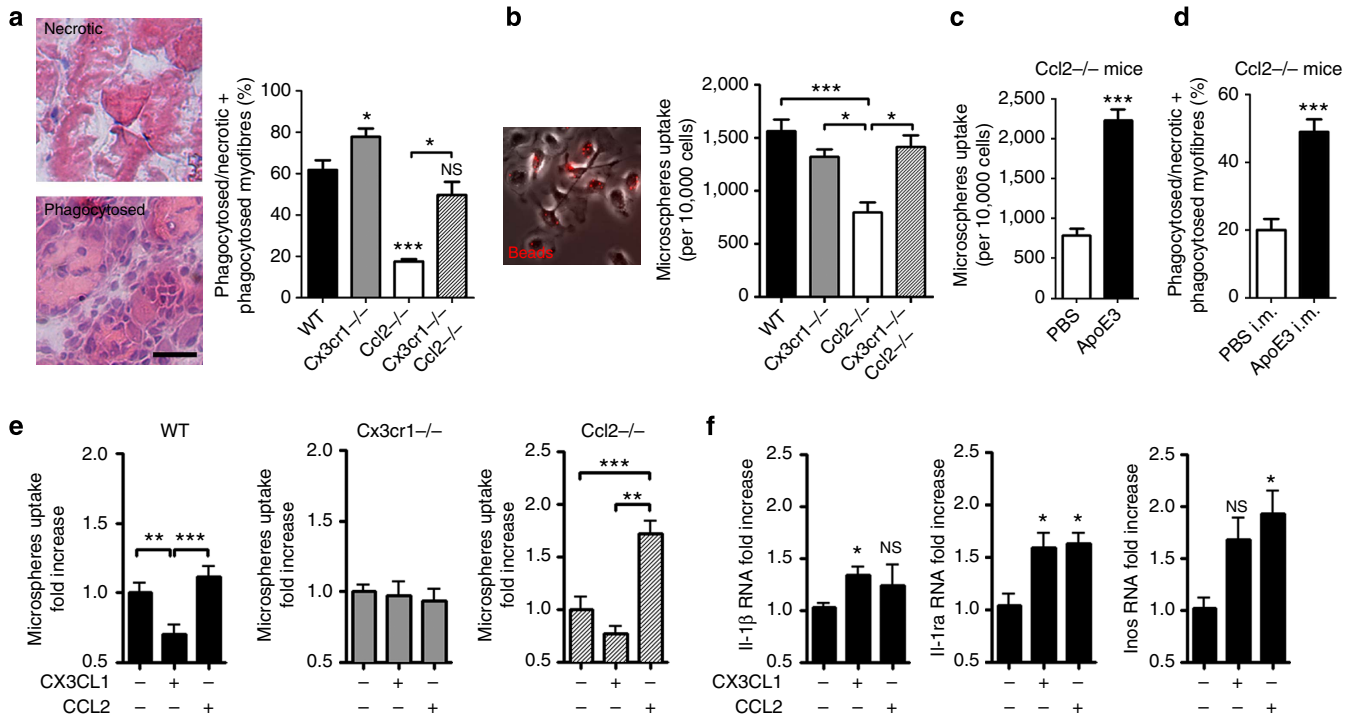


Figure 5 | Macrophage ApoE production enhances muscle debris phagocytosis. (a) Quantification of *in vivo* phagocytosis, by assessment of the numbers of infiltrated necrotic myofibers versus total necrotic myofibers infiltrated or not on day 4 post injury. Scale bar, 100 μm. Data are means + s.e.m. of six mice per strain in two independent experiments. (b) Phagocytosis activity of mononuclear phagocytes extracted from injured-muscle of WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice on day 4 post injury was assessed by incubating muscle cells for 4 h with red fluorescent microspheres. This parameter is expressed as the number of cells that engulfed at least one bead per 10,000 cells. Results are means + s.e.m. of six mice in three independent experiments. (c) Phagocytosis activity of *Ccl2*^{-/-} muscle mononuclear phagocytes in the absence or presence of exogenous human APOE3 protein. Results are mean ± s.e.m. of five mice in two independent experiments. (d) Quantification on day 4 post injury of *Ccl2*^{-/-} myofiber removal in the absence (*n* = 2) or presence (*n* = 4) of exogenous human APOE3 protein. (e) Phagocytosis activity of mononuclear phagocytes from injured-muscle of WT, *Cx3cr1*^{-/-} and *Ccl2*^{-/-} mice on day 4 post injury was assessed 16 h after incubation of muscle cells with CX3CL1 or CCL2 chemokines. The numbers of muscle cells that engulfed at least one fluorescent microsphere were compared between treated and untreated cells for all mice strains. (f) Effect of CX3CL1 and CCL2 on IL-1, IL-1 receptor antagonist (Ra) and iNOS (nitric oxide synthase) expression was measured by real-time PCR in mononuclear phagocytes extracted from WT mice incubated during 16 h with CX3CL1 (100 nM) or CCL2 (100 nM), and compared with untreated cells. Data are mean + s.e.m. of six mice per strain in three independent experiments. NS, not significant, **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001.

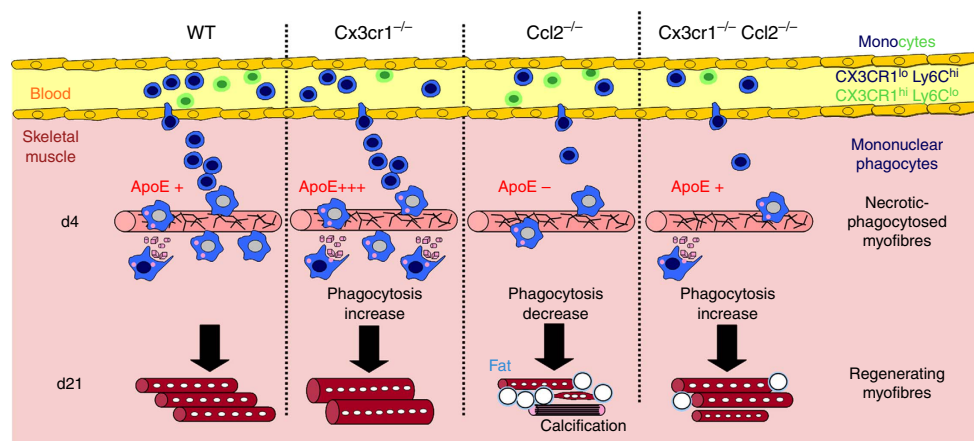


Figure 6 | Macrophage infiltration and function during muscle regeneration. Diagram depicting macrophage infiltration and functions during muscle regeneration in WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice.

and digested twice for 45 min each time in DMEM containing collagenase B 0.2% (Roche Diagnostics) and trypsin-EDTA 0.2% at 37 °C. The resulting homogenate was filtered through a 70-μm cell strainer. In some experiments, macrophages were isolated from muscle cell suspension using MACS technology (Miltenyi Biotec). A negative selection using PE-Ly6G and PE-NK1.1 antibodies and anti-PE magnetic beads (to remove neutrophils and NK cells) was followed by a

positive selection of macrophages with magnetic beads coupled with CD11b antibodies.

Flow cytometry analysis and cell sorting. Cell suspensions were incubated with anti-mouse FcγII/III receptor (clone 2.4G2, BD Biosciences, 1:100) for 10 min at

4 °C in FACS buffer ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free PBS with 0.5% BSA) and then stained with the following fluorescent-conjugated anti-mouse antibodies: V450-Ly6G (clone 1A8, BD Biosciences, 1:100), FITC-CD11c (clone HL3, BD Biosciences, 1:100), PE-Cy7-NK1.1 (clone PK136, BD Biosciences, 1:100), APC-Cy7-Ly6C (clone AL-21, BD Biosciences, 1:100), PE-CD64 (clone X54-5/7.1, BD Biosciences, 1:100), APC-IAb (major histocompatibility complex molecules-class II, clone AF6-120-1, BD Biosciences, 1:200), PE-SiglecF (clone E50-2440, BD Biosciences, 1:100), PE-CD206 (clone MR5D3, BD Biosciences, 1:100), biotinylated anti-Mgl1 (MCA2392B, Serotec, 1:100), PE-CCR2 (clone 475301, R&D Systems, 1:100), PerCP-Cy5.5-CD11b (clone M1/70, ebiosciences, 1:500) and APC-F4/80 (clone BM8, ebiosciences, 1:150). A PE-streptavidin (1:1,500, BD Biosciences) was used to reveal Mgl1 expression. Cells were analysed on a FACS Canto II (BD Biosciences) with Diva and FlowJo softwares. Sorting of macrophage cell subsets was performed on a FACSAria II cell sorter (BD Biosciences).

Microarray analysis, normalization, data set analysis. The four subsets of mononuclear phagocytes were sorted from the injured muscle by flow cytometry on day 4 post injury with the gating strategy showed in Fig. 2. RNA was amplified with the Ovation Pico WTA system V2 (NuGEN) and the resulting complementary DNA (cDNA) was hybridized on Illumina whole genome oligo microarrays (WG6 V2.0). Array data were analysed with Genome studio (Illumina) and MeV software. Filter on background signals and quantile normalization were applied, and only probe sets showing significance (P -value < 0.05) in 8 of the 16 samples were selected. One-way analysis of variance (P < 0.01) with subsequent hierarchical clustering was performed on median centred \log_2 intensity of the resulting 2,472 probes and identified 434 genes that discriminated between the four cell subsets and spread into 10 clusters. Genes showing differential expression in $Ccl2^{-/-}$ mice compared with WT, $Cx3cr1^{-/-}$ and $Cx3cr1^{-/-} Ccl2^{-/-}$ were selected according to Eisen *et al.*⁵⁶ and comparisons are presented with Venn diagrams (<http://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems Inc.) software was used to identify metabolic and signalling pathways.

Quantitative RT-PCR. Total RNA from cell lysates of injured muscles was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on 10 ng of RNA using SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). cDNA were quantified by qPCR using Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) and ApoE, $Cx3cr1$, $Ccl2$, $Il-1\beta$, $Il-1Ra$ (receptor antagonist), iNOS primers were added at 250 nM each in a final volume of 20 μ l (in duplicate for each sample). The sequences of primers used are as follows: *ApoE*-F: 5'-CCTGAACCGCTTCTGGGATT-3', *ApoE*-R: 5'-CGTAGATCCTCCATGTGCGG-3', *Cx3cr1*-F: 5'-TTCAATCCCAAGGCCTGTC-3', *Cx3cr1*-R: 5'-GTGCAAGCAACAGAGTTGGG-3', *Il1β*-F: 5'-CTGTGTCTTTCCCGTGGACC-3', *Il1β*-R: 5'-CAGTCTATGTTGGTCCGACA-3', *Il1ra*-F: 5'-TACCCATGGCTTCAGAGGCAGCC-3', *Il1ra*-R: 5'-GGCCTTTCTCAGAGCGGATGAAG-3', *Inos*-F: 5'-CCAAGCCC TCACCTACTCC-3', *Inos*-R: 5'-CTCTGAGGGCTGACACAAGG-3'. PCR (denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C (15 s) and 60 °C (60 s)) were performed on an ABI7300 (Applied Biosystems). Relative target gene quantification was normalized to GAPDH as housekeeping gene control for each sample and to untreated sample for each experiment, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

ELISA assays. Muscles obtained at day 0, 1, 4, 10 and 21 after notexin-injury were stored at -20 °C, thawed and centrifuged to obtain tissue homogenates (1 muscle in 1 ml PBS). Murine ELISA CX3CL1 (Fractalkine) and CCL2 (MCP1) assays were performed using Quantikine ELISA Mouse Immunoassay kits (Bio-technie) following the manufacturer's protocol. ApoE3 was measured in mouse serum on day 8 post injury with a HRP-human ApoE3 ELISA Kit (Mabtech).

Western blot. Macrophages sorted from injured muscle on day 4 post injury through MACS technology were pelleted and lysed in PBS pH7.4, 2% Triton X-100, 1% SDS complemented with antiprotease cocktail (Roche). The samples were then assayed for protein content, diluted in sample loading buffer and heated for 5 min at 95 °C. Proteins (45 μ g per lane) were separated by 4-20% standard SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Blots were probed with polyclonal antibodies against ApoE (Abcam, ab20874, 1:750) and tubulin (Millipore, CP06, 50 ng ml⁻¹).

Immunolabelling. Frozen muscle cryosections were stained using rabbit anti mouse-MyoD (M-318, SantaCruz) and monoclonal mouse anti-myogenin (F5D, DSHB) antibodies (green) were visualized with Alexa Fluor-594- and -488-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) before mounting in Vectashield mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories). Macrophages sorted from injured muscle on day 4 post injury through MACS technology were spun onto glass slides and kept at -80 °C until use. Apolipoprotein E immunolabelling used a rabbit polyclonal anti-mouse ApoE

(Abcam, 1/30^e), and an anti-rabbit Alexa 488 antibody (Life Technology) as a secondary antibody.

BM transplantation. BM transplantation was performed as follows: donor BM cells were obtained by flushing femoral and tibial BM of WT, $Ccl2^{-/-}$, $Cx3cr1^{-/-}$, $Cx3cr1^{GFP/GFP}$ or $Cx3cr1^{GFP/GFP} ApoE^{-/-}$ mice with PBS. Cells were filtered, washed twice and counted in a Malassez slide. 10×10^6 BM cells in 0.1 ml of PBS was injected retro-orbitally to 10.0-Gy-irradiated $Ccl2^{-/-}$ mice (5 Gy twice, 3 h apart) directly, at the end of the second irradiation. Chimerism was evaluated on mice engrafted with $CX3CR1^{sfP/sfP}$ or $CX3CR1^{sfP/sfP} ApoE^{-/-}$ BM, calculating the percentage of GFP⁺ cells among the total number of CD11b⁺ CD115⁺ F4/80⁺ monocytes. Muscle injury was performed 10 weeks after BM transplantation.

Macrophage and MPC culture. Macrophages were obtained from BM precursor cells. In brief, total BM was obtained from mice by flushing femur and tibia BM with DMEM. Cells were cultured in a DMEM-containing conditioned medium of L929 cell line (enriched in M-CSF) for 7 days. After washing, DMEM-serum-free medium was added for 24 h, and cells were recovered and centrifuged in order to obtain macrophage-conditioned medium. For phagocytosis studies, cell cultures were performed under standard conditions in DMEM/F12 (Gibco) containing 20% FBS and 2% Ultrosor G serum (Pall) during 16 h with or without addition of recombinant recombinant human cytokines CX3CL1 (R&D Systems) or CCL2 (PeproTech) at 100 nM.

Murine MPCs were obtained from TA muscle and cultured with standard conditions in DMEM/F12 (Gibco) containing 20% FBS and 2% Ultrosor G serum (Pall). For proliferation studies, MPCs were seeded at 10,000 cells per cm² on Matrigel (1/10) and incubated for 1 day with macrophage-conditioned medium + 2.5% FBS. Then, cells were incubated with anti-ki67 antibodies (15580, Abcam). For fusion index studies, MPCs were seeded at 30,000 cells per cm² on Matrigel (1/10) and incubated for 3 days with macrophage-conditioned medium containing 2% horse serum. Then, cells were incubated with antibodies against desmin (32362, Abcam).

Phagocytosis. Macrophage-enriched muscular cell suspensions extracted at day 4 post injury were cultured for 4 h with red fluorescent (580/605) Fluospheres carboxylate-modified microspheres (0.2 μ m size) at a 1:10 ratio (macrophage/microspheres) in six-well plates. Cells were analysed on a Zeiss inverted fluorescent axio observer Z1 microscope. Phagocytosis was expressed as the number of macrophages containing at least one microsphere per 1,000 cells, counted using and Image J software, in three distinct experiments. For some experiments, macrophage-enriched muscular cell suspensions were cultured for 16 h with or without addition of Apolipoprotein E3 (Leinco Technologies) at 10 μ g ml⁻¹, recombinant human cytokines CX3CL1 (R&D Systems) or CCL2 (PeproTech) at 100 nM.

In vivo phagocytosis was assessed on day 4 post injury as the percentage of phagocytosed myofibers (infiltrated by mononuclear cells) among the total number of necrotic (not infiltrated) + phagocytosed myofibers. In some case, Apolipoprotein E3 was injected in the muscle, twice per day ($2 \times 10 \mu$ g), for 3 days.

Statistical analyses. Data are presented as the mean plus the standard error of the mean (s.e.m.). Statistical analyses compared the groups with a Mann-Whitney test or with a Wilcoxon test for matched paired values (Prism software). P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

References

- McLennan, I. S. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *J. Anat.* **188**, 17–28 (1996).
- Summan, M. *et al.* Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1488–R1495 (2006).
- Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
- Mounier, R. *et al.* AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell Metab.* **18**, 251–264 (2013).
- Shireman, P. K. *et al.* MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 775–785 (2007).
- Contreras-Shannon, V. *et al.* Fat accumulation with altered inflammation and regeneration in skeletal muscle of CCR2 $^{-/-}$ mice following ischemic injury. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **292**, C953–C967 (2007).
- Cantini, M. & Carraro, U. Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**, 121–128 (1995).

8. Saclier, M., Cuvelier, S., Magnan, M., Mounier, R. & Chazaud, B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* **280**, 4118–4130 (2013).
9. Sonnet, C. *et al.* Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J. Cell Sci.* **119**, 2497–2507 (2006).
10. Cochain, C. *et al.* Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc. Res.* **88**, 186–195 (2010).
11. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
12. Lu, H., Huang, D., Ransohoff, R. M. & Zhou, L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* **25**, 3344–3355 (2011).
13. Lu, H. *et al.* Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J.* **25**, 358–369 (2011).
14. Martinez, C. O. *et al.* Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R832–R842 (2010).
15. Ochoa, O. *et al.* Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2^{-/-} mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R651–R661 (2007).
16. Shireman, P. K., Contreras-Shannon, V., Reyes-Reyna, S. M., Robinson, S. C. & McManus, L. M. MCP-1 parallels inflammatory and regenerative responses in ischemic muscle. *J. Surg. Res.* **134**, 145–157 (2006).
17. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
18. Combadiere, C. *et al.* Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* **117**, 1649–1657 (2008).
19. Aoyama, T., Inokuchi, S., Brenner, D. A. & Seki, E. CX3CL1-CX3CR1 interaction prevents carbon tetrachloride-induced liver inflammation and fibrosis in mice. *Hepatology* **52**, 1390–1400 (2010).
20. Karlmark, K. R. *et al.* The fractalkine receptor CX(3)CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology* **52**, 1769–1782 (2010).
21. Liu, Z., Condello, C., Schain, A., Harb, R. & Grutzendler, J. CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid-beta phagocytosis. *J. Neurosci.* **30**, 17091–17101 (2010).
22. Mizutani, N. *et al.* Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J. Immunol.* **179**, 7478–7487 (2007).
23. Blomster, L. V. *et al.* CX(3)CR1 deficiency exacerbates neuronal loss and impairs early regenerative responses in the target-ablated olfactory epithelium. *Mol. Cell. Neurosci.* **48**, 236–245 (2011).
24. Clover, A. J., Kumar, A. H. & Caplice, N. M. Deficiency of CX3CR1 delays burn wound healing and is associated with reduced myeloid cell recruitment and decreased sub-dermal angiogenesis. *Burns* **37**, 1386–1393 (2011).
25. Ishida, Y., Gao, J. L. & Murphy, P. M. Chemokine receptor CX3CR1 mediates skin wound healing by promoting macrophage and fibroblast accumulation and function. *J. Immunol.* **180**, 569–579 (2008).
26. Brigitte, M. *et al.* Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* **62**, 268–279 (2010).
27. Hochheiser, K. *et al.* Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *J. Clin. Invest.* **123**, 4242–4254 (2013).
28. Mizutani, M. *et al.* The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J. Immunol.* **188**, 29–36 (2012).
29. Medina-Contreras, O. *et al.* CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 4787–4795 (2011).
30. Landsman, L. *et al.* CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* **113**, 963–972 (2009).
31. Engel, D. R. *et al.* CX3CR1 reduces kidney fibrosis by inhibiting local proliferation of profibrotic macrophages. *J. Immunol.* **194**, 1628–1638 (2015).
32. Chazaud, B. *et al.* Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell Biol.* **163**, 1133–1143 (2003).
33. Griffin, C. A., Apponi, L. H., Long, K. K. & Pavlath, G. K. Chemokine expression and control of muscle cell migration during myogenesis. *J. Cell Sci.* **123**, 3052–3060 (2010).
34. Tacke, F. *et al.* Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **117**, 185–194 (2007).
35. Sennlaub, F. *et al.* CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1775–1793 (2013).
36. Cardona, A. E. *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* **9**, 917–9245 (2006).
37. Freeman, M. W. & Moore, K. J. eLiXirs for restraining inflammation. *Nature Med.* **9**, 168–169 (2003).
38. Levy, O. *et al.* Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol. Med.* **7**, 211–226 (2015).
39. Baitsch, D. *et al.* Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1160–1168 (2011).
40. Van Oosten, M. *et al.* Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J. Biol. Chem.* **276**, 8820–8824 (2001).
41. Ali, K., Middleton, M., Pure, E. & Rader, D. J. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ. Res.* **97**, 922–927 (2005).
42. Kang, J. *et al.* Apolipoprotein E^{-/-} mice have delayed skeletal muscle healing after hind limb ischemia-reperfusion. *J. Vasc. Surg.* **48**, 701–708 (2008).
43. Naik, V. *et al.* Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc. Res.* **94**, 545–554 (2012).
44. Li, A. C. & Glass, C. K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat. Med.* **8**, 1235–1242 (2002).
45. Grainger, D. J., Reckless, J. & McKilligin, E. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Immunol.* **173**, 6366–6375 (2004).
46. Varga, T. *et al.* Tissue LyC6⁺ macrophages are generated in the absence of circulating LyC6⁺ monocytes and Nur77 in a model of muscle regeneration. *J. Immunol.* **191**, 5695–5701 (2013).
47. Saederup, N., Chan, L., Lira, S. A. & Charo, I. F. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation* **117**, 1642–1648 (2008).
48. Fumagalli, S., Perego, C., Ortolano, F. & De Simoni, M. G. CX3CR1 deficiency induces an early protective inflammatory environment in ischemic mice. *Glia* **61**, 827–842 (2013).
49. Donnelly, D. J. *et al.* Deficient CX3CR1 signaling promotes recovery after mouse spinal cord injury by limiting the recruitment and activation of Ly6C^{lo}/iNOS⁺ macrophages. *J. Neurosci.* **31**, 9910–9922 (2011).
50. Combadiere, C. *et al.* CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* **117**, 2920–2928 (2007).
51. Chen, Y. W., Zhao, P., Borup, R. & Hoffman, E. P. Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J. Cell Biol.* **151**, 1321–1336 (2000).
52. Porter, J. D. *et al.* A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 263–272 (2002).
53. Fang, J., Shi, G. P. & Vaghy, P. L. Identification of the increased expression of monocyte chemoattractant protein-1, cathepsin S, UPIX-1, and other genes in dystrophin-deficient mouse muscles by suppression subtractive hybridization. *J. Cell. Biochem.* **79**, 164–172 (2000).
54. Porter, J. D. *et al.* Persistent over-expression of specific CC class chemokines correlates with macrophage and T-cell recruitment in mdx skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord.* **13**, 223–235 (2003).
55. Combadiere, C. *et al.* Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* **107**, 1009–1016 (2003).
56. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 14863–14868 (1998).

Acknowledgements

This work was supported by the European Community's Seventh Framework Project FP7-Health-2009 ENDOSTEM 241440, Association Française contre les Myopathies (AFM) 15775, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Université Pierre et Marie Curie (UPMC). We are deeply grateful to Olivier Levy and Florian Sennlaub from the 'Institut national de la vision' for the generous gift of ApoE3-pLIVE and pLIVE plasmid controls.

Author contributions

L.A. and H.P. designed and performed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. C.B.deC., M.S., P.H., L.P., E.G., F.L., J.V., R.M. and W.C. performed the experiments and analysed the data. B.Ch. and A.B. gave technical support and conceptual

advice. N.B. conducted all bioinformatics analyses. B.C. and C.C. designed experiments, wrote the manuscript and supervised the project.

Additional information

Accession number: Microarray data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) under accession code GSE73473.

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

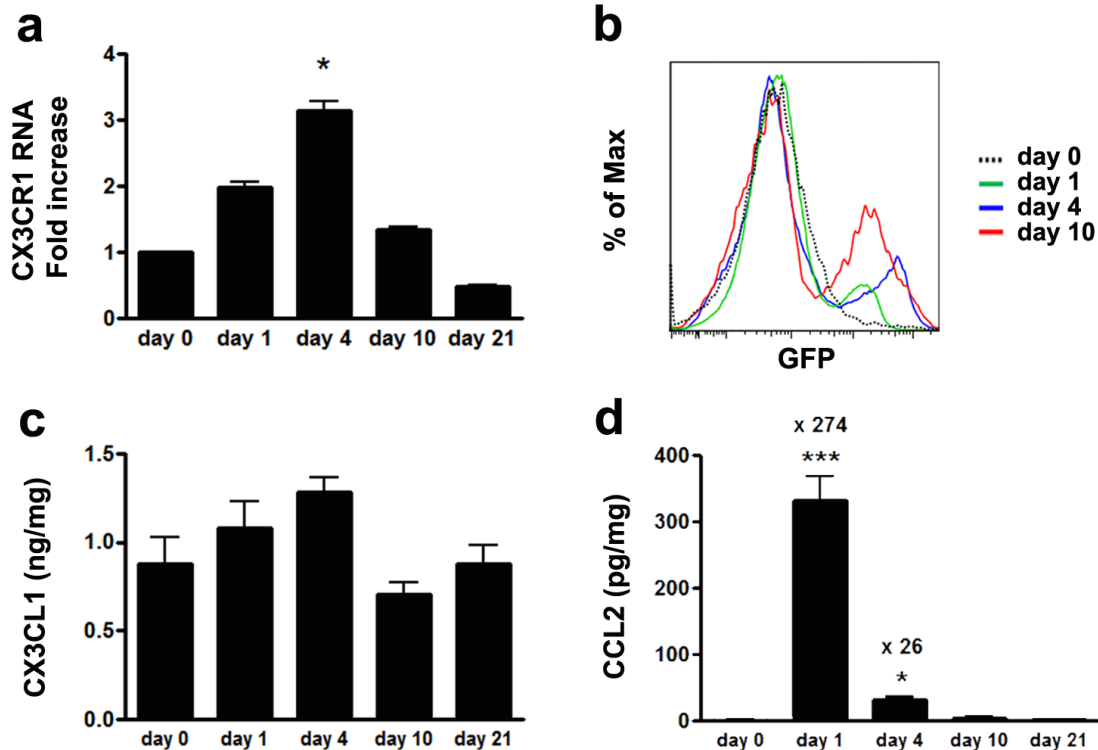
Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Arnold, L. *et al.* CX3CR1 deficiency promotes muscle repair and regeneration by enhancing macrophage ApoE production. *Nat. Commun.* 6:8972 doi: 10.1038/ncomms9972 (2015).



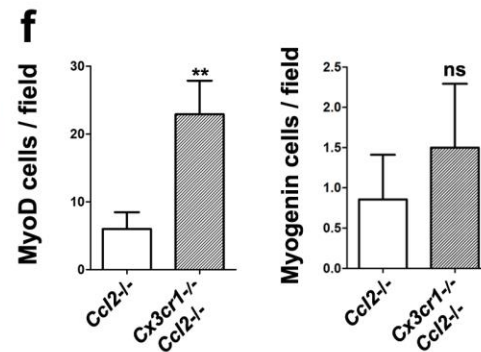
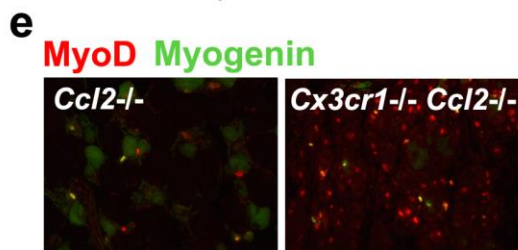
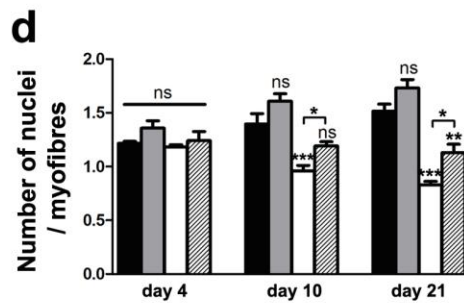
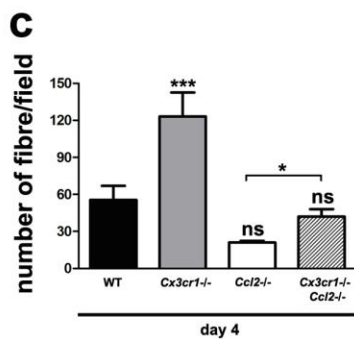
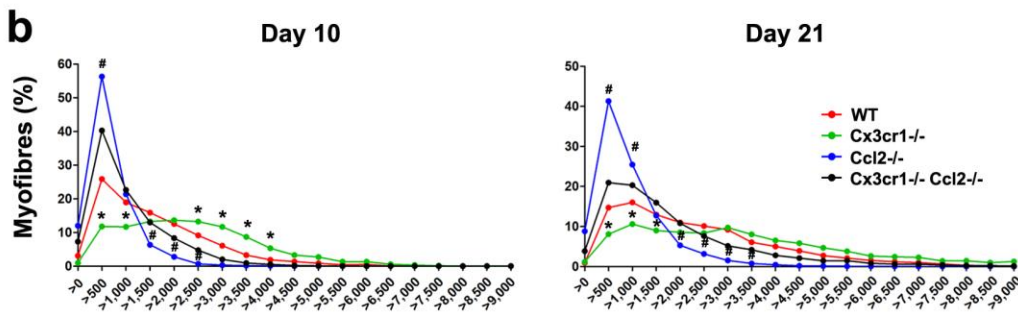
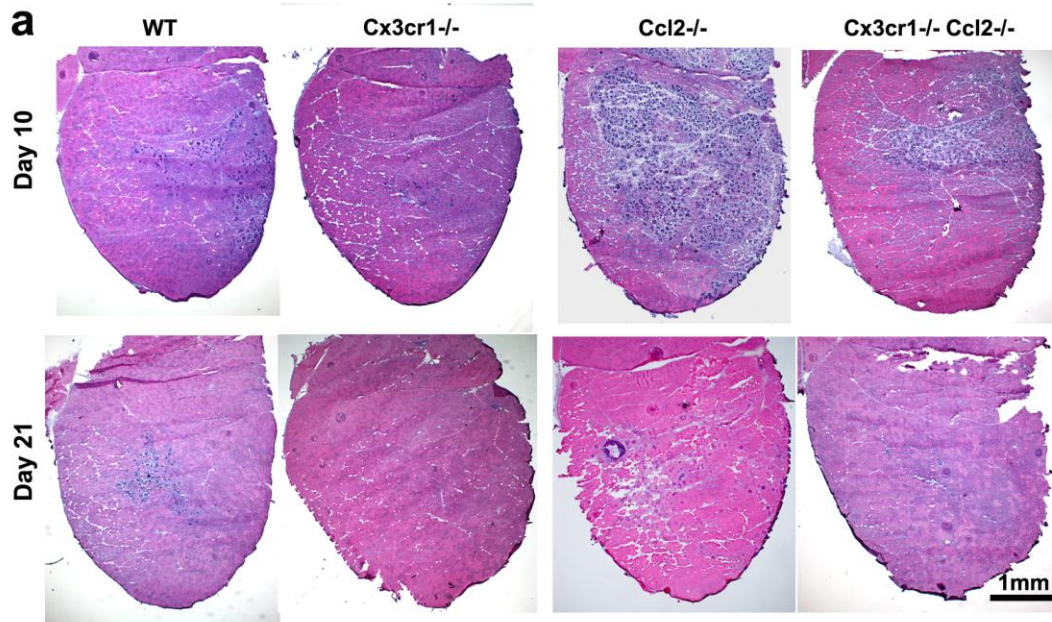
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Supplementary Figure 1

Chemokine and chemokine receptor expression during muscle regeneration

(a) Analysis of CX3CR1 mRNA expression by real time-PCR at day 0, 1, 4, 10 and 21 post- muscle injury. **(b)** Mean of fluorescence intensity of GFP expression measured by flow cytometry in muscular cell suspension of *Cx3cr1^{gfp/+}* mice at day 0 (black dotted line), day 1 (green), day 4 (blue) and day 10 (red) post-injury (one representative experiment out of 3) **(c)** CX3CL1 and **(d)** CCL2 proteins detection by ELISA on muscle tissue lysates extracted at days 0, 1, 4, 10 and 21 post-injury. Data are mean + s.e.m. of 3 to 4 mice per time point in 2 to 4 distinct experiments. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ for each time point versus day 0.

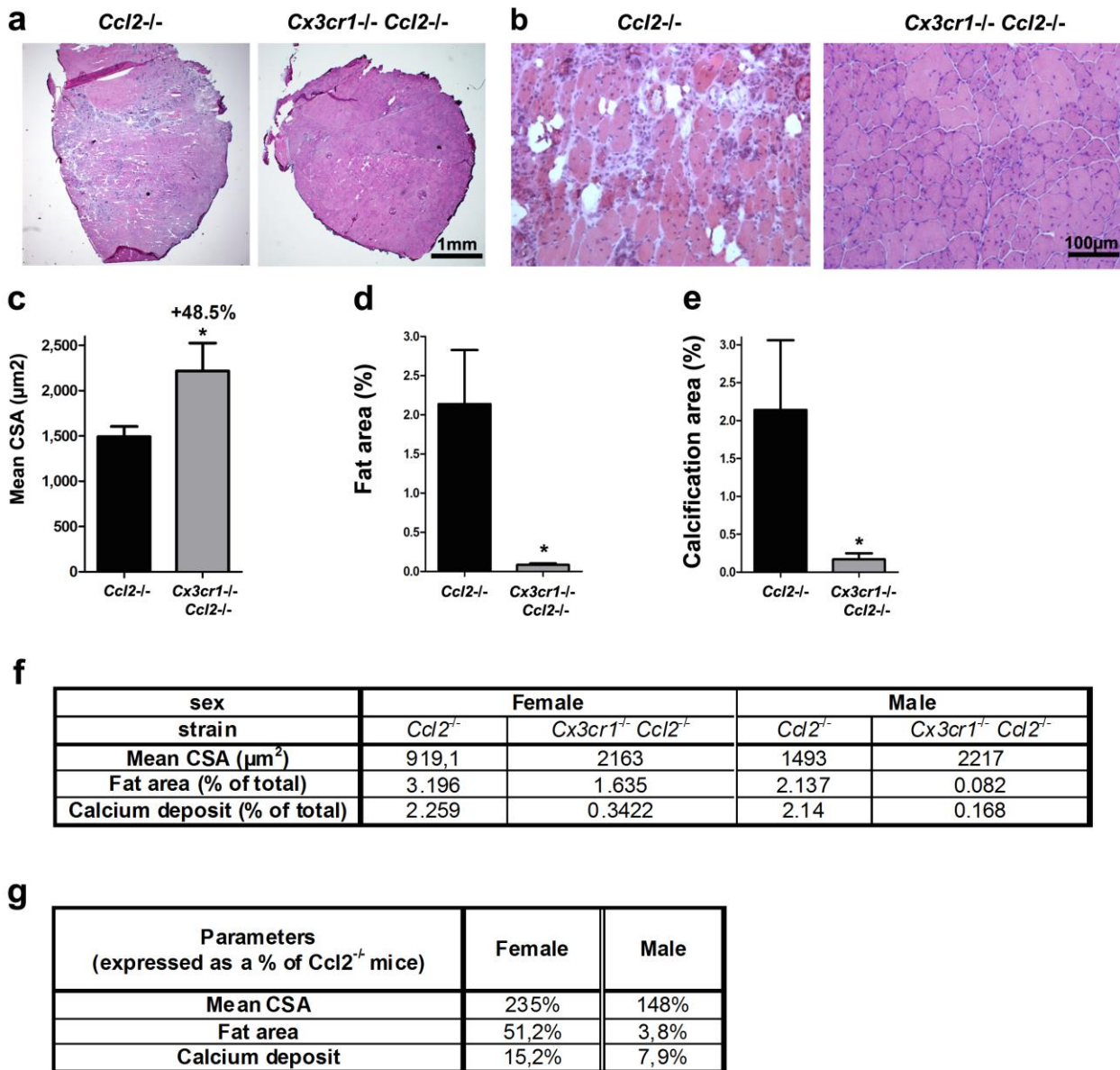


Supplementary Figure 2

Muscle regeneration in WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice

(a) Representative whole muscle cross-section of injured muscle from WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice on days 10 and 21 post-injury. (b) Distribution of CSA of regenerating myofibres

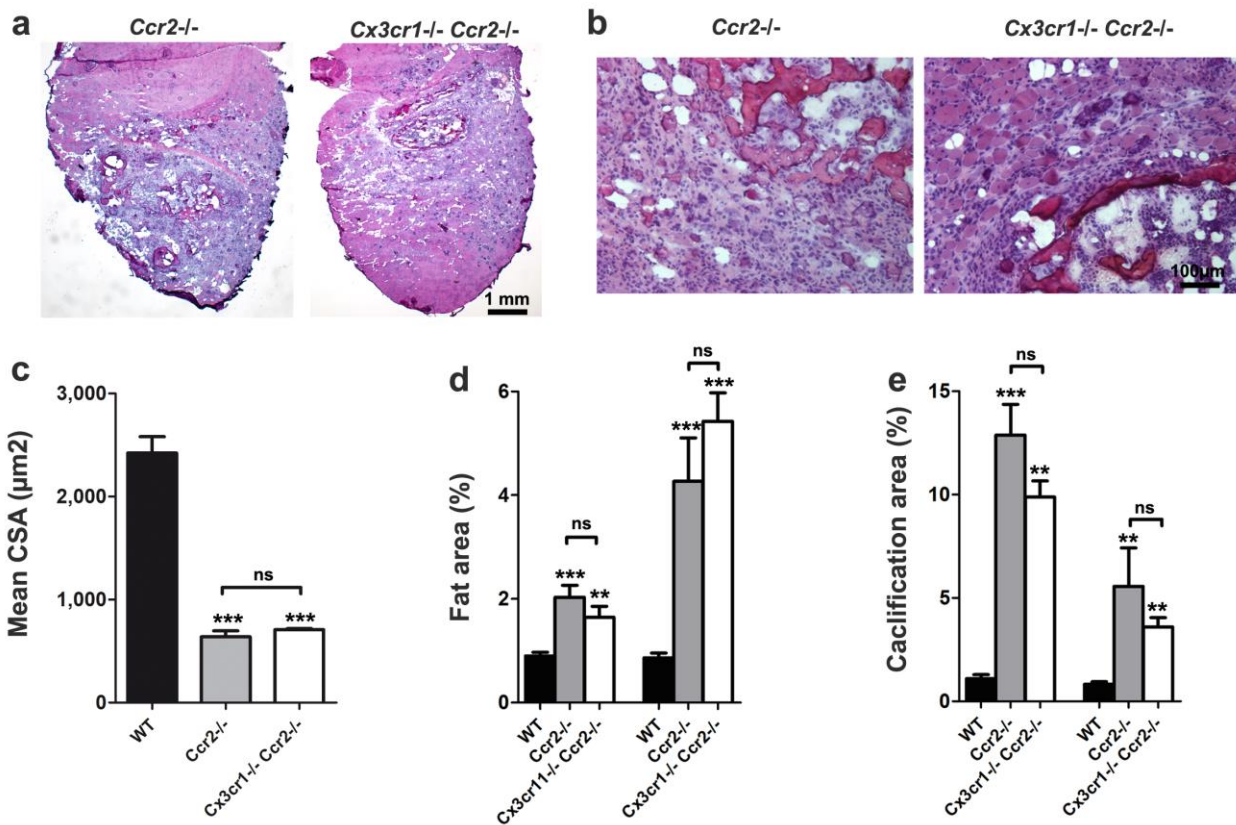
for each mouse strain on days 10 and 21 post-injury. Data are means + s.e.m. of 6 mice per strain in 2 distinct experiments. * $p < 0.05$ for *Cx3cr1*^{-/-} strain versus wild-type and # $p < 0.05$ for *Ccl2*^{-/-} versus *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} strains. **(c)** Quantification of the total number of regenerating myofibres per field on day 4 post-injury. Data are means + s.e.m. of at least 3 different fields taken from 6 different mice per strain. **(d)** Number of myonuclei inside regenerating myofibres divided by the total number of regenerating myofibres on day 4 post-injury. Data are means + s.e.m. of at least 3 different fields taken from 6 different mice per strain. **(e)** Example of muscle cross-sections of *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice immunolabelled with MyoD (red) and myogenin antibodies (green) on day 4 post-injury. **(f)** Quantification of MyoD-positive and myogenin-positive cells in an average of 5 fields per mouse on day 4 post-injury (magnification of x40). Data are mean + s.e.m. of 2 different mice per strain. ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ for each knock-out strain versus WT and for *Ccl2*^{-/-} versus *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice.



Supplementary Figure 3

Analysis of muscle regeneration in male and female *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} mice

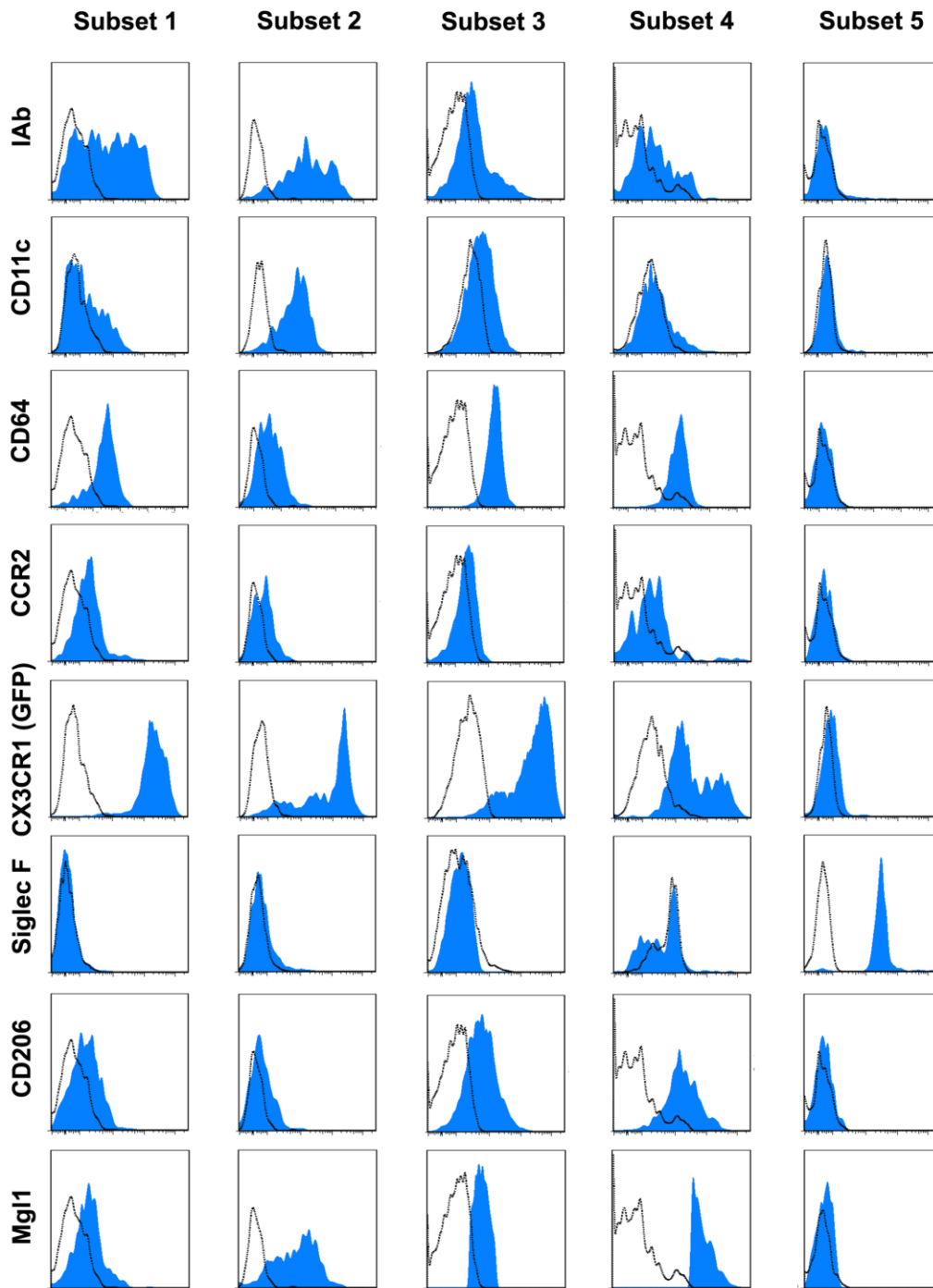
(a) Representative whole muscle cross-sections on day 21 post-injury of *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} male mice. (b) 100x magnification of representative injured muscle of *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} male mice. (c-e) Quantification of muscle regeneration, by measurement of the mean CSA of regenerating myofibres (c), and the areas of fat (d) and calcification (e). Results are mean + s.e.m. of 4 mice per group. (f, g) Comparison of muscle regeneration between *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccl2*^{-/-} female/male mice on day 21 post-injury, expressed as absolute values (f) and percentages (g).



Supplementary Figure 4

Analysis of muscle regeneration in *Ccr2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccr2*^{-/-} mice

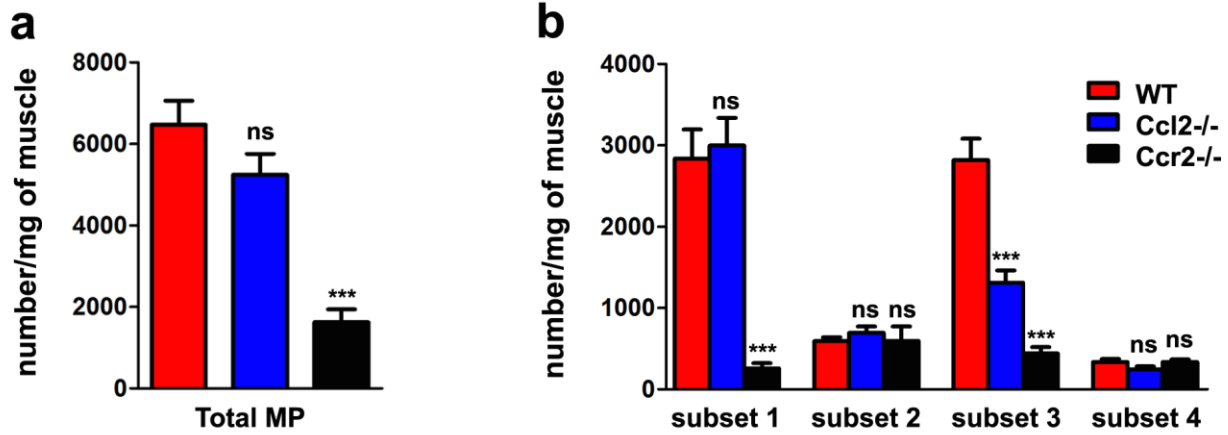
(a) Representative whole muscle cross-sections on day 21 post-injury of *Ccr2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccr2*^{-/-} female mice. (b) 100 \times magnification of representative injured muscle of *Ccr2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-} *Ccr2*^{-/-} mice. (c-e) Quantification of muscle regeneration by measurement of the mean CSA of regenerating myofibres (c), and areas of fat (d) and calcification (e). Results are mean + s.e.m. of 3 mice per group. ns: not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ for each knock-out strain versus WT mice.



Supplementary Figure 5

Phenotypic characterization of mononuclear phagocytes in injured muscle of WT mice

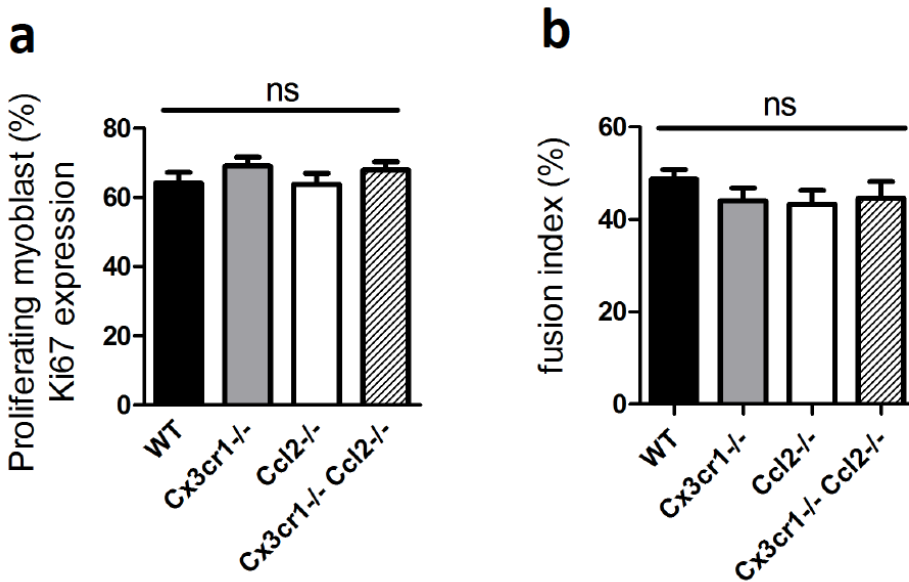
Cells were been sorted from injured muscles of WT mice on day 4 post-injury after enzymatic digestion and analysed for various surface markers by flow cytometry. Subsets 1, 2, 3 and 4 of MPs identified in Figure 3 as well as F4/80⁺ CD11b⁺ Mgl1⁻ cells corresponding to eosinophils were stained with haematoxylin/eosin and tested for expression of IAb (major histocompatibility complex (MHC) molecules - class II), CD11c, CD64, CCR2, CX3CR1, Siglec F, CD206 and Mgl1. Histograms of 1 representative experiment out of 3.



Supplementary Figure 6

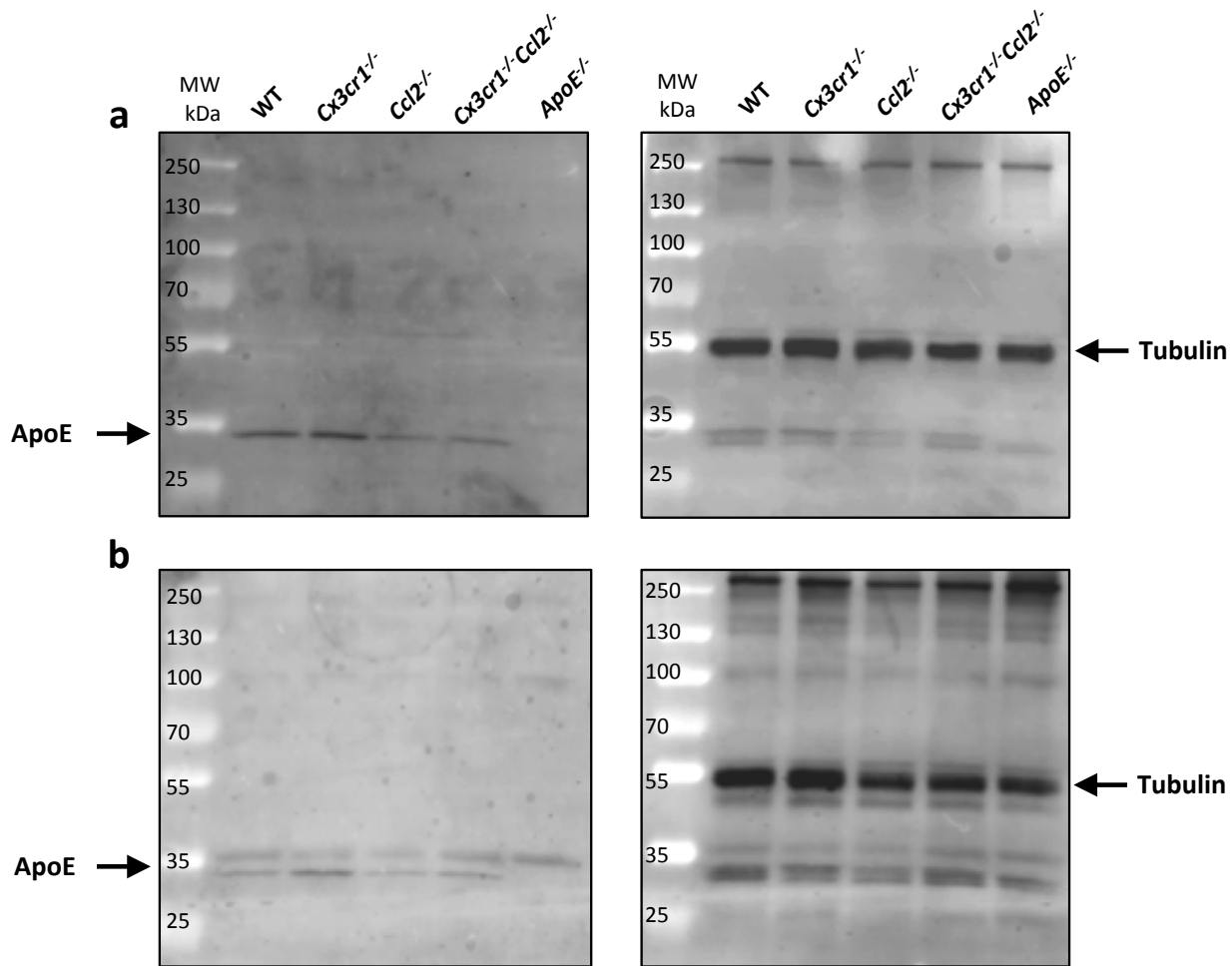
Mononuclear phagocyte distribution 4 days post-injury in *Ccl2*^{-/-} and *Ccr2*^{-/-} mice

(a) Total number and **(b)** number per subset of MPs extracted from injured muscles of WT ($n=12$), *Ccl2*^{-/-} ($n=12$) and *Ccr2*^{-/-} ($n=4$) mice. ns: not significant, *** $p<0.001$ for each knock-out strain versus WT mice.



Supplementary Figure 7
Macrophages effect toward myogenesis

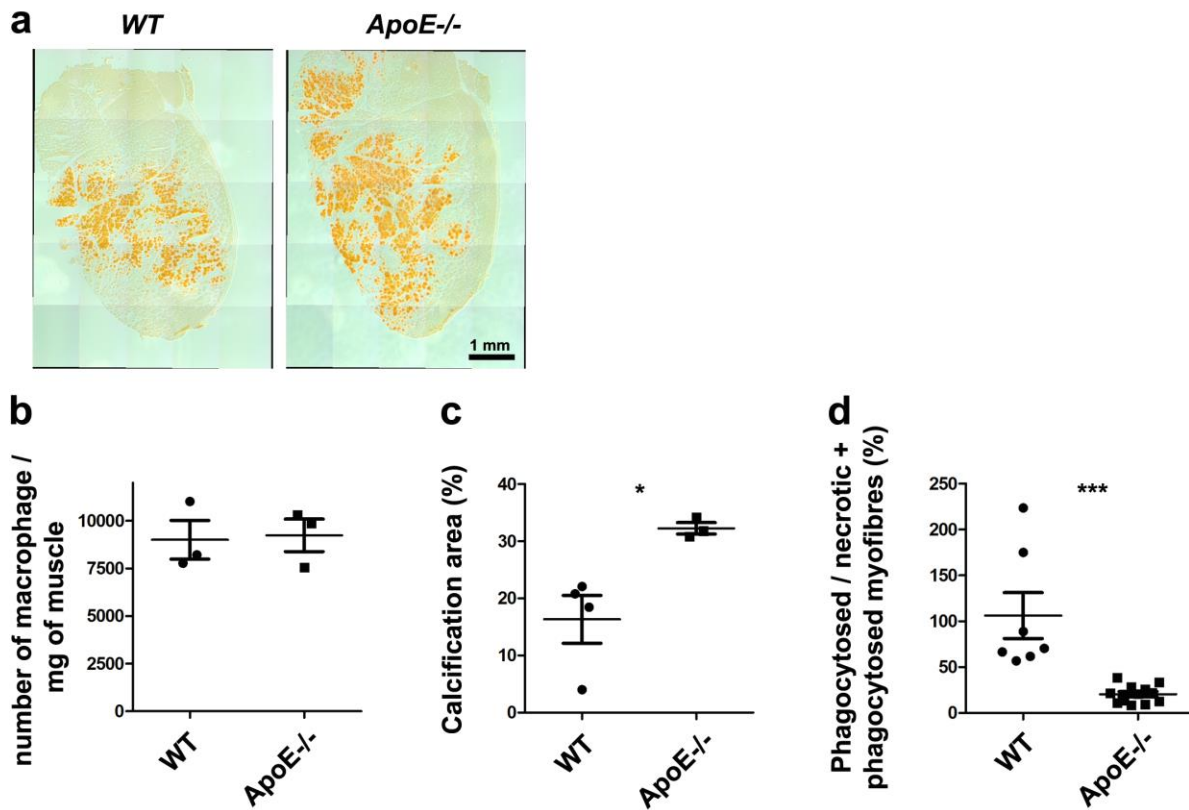
In vitro experiments have been performed to understand the role of CX3CR1 and CCL2 expressing macrophage toward myogenic precursor cells proliferation (Ki67 expression) and fusion (% of myoblast within myotubes vs total number of myoblast counted). **(a)** 24h conditioned media from WT, Cx3cr1^{-/-}, Ccl2^{-/-} and Cx3cr1^{-/-} Ccl2^{-/-} bone marrow derived macrophages have been added on primary myogenic precursor cells and the Ki67 expression has been assessed 1 day later. **(b)** Myoblast fusion index has been assessed 4 days after macrophage conditioned media addition. Results are a mean + s.e.m. of 2 distinct experiments. ns: not significant



Supplementary Figure 8

ApoE expression in mononuclear phagocytes from injured muscle of WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-} and *Cx3cr1*^{-/-}*Ccl2*^{-/-} mice

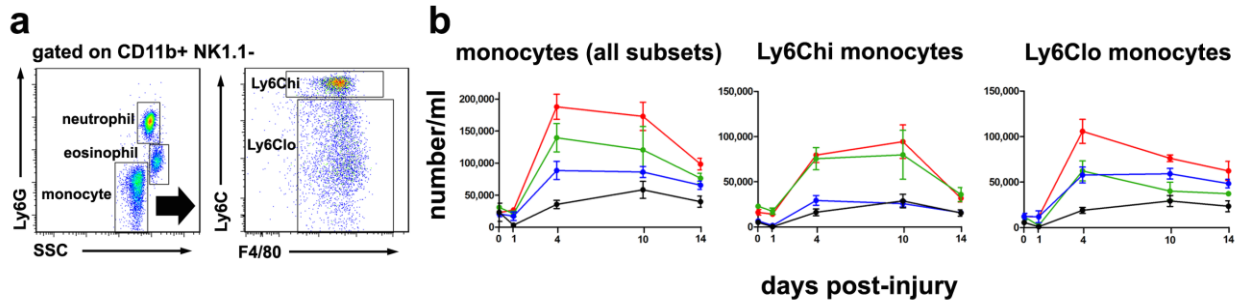
Mononuclear phagocytes were isolated from muscle of WT, *Cx3cr1*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-}, *Cx3cr1*^{-/-}*Ccl2*^{-/-} and *ApoE*^{-/-} mice 4 days post-notexin injection using magnetic columns (CD11b+ Ly6G- NK1.1-). Western-blot (45µg of total protein/lane) were performed using antibodies against ApoE (left panel) and against tubulin (right panel) from 2 independent experiments (a and b) (First lane: Molecular weight (MW) indicated in kDa).



Supplementary Figure 9

Necrotic/calcified myofibres removal by mononuclear phagocytes in ApoE^{-/-} mice

(a) Representative whole muscle cross-sections on day 4 post-injury of WT and ApoE^{-/-} female mice stained with Alizarin Red. (b) Total number of MPs extracted from injured muscles of WT (n=3) and ApoE^{-/-} (n=3) mice. Quantification of muscle debris removal by assesment of the calcification area (n=3 mice per strain) (c) as well as the percentage of phagocytosed vs necrotic myofibres (d) on day 4 post-injury. WT (n=7) and ApoE^{-/-} (n=10) mice. Results are a mean + s.e.m. of 2 distinct experiments. ns: not significant, *p<0.05 and *** p<0.001 for ApoE^{-/-} mice versus WT mice.



Supplementary Figure 10

Kinetics of blood monocytosis during skeletal muscle regeneration

Blood was collected in heparin, labelled with Ly6G, CD11b, F4/80, NK1.1 and Ly6C antibodies and analysed by flow cytometry. **(a)** The two subsets of blood monocytes are identified as $CD11b^+ F4/80^+ Ly6G^- NK1.1^- SSC^{low}$ cells according to the expression level of Ly6C antigen. $Ly6C^{high}$ monocytes correspond to the so-called inflammatory monocytes whereas $Ly6C^{low}$ monocytes correspond to patrolling MOs. **(b)** Kinetics of blood monocytes depicted as total number and number of $Ly6C^{high}$ and $Ly6C^{low}$ monocytes during muscle regeneration in WT (red line), *Cx3cr1* (green line), *Ccl2* (blue line) and *Cx3cr1 Ccl2* (black line) -deficient mice. Data are mean + s.e.m. of at least 6 mice per strain and per time point in 2 to 4 distinct experiments.

Article 5 : «CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity »

Cancer Res. 2016 Nov 15;76(22) :6483-6494

*Loyher PL, Rochefort J, **Baudesson de Chanville C**, Hamon P, Lescaille G, Bertolus C, Guillot-Delost M, Krummel MF, Lemoine FM, Combadière C, Boissonnas A. Cancer Res. 2016 Sep*

La chimiokine CCL2 et son récepteur CCR2 sont connus pour entraîner le recrutement des Mo et des cellules myéloïdes suppressives dans le microenvironnement tumoral (TME). Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du CCR2 sur les Treg après leur activation et leur rencontre avec l'antigène tumoral dans les ganglions drainant. Les tumeurs solides, elles, produisent un fort taux de CCL2 entraînant le recrutement de ces Treg activées, contribuant ainsi à l'immunosuppression du TME et à la tolérance immunitaire vis-a-vis de la tumeur. Le traitement des souris avec une faible dose de cyclophosphamide montre une déplétion préférentielle des Treg CCR2⁺ améliorant l'activation des lymphocytes CD8⁺ spécifiques de la tumeur. Cette étude met en évidence le rôle crucial de CCR2 dans la régulation de l'immunosuppression médiée par les Treg et fournit plus d'informations sur la réponse immunitaire antitumorale après traitement par une faible dose de cyclophosphamide. Ainsi, nous avons pu définir une nouvelle cible pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie. Il apparaît également que CCR2 exprimé par les Treg pourrait servir de biomarqueur de l'efficacité des thérapies anticancéreuse.

CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity

Pierre-Louis Loyher¹, Juliette Rochefort¹, Camille Baudesson de Chanville¹, Pauline Hamon¹, Géraldine Lescaille¹, Chloé Bertolus^{1,2}, Maude Guillot-Delost¹, Matthew F. Krummel³, François M. Lemoine¹, Christophe Combadière¹, and Alexandre Boissonnas¹

Abstract

The CCL2 chemokine receptor CCR2 drives cancer by mediating the recruitment of monocytes and myeloid-derived suppressor cells to the tumor microenvironment. In this study, we extend the significance of CCR2 in this setting by identifying a new role for it in mediating recruitment of CD4⁺ T regulatory cells (Treg). Following tumor initiation, an expanded population of CCR2⁺ Tregs required CCR2 expression to traffic between draining lymph nodes (dLN) and the tumor. This Treg subset was enriched in the fraction of tumor antigen-specific cells in the dLN, where they displayed an activated immunosuppressive phenotype. Notably,

in mouse models, low-dose cyclophosphamide treatment preferentially depleted CCR2⁺ Treg, enhancing priming of tumor-specific CD8⁺ T cells. In the MMTV-PyMT transgenic mouse model of breast cancer and in oral squamous cell carcinoma patients, tumor development was associated with decreased blood frequency and inversely increased tumor frequency of CCR2⁺ Tregs. Our results define a novel subset of CCR2⁺ Treg involved in tumoral immune escape, and they offer evidence that this Treg subset may be preferentially eradicated by low-dose cyclophosphamide treatment. *Cancer Res*; 76(22): 6483–94. ©2016 AACR.

Introduction

Chemokine–chemokine receptor interactions play major roles in the shaping of the tumor microenvironment (TME). These interactions can induce the differential recruitment of immune cells and by this mean turn the TME into an immunosuppressive site (1, 2). CCR2, a chemokine receptor highly expressed by inflammatory monocytes, is crucial for the recruitment of the latter from the bone marrow to inflamed tissues (3) but also displays chemotactic properties for T cells (4, 5). Secretion of the major CCR2 ligand (CCL2) by both the tumor and tumor stromal cells is common in many tumor types in both human and mouse models (6, 7). For these reasons, the CCR2–CCL2 axis is an important mechanistic marker of tumor development (8) and can also predict clinical benefit after cancer therapy (6). Beyond tumor-associated myeloid cells, regulatory T cells (Treg) have a well-established role in promoting tumor tolerance and represent

an obstacle to efficient T cell–based antitumor immunotherapy (9–11). Suppression of antitumor effector functions of both CD4⁺ Th cells and cytotoxic CD8⁺ T cells by Tregs can occur through various cell-to-cell or soluble mechanisms (12) both in draining lymph nodes (dLN; ref. 13) or in the tumor itself (9). A better understanding of the mechanisms involved in Treg trafficking and accumulation within the TME is thus needed.

Tregs display different homing properties, and their appropriate compartmentalization is crucial for their *in vivo* activity (14, 15). Following thymus emigration, Tregs can enter secondary lymphoid organs in a CCR7- and CD62L-dependent fashion. This lineage can be maintained throughout time by further recruitment or by continuous self-renewal (16). Activation and antigen priming in secondary lymphoid organs promote downregulation of CCR7 and CD62L, whereas other memory/effector type trafficking receptors may be upregulated to allow Tregs to migrate into nonlymphoid or inflamed tissues (14, 17–19). To date, few chemokine receptors have been associated with the tumor homing properties of Tregs, although a role for CCL22 in the recruitment of CCR4⁺ Tregs into human ovarian and/or breast cancer has been described (20–22).

CCL2 is described as a proinflammatory cytokine, but contradictory functions have been observed in the absence of CCR2 in noninfectious inflammatory models (23, 24). A dual role for CCR2 was described in a model of arthritis because a subset of highly suppressive Treg, expressing CCR2, expanded during the course of the disease (24). The chemokine receptors CCR2, CCR4, and CCR5 and P- and E-selectins were all necessary to ensure efficient homing of Tregs to a graft tissue (25). Finally, in a model of delayed-type hypersensitivity reaction, antigen-specific Tregs required CCR2 to migrate toward the antigen site (26). Altogether,

¹Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06 UMR_S1135, Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Inserm U1135, CNRS ERL8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Paris, France. ²Department of Maxillofacial Surgery, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. ³Department of Pathology, University of California San Francisco, San Francisco, California.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Alexandre Boissonnas, Sorbonne Universités, UPMC Université, 91 Boulevard de l'hôpital, Paris 75013, France. Phone: 33-1-4077-9897; Fax: 33-1-4077-9734; E-mail: alexandre.boissonnas@upmc.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0984

©2016 American Association for Cancer Research.

these findings support a role for CCR2 in the homing of activated Tregs to an inflamed site.

We therefore hypothesized that CCR2 expression on Tregs might play a central role in tumor context. Herein, we studied the role of CCR2 on the compartmentalization and the dynamic of Tregs in different tumor models, as well as human oral squamous cell carcinoma (OSCC). We showed that CCR2⁺ Tregs represent a discrete subset that is highly important for suppressing antitumor responses. Finally, we observed a selective depletion of this subset by low-dose cyclophosphamide, which provides new interpretation in the Treg-mediated effect of cyclophosphamide treatment.

Materials and Methods

Ethical statement

All experiment protocols were approved by the French animal experimentation and ethics committee and validated by "Service Protection et Santé Animales, Environnement" with the number A-75-2065 for tumor experiments and A-75-1315 for parabiosis experiments. Human samples were obtained after informed written consent according to local ethics committee authorization.

Human tissue and blood samples

Blood ($n = 30$) and tumors ($n = 14$) samples from patients with primary OSCCs (three at stage I, four at stage II, one at stage III, and 26 at stage IV) were obtained during surgical resection (Department of Maxillofacial Surgery, Pitié-Salpêtrière Hospital; Paris, France). Gingival tissues ($n = 10$) were collected from healthy subjects undergoing preventive wisdom tooth extraction (Odontology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France). Control blood samples ($n = 42$) were obtained from volunteer healthy donors (Etablissement Français du Sang, Paris, France). The male-to-female ratio was 1.7:1 for OSCC blood patients (mean age, 60.8 ± 10 years); 1.9:1 (mean age, 51.6 ± 18.1 years) for control blood and 2.5:1 for tumors patients (mean age, 62.5 ± 8.9 years); 1.5:1 for gingival tissues (mean age, 40.2 ± 18 years).

Mice

C57BL/6 mice (10–14 weeks) were obtained from JANVIER LABS. C57BL/6 *Rag2*^{-/-} TCR ($\alpha 2$, $\nu \beta 5$) transgenic mice (OT1) were crossed to CD45.1 C57BL/6 (Animalerie centrale, Institut Curie, Paris, France) to obtain OT1 CD45.1 mice. Foxp3-EGFP transgenic mice, *Ccr2*^{-/-}, *Ccr1*^{-/-}, *Ccr5*^{-/-}, *D6*^{-/-}, and Foxp3-EGFP X *Ccr2*^{-/-} mice were bred in the animal facility (Centre d'Exploration Fonctionnelle, Pitié-Salpêtrière, Paris, France). MMTV PyMT-P2A-mCherry-P2A-OVA (PyMT-ChOVA) mice (27) were crossed with *Ccr2*^{-/-} mice. *Ccr2*^{flp/+} mice were kindly provided by Israel Charo (Gladstone Institute, San Francisco, CA; ref. 28).

Parabiosis

C57BL6 female host parabionts were generated with Foxp3-EGFP X *Ccr2*^{-/-} females, injected with MCA-OVA tumor cells 15 days after surgery to allow establishments of blood chimerism, and analyzed 10 days later. The Treg chimerism was evaluated by determining the percentage of EGFP-expressing *Ccr2*^{-/-} Tregs out of total Tregs intracellularly stained with Foxp3 antibody.

Cells

The MCA-OVA cell line (kindly provided by Dr. C. Théry, Institut Curie, Paris, France, in 2010) is the MCA-101 cell line, stably transfected with a plasmid encoding for soluble ovalbumin (OVA; ref. 29). After resuscitation, MCA-OVA cell line was cultured in Dulbecco's medium with antibiotics and 10% FCS for a maximum of 4 months. Stability of the cell line is evaluated according to consistent tumor growth throughout the different studies (29–31). CD8⁺ OT1 T cells (specific for OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide in a H2-K^b context) were obtained from lymph nodes of OT1 *Rag2*^{-/-} mice (herein called OT1 T cells, with purity between 94% and 98%).

Tumor engraftment and mice antitumor treatment

Protocols from refs. 30 and 31 were strictly reproduced. Briefly, MCA-OVA cells (2×10^5) were injected subcutaneously in the flank of mice. Tumor size was measured twice a week using a caliper, $V = L \times l \times (L + l)/2$. Low-dose chemotherapy was performed 7 days after tumor inoculation by a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide (Sigma-Aldrich) diluted in PBS at 100 mg/kg. Adoptive T-cell transfer was performed on day 10 after tumor inoculation by intravenous injection of 5×10^6 freshly harvested OT1 T cells.

ELISA

Plasma, tumor, and lymph node tissues were harvested on indicated days, stored in PBS at -80°C , thawed, and centrifuged to obtain tissue homogenates. Murine CCL2 ELISA was performed using Quantikine ELISA Mouse Immunoassay Kits (Bio-Techne) following the manufacturer's protocol.

Flow cytometry

Phenotypic characterization was performed using either a FACSCanto II or FACS LSRFortessa (Becton Dickinson) for murine cells and LSRII flow cytometer (Becton Dickinson) for human cells. For analysis, FlowJo software (Tree Star Inc.) was used. MCA-OVA tumors, MMTV-PyMT primary mammary tumors (3–4 days after detection by palpation), and dLN (axillary) were entirely mashed in PBS with 0.5% BSA/2 mmol/L EDTA (FACS buffer) and filtered using 70- μm cell strainer (BD Biosciences). Blood was drawn and lysed in RBC lysis buffer containing 0.15 mol/L NH_4Cl , 0.01 mmol/L KHCO_3 , and 0.1 mmol/L EDTA. Surface staining was performed by incubating 50 μL of cell suspension (one tenth of the total) with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ purified anti-CD16/32 (2.4G2; BD Biosciences) for 10 minutes at 4°C and for an additional 20 minutes with appropriate dilution of specific surface antibodies. Dead cells were excluded using LIVE/DEAD Fixable Stain (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Forward- and side scatter parameters were used for doublets exclusion. After incubation, cell suspensions were washed once in FACS buffer. For CD4⁺ tumor antigen-specific T-cell analysis, cells were stained with the T-select MHC Class II mouse tetramer I-A^b OVA₃₂₃₋₃₃₉ Tetramer-PE (MBL International Corporation) prior to surface staining according to the manufacturers' instructions. CCL2-binding assay was achieved as described previously (32). Briefly, after surface staining, cells were incubated in the dark for 45 minutes at 37°C in RPMI medium with GlutaMAX containing 25 nmol/L murine CCL2^{AF647} (Almac Sciences). Cells were then washed in FACS buffer. In some experiments, cells were preincubated with 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ recombinant

human rhCCL2 chemokine (PeproTech) at 37°C for 45 minutes. For DNA content analysis, cells were incubated with 16 µmol/L Hoechst in a final volume of 500 µL of FACS buffer with shaking at 37°C for 45 minutes prior to surface staining and washed with 3 mL of FACS buffer. For intracellular OTI IFN γ staining, cell suspensions were restimulated *ex vivo* with 1 µmol/L OVA_{257–264} for 3 hours at 37°C in the presence of 5 µg/mL Brefeldin A. For IL10 staining, cells were preincubated for 6 hours with cell activation cocktail with Brefeldin A according to the manufacturers' instructions (BioLegend). After surface staining, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes, washed twice in Perm/Wash solution (BD Biosciences), incubated 10 minutes with 1 µg/mL purified anti-CD16/32 in Perm/Wash at room temperature, and incubated for 30 minutes in Perm/Wash in the presence of anti-IFN γ or anti-IL10. For intracellular staining, the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set, anti-Foxp3, and anti-Ki67 (eBioscience) were used according to the manufacturers' instructions. Samples were washed in FACS buffer before acquisition. Calculation of absolute numbers of different cell populations was performed by adding in each vial a fixed number (10,000) of nonfluorescent 10-µm Polybead Carboxylate Microspheres (Polysciences) according to the formula: number of cells = (number of acquired cells \times 10,000)/(number of acquired beads). The number of cells obtained for each sample was extrapolated to the whole organs.

Cell suspensions from human tumor and gingival samples were obtained after nonenzymatic digestion using Cell Recovery Solution (Corning) at 4°C for 1 hour. After filtering, washing, and counting, cells were stained with Fixable Viability Dye eFluor780 (eBioscience) at 2°C to 8°C for 30 minutes. Cells from tissues and whole blood were stained with directly labeled surface antibodies at 4°C during 20 minutes and permeabilized with Foxp3/TFs Staining Buffer Set (eBioscience) for intracellular staining, according to the manufacturer's instructions. After staining, whole blood was lysed to eliminate red blood cells.

***In vivo* proliferation assay**

CD45.1 OTI T cells were incubated for 10 minutes at 37°C in PBS with 5 mmol/L carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Invitrogen). Cells (5×10^6) were injected in PBS into CD45.2 tumor-bearing or tumor-free mice. After 4 days, the frequency and number of OTI T cells that had performed more than three divisions (defined as highly divided) in dLN and tumor were measured while gating on CD45.1⁺CD8⁺ cells.

Additional information can be found in Supplementary Materials and Methods.

Results

CCR2 expression on Tregs is required for tumor infiltration

We first examined the impact of CCR2 invalidation on tumor growth and on the compartmentalization of Tregs in mice injected subcutaneously with the methylcholanthrene-induced, ovalbumin-expressing tumor cell line (MCA-OVA). We previously showed the importance of Treg in limiting antitumor CD8⁺ T-cell responses in this model (30). In *Ccr2*^{-/-} mice, tumor growth was slightly reduced by day 13 after tumor inoculation, as compared with wild-type (WT) mice. These differences in tumor size became significant on day 20 and were then sustained throughout the monitoring period (Fig. 1A). In keeping with a role of the

CCR2/CCL2 axis in tumor development, the CCR2 chemokine CCL2 was detected in MCA-OVA cell line supernatants (Fig. 1B) and was found to increase in inoculated tumor from day 7 to day 19 (Fig. 1C). In WT mice, the percentage of tumor-infiltrating Tregs (CD25⁺Foxp3⁺) among CD4⁺ cells increased between day 7 and day 13. In *Ccr2*^{-/-} mice, the frequency of tumor-infiltrating Tregs was similar on day 7 compared with WT mice, but they failed to accumulate further (Fig. 1D and Supplementary Fig. S1A). The absolute count of Treg/mg of tumor increased between day 7 and day 10, stabilized between day 10 and day 13 in WT mice but diminished in proportion to tumor weight in *Ccr2*^{-/-} mice (Supplementary Fig. S1B). On the other hand, the numbers of intratumor conventional CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ Th cells were not significantly reduced by CCR2 deficiency (Supplementary Fig. S1C). In the dLN, the frequency of Tregs among CD4⁺ cells was similar (Fig. 1D). Because the number of Tregs increased similarly with time in WT and *Ccr2*^{-/-} mice, we excluded that the defect of tumor infiltration was due to a defect of Treg amplification in the dLN. A significantly higher accumulation of Tregs but not Th in the dLN of *Ccr2*^{-/-} mice was even observed on day 13 (Supplementary Fig. S1D and S1E). Thus, we uncovered a role of the CCL2/CCR2 axis in the preferential tumor recruitment of Tregs compared with Th cells over time.

To confirm that the defect of Treg infiltration into the tumor in the absence of CCR2 was intrinsic to Tregs, we performed parabiosis experiment between WT and Foxp3-EGFP *Ccr2*^{-/-} mice (Fig. 1E). The proportion of EGFP⁺*Ccr2*^{-/-} Tregs among total Tregs in the dLN and tumor was determined on day 10 after tumor injection in both parabiont hosts. In the dLN, the absence of CCR2 did not seem to affect Treg expansion and distribution. In contrast, EGFP⁺*Ccr2*^{-/-} Tregs that migrated to the tumor tissue represented only 19.8 \pm 6.8% of total Tregs in WT host and 20.1 \pm 7% of total Tregs in *Ccr2*^{-/-} host (Fig. 1F and G). These results indicate that CCR2 expression by Tregs is required for their accumulation to the tumor site.

A transient increase in CCL2 protein level was detected in the dLN on day 7 and day 10 but resumed to basal value by day 13 (Supplementary Fig. S2A). Plasma CCL2 protein level was also slightly increased after MCA-OVA inoculation at all the time points analyzed (Supplementary Fig. S2B). We therefore speculated that the CCR2/CCL2 axis could also locally regulate Treg migration in the dLN. *In situ* analysis of Tregs dynamic by real-time imaging showed increased motility in tumor dLN compared with non-dLN (mean velocity of 7.3 \pm 4.6 µm/minute vs. 2.9 \pm 3 µm/minute, respectively; Supplementary Fig. S2C and S2D). Tregs displayed various migratory behaviors, ranging from highly motile to completely arrested. In WT mice, up to 36% of EGFP⁺ Tregs were highly motile, never making significant arrest during their track (Supplementary Fig. S2E). In *Ccr2*^{-/-} mice, the mean velocity of EGFP⁺ Tregs in the dLN was slightly reduced compared with WT mice (6 \pm 4.3 µm/minute; Supplementary Fig. S2D), and the proportion of highly motile Tregs dropped to 12% (Supplementary Fig. S2E).

We could not detect any significant differences in the absolute count of four different subsets of antigen-presenting cells between WT and *Ccr2*^{-/-} mice that could affect Treg interactions or displacement and account for the defect of migration (Supplementary Fig. S2F and S2G).

These results indicated that CCR2 contributed to increasing the dynamic of Tregs within the dLN and might reflect Treg emigration from the dLN toward the tumor.

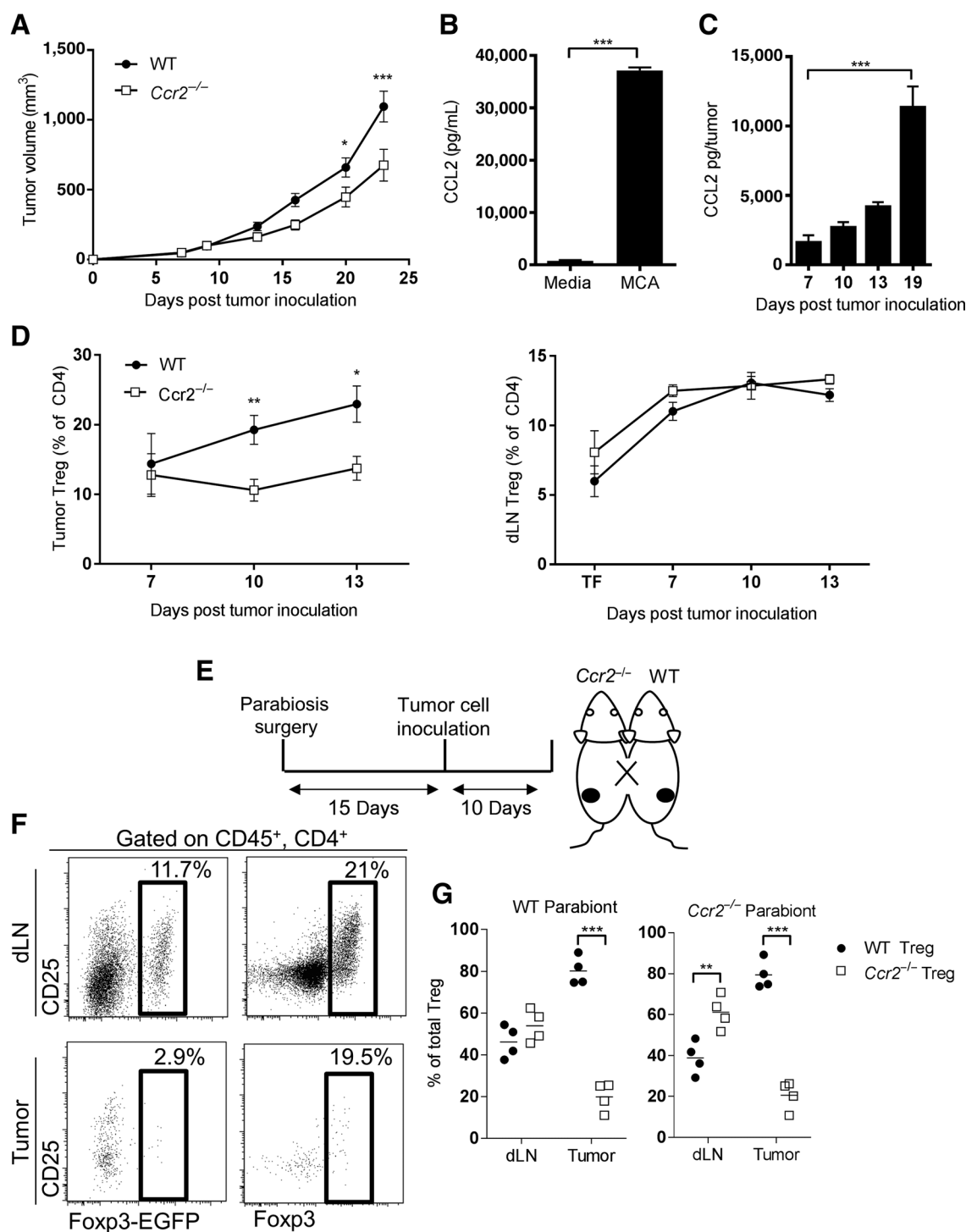


Figure 1. CCR2 expression on Tregs is required for tumor infiltration. **A**, MCA-OVA tumor growth in WT mice (black circles) or *Ccr2*^{-/-} (white squares). Graphs, mean ± SEM (*n* = 20 mice in each group, from three independent experiments). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used. **B** and **C**, CCL2 protein level in supernatants of MCA-OVA cell cultures (**B**) and tumors (**C**; *n* = 4–6 mice of two experiments). ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was performed. **D**, quantification of the percentage of Treg among CD4⁺ cells in tumors (left) and dLN (right) of WT (black circles) and *Ccr2*^{-/-} mice (white squares). Data represent mean ± SEM of at least 10 mice from three independent experiments. Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used. **E**, parabiosis experimental protocol. **F**, representative dot plot showing Treg chimerism in dLN and tumors of mouse parabionts. **G**, graphs represent the proportion of WT and *Ccr2*^{-/-} Tregs in dLN and tumors in WT (left) and *Ccr2*^{-/-} parabionts (right). Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used. (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001).

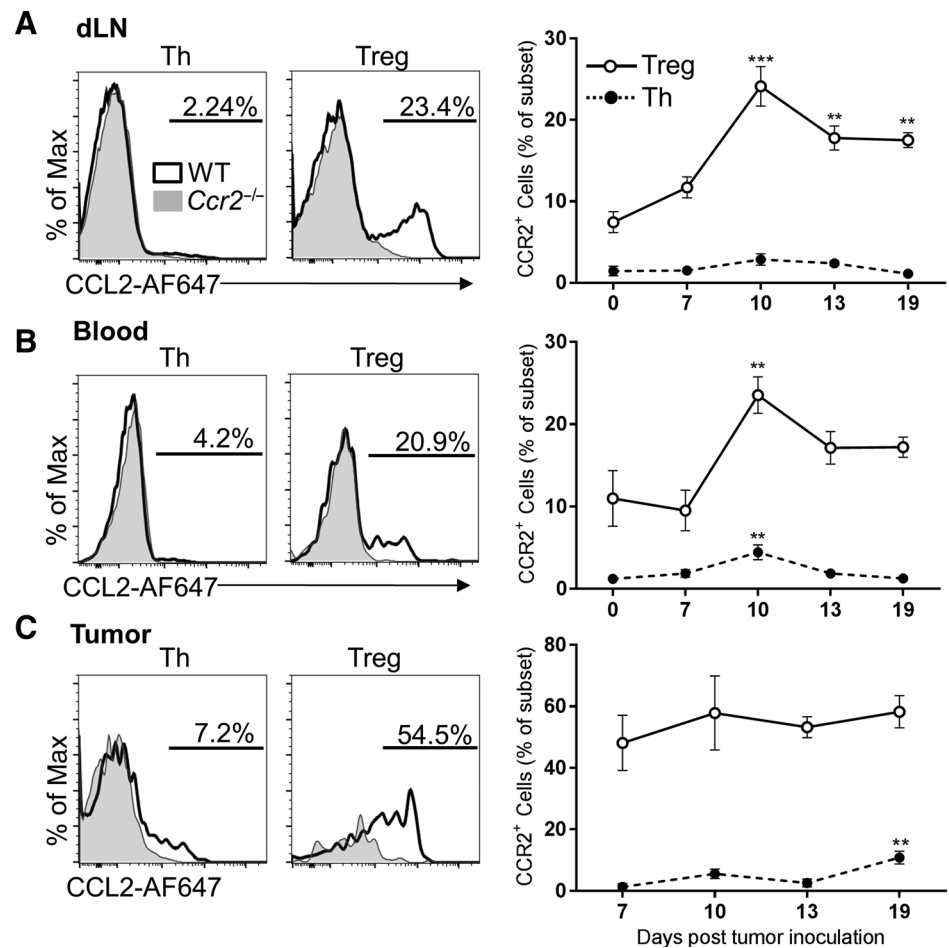


Figure 2.

CCR2⁺ Tregs accumulate during tumor development. **A–C**, CCR2 expression by Th cells and Tregs was analyzed in dLN (**A**), blood (**B**), and tumors (**C**). Left, representative histogram plots showing CCL2-AF647 binding on Th and Tregs in WT (empty histograms) and *Ccr2*^{-/-} mice (filled histograms). Graphs show mean ± SEM of the percentage of CCR2⁺ cells (*n* = at least 9 mice in each group from three independent experiments). One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used to compare means at each time points with tumor-free mice (day 0) or with day 7 in the tumor (**, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001).

CCR2⁺ Tregs accumulate during tumor development

We next investigated whether Tregs express the CCR2 receptor at their surface. CCR2 staining using the antibody that labeled inflammatory monocytes was not detected on Treg. CCR2 is the best known receptor for the chemokine CCL2 and presents high affinity for this chemokine. Using the CCR2 ligand, conjugated with Alexa-647 dye (CCL2^{AF647}) as previously done (32), we revealed functional surface CCR2 receptor expression in both blood inflammatory monocytes and Tregs (Supplementary Fig. S3A). A significant and distinct fraction of Tregs binds the chemokine in the tumor, blood, and dLN (Fig. 2). This binding was almost completely abrogated in *Ccr2*^{-/-} mice and in the presence of competitive unlabeled CCL2 (Supplementary Fig. S3B) but was similar in CCR1, CCR5, and D6-deficient mice, the three other receptors that have been shown to bind CCL2 with lower affinity (Supplementary Fig. S3C). CCL2 binding was specifically detected on RFP⁺ Tregs reporting *Ccr2* transcription (Supplementary Fig. S3D). CCL2 binding was assessed in both Th and Treg compartments and the proportion of cells binding the chemokine in WT mice, but not in *Ccr2*^{-/-}, was therefore considered to be CCR2⁺ T cells. At steady state, 8.8 ± 4.9% of Tregs were CCR2⁺ in the dLN, whereas less than 2% of Th cells bound CCL2 (Fig. 2A). The proportion of CCR2⁺ Tregs peaked to 21.3 ± 8.4% on day 10 and subsequently dropped to 16.5 ± 2.3% on day 19. In the blood, the percentage of CCR2⁺ Tregs was 10.9 ± 5.8% at

steady state, increased up to 23.5 ± 5.4% on day 10, and dropped to 17.27 ± 3.4% on day 19 (Fig. 2B). In contrast, the proportion of CCR2⁺ Th did not significantly increase in those tissues over time (Fig. 2A and B). In the tumor, the proportion of CCR2⁺ Tregs was higher compared with dLN and blood but remained stable over time (from 48.1 ± 17.9% on day 7 to 58.2% ± 13.7 on day 19). The proportion of CCR2⁺ tumor-infiltrating Th still remained lower (Fig. 2C). Finally, CCR2⁺ Tregs represented both distinct and differentially overlapping subsets with the CCR4⁺, CCR5⁺, and CCR6⁺ Tregs in the dLN, and these CCR2⁺ Tregs were preferentially enriched within the tumor compared with the other subsets. Notably, the proportion of CCR2⁺ Tregs coexpressing CCR4 and CCR6 was lower in the tumor compared with dLN, whereas the one coexpressing CCR5 remained similar (Supplementary Fig. S3E).

We concluded that the CCR2⁺ Treg fraction sequentially increased in the dLN and the blood during the early steps of tumor growth while it was constantly highly represented among tumor-infiltrating Tregs. Overall, our results suggested that CCR2 represents a major Treg homing receptor in tumor context.

CCR2⁺ Tregs are activated, IL10 producing, and tumor antigen-specific cells

To better characterize CCR2⁺ Tregs, we compared the phenotype of CCR2⁺ and CCR2⁻ Tregs in the dLN and in the tumor. In the dLN, CCR2⁺ Tregs displayed an activated

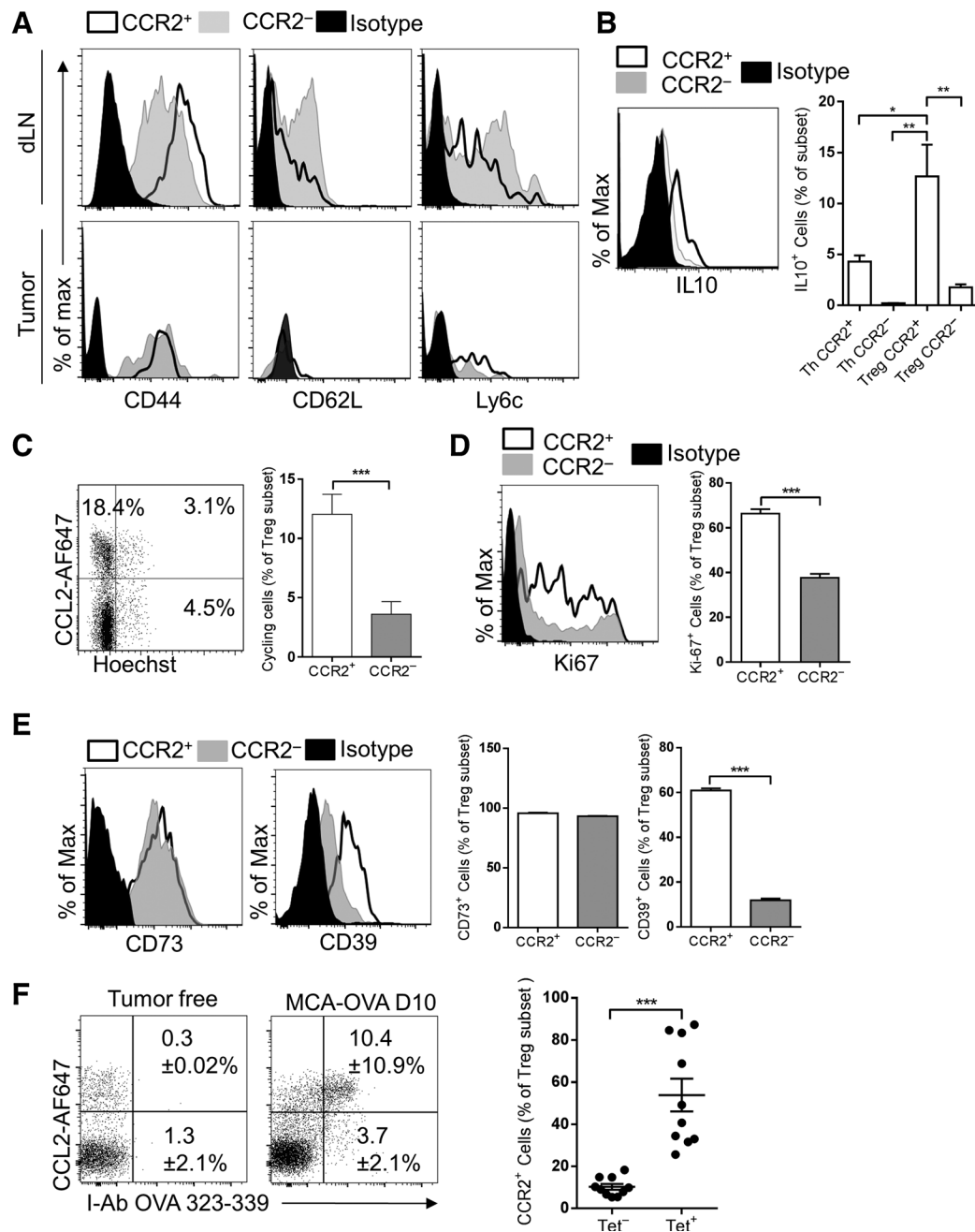


Figure 3.

CCR2⁺ Tregs are activated, IL10 producing, and tumor antigen-specific cells. The phenotype of Ccr2⁺ and Ccr2⁻ Tregs was analyzed on day 10 after tumor inoculation. **A**, representative histogram plots of indicated surface markers. **B**, representative dot plot of IL10 staining gated on dLN Treg subsets (left) and quantification (right). Data represent mean ± SEM of 4 mice from two independent experiments. One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used. **C**, representative dot plots of CCR2 and DNA staining (Hoechst; left) in dLN. Bars represent mean ± SEM of 14 mice from four independent experiments (right). Student *t* test was used. **D**, representative histogram plot of Ki67 expression (left) in dLN. Bars represent mean ± SEM of 6 mice from two independent experiments (right). Student *t* test was used. **E**, representative histogram plots of CD73 and CD39 expression in dLN. Bars represent mean ± SEM of 6 mice from two independent experiments. **F**, representative FACS dot plot of concomitant CCR2 and I-Ab OVA₃₂₃₋₃₃₉ tetramer staining in the dLN of tumor-free and tumor-bearing mice; percentage ± SD are indicated (left). Quantification of CCR2⁺ Treg in the tetramer-negative and -positive fraction (Tet⁻ and Tet⁺); bars indicate mean ± SEM (right) of 10 mice from three independent experiments. Student *t* test was used. (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001).

phenotype, expressing higher levels of CD44 and lower levels of Ly6C and CD62L as compared with CCR2⁻ Tregs. In the tumor, CCR2⁺ and CCR2⁻ Tregs were all CD44^{high}, CD62L^{low}, and Ly6C^{low} (Fig. 3A). In addition, CCR2⁺ Tregs were the cells

with the highest capacity to produce IL10 after phorbol 12-myristate 13-acetate-ionomycin stimulation compared with CCR2⁻ Tregs, but also compared with CCR2⁺ and CCR2⁻ Th lymphocytes (Fig. 3B).

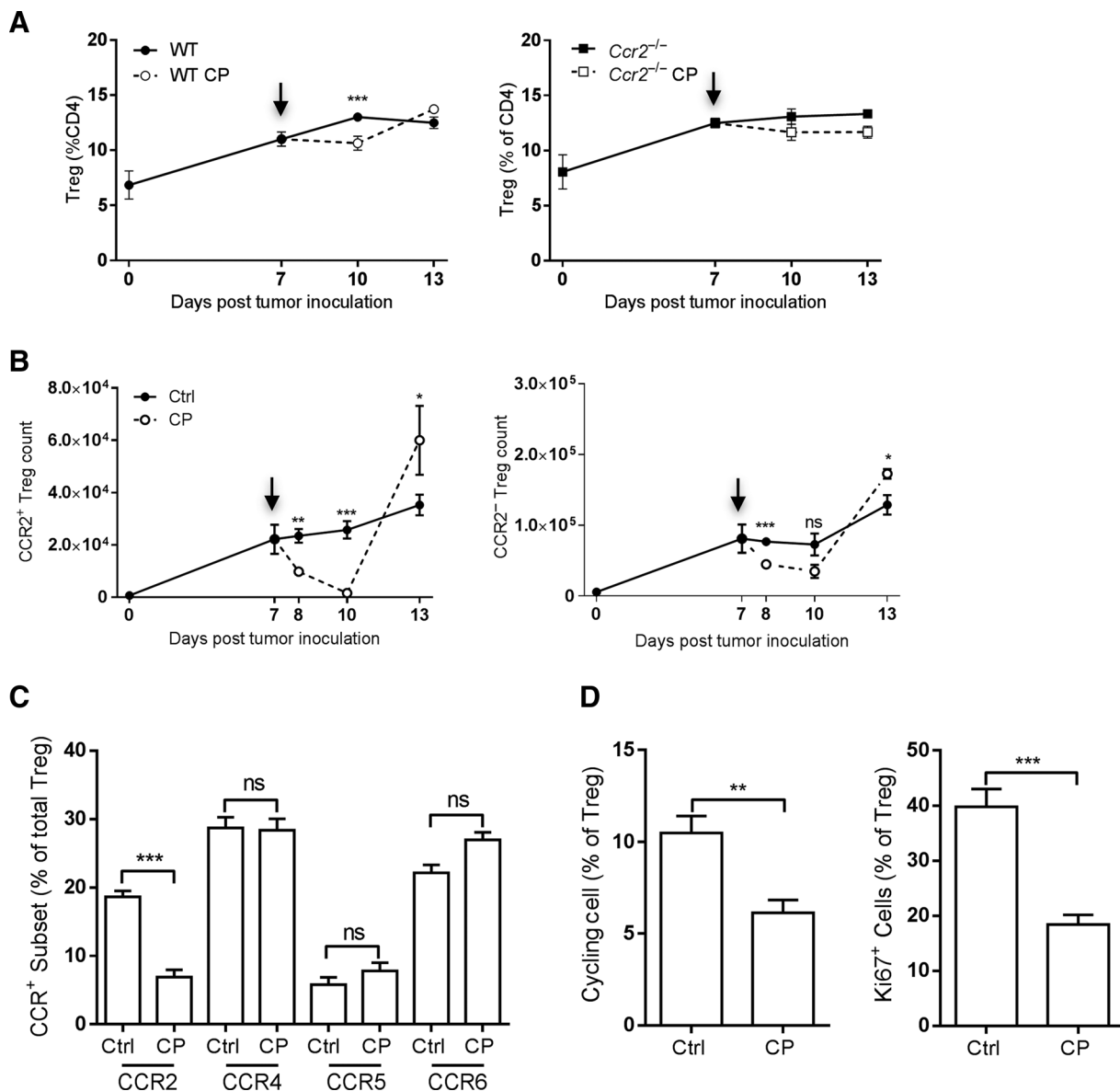


Figure 4.

CCR2⁺ Tregs are preferentially depleted by low-dose cyclophosphamide treatment. **A**, graphs show percentage of dLN Tregs among CD4⁺ T cells in WT (left) and *Ccr2*^{-/-} mice (right) treated (dashed lines) or untreated (full lines) with low-dose cyclophosphamide (CP; 100 mg/kg) on day 7. Data, mean ± SEM ($n = 6$ to 10 mice from 2–5 independent experiments). **B**, quantification of the number of Treg CCR2⁺ (left) and CCR2⁻ (right) in WT mice. Data, mean ± SEM ($n = 6$ to 10 mice from 2–5 independent experiments). **C**, bars show the frequency of the indicated chemokine receptor among total Tregs in the dLN on day 10. Ctrl, control; ns, not significant. Data, mean ± SEM ($n = 5$ mice/group). One-way ANOVA tests with Bonferroni multiple comparison tests were used to compare treated with nontreated mice at each time point. **D**, bars represent the frequency of cycling (Hoechst⁺, left; Ki67⁺, right) Tregs in the dLN on day 10. Data, mean ± SEM ($n = 5$ –8 mice/group, Student *t* test was performed; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

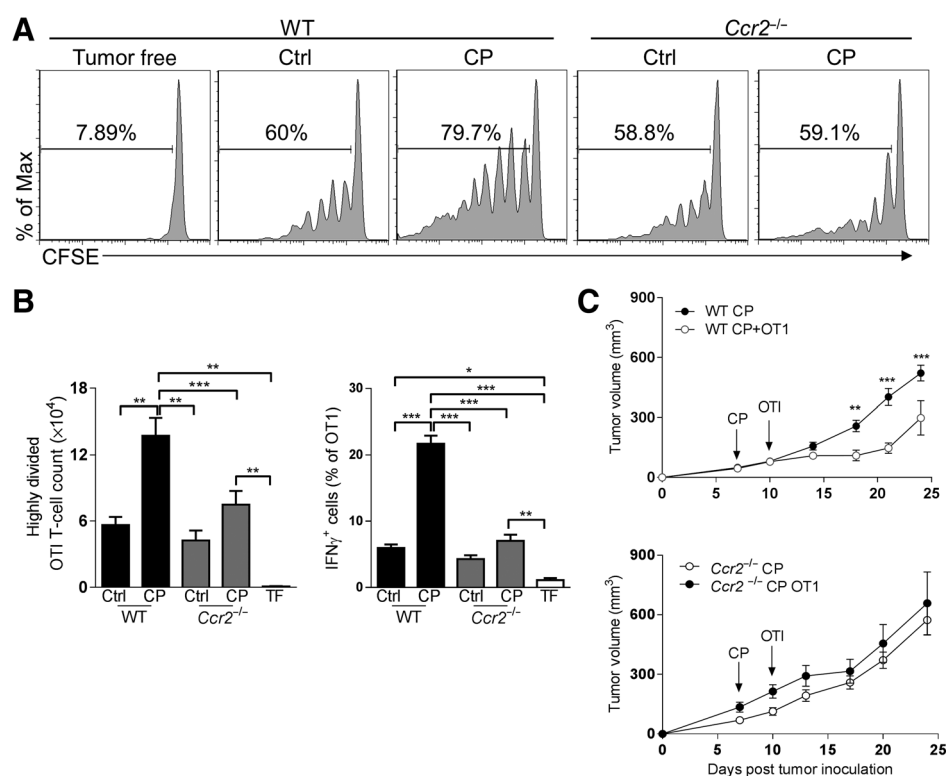
Accordingly, the CCR2⁺ Treg subset in the dLN was cycling more than the CCR2⁻ Treg subset as shown by Hoechst and Ki67 staining (Fig. 3C and D).

CD73 and CD39 expression on Tregs have been previously associated with strong immunosuppression (33). CD73 expression was similar in CCR2⁺ and CCR2⁻ Tregs, but CD39 expression was greater in the former (Fig. 3E). Finally, staining with OVA-323-339 MHCII tetramer (I-Ab OVA-323-339) revealed that tumor antigen-specific Tregs were more restricted to the CCR2⁺

subset (Fig. 3F). We concluded that CCR2⁺ Tregs represent proliferating tumor-activated Tregs with a high immunosuppressive activity.

CCR2⁺ Tregs are preferentially depleted by low-dose cyclophosphamide treatment

Low dose of cyclophosphamide has been shown to specifically deplete Tregs, thereby enhancing anti-tumor T-cell priming and

**Figure 5.**

Low-dose cyclophosphamide (CP) fails to enhance the priming of OT-1 in the dLN of *Ccr2*^{-/-} mice. Three days after treatment with low-dose cyclophosphamide, CFSE-labeled OT-1 cells were transferred in tumor-bearing WT and *Ccr2*^{-/-} mice. Proliferation and IFN γ production of OT-1 in dLN were analyzed 3 days later. **A**, representative dot plots show CFSE dilution gated on CD45.1⁺ OT-1 cells. Ctrl, control. **B**, quantification of OT-1 cell proliferation and IFN γ production on day 13. Data, mean \pm SEM ($n = 15$ mice from three independent experiments). **C**, tumor growth in cyclophosphamide-treated WT and *Ccr2*^{-/-} mice with (white) or without (black) OT-1 adoptive transfer. Graphs represent mean \pm SEM of 15 to 20 mice in each group from three independent experiments. Two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

proliferation (34, 35). We thought to analyze the impact of this alkylating agent on dLN CCR2⁺ Tregs.

As expected, after one single low dose of cyclophosphamide (100 mg/kg) on day 7, the percentage of Tregs in the dLN was reduced by 25% on day 10 and recovered on day 13 in WT mice. The percentage of Tregs remained barely affected in *Ccr2*^{-/-} mice (Fig. 4A). The depletion observed in WT mice preferentially affected CCR2⁺ Tregs. Indeed, the absolute number of CCR2⁺ Tregs gradually decreased from day 7 to day 10 (93% depletion), whereas CCR2⁻ Tregs were less affected (52% depletion). For both subsets, Treg recovery occurred within 3 days (Fig. 4B). Cyclophosphamide sensitivity was selective to the CCR2⁺ Tregs compared with CCR4⁺, CCR5⁺, and CCR6⁺ Tregs, emphasizing the preferential targeting of the CCR2⁺ subset (Fig. 4C). The frequency of cycling Tregs among total Treg of the dLN confirmed that cyclophosphamide treatment preferentially ablated proliferating Tregs (Fig. 4D). Comparative cell-cycle analysis in the dLN on day 8 and day 13 first revealed that the proportion of Tregs but not Th cells engaged in cell cycle is higher in WT mice compared with *Ccr2*^{-/-} mice. Nevertheless, the absolute numbers of cycling Tregs are identical, arguing that noncycling Tregs accumulate in the dLN of *Ccr2*^{-/-} mice (Supplementary Fig. S4). We conclude that CCR2⁺ Tregs are preferentially targeted by low-dose cyclophosphamide due to their higher activating and proliferating state and that in the absence of CCR2, noncycling Tregs are retained in the dLN, leading to lower depletion after cyclophosphamide treatment.

Low-dose cyclophosphamide fails to enhance the priming of OT-1 in the dLN of *Ccr2*^{-/-} mice

We previously showed that low-dose cyclophosphamide treatment transiently enhances antitumor CD8⁺ T-cell response

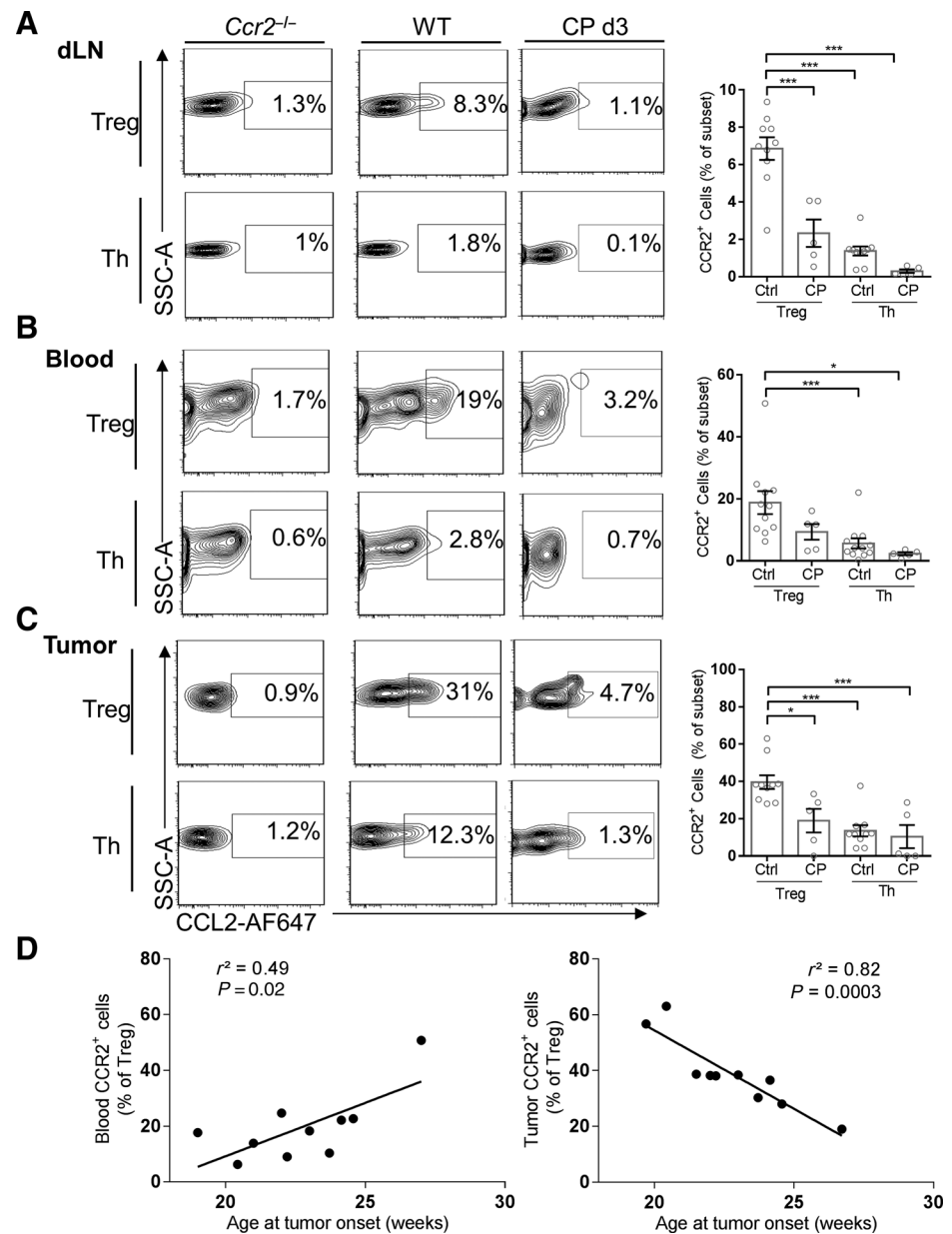
against MCA-OVA tumor (31). To assess whether the reduced Treg depletion in *Ccr2*^{-/-} mice treated with low-dose cyclophosphamide has a functional impact, we adoptively transferred naive OT-1 CD8⁺ cytotoxic T cells 3 days after cyclophosphamide treatment and analyzed 3 days after transfer cell proliferation and IFN γ production in the dLN. In cyclophosphamide-treated WT mice, the proliferation rate of OT-1 cells was improved by 2.5-fold, whereas OT-1 cell count was not significantly changed in *Ccr2*^{-/-} mice. The percentage of IFN γ -producing OT-1 was also increased in WT cyclophosphamide-treated mice but not in *Ccr2*^{-/-} mice (Fig. 5A and B). Accordingly, the therapeutic combination did yield a significant reduction in tumor growth from day 18, when compared with mice treated with low-dose cyclophosphamide alone, but this beneficial effect was completely lost in *Ccr2*^{-/-} mice (Fig. 5C). Altogether, these results indicate that preferential depletion of CCR2⁺ Tregs is associated with increased priming of tumor-specific CD8⁺ T cells. On the other hand, in *Ccr2*^{-/-} mice, where Tregs are not as effectively depleted, low-dose cyclophosphamide failed to enhance the priming of tumor-specific CD8⁺ T cells.

CCR2⁺ Tregs accumulate within spontaneous mammary carcinoma and are preferentially depleted by low-dose cyclophosphamide

We next evaluated whether the CCR2⁺ Treg subset expansion could be applicable to a less inflammatory and a more progressive tumor model. CCL2^{AF647} was also used to stain CCR2⁺ CD4⁺ T cells in the spontaneous Cherry-OVA PyMT mammary carcinoma model, in which tumor apparition occurs at 23 ± 2.1 weeks of age. Consistent with the results in the MCA-OVA tumor model, CCL2 binding defined a higher proportion of CCR2⁺ Tregs compared with Th in the dLN, blood, and tumor. PyMT mice were treated

Figure 6.

CCR2⁺ Tregs accumulate within spontaneous mammary carcinoma and are preferentially depleted by low-dose cyclophosphamide. **A–C**, representative contour plots (left) of CCL2 binding on Treg and Th cells from WT and *Ccr2*^{-/-} MMTV-PyMT mice, 3 days after treatment with cyclophosphamide (CP) in dLN (**A**), blood (**B**), and tumor (**C**). Graphs, percentage of CCR2⁺ Tregs and Th (right). One-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test was used ($n = 5-10$ mice). Ctrl, control. **D**, graphs show correlative analysis between the percentage of CCR2⁺ Tregs and the age at tumor onset in the blood (left) and the tumor (right). Linear regression was calculated, and Pearson correlation coefficients are indicated. (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$).



with either PBS or low-dose cyclophosphamide once tumor nodules were palpable, and frequencies of CCR2⁺ Tregs and Th cells were monitored 3 days after treatment. Similarly to the observations made in the MCA-OVA model, low-dose cyclophosphamide led to a preferential depletion of CCR2⁺ Tregs in the different compartments (Fig. 6A–C). In addition, we found that a lower percentage of CCR2⁺ Tregs in the blood and a higher percentage of CCR2⁺ Tregs in the tumor correlated with an earlier onset of tumor development (Fig. 6D).

CCR2⁺ Tregs accumulate within human OSCC

Finally, we examined the expression of CCR2 in Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁻) and Th cells (CD4⁺CD25^{-/low}Foxp3⁻) isolated from blood and tumors of OSCC patients and compared with healthy blood donors and nontumor gingival tissues from patients undergoing wisdom tooth extraction. Com-

pared with the mouse, the human anti-CCR2 antibody did provide a good signal quality on T cells. The specificity of CCR2 staining was confirmed by preincubating the cells with unlabeled CCL2 chemokine, which inhibited the binding of the CCR2 antibody and allowed to define our gating for CCR2⁺ T cells (Fig. 7A). Although the proportions of CCR2⁺ Th in the blood were similar between OSCC patients and control blood ($13.9 \pm 4.9\%$, $14.1 \pm 6.7\%$), the percentage of CCR2⁺ Tregs was significantly decreased in patients ($10.9 \pm 4\%$) as compared with healthy donors ($17.1 \pm 5.3\%$; Fig. 7B). The frequency of CCR2⁺ Th cells was also similar between tumor tissue and healthy gingiva. However, the percentage of CCR2⁺ Tregs was increased to $38.6 \pm 6.5\%$ in tumor tissues as compared with healthy gingival (28.1 ± 7.9). In conclusion, in OSCC patients, we observed a reduced frequency of circulating CCR2⁺ Tregs while they accumulated in the tumor microenvironment.

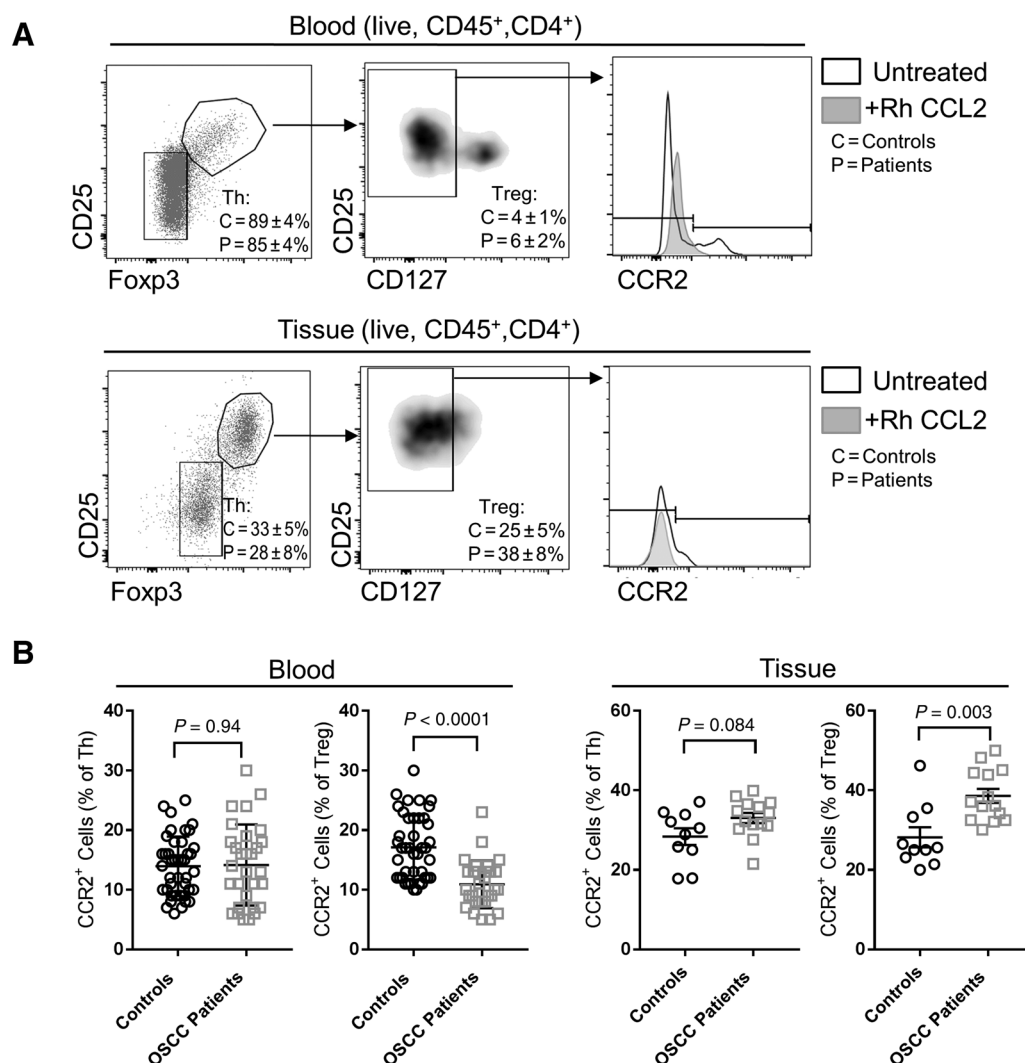


Figure 7. CCR2⁺ Tregs accumulate within human OSCC. **A**, gating strategy for Th and Treg cells in human fresh blood (top) and OSCC tumors (bottom). Mean percentage \pm SD of Th cells and Tregs among total CD4⁺ cells in healthy control subjects (C) or OSCC patients (P) are indicated. Histogram plots show CCR2 expression on Tregs after preincubation with rhCCL2 competitor (gray histogram) or not (empty histogram). **B**, frequency of CCR2⁺ Th and Tregs in the blood of healthy ($n = 42$) or OSCC patients ($n = 30$; left) and healthy gingival tissues ($n = 10$) or OSCC tumors ($n = 14$; right). Two-tailed Mann-Whitney test was used (P values are indicated).

Discussion

Chemokine receptor-mediated immune cell migration is usually achieved through combinatorial expression of multiple chemokine receptors (1). So far, most studies on the direct role of the chemokine CCL2 and its main receptor CCR2 have focused on myeloid cells because of their higher CCR2 expression. However, tumor-derived CCL2 was shown to be sufficient to mediate the tumor tropism of adoptively transferred T cells (36). Reduction of intratumor Tregs was observed in previous study following CCL2 blockade (37), but the direct role of this axis in mediating the tumor homing of Tregs has not been studied in depth.

We investigated whether the CCL2 chemokine could also be used by Tregs for their homing toward solid tumors *in vivo*. The reduction of tumor growth in *Ccr2*^{-/-} mice was associated with

a drastic reduction in both the number and percentage of Tregs inside the tumor. Parabiosis experiments to track the fate of *Ccr2*^{-/-} Tregs in analogous microenvironments suggest that CCR2 expression on Tregs is required for the migration toward the tumor of at least 50% of Tregs, representing approximately the fraction of CCR2⁺ Tregs within the tumor. The CCR2⁺ Treg subset started to expand in the dLN concomitantly with the appearance of differences in tumor size between WT and *Ccr2*^{-/-} mice, as well as the tumor infiltration of CCR2⁺ Tregs. These observations suggest the induction of two distinct, CCR2-independent and CCR2-dependent, phases of Treg recruitment. The CCR2⁺ Treg subset phenotype was consistent with one of activated Treg, highly cycling and immunosuppressive compared with CCR2⁻ Tregs. In addition, the dynamic behavior of endogenous Tregs was affected by CCR2 deficiency in the dLN but not in non-dLN.

Indeed, we found a significant enrichment of tumor antigen-specific Tregs in the CCR2⁺ versus CCR2⁻ fraction. As a result, CCR2 upregulation by Tregs might follow tumor-induced T-cell activation.

The spontaneous PyMT model relates more to a chronic inflammatory state, where tumors slowly develop compared with the more acute and aggressive inoculated cell lines (38). In this model, Treg ablation was demonstrated to reduce both primary and metastatic tumor progression though increased IFN γ production (39). In the same line, increased frequency and suppressive activity of Tregs were associated with advanced stages in OSCC patients (40–42). In both the PyMT model and human OSCC patients, we observed a lower blood frequency and higher tumor frequency of CCR2⁺ Tregs compared with healthy controls. In the PyMT model, the onset of tumor apparition correlated with increased CCR2⁺ Treg blood frequency but decreased tumor frequency. In this case, increased recruitment of CCR2⁺ Tregs to the tumor might explain the lowering of the blood frequency and suggests that intratumoral CCR2⁺ Tregs favor immunosuppression and accelerate tumor escape. In the MCA model, both blood and dLN CCR2⁺ Treg frequency peaked on day 10 after tumor inoculation and subsequently reduced. This observation might reflect the early establishment of immune tolerance after tumor inoculation that is difficult to observe during spontaneous long-term tumor development in mice and humans.

Preferential depletion of Treg versus non-Treg compartment by the chemotherapeutic agent cyclophosphamide allows for the induction of an improved response to immunotherapies in pre-clinical model and is under investigation in human clinical trials (34, 43, 44). We observed a more marked Treg depletion in the highly cycling CCR2⁺ subset following low-dose cyclophosphamide treatment in mice models. These results are consistent with the previous observation that cycling Tregs having a phenotype associated with maximal suppression (45) are depleted by the same alkylating agent (46). Preferential CCR2⁺ Treg eradication by low-dose cyclophosphamide in humans requires further investigations. Cyclophosphamide sensitivity *in vitro* has also been associated with reduced detoxification processes due to lower intracellular ATP (47). We observed that CCR2⁺ Tregs expressed higher level of the ectonucleoside triphosphate diphosphorylase CD39, which could contribute to higher sensitivity of the subset. No preferential depletion of the CD39⁺CCR2⁺ Tregs was observed *in vivo*, suggesting that CD39 expression does not predict cyclophosphamide sensitivity in contrast to cell cycle. Exogenous CCL2 addition neither enhanced Treg proliferation nor cyclophosphamide sensitivity *in vitro* (data not shown), suggesting that

CCR2 exerts exclusively migratory function on Tregs. Preferential depletion of CCR2⁺ Tregs after low-dose cyclophosphamide also occurred in the spontaneous MMTV-PyMT mammary carcinoma model. Beyond the weak and transient depletion of the overall Treg population, the preferential depletion of the CCR2⁺ antigen-specific Treg subset might thus explain the strong combinatorial antitumor effect mediated by OTI cell adoptive transfer.

Our data demonstrate a crucial role of CCR2 in the regulation of Treg-mediated immunosuppression and provide more insights in the antitumor immune response after low-dose cyclophosphamide. These observations allowed us to define a novel target to improve the efficacy of chemotherapy.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: P.-L. Loyher, C. Combadière, A. Boissonnas

Development of methodology: P.-L. Loyher, J. Rochefort, M. Guillot-Delost, A. Boissonnas

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): P.-L. Loyher, J. Rochefort, C. Baudesson de Chanville, P. Hamon, C. Bertolus, A. Boissonnas

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): P.-L. Loyher, J. Rochefort, A. Boissonnas

Writing, review, and/or revision of the manuscript: P.-L. Loyher, J. Rochefort, C. Baudesson de Chanville, P. Hamon, C. Bertolus, M. Guillot-Delost, F.M. Lemoine, C. Combadière, A. Boissonnas

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): G. Lescaille, M.F. Krummel, F.M. Lemoine, C. Combadière, A. Boissonnas

Study supervision: C. Bertolus, A. Boissonnas

Acknowledgments

The authors wish to thank the Plateforme Imagerie Pitié-Salpêtrière (PICPS) for assistance with the two-photon microscope and the animal facility "NAC" for mice breeding assistance.

Grant Support

A. Boissonnas received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n°304810 – RAIDS, Inserm, la "Ligue contre le cancer", and "Association pour la Recherche sur le Cancer". P. Hamon is funded by la "Ligue contre le cancer".

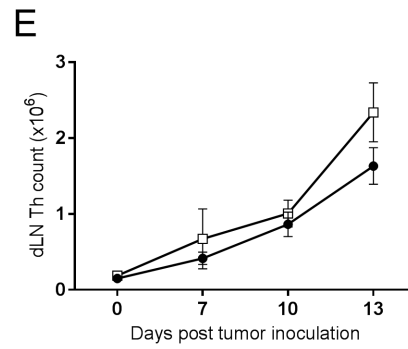
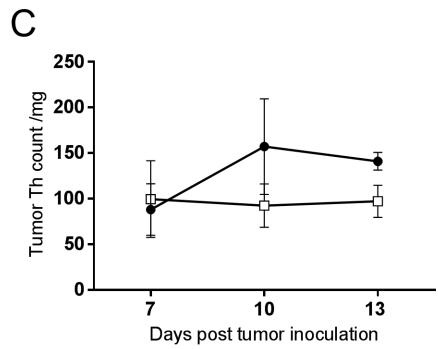
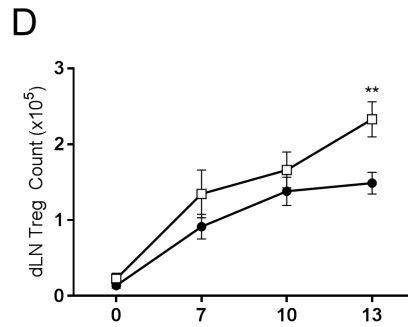
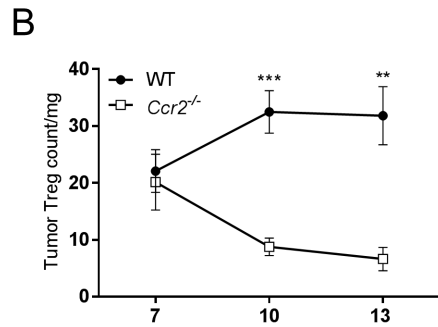
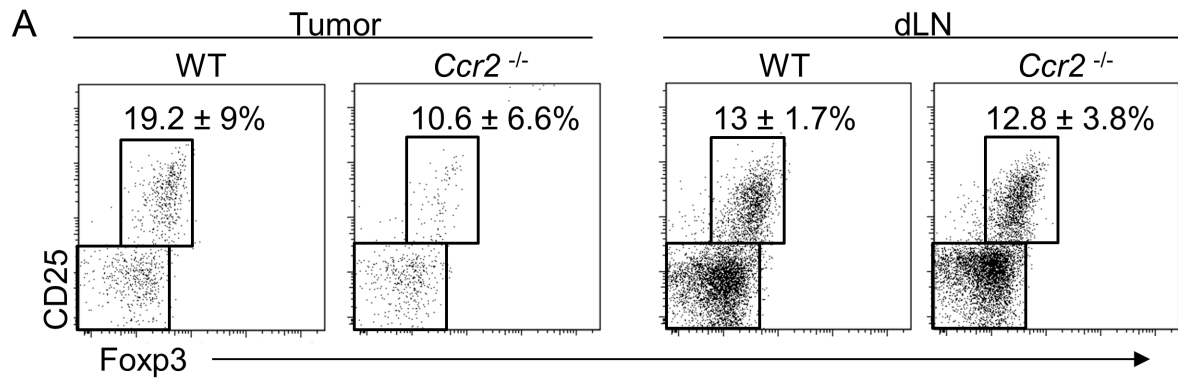
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received April 12, 2016; revised September 7, 2016; accepted September 15, 2016; published OnlineFirst September 28, 2016.

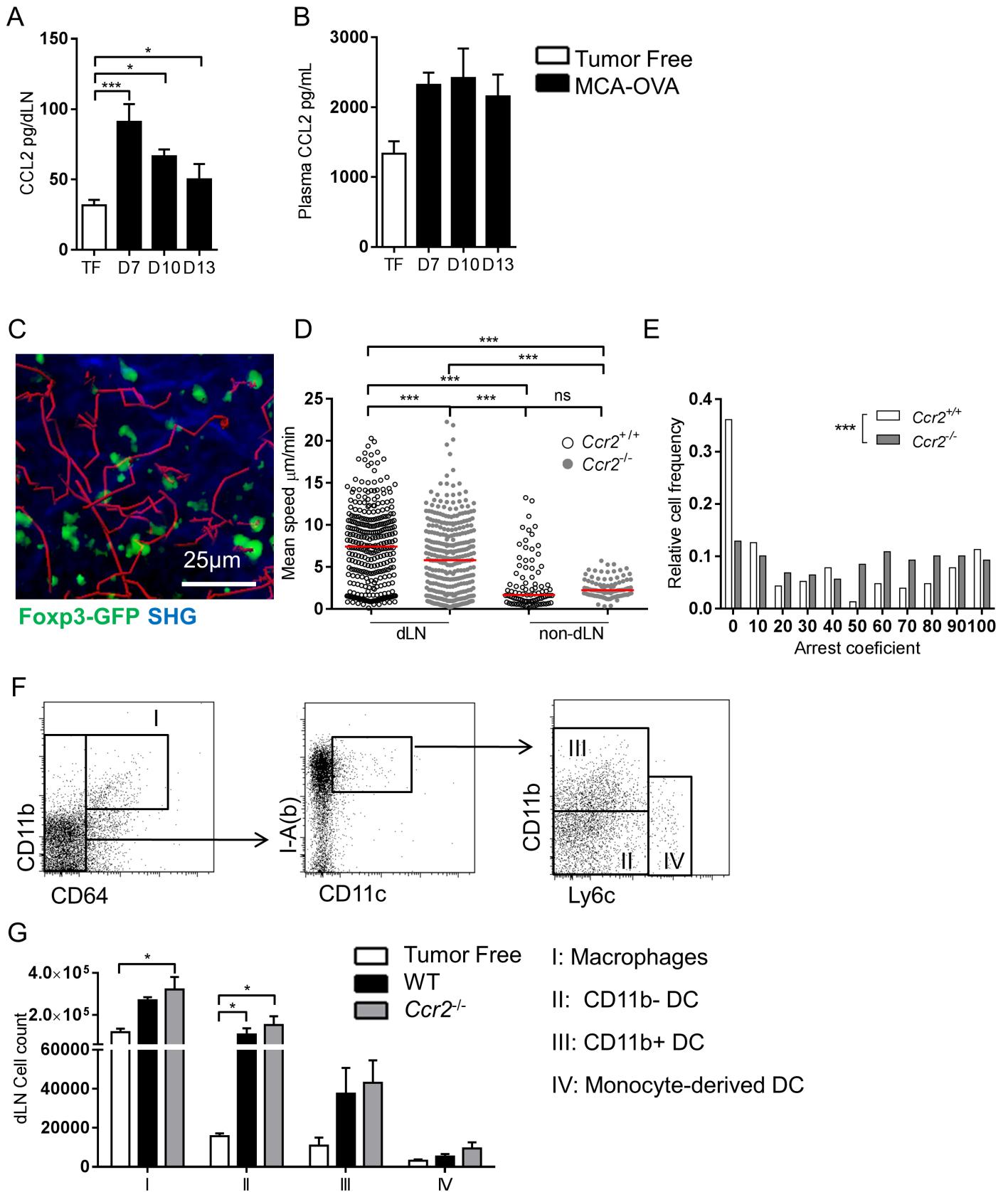
References

- Franciszewicz K, Boissonnas A, Boutet M, Combadière C, Mami-Chouaib F. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res* 2012; 72:6325–32.
- Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer. *Cancer Immunol Res* 2014; 2:1125–31.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:762–74.
- Amoura Z, Combadière C, Faure S, Parizot C, Miyara M, Raphael D, et al. Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3487–96.
- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:3652–6.
- Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell* 2015; 28:690–714.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011; 475:222–5.
- Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:149–54.
- Darrasse-Jeze G, Podsypanina K. How numbers, nature, and immune status of foxp3(+) regulatory T-cells shape the early immunological events in tumor development. *Front Immunol* 2013; 4:292.
- Ondondo B, Jones E, Godkin A, Gallimore A. Home sweet home: the tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells. *Front Immunol* 2013; 4:197.

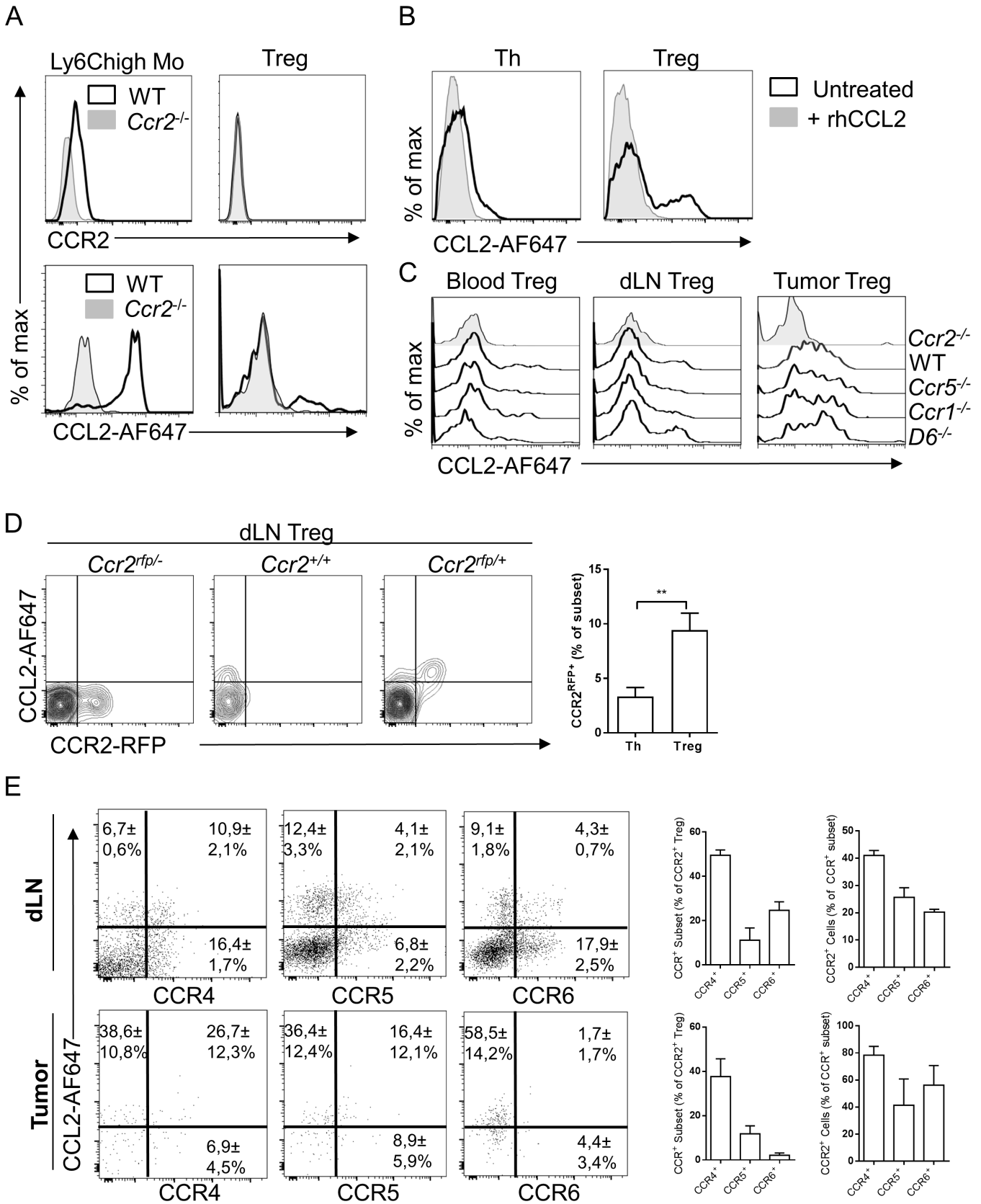
11. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007;117:1167–74.
12. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636–45.
13. Munn DH, Mellor AL. The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site. *Immunol Rev* 2006;213:146–58.
14. Wei S, Kryczek I, Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 2006;108:426–31.
15. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11:119–30.
16. Rubtsov YP, Nier RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, et al. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 2010;329:1667–71.
17. Ding Y, Xu J, Bromberg JS. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol* 2012;33:174–80.
18. Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2006;177:840–51.
19. Campbell DJ. Control of regulatory T cell migration, function, and homeostasis. *J Immunol* 2015;195:2507–13.
20. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.
21. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 2009;69:2000–9.
22. Layseca-Espinosa E, Korniotis S, Montandon R, Gras C, Bouillie M, Gonzalez-Amaro R, et al. CCL22-producing CD8alpha- myeloid dendritic cells mediate regulatory T cell recruitment in response to G-CSF treatment. *J Immunol* 2013;191:2266–72.
23. Mitchell C, Couton D, Couty JP, Anson M, Crain AM, Bizet V, et al. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am J Pathol* 2009;174:1766–75.
24. Bruhl H, Cihak J, Schneider MA, Plachy J, Rupp T, Wenzel I, et al. Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells. *J Immunol* 2004;172:890–8.
25. Zhang N, Schroppe B, Lal G, Jakubzick C, Mao X, Chen D, et al. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 2009;30:458–69.
26. Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, et al. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol* 2014;44:1005–15.
27. Engelhardt JJ, Boldajipour B, Beemiller P, Pandurangi P, Sorensen C, Werb Z, et al. Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell* 2012;21:402–17.
28. Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Coteur AC, Tsou CL, et al. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* 2010;5:e13693.
29. Zeelenberg IS, van Maren WW, Boissonnas A, Van Hout-Kuijjer MA, Den Brok MH, Wagenaars JA, et al. Antigen localization controls T cell-mediated tumor immunity. *J Immunol* 2011;187:1281–8.
30. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A, et al. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 2010;32:266–78.
31. Boissonnas A, Licata F, Poupel L, Jacquelin S, Fetler L, Krumeich S, et al. CD8+ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network. *Neoplasia* 2013;15:85–94.
32. Ford LB, Cerovic V, Milling SW, Graham GJ, Hansell CA, Nibbs RJ. Characterization of conventional and atypical receptors for the chemokine CCL2 on mouse leukocytes. *J Immunol* 2014;193:400–11.
33. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257–65.
34. Madondo MT, Quinn M, Plebanski M. Low dose cyclophosphamide: mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat Rev* 2016;42:3–9.
35. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:641–8.
36. Brown CE, Vishwanath RP, Aguilar B, Starr R, Najbauer J, Aboody KS, et al. Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells. *J Immunol* 2007;179:3332–41.
37. Fridlender ZG, Buchlis G, Kapoor V, Cheng G, Sun J, Singhal S, et al. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Res* 2010;70:109–18.
38. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 1992;12:954–61.
39. Bos PD, Plitas G, Rudra D, Lee SY, Rudensky AY. Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy. *J Exp Med* 2013;210:2435–66.
40. Drennan S, Stafford ND, Greenman J, Green VL. Increased frequency and suppressive activity of CD127(low/–) regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck squamous cell carcinoma are associated with advanced stage and nodal involvement. *Immunology* 2013;140:335–43.
41. Lim KP, Chun NA, Ismail SM, Abraham MT, Yusoff MN, Zain RB, et al. CD4+CD25hiCD127low regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One* 2014;9:e103975.
42. Schott AK, Pries R, Wollenberg B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer. *Int J Mol Med* 2010;26:67–75.
43. Le DT, Jaffee EM. Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: a current perspective. *Cancer Res* 2012;72:3439–44.
44. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood* 2005;105:2862–8.
45. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard OM, Mannel DN, Oppenheim JJ. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* 2008;180:6467–71.
46. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BW, et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1219–28.
47. Zhao J, Cao Y, Lei Z, Yang Z, Zhang B, Huang B. Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer Res* 2010;70:4850–8.



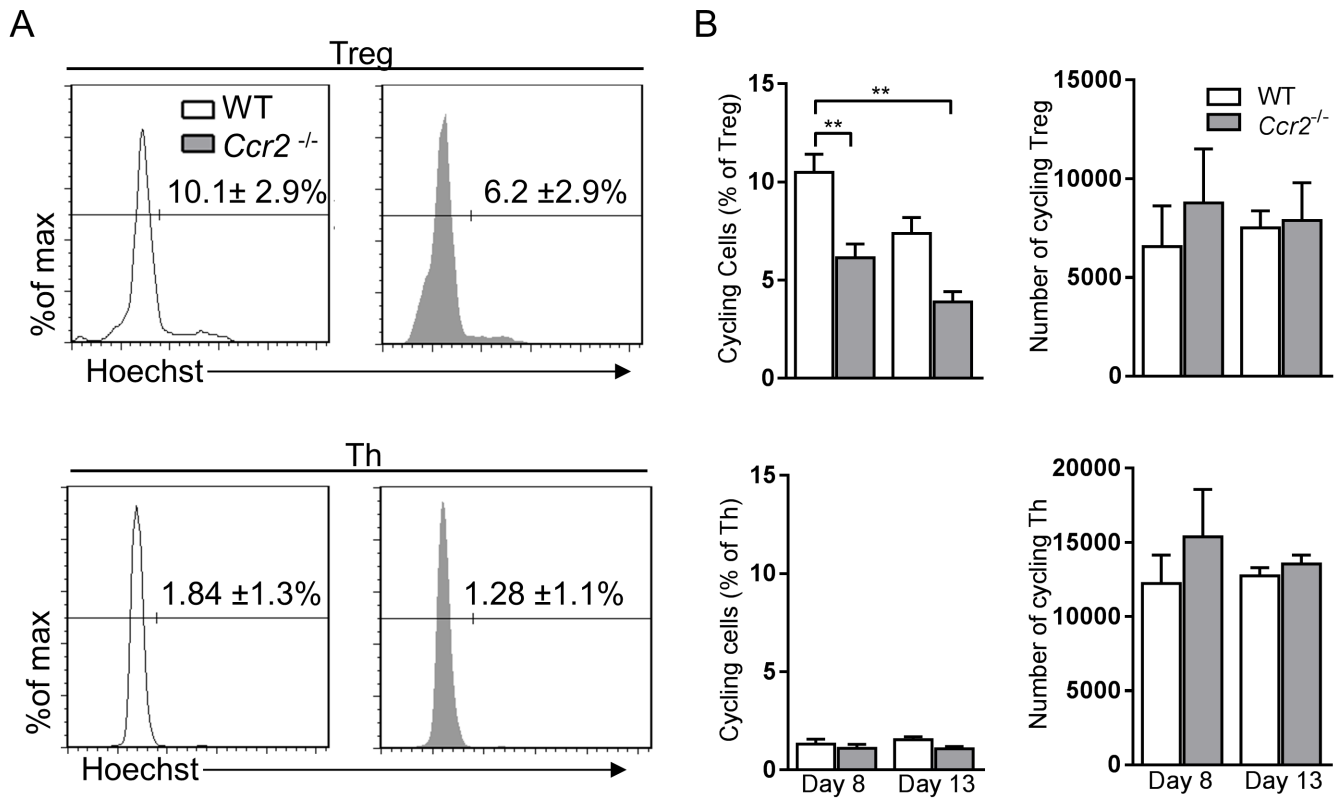
Supplemental figure 1: Tregs fail to migrate to the tumor in *Ccr2*^{-/-} mice but accumulate in the dLN



Supplemental Figure 2: The dynamic of Tregs is reduced in the dLN of *Ccr2*^{-/-} mice compared to WT mice



Supplemental Figure 3: CCL2-AF647 staining allows specific characterization of CCR2 receptor expression on Tregs



Supplemental figure 4: Non-cycling Tregs accumulate in the dLN of *Ccr2*^{-/-} mice compare to WT mice

DISCUSSION

Le sepsis est défini comme une réponse anti-infectieuse inappropriée, causant une inflammation généralisée et conduisant à des lésions tissulaires et à la défaillance des organes. Bien qu'initialement méconnue, l'apparition d'une immunosuppression sévère chez les patients atteints de septicémie est maintenant un phénomène bien établi (Angus et al., 2001; Martin et al., 2003). Ce phénomène apparaît tardivement au cours de la maladie et est décrit à la fois en clinique et dans les modèles précliniques de sepsis murin (Boomer et al., 2011; Martire-Greco et al., 2014). Cependant, la cinétique et les mécanismes conduisant à l'immunosuppression et à l'acquisition d'infections secondaires ne sont pas clairement établis. Mon travail de thèse a donc consisté à mieux définir les mécanismes immunologiques notamment ceux de la réponse immunitaire innée menant à cet état d'immunoparalysie.

Notre première étude a consisté à caractériser le rôle des monocytes inflammatoires (Mo Ly6C^{high}) au cours de la phase précoce du sepsis et plus particulièrement leur implication dans les lésions rénales associées (**Article 1**). Le modèle de sepsis polymicrobien (CLP) utilisé engendre une mortalité proche des 50% et provoque une destruction des tubules rénaux, l'augmentation de la créatinine plasmatique et de l'urée dans le sang, signes de lésions rénales aiguës.

L'étude des populations myéloïdes a montré une augmentation du nombre de Mo Ly6C^{high} (Mo inflammatoires) dans le sang et les reins, concomitante à une diminution dans la moelle osseuse, 6h après le début de la maladie. Les nombres de Mo Ly6C^{low} et de DC sont eux restés stables. Ainsi, les phénomènes conduisant au recrutement des Mo Ly6C^{high} issus de la moelle osseuse sont rapides et transitoires (retour aux valeurs pré-infectieuses en 24h). De plus, le recrutement de cette population dépend de l'axe CCL2/CCR2 et est essentiel à la survie des souris mais aussi au maintien de l'intégrité des tissus rénaux. On attribue donc un rôle protecteur des Mo Ly6C^{high} au cours de la phase précoce du sepsis. La protection conférée par le recrutement des phagocytes mononuclés via l'axe CCL2/CCR2 a également été mis en évidence dans notre étude sur les lésions musculaires (**Article 4**). En effet, l'absence de la chimiokine CCL2 ou de son récepteur CCR2 a montré une faible capacité des souris à réparer les fibres musculaires endommagées. Ce phénomène est là aussi dépendant du recrutement cellulaire, impacté par l'absence du signal CCL2 mais aussi par la faible capacité phagocytaire de ces cellules, essentielle à la réparation musculaire. Le recrutement cellulaire via l'axe

CCL2/CCR2 est également décrit comme crucial dans de nombreux modèles infectieux tels que *L.monocytogenes* (Grainger et al., 2013; Serbina and Pamer, 2006) et *M.tuberculosis* (Antonelli et al., 2010; Robben et al., 2005).

L'étude de l'absence ou du blocage du récepteur de chimiokine CX3CR1 a révélé une aggravation des lésions rénales après les CLP, alors que le traitement par CX3CL1 les a diminuées. Le rôle protecteur du CX3CR1 et du traitement par le CX3CL1 sur la mortalité post-sepsis a été mis en évidence dans deux autres études (He et al., 2009; Ishida et al., 2008). Nos résultats montrent une protection des tissus rénaux dépendante de l'expression du CX3CR1 par les Mo Ly6C^{high}, conférée par leur capacité d'adhérence à l'endothélium vasculaire rénal (margination des cellules). La margination des Mo via CX3CR1 a également été démontrée dans un modèle de choc endotoxique par LPS (**Article 3**).

Nous avons observé que les PMN sont eux aussi recrutés très précocement dans le sang et les reins après le début de la maladie. Leur rôle n'a pas été étudié dans nos premiers travaux mais leur contribution aux phénomènes inflammatoires précoces et aux lésions tissulaires a précédemment été décrite. La contribution de cette population n'est donc pas négligeable. Dans la mesure où la cinétique de recrutement des PMN est proche de celle des Mo, il serait intéressant d'étudier à des temps précoces l'impact de la présence ou non de cette population sur le recrutement et la fonction des Mo et inversement.

Pour conclure, la surveillance des tissus rénaux par les Mo est conditionnée par le récepteur de chimiokine CX3CR1 et confère une protection contre les lésions tissulaires rénales au cours du sepsis. L'impact de la modulation de CCR2 et CX3CR1 sur les autres organes tels que le foie ou encore le poumon n'a pas été étudié et mériterait une investigation afin de déterminer si les phénomènes observés sont systémiques. Le rôle des monocytes au cours de la première phase du sepsis semble primordial et le développement ou l'amélioration des modulateurs des RCK pourrait être une option thérapeutique.

A. Étude de la phase tardive du sepsis

Les mécanismes de transition de la phase inflammatoire vers la phase d'immunosuppression sont encore mal compris. Nous avons choisi d'étudier précisément la distribution, la localisation et les fonctions des Mo au cours du développement du sepsis polymicrobien à des temps plus tardifs (**Article 2**).

Mon étude s'est construite sur un modèle de sepsis polymicrobien sublétal suivi d'une pneumonie bactérienne à *E.coli*. Ce choix est justifié par deux raisons : la première est qu'il semble proche des données cliniques où la mortalité due au sepsis se situe entre 20% et 30% ; la seconde est que les infections bactériennes du poumon sont celles les plus fréquemment retrouvées chez les patients septiques.

1. Mobilisation et localisation cellulaire

L'étude prolongée de la mobilisation des différentes populations myéloïdes a révélé un second pic d'accumulation des cellules, plus tardif (J10) et observable dans de nombreux organes. Des études antérieures ont déjà mis en évidence une forte mobilisation des cellules myéloïdes CD11b⁺GR1⁺ dans le sang et la moelle osseuse une semaine après les CLP. Cependant, les proportions de Mo et de PMN ainsi que leurs distributions dans les organes cibles d'infections secondaires n'avaient pas été évaluées. Nous avons montré dans notre travail que l'accumulation cellulaire tardive (observable après une semaine dans notre modèle) n'affecte pas que le sang et la moelle osseuse mais touche également de nombreux autres organes tels que la rate, le foie, les reins et les poumons. De plus, ce phénomène touche à la fois les Mo inflammatoires Ly6C^{high} et les PMN.

Par ailleurs, il apparaît que les Mo résidents Ly6C^{low} comme lors de la phase précoce (6h et 24h après les CLP) ne soient pas affectés par ce phénomène. Cela suggère une moindre sensibilité de ces derniers au stress infectieux ou un défaut de maturation des précurseurs myéloïdes vers un phénotype Ly6C^{low}. Nous avons observé une légère augmentation mais non significative du nombre de DC CD11b⁺, 10 jours après les CLP. Phénomène également décrit par Benjamin *et al.* (Benjamin, 2005). L'augmentation de cette population pourrait être due à la différenciation des Mo mobilisés tardivement dans le poumon. Celle-ci pourrait participer aux mécanismes immunosuppresseurs.

Cependant, Grimaldi *et al.* ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation directe entre le nombre de mDC et l'apparition d'infections secondaires au sepsis. L'étude fine de la différenciation des monocytes *in vivo* dans le poumon au cours de la maladie à des stades tardifs reste à être explorée.

Nous avons également mis en évidence une forte diminution des macrophages alvéolaires entre le 7^{ème} et le 15^{ème} jour après les CLP. Cette forte diminution peut être due à différents mécanismes inflammatoires induisant la mort programmée des macrophages alvéolaires (AM) (Fan and Fan, 2018). L'activation de l'inflammasome par un signal LPS -TLR4 peut être à la base de mécanismes provoquant la pyroptose et donc la mort des AM (He et al., 2016). La nécrose programmée (nécroptose) est également un phénomène envisageable puisque celle-ci est souvent observée lors de traumatismes graves ou d'infections entraînant la défaillance des organes. La nécroptose des AM peut être déclenchée par l'activation du TLR4 via le LPS ou encore par la protéine CIRP (Cold inducible RNA-binding protein) (Li et al., 2016). En effet, chez des sujets septiques, le taux de CIRP dans le plasma est très élevé (Qiang et al., 2013). Cette protéine a été associée au développement des lésions pulmonaires aiguës au cours du sepsis et peut également induire de l'apoptose des cellules (Khan et al., 2017). Le rétablissement du nombre d'AM à lieu 28 jours après les CLP selon nos observations. La reconstitution des AM peut être due à la différenciation des Mo (donnant des AM dérivés des monocytes) ou à la prolifération des AM résidents restant. L'étude à des temps tardifs (entre 28 et 50 jours) des AM dans les souris CCR2^{-/-} survivantes au sepsis permettrait de répondre en partie à cette question. En effet, les souris CCR2^{-/-} n'ont pas montrées d'accumulation de Mo mais ont un nombre réduit d'AM, 10 jours après les CLP. Dans ces conditions, si les AM sont reconstitués à partir du 28^{ème} jour alors il serait peu probable que ceux-ci soient issus de la différenciation des Mo. Nous n'avons pas identifié les mécanismes impliqués dans la disparition et la reconstitution des AM au cours de la phase tardive du sepsis mais une étude propre pourrait leur être consacrée.

De nombreuses études associent l'augmentation du nombre de cellules dans un organe à une l'infiltration cellulaire, c'est à dire une traversée des cellules du compartiment vasculaire vers le stroma ou le parenchyme tissulaire. Notre analyse de la répartition des cellules entre les compartiments vasculaires et parenchymateux des organes a révélé que les cellules n'infiltraient pas les tissus mais restaient localisées au niveau du réseau vasculaire des organes en concordance avec l'accumulation cellulaire

systémique observée. La vidéo-microscopie du poumon explanté nous a permis de confirmer cette localisation purement vasculaire des Mo et des PMN dans les poumons, les reins et le foie des souris septiques. Nous avons également étudié la dynamique des Mo dans le réseau vasculaire et identifié des cellules en « crawling » et des cellules adhérentes. La plupart semblaient être piégée dans les capillaires. Notre hypothèse actuelle propose que les cellules marginent à l'endothélium vasculaire pulmonaire comme observé lors de nos précédents travaux portant sur l'étude *in vivo* du rein au cours du sepsis précoce (**Article 1**) et lors d'une inflammation du péritoine induite par LPS (**Article 2**). Cependant, nos conditions expérimentales ne nous ont pas permis de quantifier la mobilité intravasculaire des Mo car l'absence de flux sanguin lors de l'imagerie du poumon biaise l'analyse. L'imagerie du poumon *in vivo* nécessite une ventilation mécanique par intubation des souris ainsi qu'une chambre spéciale permettant l'isolement du poumon, matériels dont nous ne disposons pas. La mobilité des Mo *in vivo* pourrait être observée plus facilement au niveau du foie ou du rein (technique utilisée dans l'**Article 1** pour le rein) au moment de la seconde vague des Mo.

Ces travaux ont permis une vision spatio-temporelle plus précise des réponses inflammatoires en caractérisant une invasion vasculaire des organes et non une infiltration des tissus.

Nous avons cherché à expliquer l'origine de cette invasion tardive des organes par les Mo Ly6C^{high} et les PMN. Classiquement, les cellules inflammatoires sont décrites comme pouvant être issues de précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse ou de la rate (Lombard et al., 2016). Au cours de la première vague, l'augmentation des Mo inflammatoires et des PMN est concomitante à une perte de ces cellules dans la moelle osseuse et dans la rate ce qui traduit probablement un relargage massif (**Article 1 et 2**). Nos résultats laissent à penser que les Mo recrutés tardivement au niveau des poumons (10 jours post-sepsis) seraient issus exclusivement de progéniteurs de la moelle osseuse. En effet, la splénectomie n'a pas impacté le nombre de cellules recrutées au niveau des tissus étudiés. Cependant, aucune diminution du nombre de Mo et de PMN dans la moelle osseuse concomitante à l'accumulation n'a été mesurée. Ceci laisse à supposer que la forte myélopoïèse de la moelle osseuse masque la sortie extramédullaire des Mo et des PMN.

2. Contrôle du recrutement cellulaire et phénomènes inflammatoires

La cause de cette amplification tardive des Mo et des PMN peut être liée à différents facteurs tels qu'un mauvais contrôle de la charge bactérienne ou être due à des phénomènes inflammatoires inappropriés. Ainsi, le nombre de Mo a été fortement réduit au niveau des poumons et du sang après le traitement par un anti-inflammatoire (Dexaméthasone) alors que l'antibiotique (Enrofloxacin) seul n'a eu aucun effet. Ceci indique que l'amplification des Mo Ly6C^{high} est dépendante d'une inflammation aseptique. Les éléments moléculaires responsables de cette stimulation ne sont pas encore déterminés. Nous avons tout de même mis en évidence que l'invasion monocytaire était sous le contrôle de l'axe chimiokinique CCL2/CCR2 et dans une moindre mesure de l'axe CX3CL1/CX3CR1. L'étude des autres populations cellulaires a montré que les phénomènes inflammatoires touchent spécifiquement les Mo et n'affectent pas les PMN, les macrophages alvéolaires et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺.

La perte de mobilisation des Mo Ly6C^{high} par les souris CCR2^{-/-} est un phénomène bien connu et est également retrouvé lors de la phase précoce du sepsis (1^{ier} pic d'accumulation) (**Article 1**) et du choc endotoxique par induit par LPS (**Article 3**). L'absence du récepteur CCR2 augmente fortement la mortalité des souris septiques et est décrit comme délétère dans de nombreuses maladies infectieuses. L'étude du rôle de CX3CR1 apparaît plus complexe. Notre première étude ne montre pas de contrôle de ce récepteur sur le recrutement des Mo 6h après les CLP (1^{ier} pic) dans le sang et les reins mais met en avant une différence fonctionnelle des Mo (**Article 1**). Plus tardivement, 10 jours après les CLP (2^{ème} pic), le récepteur CX3CR1 contrôle le recrutement des Mo dans le poumon (**Article 2**). Néanmoins, dans nos deux études l'absence de celui-ci est plutôt néfaste car il augmente les lésions tissulaires et la mortalité des souris septiques. A contrario, dans notre modèle de régénération musculaire, l'absence du CX3CR1 augmente la phagocytose des macrophages médiée par la surexpression de la protéine APOE (Apolipoprotéine E) (**Article 4**). Ainsi, le rôle du récepteur CX3CR1 semble varier en fonction de la population cellulaire qui l'exprime et de l'environnement inflammatoire.

Le recrutement des PMN dans le réseau vasculaire du poumon est indépendant de celui des Mo car la perte de recrutement des Mo n'affecte pas celle des neutrophiles dans ce modèle. Les PMN n'expriment ni le CCR2 ni le CX3CR1 dans notre étude. Nous n'avons pas identifié les axes chimiokiniques responsables de la seconde vague de

recrutement mais il est fort probable que les axes CXCL8/CXCR2 ou CXCL1-CXCL5/CXCR2 soient impliqués. Lombard *et al*, ont également mis en évidence une seconde vague de recrutement des PMN tardive dans le poumon au cours d'une infection par *M.tuberculosis*. Ce recrutement a été identifié comme dépendant de la production de CXCL1 et de CXCL2 par les cellules épithéliales suite à leurs stimulations par l'IL-17A produit par les cellules T (Lombard et al., 2016). Il serait donc probable que les cellules T CD4⁺, CD8⁺ et/ou $\gamma\delta$ soient de fortes productrices d'IL-17A 10 jours après le début de la maladie et que celles-ci entraînent la mobilisation tardive des PMN.

Ce travail a permis de mettre en évidence que l'envahissement tardif des vaisseaux sanguins de différents organes par les Mo Ly6C^{high} était sous le contrôle de phénomènes inflammatoires opérant durant la maladie. Cette période tardive du sepsis est reconnue comme une période « immunosuppressive »

3. Caractérisation phénotypique des Mo

La caractérisation phénotypique des Mo Ly6C^{high} 10 jours après CLP a mis en évidence une diminution de l'expression du CMH-II et du CX3CR1 ainsi qu'une légère augmentation de l'intégrine CD11b à la surface des cellules. Le CMH-II est essentiel pour présenter les peptides antigéniques et activer la réponse adaptative. Sa diminution d'expression sur les Mo a été définie chez l'Homme comme un marqueur de l'anergie des Mo (Hynninen et al., 2003; Monneret et al., 2004). De plus, l'amplitude et la durée de la diminution de l'expression du CMH-II sont corrélées à l'augmentation du risque d'infections nosocomiales (Monneret et al., 2008). En ce qui concerne l'expression du CX3CR1, notre première étude a révélé que l'absence de celui-ci était associée à une augmentation des lésions rénales et à une mortalité accrue des souris lors de la phase précoce du sepsis (**Article 1**). D'autres études ont associé la diminution de l'expression du CX3CR1 des macrophages péritonéaux à des mécanismes d'immunoparalysie (Ge et al., 2016; Hogg et al., 2004). La faible expression du CX3CR1 sur les macrophages péritonéaux au cours de la phase tardive s'expliquerait par l'internalisation du récepteur via l'activation de la voie de signalisation associée au TLR4 (Ge et al., 2016). Il est donc fortement probable que ce phénomène est également lieu sur les Mo Ly6C^{high} d'autant plus que la diminution du CX3CR1 est visible dans de nombreux organes dans notre modèle. Ce résultat est cohérent avec le concept de désactivation des Mo induite par le LPS (mécanisme de tolérance immunitaire). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure

l'action du CX3CL1 soluble issu du clivage de sa forme membranaire exprimée par les cellules endothéliales et retrouvé en forte quantité chez les patients septiques (Pachot et al., 2008). Ainsi, la diminution de l'expression du CX3CR1 serait amplifiée par la stimulation du CX3CL1 soluble. Pour l'intégrine CD11b qui forme avec le CD18 un hétérodimère appelé Mac-1 (ou CR3) et qui est impliqué dans l'adhésion et la migration des leucocytes (Solovjov et al., 2005), l'augmentation de son expression sur les Mo septiques est cohérente avec une margination plus importante.

Ainsi, nous pouvons conclure que la seconde vague de recrutement des Mo Ly6C^{high} est caractérisée par des changements phénotypiques conduisant à une probable altération de leur activation et fonction. Nous avons donc supposé que ces cellules ne permettraient pas une protection efficace lors d'un second challenge infectieux.

B. Étude de l'infection secondaire au cours du sepsis tardif

1. Modèle d'infection secondaire pulmonaire par *E.coli*

Nous avons utilisé une souche bactérienne *Escherichia coli* (Gram⁻) afin de réaliser nos infections pulmonaires secondaires au sepsis. Celle-ci se cultive en laboratoire de niveau 1 et nous a permis d'obtenir plusieurs souches fluorescentes rapidement car elles sont très utilisées en recherche. Son utilisation est donc très peu contraignante. Néanmoins, *Escherichia coli* ne se place qu'à la 4^{ème} position sur les 6 organismes pathogènes les plus retrouvés dans 80% des infections nosocomiales bactériennes pulmonaires en Amérique du nord et en Europe. Les trois organismes pathogènes les plus retrouvés sont : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella* (Jones, 2010; Walter et al., 2018). Il serait intéressant de reproduire notre modèle d'infection secondaire en utilisant ces pathogènes ou d'autres pneumocoques.

2. Caractérisation de la seconde infection

Nous avons vérifié l'altération des fonctions monocytaires en réalisant une seconde infection pulmonaire mimant une infection nosocomiale chez les patients septiques. Les souris septiques sont plus fragiles à une seconde infection avec une mortalité de 20% contre 0% pour les Sham. De plus, des signes d'oedèmes pulmonaires (augmentation du poids des poumons) et un mauvais contrôle de la clairance

bactérienne (augmentation de la charge bactérienne dans les BAL) sont associés à la mortalité accrue des souris. Un défaut d'infiltration des Mo pourrait rendre compte de cette susceptibilité des souris septiques à la seconde infection pulmonaire. L'utilisation de la technique du « blood/tissue partitioning » nous a permis d'étudier cette infiltration cellulaire dans le poumon. Cette technique a un réel avantage par rapport à l'étude en cytométrie conventionnelle des lavages broncho-alvéolaires car elle permet l'étude fine de la proportion des cellules infiltrées rapportée à la totalité des cellules pulmonaires. Ainsi, les souris Sham montrent un fort recrutement des Mo Ly6C^{high} totaux au niveau des poumons entre 24h et 48h alors que les nombres restent stables pour les souris CLP. De plus, les cellules infiltrent le parenchyme pulmonaire sans montrer de différence significative entre la condition Sham et CLP. Les Mo des souris septiques ne semblent donc pas avoir perdu leur capacité d'extravasation malgré leur défaut d'expression du récepteur CX3CR1. Ce résultat est concordant avec un modèle de péritonite aiguë (injection de thioglycolate) dans lequel le blocage des interactions CX3CR1/CX3CL1 n'altère pas l'extravasation trans-endothéliale des Mo dans la cavité péritonéale (Jung et al., 2000). Il apparaît que la mobilisation des Mo lors de la seconde infection semble provenir de compartiments différents entre les souris septiques et les souris contrôles. L'absence de recrutement monocyttaire supplémentaire chez les souris septiques nous laisse penser que ce sont les Mo marginés au réseau vasculaire pulmonaire qui infiltrent le parenchyme. Chez les souris Sham infectées des Mo matures et fonctionnels semblent être recrutés, alors que dans les conditions septiques, les Mo qui infiltrent les poumons seraient déjà présents et moins fonctionnels. Nous n'avons malheureusement pas d'outils pour vérifier cette hypothèse.

L'absence du récepteur CCR2 est délétère lors de nombreuses infections (Grainger et al., 2013; Antonelli et al., 2010) ce qui corrèle avec nos résultats montrant une forte mortalité des souris déficientes en CCR2 à la seconde infection. De plus, nous avons précédemment montré que l'absence du récepteur CCR2 bloquait spécifiquement le recrutement des Mo sans affecter les autres populations au cours du sepsis tardif.

Le recrutement des Mo Ly6C^{high} est donc essentiel à la survie des souris septiques mais celui-ci ne semble pourtant pas protéger efficacement contre la seconde infection.

3. Environnement inflammatoire

La seconde infection se développe dans un environnement cytokinique différent entre les conditions septiques (souris CLP) et non septiques (souris Sham). En effet, une augmentation de la production des transcrits CCL2 est observée 10 jours après la CLP corrélant avec la forte accumulation des Mo dans le poumon. Lors de la seconde infection, l'expression des transcrits d'iNOS, IL-10, IL-6 et CCL2 est globalement augmentée dans les poumons. Cependant, les souris septiques montrent une plus faible augmentation de l'expression d'iNOS et de d'IL-6. Ces molécules qui sont notamment produites par les Mo et les macrophages, après leur stimulation par le LPS (Peck et al., 2004; Tumer et al., 2007), sont fortement impliquées dans les fonctions phagocytaires. Ainsi, l'IL-6 est reconnue pour son action protectrice des lésions pulmonaires lors d'une infection grippale grâce à son action sur la phagocytose des cellules infectées (Yang et al., 2017). Le rôle toxique direct sur les bactéries du NO est connu depuis de nombreuses années (MacMicking et al., 1997) et l'expression de iNOS par les Mo et les mDC est associée à une augmentation de la mort bactérienne (Serbina et al., 2003b). Ainsi, le défaut d'expression des transcrits IL-6 et iNOS par les cellules pulmonaires des souris septiques au cours de la seconde infection participerait à la susceptibilité et à la sévérité de la maladie.

4. Caractérisation phénotypique des Mo

La caractérisation phénotypique des Mo infiltrés et vasculaires du poumon après la seconde infection a montré des différences majeures. Dans un premier temps, nous avons pu mettre en évidence que l'expression des marqueurs d'activation ou de costimulation (activateurs ou inhibiteurs) était spécifiquement augmentée sur les Mo infiltrés chez les souris Sham et CLP. Cependant, les Mo Ly6C^{high} des souris septiques restimulés par la seconde infection ne sont pas capables d'atteindre les mêmes niveaux d'expression que les souris Sham pour les marqueurs CMH-II, CD80, CD86 et PDL1. Wolk *et al* ont montré que la diminution de l'expression du CD86 et du CMH-II sur les Mo cultivés en présence d'endotoxine (LPS) limitait la capacité à induire la prolifération des lymphocytes T (Wolk et al., 2000).

De façon surprenante, nous avons identifié une diminution de l'expression du PDL1 sur les Mo septiques après la seconde infection. Nous n'avons pas observé de différence d'expression du PD1 sur les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et sur les cellules B

entre les différents groupes d'étude. Néanmoins, le blocage des signaux inhibiteurs PD1 ou PDL1 est vu comme bénéfique à la survie des souris dans des modèles de sepsis murins (Huang et al., 2009; Zhang et al., 2010). Cependant, l'expression du PD1 et du PDL1 par les Mo est augmentée chez les patients septiques mais plus faiblement chez ceux qui n'ont pas survécu à la maladie (Ferreira da Mota et al., 2017). Il est possible qu'une expression plus élevée du PDL1 puisse être protectrice dans un contexte infectieux grâce à une modulation fine de la réponse immunitaire. La perte de ce signal régulateur pourrait être cruciale lors de la complication du sepsis par une infection nosocomiale.

L'altération des voies de costimulation (activatrices comme inhibitrices) pourrait jouer un rôle dans la mise en place des réponses immunitaires adaptatives au cours de la phase tardive. Nous avons réalisé notre modèle en utilisant des souris Rag^{-/-} dépourvues de lymphocytes T et B. Malheureusement, les résultats ont été très variables et ne nous ont pas permis de mettre en évidence une différence de mortalité avec les souris WT. La littérature est contradictoire puisque certaines études ont montré une mortalité accrue post-septique des souris Rag^{-/-} (Reim et al., 2009) tandis que d'autres ne montraient pas d'effet entre les souris Rag^{-/-} et WT (Bosmann et al., 2011). Cependant, la caractérisation des Mo à des temps tardif et au cours de la seconde infection en absence de lymphocytes nous permettrait de mettre en avant les mécanismes dépendant ou non des lymphocytes. Nous pouvons envisagé que l'expression des molécules CD80, CD86 et PDL1 permettrait l'interaction des cellules de l'immunité innée avec d'autres cellules que les lymphocytes « classiques ». En effet, certains lymphocytes T non conventionnel tel que les iNKT peuvent exprimer le PD1 au cours du sepsis (Fallon et al., 2017; Heffernan et al., 2013). Ainsi, la faible expression du PDL1 par les Mo septiques au cours de la seconde infection n'exercerait qu'un faible contrôle sur les iNKT PD1⁺, connues pour avoir un rôle délétère via l'altération des fonctions phagocytaires des cellules au cours des infections (Lee et al., 2010; Wintermeyer et al., 2009).

Globalement, nos résultats montrent que l'altération des voies costimulatrices impliquant les Mo a un rôle au cours de la phase tardive du sepsis et participerait au mauvais contrôle des infections opportunistes secondaires.

5. Causes du dysfonctionnement des Mo

L'incapacité des Mo à s'activer efficacement suite à la seconde infection pourrait avoir des conséquences sur leur capacité à lutter contre les pathogènes. Précédemment, nous avons mis en évidence une augmentation de la charge bactérienne dans les BAL des souris en sepsis, 48h après la seconde infection. Ce résultat a également été retrouvé dans un modèle d'infection secondaire par *P.aeruginosa* (Deng et al., 2017). Notre étude de la phagocytose *in vivo* des Mo Ly6C^{high} nous a permis de mettre en évidence un défaut de la capacité phagocytaire de ces cellules suite à leur infiltration dans le poumon. Ce défaut fonctionnel corrèle avec un faible état d'activation cellulaire mais également avec un environnement inflammatoire peu favorable (diminution de l'iNOS et de l'IL-6).

Le dysfonctionnement des Mo Ly6C^{high} induit par leur faible état d'activation participerait activement aux phénomènes immunitaires lors de la phase tardive du sepsis. Leur état d'activation peut être corrélé à leur forte mobilisation au stade tardif. Il est possible que les précurseurs de la moelle osseuse soient engagés dans une hématopoïèse incomplète, libérant des Mo qui n'auraient pas une maturité suffisante pour permettre des réponses anti-infectieuses optimales. Néanmoins, nous avons noté que ceux-ci peuvent exprimer certains marqueurs d'activations mais dans une moindre mesure après un « second challenge ». Ainsi, évaluer leur stade de maturité en n'en identifiant les marqueurs permettrait un dépistage rapide du statut « immuno-incompétent » du patient. Dans ces conditions, et à ce stade de la maladie (temps tardif), le traitement par des facteurs de croissance hématopoïétiques spécifiques d'une lignée de différenciation tel que le M-CSF (pour *Macrophage colony-stimulation factor*) ou le G-CSF (pour *Granulocyte colony-stimulation factor*) pourrait être favorable.

L'induction d'une tolérance aux endotoxines serait également un mécanisme pouvant conduire au dysfonctionnement tardif des Mo. En effet, l'exposition répétée des cellules mononuclées à une stimulation LPS (compassant des bacilles à Gram-négatif) peut entraîner des mécanismes de tolérance conduisant à la « down-régulation » des gènes impliqués dans l'inflammation (Foster et al., 2007). La tolérance immunitaire au cours du choc septique a été associée à une anomalie des voies de costimulation (Roger et al., 2009) concordant avec nos observations au cours de la phase tardive du sepsis. La culture *in vitro* de cellules isolées de patients septiques a montré une capacité fortement réduite de ces dernières à répondre à une seconde stimulation par le LPS avec une

réponse immunitaire plutôt anti-inflammatoire (Cavaillon and Adib-Conquy, 2006). De plus, les profils de production cytokinique des cellules isolées de patients à des stades de sepsis avancés ont montré quelques similitudes avec ceux des cellules issues de modèles de tolérance aux endotoxines (Otto et al., 2011; Schefold et al., 2008). Il serait donc intéressant de comparer les résultats obtenus dans notre modèle de sepsis murin et d'infection secondaire à un modèle de tolérance aux endotoxines (injection de doses répétées de LPS en intrapéritonéale) suivi de la même infection secondaire. Cela nous permettrait d'établir si les phénomènes immunitaires observés dans notre étude mettent en jeu des mécanismes de tolérance.

En conclusion, cette étude ciblée sur l'activité des Mo Ly6C^{high} nous a permis de mieux comprendre leur rôle dans les réponses immunitaires au cours du sepsis tardif et lors du développement d'infections secondaires. N'excluant pas l'importance des autres populations cellulaires de l'immunité innée telles que les DC, les macrophages alvéolaires et les PMN, les Mo semblent jouer un rôle important voire primordial au cours de la physiopathologie du sepsis. Une meilleure compréhension des phénomènes cellulaires et inflammatoires agissant au cours du sepsis précoce et tardif permettra le développement de traitements plus adaptés à la cinétique des événements inflammatoires.

Bibliographie

World Health Assembly et World Health Organisation 2017 ; (Boomer et al., 2011) Rapport de OMS; Statistiques sanitaires mondiales 2011; http://www.who.int/whosis-/whostat/FR_WHS2011_Full

Ajuebor, M.N., Flower, R.J., Hannon, R., Christie, M., Bowers, K., Verity, A., and Perretti, M. (1998). Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J. Leukoc. Biol.* 63, 108–116.

Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 678–689.

Alves, J.N., Pires, K.M.P., Lanzetti, M., Barroso, M.V., Benjamim, C.F., Costa, C.A., Resende, A.C., Santos, J.C., Ribeiro, M.L., Porto, L.C., et al. (2013). Critical role for CCR2 and HMGB1 in induction of experimental endotoxic shock. *Arch. Biochem. Biophys.* 537, 72–81.

Anderson, K.G., Mayer-Barber, K., Sung, H., Beura, L., James, B.R., Taylor, J.J., Qunaj, L., Griffith, T.S., Vezys, V., Barber, D.L., et al. (2014). Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat. Protoc.* 9, 209–222.

Andreu-Ballester, J.C., Tormo-Calandín, C., Garcia-Ballesteros, C., Pérez-Griera, J., Amigó, V., Almela-Quilis, A., Ruiz del Castillo, J., Peñarroja-Otero, C., and Ballester, F. (2013). Association of $\gamma\delta$ T Cells with Disease Severity and Mortality in Septic Patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 738–746.

Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M.R. (2001). Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 29, 1303–1310.

Antonelli, L.R.V., Gigliotti Rothfuchs, A., Gonçalves, R., Roffê, E., Cheever, A.W., Bafica, A., Salazar, A.M., Feng, C.G., and Sher, A. (2010). Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *J. Clin. Invest.* 120, 1674–1682.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* 204, 1057–1069.

Arnold, L., Perrin, H., de Chanville, C.B., Saclier, M., Hermand, P., Poupel, L., Guyon, E., Licata, F., Carpentier, W., Vilar, J., et al. (2015). CX3CR1 deficiency promotes muscle repair and regeneration by enhancing macrophage ApoE production. *Nat. Commun.* 6, 8972.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* 317, 666–670.

- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 669–692.
- Bardoel, B.W., Kenny, E.F., Sollberger, G., and Zychlinsky, A. (2014). The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe* *15*, 526–536.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* *385*, 640–644.
- Bellingan, G. (1999). Inflammatory cell activation in sepsis. *Br. Med. Bull.* *55*, 12–29.
- Benjamim, C.F. (2005). Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood* *105*, 3588–3595.
- Bernard, G.R., Vincent, J.-L., Laterre, P.-F., LaRosa, S.P., Dhainaut, J.-F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J.S., Garber, G.E., Helterbrand, J.D., Ely, E.W., et al. (2001). Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *N. Engl. J. Med.* *344*, 699–709.
- Biswas, S.K., and Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* *30*, 475–487.
- Bjerkeli, V., Damas, J.K., Fevang, B., Holter, J.C., Aukrust, P., and Froland, S.S. (2007). Increased expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in Wegener's granulomatosis possible role in vascular inflammation. *Rheumatology* *46*, 1422–1427.
- Blease, K., Mehrad, B., Standiford, T.J., Lukacs, N.W., Gosling, J., Boring, L., Charo, I.F., Kunkel, S.L., and Hogaboam, C.M. (2000). Enhanced pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR2^{-/-} mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 2603–2611.
- Bo, L., Wang, F., Zhu, J., Li, J., and Deng, X. (2011). Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit. Care* *15*, R58.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* *101*, 1644–1655.
- Bone, R.C., Grodzin, C.J., and Balk, R.A. (1997). Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest* *112*, 235–243.
- Boomer, J.S., To, K., Chang, K.C., Takasu, O., Osborne, D.F., Walton, A.H., Bricker, T.L., Jarman, S.D., Kreisel, D., Krupnick, A.S., et al. (2011). Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA* *306*, 2594.
- Bosmann, M., Russkamp, N.F., Patel, V.R., Zetoune, F.S., Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2011). The Outcome of Polymicrobial Sepsis Is Independent of T and B Cells: *Shock* *36*, 396–401.
- Bouma, G., Ancliff, P.J., Thrasher, A.J., and Burns, S.O. (2010). Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. *Br. J. Haematol.* *151*, 312–326.

- Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N.A., Cooper, C.E., and Singer, M. (2002). Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet* *360*, 219–223.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* *303*, 1532–1535.
- Brown, K.A., Brain, S.D., Pearson, J.D., Edgeworth, J.D., Lewis, S.M., and Treacher, D.F. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet Lond. Engl.* *368*, 157–169.
- Broxmeyer, H.E. (2001). Regulation of Hematopoiesis by Chemokine Family Members. *Int. J. Hematol.* *74*, 9–17.
- Broxmeyer, H.E., Kohli, L., Kim, C.H., Lee, Y., Mantel, C., Cooper, S., Hangoc, G., Shaheen, M., Li, X., and Clapp, D.W. (2003). Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 630–638.
- Brunialti, M.K.C., Martins, P.S., Barbosa de Carvalho, H., Machado, F.R., Barbosa, L.M., and Salomao, R. (2006). TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock Augusta Ga* *25*, 351–357.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* *27*, 111–122.
- Cabrera-Perez, J., Condotta, S.A., Badovinac, V.P., and Griffith, T.S. (2014). Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J. Leukoc. Biol.* *96*, 767–777.
- Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., and Geissmann, F. (2013). Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. *Cell* *153*, 362–375.
- Cavaillon, J.-M., and Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* *10*, 233.
- Chang, K., Svabek, C., Vazquez-Guillamet, C., Sato, B., Rasche, D., Wilson, S., Robbins, P., Ulbrandt, N., Suzich, J., Green, J., et al. (2014). Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* *18*, R3.
- Chang, K.C., Burnham, C.-A., Compton, S.M., Rasche, D.P., Mazuski, R., SMcDonough, J., Unsinger, J., Korman, A.J., Green, J.M., and Hotchkiss, R.S. (2013). Blockade of the negative co-stimulatory molecules PD-1 and CTLA-4 improves survival in primary and secondary fungal sepsis. *Crit. Care* *17*, R85.
- CHAUDHRY, H., ZHOU, J., ZHONG, Y., and ALI, M.M. (2015). Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *28*.

- Chen, Y., Green, S.R., Ho, J., Li, A., Almazan, F., and Quehenberger, O. (2005). The mouse CCR2 gene is regulated by two promoters that are responsive to plasma cholesterol and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *332*, 188–193.
- Chiba, A., and Miyake, S. (2014). Basic techniques for studies of iNKT cells and MAIT cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1142*, 75–84.
- Chiba, A., Tajima, R., Tomi, C., Miyazaki, Y., Yamamura, T., and Miyake, S. (2012). Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.* *64*, 153–161.
- Chistiakov, D.A., Grechko, A.V., Myasoedova, V.A., Melnichenko, A.A., and Orekhov, A.N. (2018). The role of monocytosis and neutrophilia in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* *22*, 1366–1382.
- Chiswick, E.L., Mella, J.R., Bernardo, J., and Remick, D.G. (2015). Acute-Phase Deaths from Murine Polymicrobial Sepsis Are Characterized by Innate Immune Suppression Rather Than Exhaustion. *J. Immunol.* *195*, 3793–3802.
- Chousterman, B.G., Boissonnas, A., Poupel, L., Baudesson de Chanville, C., Adam, J., Tabibzadeh, N., Licata, F., Lukaszewicz, A.-C., Lombes, A., Deterre, P., et al. (2016). Ly6Chigh Monocytes Protect against Kidney Damage during Sepsis via a CX3CR1-Dependent Adhesion Mechanism. *J. Am. Soc. Nephrol.* *27*, 792–803.
- Chua, W.-J., Truscott, S.M., Eickhoff, C.S., Blazevic, A., Hoft, D.F., and Hansen, T.H. (2012). Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. *Infect. Immun.* *80*, 3256–3267.
- Chung, C.-S., Watkins, L., Funches, A., Lomas-Neira, J., Cioffi, W.G., and Ayala, A. (2006). Deficiency of gammadelta T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *291*, R1338–1343.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* *13*, 463–469.
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *420*, 7.
- Cohen, J., Cristofaro, P., Carlet, J., and Opal, S. (2004). New method of classifying infections in critically ill patients*: *Crit. Care Med.* *32*, 1510–1526.
- Colbert, J.F., Traystman, R.J., Poisson, S.N., Herson, P.S., and Ginde, A.A. (2016). Sex-Related Differences in the Risk of Hospital-Acquired Sepsis and Pneumonia Post Acute Ischemic Stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* *25*, 2399–2404.
- Combadière, C., Potteaux, S., Gao, J.-L., Esposito, B., Casanova, S., Lee, E.J., Debré, P., Tedgui, A., Murphy, P.M., and Mallat, Z. (2003). Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* *107*, 1009–1016.
- Conlan, J.W., and North, R.J. (1994). Neutrophils are essential for early anti-Listeria

defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 179, 259–268.

Connor, R.I., Shen, L., and Fanger, M.W. (1990). Evaluation of the antibody-dependent cytotoxic capabilities of individual human monocytes. Role of Fc gamma RI and Fc gamma RII and the effects of cytokines at the single cell level. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 145, 1483–1489.

Cooper, S., Mantel, C., and Broxmeyer, H.E. (1994). Myelosuppressive effects in vivo with very low dosages of monomeric recombinant murine macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Exp. Hematol.* 22, 186–193.

Cornberg, M., Kenney, L.L., Chen, A.T., Waggoner, S.N., Kim, S.-K., Dienes, H.P., Welsh, R.M., and Selin, L.K. (2013). Clonal Exhaustion as a Mechanism to Protect Against Severe Immunopathology and Death from an Overwhelming CD8 T Cell Response. *Front. Immunol.* 4.

Costa, V.S., Mattana, T.C.C., and da Silva, M.E.R. (2010). Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 88, 222–226.

Croxford, J.L., Miyake, S., Huang, Y.-Y., Shimamura, M., and Yamamura, T. (2006). Invariant V(alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* 7, 987–994.

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

Delabranche, X., Stiel, L., Severac, F., Galoisy, A.-C., Mauvieux, L., Zobairi, F., Lavigne, T., Toti, F., Anglès-Cano, E., Meziani, F., et al. (2017). Evidence of Netosis in Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation: *SHOCK* 47, 313–317.

Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., et al. (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1⁺ CD11b⁺ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* 204, 1463–1474.

Delano, M.J., Thayer, T., Gabrilovich, S., Kelly-Scumpia, K.M., Winfield, R.D., Scumpia, P.O., Cuenca, A.G., Warner, E., Wallet, S.M., Wallet, M.A., et al. (2011). Sepsis Induces Early Alterations in Innate Immunity That Impact Mortality to Secondary Infection. *J. Immunol.* 186, 195–202.

Deng, D., Li, X., Liu, C., Zhai, Z., Li, B., Kuang, M., Li, P., Shang, S., Song, Y., Cen, Y., et al. (2017). Systematic investigation on the turning point of over-inflammation to immunosuppression in CLP mice model and their characteristics. *Int. Immunopharmacol.* 42, 49–58.

Deng, M., Scott, M.J., Loughran, P., Gibson, G., Sodhi, C., Watkins, S., Hackam, D., and Billiar, T.R. (2013). Lipopolysaccharide Clearance, Bacterial Clearance, and Systemic Inflammatory Responses Are Regulated by Cell Type-Specific Functions of TLR4 during Sepsis. *J. Immunol.* 190, 5152–5160.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 313–326.

Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 58, 49–59.

Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Ivanyi, J., Fournié, J.J., Krensky, A.M., Bonneville, M., Peyrat, M.A., Caccamo, N., Sireci, G., and Salerno, A. (2001). Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 184, 1082–1085.

Dietlin, T.A., Hofman, F.M., Lund, B.T., Gilmore, W., Stohlman, S.A., and van der Veen, R.C. (2007). Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1205–1212.

Dries, D.J., Jurkovich, G.J., Maier, R.V., Clemmer, T.P., Struve, S.N., Weigelt, J.A., Stanford, G.G., Herr, D.L., Champion, H.R., and Lewis, F.R. (1994). Effect of interferon gamma on infection-related death in patients with severe injuries. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960* 129, 1031–1041; discussion 1042.

Drifte, G., Dunn-Siegrist, I., Tissières, P., and Pugin, J. (2013). Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome*: *Crit. Care Med.* 41, 820–832.

Dunay, I.R., Fuchs, A., and Sibley, L.D. (2010). Inflammatory Monocytes but Not Neutrophils Are Necessary To Control Infection with *Toxoplasma gondii* in Mice. *Infect. Immun.* 78, 1564–1570.

Dunne, A. (2011). Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 669–673.

van Eeden, S.F., Lawrence, E., Sato, Y., Kitagawa, Y., and Hogg, J.C. (2000). Neutrophils released from the bone marrow by granulocyte colony-stimulating factor sequester in lung microvessels but are slow to migrate. *Eur. Respir. J.* 15, 1079–1086.

Efron, P.A., Martins, A., Minnich, D., Tinsley, K., Ungaro, R., Bahjat, F.R., Hotchkiss, R., Clare-Salzler, M., and Moldawer, L.L. (2004). Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 3035–3043.

Ellman, H. (1984). Capillary permeability in septic patients. *Crit. Care Med.* 12, 629–633.

El-Shazly, A., Berger, P., Girodet, P.-O., Ousova, O., Fayon, M., Vernejoux, J.-M., Marthan, R., and Tunon-de-Lara, J.M. (2006). Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 1860–1868.

Ermert, D., Zychlinsky, A., and Urban, C. (2009). Fungal and bacterial killing by neutrophils. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 470, 293–312.

- Esper, A.M., Moss, M., Lewis, C.A., Nisbet, R., Mannino, D.M., and Martin, G.S. (2006). The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis: *Crit. Care Med.* *34*, 2576–2582.
- Etogo, A.O., Nunez, J., Lin, C.Y., Toliver-Kinsky, T.E., and Sherwood, E.R. (2008). NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 6334–6345.
- Faivre, V., Lukaszewicz, A.C., Alves, A., Charron, D., Payen, D., and Haziot, A. (2012). Human Monocytes Differentiate into Dendritic Cells Subsets that Induce Anergic and Regulatory T Cells in Sepsis. *PLoS ONE* *7*, e47209.
- Fallon, E.A., Chun, T.T., Young, W.A., Gray, C., Ayala, A., and Heffernan, D.S. (2017). Program Cell Death Receptor-1-Mediated Invariant Natural Killer T-Cell Control of Peritoneal Macrophage Modulates Survival in Neonatal Sepsis. *Front. Immunol.* *8*.
- Fan, E.K.Y., and Fan, J. (2018). Regulation of alveolar macrophage death in acute lung inflammation. *Respir. Res.* *19*, 50.
- Fan, X., Liu, Z., Jin, H., Yan, J., and Liang, H. (2015). Alterations of Dendritic Cells in Sepsis: Featured Role in Immunoparalysis. *BioMed Res. Int.* *2015*, 1–10.
- Fang, H., Jiang, W., Cheng, J., Lu, Y., Liu, A., Kan, L., and Dahmen, U. (2015). Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis. *J. Immunol. Res.* *2015*, 1–8.
- Ferreira da Mota, N.V., Brunialti, M.K.C., Santos, S.S., Machado, F.R., Assunção, M., de Azevedo, L.C.P., and Salomao, R. (2017). Immunophenotyping of Monocytes During Human Sepsis Shows Impairment in Antigen Presentation: A Shift Toward Nonclassical Differentiation and Upregulation of FcγR1-Receptor. *SHOCK* *1*.
- Flierl, M.A., Rittirsch, D., Gao, H., Hoesel, L.M., Nadeau, B.A., Day, D.E., Zetoune, F.S., Sarma, J.V., Huber-Lang, M.S., Ferrara, J.L.M., et al. (2008). Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *22*, 2198–2205.
- Flohé, S.B., Agrawal, H., Schmitz, D., Gertz, M., Flohé, S., and Schade, F.U. (2006). Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 473–481.
- Foster, S.L., Hargreaves, D.C., and Medzhitov, R. (2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* *447*, 972–978.
- Freitas, A., Alves-Filho, J.C., Victoni, T., Secher, T., Lemos, H.P., Sônego, F., Cunha, F.Q., and Ryffel, B. (2009). IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 7846–7854.
- Fumeaux, T., Dufour, J., Stern, S., and Pugin, J. (2004). Immune monitoring of patients with septic shock by measurement of intraleukocyte cytokines. *Intensive Care Med.* *30*, 2028–2037.
- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162–174.

- Gaieski, D.F., Edwards, J.M., Kallan, M.J., and Carr, B.G. (2013). Benchmarking the Incidence and Mortality of Severe Sepsis in the United States*: *Crit. Care Med.* *41*, 1167–1174.
- Gao, H., Leaver, S.K., Burke-Gaffney, A., and Finney, S.J. (2008). Severe sepsis and Toll-like receptors. *Semin. Immunopathol.* *30*, 29–40.
- Garland, A., Olafson, K., Ramsey, C.D., Yogendran, M., and Fransoo, R. (2014). Distinct determinants of long-term and short-term survival in critical illness. *Intensive Care Med.* *40*, 1097–1105.
- Ge, X.-Y., Fang, S.-P., Zhou, M., Luo, J., Wei, J., Wen, X.-P., Yan, X.-D., and Zou, Z. (2016). TLR4-dependent internalization of CX3CR1 aggravates sepsis-induced immunoparalysis. *Am. J. Transl. Res.* *8*, 5696.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* *19*, 71–82.
- Gerhardt, T., and Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* *107*, 321–330.
- Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Luster, A.D., Luscinskas, F.W., and Rosenzweig, A. (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* *398*, 718–723.
- Goda, S., Imai, T., Yoshie, O., Yoneda, O., Inoue, H., Nagano, Y., Okazaki, T., Imai, H., Bloom, E.T., Domae, N., et al. (2000). CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 4313–4320.
- Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., and Van Kaer, L. (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 231–237.
- Gogos, C.A., Drosou, E., Bassaris, H.P., and Skoutelis, A. (2000). Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* *181*, 176–180.
- Gogos, C.A., Drosou, E., Bassaris, H.P., and Skoutelis, A. (2018). Pro- versus Anti-inflammatory Cytokine Profile in Patients with Severe Sepsis: A Marker for Prognosis and Future Therapeutic Options. *5*.
- Gold, M.C., and Lewinsohn, D.M. (2013). Co-dependents: MR1-restricted MAIT cells and their antimicrobial function. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 14–19.
- Gold, M.C., Cerri, S., Smyk-Pearson, S., Cansler, M.E., Vogt, T.M., Delepine, J., Winata, E., Swarbrick, G.M., Chua, W.-J., Yu, Y.Y.L., et al. (2010). Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol.* *8*, e1000407.
- Gomes, R.N., Bozza, F.A., Amâncio, R.T., Japiassú, A.M., Vianna, R.C.S., Larangeira, A.P., Gouvêa, J.M., Bastos, M.S., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., et al. (2006). Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock Augusta Ga* *26*, 41–49.

Gomes, R.N., Teixeira-Cunha, M.G.A., Figueiredo, R.T., Almeida, P.E., Alves, S.C., Bozza, P.T., Bozza, F.A., Bozza, M.T., Zimmerman, G.A., and Castro-Faria-Neto, H.C. (2013). Bacterial Clearance in Septic Mice is Modulated by MCP-1/CCL2 and Nitric Oxide: Shock 1.

Gong, J.H., Ratkay, L.G., Waterfield, J.D., and Clark-Lewis, I. (1997). An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J. Exp. Med.* 186, 131–137.

Grainger, J.R., Wohlfert, E.A., Fuss, I.J., Bouladoux, N., Askenase, M.H., Legrand, F., Koo, L.Y., Brenchley, J.M., Fraser, I.D.C., and Belkaid, Y. (2013). Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nat. Med.* 19, 713–721.

Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 659–702.

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

Grimaldi, D., Le Bourhis, L., Sauneuf, B., Dechartres, A., Rousseau, C., Ouaz, F., Milder, M., Louis, D., Chiche, J.-D., Mira, J.-P., et al. (2014). Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. *Intensive Care Med.* 40, 192–201.

Guidet, B., and Maury, E. (2013). Sex and severe sepsis. *Crit. Care* 17, 144.

Guignant, C., Lepape, A., Huang, X., Kherouf, H., Denis, L., Poitevin, F., Malcus, C., Chéron, A., Allaouchiche, B., Gueyffier, F., et al. (2011). Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Crit. Care* 15, R99.

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

Gutcher, I., and Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J. Clin. Invest.* 117, 1119–1127.

Hall, M.J., Williams, S.N., DeFrances, C.J., and Golosinskiy, A. (2011). Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals.

Hallwirth, U., Pomberger, G., Zaknun, D., Szepfalusi, Z., Horcher, E., Pollak, A., Roth, E., and Spittler, A. (2002). Monocyte phagocytosis as a reliable parameter for predicting early-onset sepsis in very low birthweight infants. *Early Hum. Dev.* 67, 1–9.

Hamon, P., Loyher, P.-L., de Chanville, C.B., Licata, F., Combadière, C., and Boissonnas, A. (2016). CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. *Blood* blood–2016.

Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77)

controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat. Immunol.* *12*, 778–785.

He, M., Mochhala, S.M., Adhikari, S., and Bhatia, M. (2009). Administration of exogenous fractalkine, a CX3C chemokine, is capable of modulating inflammatory response in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Shock Augusta Ga* *31*, 33–39.

He, X., Qian, Y., Li, Z., Fan, E.K., Li, Y., Wu, L., Billiar, T.R., Wilson, M.A., Shi, X., and Fan, J. (2016). TLR4-Upregulated IL-1 β and IL-1RI Promote Alveolar Macrophage Pyroptosis and Lung Inflammation through an Autocrine Mechanism. *Sci. Rep.* *6*, 31663.

Heffernan, D.S., Monaghan, S.F., Thakkar, R.K., Tran, M.L., Chung, C.-S., Gregory, S.H., Cioffi, W.G., and Ayala, A. (2013). Inflammatory Mechanisms in Sepsis: Elevated Invariant Natural Killer T-Cell Numbers in Mouse and Their Modulatory Effect on Macrophage Function. *Shock* *40*, 122–128.

Hein, F., Massin, F., Cravoisy-Popovic, A., Barraud, D., Levy, B., Bollaert, P.-E., and Gibot, S. (2010). The relationship between CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit. Care* *14*, R19.

Helk, E., Bernin, H., Ernst, T., Ittrich, H., Jacobs, T., Heeren, J., Tacke, F., Tannich, E., and Lotter, H. (2013). TNF α -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection. *PLoS Pathog.* *9*, e1003096.

Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* *14*, 821–830.

Hoesel, L.M., Neff, T.A., Neff, S.B., Younger, J.G., Olle, E.W., Gao, H., Pianko, M.J., Bernacki, K.D., Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2005). Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock Augusta Ga* *24*, 40–47.

Hogg, J.C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W.M., Buzatu, L., Cherniack, R.M., Rogers, R.M., Sciurba, F.C., Coxson, H.O., et al. (2004). The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2645–2653.

Holtmeier, W., and Kabelitz, D. (2005). γ delta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem. Immunol. Allergy* *86*, 151–183.

Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013a). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 862–874.

Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013b). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* *13*, 260–268.

Hu, C.K., Venet, F., Heffernan, D.S., Wang, Y.L., Horner, B., Huang, X., Chung, C.-S., Gregory, S.H., and Ayala, A. (2009). The role of hepatic invariant NKT cells in systemic/local inflammation and mortality during polymicrobial septic shock. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *182*, 2467–2475.

Huang, X., Venet, F., Wang, Y.L., Lepape, A., Yuan, Z., Chen, Y., Swan, R., Kherouf, H.,

Monneret, G., Chung, C.-S., et al. (2009). PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 6303–6308.

Huang, X., Chen, Y., Chung, C.-S., Yuan, Z., Monaghan, S.F., Wang, F., and Ayala, A. (2014). Identification of B7-H1 as a Novel Mediator of the Innate Immune/Proinflammatory Response as well as a Possible Myeloid Cell Prognostic Biomarker in Sepsis. *J. Immunol.* *192*, 1091–1099.

Huffnagle, G.B., Strieter, R.M., Standiford, T.J., McDonald, R.A., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., and Toews, G.B. (1995). The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *155*, 4790–4797.

Hynninen, M., Pettilä, V., Takkunen, O., Orko, R., Jansson, S.-E., Kuusela, P., Renkonen, R., and Valtonen, M. (2003). Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock Augusta Ga* *20*, 1–4.

Iijima, N., Mattei, L.M., and Iwasaki, A. (2011). Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 284–289.

Inoue, S., Suzuki, K., Komori, Y., Morishita, Y., Suzuki-Utsunomiya, K., Hozumi, K., Inokuchi, S., and Sato, T. (2014). Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. *Crit. Care* *18*, R130.

Ishida, Y., Hayashi, T., Goto, T., Kimura, A., Akimoto, S., Mukaida, N., and Kondo, T. (2008). Essential Involvement of CX3CR1-Mediated Signals in the Bactericidal Host Defense during Septic Peritonitis. *J. Immunol.* *181*, 4208–4218.

Ito, H., Koide, N., Hassan, F., Islam, S., Tumurkhuu, G., Mori, I., Yoshida, T., Kakumu, S., Moriwaki, H., and Yokochi, T. (2006). Lethal endotoxic shock using alpha-galactosylceramide sensitization as a new experimental model of septic shock. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *86*, 254–261.

Ivanov, S., Paget, C., and Trottein, F. (2014). Role of Non-conventional T Lymphocytes in Respiratory Infections: The Case of the Pneumococcus. *PLoS Pathog.* *10*, e1004300.

Iwasaka, H., and Noguchi, T. (2004). [Th1/Th2 balance in systemic inflammatory response syndrome (SIRS)]. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* *62*, 2237–2243.

Jaber, B.L., and Pereira, B.J.G. (1996). Inflammatory mediators in sepsis: rationale for extracorporeal therapies? *Am. J. Kidney Dis.* *28*, S35–S49.

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity* *39*, 599–610.

Janeway, C.A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54 Pt 1*, 1–13.

- Janssens, S., and Beyaert, R. (2002). A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 474–482.
- Johnston, B., Burns, A.R., Suematsu, M., Issekutz, T.B., Woodman, R.C., and Kubes, P. (1999). Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J. Clin. Invest.* *103*, 1269–1276.
- Jones, R.N. (2010). Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *51 Suppl 1*, S81-87.
- Jones, B.A., Beamer, M., and Ahmed, S. (2010). Fractalkine/CX3CL1: A Potential New Target for Inflammatory Diseases. *Mol. Interv.* *10*, 263–270.
- Jones, H.R., Robb, C.T., Perretti, M., and Rossi, A.G. (2016). The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin. Immunol.* *28*, 137–145.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4106–4114.
- Keh, D., and Sprung, C.L. (2004). Use of corticosteroid therapy in patients with sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit. Care Med.* *32*, S527-533.
- Kellum, J.A., Kong, L., Fink, M.P., Weissfeld, L.A., Yealy, D.M., Pinsky, M.R., Fine, J., Krichevsky, A., Delude, R.L., Angus, D.C., et al. (2007). Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the Genetic and Inflammatory Markers of Sepsis (GenIMS) Study. *Arch. Intern. Med.* *167*, 1655–1663.
- Kempker, J.A., and Martin, G.S. (2016). The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. *Clin. Chest Med.* *37*, 165–179.
- Kennedy, A.D., and DeLeo, F.R. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* *43*, 25–61.
- Khan, M.M., Yang, W.-L., Brenner, M., Bolognese, A.C., and Wang, P. (2017). Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) causes sepsis-associated acute lung injury via induction of endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* *7*, 41363.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., et al. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol.* *1*, 398–401.
- Kwiecinski, J., Rhost, S., Löfbom, L., Blomqvist, M., Månsson, J.E., Cardell, S.L., and Jin, T. (2013). Sulfatide attenuates experimental *Staphylococcus aureus* sepsis through a CD1d-dependent pathway. *Infect. Immun.* *81*, 1114–1120.
- Lambeck, S., Weber, M., Gonnert, F.A., Mrowka, R., and Bauer, M. (2012). Comparison of Sepsis-Induced Transcriptomic Changes in a Murine Model to Clinical Blood Samples Identifies Common Response Patterns. *Front. Microbiol.* *3*.
- Landoni, V.I., Martire-Greco, D., Rodriguez-Rodrigues, N., Chiarella, P., Schierloh, P.,

- Isturiz, M.A., and Fernandez, G.C. (2016). Immature myeloid Gr-1+ CD11b+ cells from lipopolysaccharide-immunosuppressed mice acquire inhibitory activity in the bone marrow and migrate to lymph nodes to exert their suppressive function. *Clin. Sci.* *130*, 259–271.
- Lazar-Molnar, E., Chen, B., Sweeney, K.A., Wang, E.J., Liu, W., Lin, J., Porcelli, S.A., Almo, S.C., Nathenson, S.G., and Jacobs, W.R. (2010). Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 13402–13407.
- Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonnier, V., Premel, V., et al. (2010). Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 701–708.
- Lee, M., Lee, Y., Song, J., Lee, J., and Chang, S.-Y. (2018). Tissue-specific Role of CX₃CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease. *Immune Netw.* *18*.
- Lee, S., Nakahira, K., Dalli, J., Siempos, I.I., Norris, P.C., Colas, R.A., Moon, J.-S., Shinohara, M., Hisata, S., Howrylak, J.A., et al. (2017). NLRP3 Inflammasome Deficiency Protects against Microbial Sepsis via Increased Lipoxin B4 Synthesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *196*, 713–726.
- Lee, W.-Y., Moriarty, T.J., Wong, C.H.Y., Zhou, H., Strieter, R.M., van Rooijen, N., Chaconas, G., and Kuberski, P. (2010). An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells. *Nat. Immunol.* *11*, 295–302.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* *86*, 973–983.
- Lerolle, N., Nochy, D., Guérot, E., Bruneval, P., Fagon, J.-Y., Diehl, J.-L., and Hill, G. (2010). Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med.* *36*, 471–478.
- Leung, B., and Harris, H.W. (2010). NKT Cells in Sepsis. *Clin. Dev. Immunol.* *2010*, 1–10.
- Levi, M., and van der Poll, T. (2005). Two-Way Interactions Between Inflammation and Coagulation. *Trends Cardiovasc. Med.* *15*, 254–259.
- Li, J., Zhang, Y., Lou, J., Zhu, J., He, M., Deng, X., and Cai, Z. (2012). Neutralisation of peritoneal IL-17A markedly improves the prognosis of severe septic mice by decreasing neutrophil infiltration and proinflammatory cytokines. *PloS One* *7*, e46506.
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., and Salfeld, J. (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* *80*, 401–411.
- Li, Z., Scott, M.J., Fan, E.K., Li, Y., Liu, J., Xiao, G., Li, S., Billiar, T.R., Wilson, M.A., Jiang, Y., et al. (2016). Tissue damage negatively regulates LPS-induced macrophage necroptosis. *Cell Death Differ.* *23*, 1428–1447.

- Liao, X.-L., Feng, T., Zhang, J.-Q., Cao, X., Wu, Q.-H., Xie, Z.-C., Kang, Y., and Li, H. (2017). Phenotypic Changes and Impaired Function of Peripheral $\gamma\delta$ T Cells in Patients With Sepsis: *SHOCK* *48*, 321–328.
- Lima, C.X., Souza, D.G., Amaral, F.A., Fagundes, C.T., Rodrigues, I.P.S., Alves-Filho, J.C., Kosco-Vilbois, M., Ferlin, W., Shang, L., Elson, G., et al. (2015). Therapeutic Effects of Treatment with Anti-TLR2 and Anti-TLR4 Monoclonal Antibodies in Polymicrobial Sepsis. *PLOS ONE* *10*, e0132336.
- Ling, Y.M., Shaw, M.H., Ayala, C., Coppens, I., Taylor, G.A., Ferguson, D.J.P., and Yap, G.S. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J. Exp. Med.* *203*, 2063–2071.
- Lipinska-Gediga, M. (2016). Coagulopathy in sepsis — a new look at an old problem. *Anestezjol. Intensywna Ter.* *48*, 352–359.
- Liu, Y., Jing, Y.-Y., Zeng, C.-Y., Li, C.-G., Xu, L.-H., Yan, L., Bai, W.-J., Zha, Q.-B., Ouyang, D.-Y., and He, X.-H. (2017). Scutellarin Suppresses NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages and Protects Mice against Bacterial Sepsis. *Front. Pharmacol.* *8*, 975.
- Liuzzi, A.R., Kift-Morgan, A., Lopez-Anton, M., Friberg, I.M., Zhang, J., Brook, A.C., Roberts, G.W., Donovan, K.L., Colmont, C.S., Toleman, M.A., et al. (2016). Unconventional Human T Cells Accumulate at the Site of Infection in Response to Microbial Ligands and Induce Local Tissue Remodeling. *J. Immunol.* *197*, 2195–2207.
- Lombard, R., Doz, E., Carreras, F., Epardaud, M., Le Vern, Y., Buzoni-Gatel, D., and Winter, N. (2016). IL-17RA in Non-Hematopoietic Cells Controls CXCL-1 and 5 Critical to Recruit Neutrophils to the Lung of Mycobacteria-Infected Mice during the Adaptive Immune Response. *PloS One* *11*, e0149455.
- Loyher, P.-L., Rochefort, J., Baudesson de Chanville, C., Hamon, P., Lescaille, G., Bertolus, C., Guillot-Delost, M., Krummel, M.F., Lemoine, F.M., Combadiere, C., et al. (2016). CCR2 Influences T Regulatory Cell Migration to Tumors and Serves as a Biomarker of Cyclophosphamide Sensitivity. *Cancer Res.* *76*, 6483–6494.
- MacMicking, J., Xie, Q., and Nathan, C. (1997). NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 323–350.
- Mahad, D.J., and Ransohoff, R.M. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin. Immunol.* *15*, 23–32.
- Marois, L., Paré, G., Vaillancourt, M., Rollet-Labelle, E., and Naccache, P.H. (2011). Fc γ RIIIb Triggers Raft-dependent Calcium Influx in IgG-mediated Responses in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* *286*, 3509–3519.
- Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Laude, H., Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I.C., Tilloy, F., et al. (2009). Stepwise Development of MAIT Cells in Mouse and Human. *PLoS Biol.* *7*, e1000054.
- Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., and Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1546–1554.

- Martire-Greco, D., Landoni, V.I., Chiarella, P., Rodriguez-Rodrigues, N., Schierloh, P., Rearte, B., Isturiz, M.A., and Fernandez, G.C. (2014). all- *trans* -Retinoic acid improves immunocompetence in a murine model of lipopolysaccharide-induced immunosuppression. *Clin. Sci.* *126*, 355–365.
- Mathelier-Fusade, P., Delers, F., and Engler, R. (1990). Interleukine-8. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* *5*, 9–13.
- Matsuda, J.L., Mallevaey, T., Scott-Browne, J., and Gapin, L. (2008). CD1d-restricted iNKT cells, the “Swiss-Army knife” of the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 358–368.
- Matsushima, A., Ogura, H., Fujita, K., Koh, T., Tanaka, H., Sumi, Y., Yoshiya, K., Hosotsubo, H., Kuwagata, Y., Shimazu, T., et al. (2004). Early activation of gammadelta T lymphocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *Shock Augusta Ga* *22*, 11–15.
- Maus, U.A., Waelsch, K., Kuziel, W.A., Delbeck, T., Mack, M., Blackwell, T.S., Christman, J.W., Schlondorff, D., Seeger, W., and Lohmeyer, J. (2003). Monocytes Are Potent Facilitators of Alveolar Neutrophil Emigration During Lung Inflammation: Role of the CCL2-CCR2 Axis. *J. Immunol.* *170*, 3273–3278.
- Mayr, F.B., Yende, S., and Angus, D.C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* *5*, 4–11.
- Maze, R., Sherry, B., Kwon, B.S., Cerami, A., and Broxmeyer, H.E. (1992). Myelosuppressive effects in vivo of purified recombinant murine macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *149*, 1004–1009.
- McComb, J.G., Ranganathan, M., Liu, X.H., Pilewski, J.M., Ray, P., Watkins, S.C., Choi, A.M.K., and Lee, J.S. (2008). CX3CL1 up-regulation is associated with recruitment of CX3CR1+ mononuclear phagocytes and T lymphocytes in the lungs during cigarette smoke-induced emphysema. *Am. J. Pathol.* *173*, 949–961.
- McCormack, D.G., Mehta, S., Tynl, K., Scott, J.A., Potter, R., and Rohan, M. (2000). Pulmonary Microvascular Changes during Sepsis: Evaluation Using Intravital Videomicroscopy. *Microvasc. Res.* *60*, 131–140.
- McNab, F.W., Berry, M.P.R., Graham, C.M., Bloch, S.A.A., Oni, T., Wilkinson, K.A., Wilkinson, R.J., Kon, O.M., Banchereau, J., Chaussabel, D., et al. (2011). Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis: Immunity to infection. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1941–1947.
- McPeak, M.B., Youssef, D., Williams, D.A., Pritchett, C., Yao, Z.Q., McCall, C.E., and El Gazzar, M. (2017). Myeloid Cell-Specific Knockout of NFI-A Improves Sepsis Survival. *Infect. Immun.* *85*.
- 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.
- Meisel, C., Schefold, J.C., Pschowski, R., Baumann, T., Hetzger, K., Gregor, J., Weber-Carstens, S., Hasper, D., Keh, D., Zuckermann, H., et al. (2009). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-

blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 640–648.

Mencacci, A., Montagnoli, C., Bacci, A., Cenci, E., Pitzurra, L., Spreca, A., Kopf, M., Sharpe, A.H., and Romani, L. (2002). CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 3180–3190.

Mera, S., Tatulescu, D., Cismaru, C., Bondor, C., Slavcovici, A., Zanc, V., Carstina, D., and Oltean, M. (2011). Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis: SIMULTANEOUS ANALYSIS OF 17 CYTOKINES IN SEPSIS. *APMIS* 119, 155–163.

Monneret, G., Finck, M.-E., Venet, F., Debard, A.-L., Bohé, J., Bienvenu, J., and Lepape, A. (2004). The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol. Lett.* 95, 193–198.

Monneret, G., Venet, F., Pachot, A., and Lepape, A. (2008). Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med. Camb. Mass* 14, 64–78.

Monneret, G., Demaret, J., Gossez, M., Reverdiau, E., Malergue, F., Rimmelé, T., and Venet, F. (2017). Novel Approach in Monocyte Intracellular TNF Measurement: Application to Sepsis-Induced Immune Alterations. *SHOCK* 47, 318–322.

Moss, M. (2005). Epidemiology of sepsis: race, sex, and chronic alcohol abuse. *Clin. Infect. Dis.* 41, S490–S497.

Mukherjee, R., Kanti Barman, P., Kumar Thatoi, P., Tripathy, R., Kumar Das, B., and Ravindran, B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* 5.

Muller Kobold, A.C., Tulleken, J.E., Zijlstra, J.G., Sluiter, W., Hermans, J., Kallenberg, C.G., and Tervaert, J.W. (2000). Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 26, 883–892.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145–176.

Nacira, S., Meziani, F., Dessebe, O., Cattan, V., Collin, S., Montemont, C., Gibot, S., Asfar, P., Ramarosan, A., Regnault, V., et al. (2009). Activated protein C improves lipopolysaccharide-induced cardiovascular dysfunction by decreasing tissular inflammation and oxidative stress*: *Crit. Care Med.* 37, 246–255.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–3047.

Nalos, M., Santner-Nanan, B., Parnell, G., Tang, B., McLean, A.S., and Nanan, R. (2012). Immune effects of interferon gamma in persistent staphylococcal sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 110–112.

- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 6, 3051–3064.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.
- Noel, G., Wang, Q., Osterburg, A., Schwemberger, S., James, L., Haar, L., Giacalone, N., Thomas, I., and Ogle, C. (2010). A ribonucleotide reductase inhibitor reverses burn-induced inflammatory defects. *Shock Augusta Ga* 34, 535–544.
- Nolan, A., Weiden, M., Kelly, A., Hoshino, Y., Hoshino, S., Mehta, N., and Gold, J.A. (2008). CD40 and CD80/86 Act Synergistically to Regulate Inflammation and Mortality in Polymicrobial Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 301–308.
- Nolan, A., Kobayashi, H., Naveed, B., Kelly, A., Hoshino, Y., Hoshino, S., Karulf, M.R., Rom, W.N., Weiden, M.D., and Gold, J.A. (2009). Differential Role for CD80 and CD86 in the Regulation of the Innate Immune Response in Murine Polymicrobial Sepsis. *PLoS ONE* 4, e6600.
- North, R.J. (1970). The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. *J. Exp. Med.* 132, 521–534.
- Ogasawara, K., Takeda, K., Hashimoto, W., Satoh, M., Okuyama, R., Yanai, N., Obinata, M., Kumagai, K., Takada, H., Hiraide, H., et al. (1998). Involvement of NK1+ T cells and their IFN-gamma production in the generalized Shwartzman reaction. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160, 3522–3527.
- Ogiku, M., Kono, H., Hara, M., Tsuchiya, M., and Fujii, H. (2012). Interleukin-17A plays a pivotal role in polymicrobial sepsis according to studies using IL-17A knockout mice. *J. Surg. Res.* 174, 142–149.
- O'Neill, L. (2003). Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 396–403.
- Opal, S.M., and DePalo, V.A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117, 1162–1172.
- Opal, S.M., Laterre, P.-F., Francois, B., LaRosa, S.P., Angus, D.C., Mira, J.-P., Wittebole, X., Dugernier, T., Perrotin, D., Tidswell, M., et al. (2013). Effect of Eritoran, an Antagonist of MD2-TLR4, on Mortality in Patients With Severe Sepsis: The ACCESS Randomized Trial. *JAMA* 309, 1154.
- Otto, G.P., Sossdorf, M., Claus, R.A., Rödel, J., Menge, K., Reinhart, K., Bauer, M., and Riedemann, N.C. (2011). The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit. Care Lond. Engl.* 15, R183.
- Ovchinnikov, D.A., van Zuylen, W.J.M., DeBats, C.E.E., Alexander, K.A., Kellie, S., and Hume, D.A. (2008). Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J. Leukoc. Biol.* 83, 430–433.
- Pachot, A., Lepape, A., Vey, S., Bienvenu, J., Mougin, B., and Monneret, G. (2006). Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunol. Lett.* 106, 63–71.

Pachot, A., Cazalis, M.-A., Venet, F., Turrel, F., Faudot, C., Voirin, N., Diasparra, J., Bourgoin, N., Poitevin, F., Mougin, B., et al. (2008). Decreased Expression of the Fractalkine Receptor CX3CR1 on Circulating Monocytes as New Feature of Sepsis-Induced Immunosuppression. *J. Immunol.* *180*, 6421–6429.

Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A., et al. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J. Exp. Med.* *194*, 1361–1373.

Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*, 2527–2534.

Pastille, E., Didovic, S., Brauckmann, D., Rani, M., Agrawal, H., Schade, F.U., Zhang, Y., and Flohe, S.B. (2011). Modulation of Dendritic Cell Differentiation in the Bone Marrow Mediates Sustained Immunosuppression after Polymicrobial Sepsis. *J. Immunol.* *186*, 977–986.

Patel, A., and Gruber, P. (2015). Severe infections in neutropenic patients. *Curr. Opin. Crit. Care* *21*, 586–592.

Patel, S.P., and Kurzrock, R. (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 847–856.

Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* *214*, 1913–1923.

Patera, A.C., Drewry, A.M., Chang, K., Beiter, E.R., Osborne, D., and Hotchkiss, R.S. (2016). Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J. Leukoc. Biol.* *100*, 1239–1254.

Patil, N., Guo, Y., Luan, L., and Sherwood, E. (2017). Targeting Immune Cell Checkpoints during Sepsis. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 2413.

Paula-Neto, H.A., Alves-Filho, J.C., Souto, F.O., Spiller, F., Amêndola, R.S., Freitas, A., Cunha, F.Q., and Barja-Fidalgo, C. (2011). Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis. *Shock Augusta Ga* *35*, 17–27.

Pavon, A., Binguet, C., Kara, F., Martinet, O., Ganster, F., Navellou, J.-C., Castelain, V., Barraud, D., Cousson, J., Louis, G., et al. (2013). Profile of the Risk of Death After Septic Shock in the Present Era: An Epidemiologic Study. *Crit. Care Med.* *41*, 2600–2609.

Peck, O.M., Williams, D.L., Breuel, K.F., Kalbfleisch, J.H., Fan, H., Tempel, G.E., Teti, G., and Cook, J.A. (2004). Differential regulation of cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-induced tolerance and priming. *Cytokine* *26*, 202–208.

Pène, F., Grimaldi, D., Zuber, B., Sauneuf, B., Rousseau, C., El Hachem, C., Martin, C., Belaïdouni, N., Balloy, V., Mira, J.-P., et al. (2012). Toll-Like Receptor 2 Deficiency Increases Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in the Setting of Sepsis-

Induced Immune Dysfunction. *J. Infect. Dis.* 206, 932–942.

Peters, W., Cyster, J.G., Mack, M., Schlöndorff, D., Wolf, A.J., Ernst, J.D., and Charo, I.F. (2004). CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11c^{dim}/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 172, 7647–7653.

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

Poupel, L., Boissonnas, A., Hermand, P., Dorgham, K., Guyon, E., Auvynet, C., Charles, F.S., Lesnik, P., Deterre, P., and Combadiere, C. (2013). Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2297–2305.

Prescott, H.C., Osterholzer, J.J., Langa, K.M., Angus, D.C., and Iwashyna, T.J. (2016). Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. *BMJ* i2375.

Price, S.A., Spain, D.A., Wilson, M.A., Harris, P.D., and Garrison, R.N. (1999). Subacute Sepsis Impairs Vascular Smooth Muscle Contractile Machinery and Alters Vasoconstrictor and Dilator Mechanisms. *J. Surg. Res.* 83, 75–80.

Qiang, X., Yang, W.-L., Wu, R., Zhou, M., Jacob, A., Dong, W., Kuncewitch, M., Ji, Y., Yang, H., Wang, H., et al. (2013). Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. *Nat. Med.* 19, 1489–1495.

Qin, G., Mao, H., Zheng, J., Sia, S.F., Liu, Y., Chan, P.-L., Lam, K.-T., Peiris, J.S.M., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2009). Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. *J. Infect. Dis.* 200, 858–865.

Quartin, A.A., Schein, R.M., Kett, D.H., and Peduzzi, P.N. (1997). Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA* 277, 1058–1063.

Quenot, J.-P., Binquet, C., Kara, F., Martinet, O., Ganster, F., Navellou, J.-C., Castelain, V., Barraud, D., Cousson, J., Louis, G., et al. (2013). The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care* 17, R65.

Quenot, J.P., Pavon, A., Fournel, I., Barbar, S.D., and Bruyère, R. (2015). Le choc septique de l'adulte en France : vingt ans de données épidémiologiques. *Réanimation* 24, 303–309.

Rangel-Frausto, M.S. (1999). The epidemiology of bacterial sepsis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13, 299–312, vii.

Raspé, C., Höcherl, K., Rath, S., Sauvant, C., and Bucher, M. (2013). NF- κ B-mediated inverse regulation of fractalkine and CX3CR1 during CLP-induced sepsis. *Cytokine* 61, 97–103.

Reim, D., Westenfelder, K., Kaiser-Moore, S., Schlautkötter, S., Holzmann, B., and Weighardt, H. (2009). Role of T cells for cytokine production and outcome in a model of

acute septic peritonitis. *Shock* Augusta Ga 31, 245–250.

Rello, J., Paiva, J.A., Baraibar, J., Barcenilla, F., Bodi, M., Castander, D., Correa, H., Diaz, E., Garnacho, J., Llorio, M., et al. (2001). International Conference for the Development of Consensus on the Diagnosis and Treatment of Ventilator-associated Pneumonia. *Chest* 120, 955–970.

Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., Levy, M.M., Antonelli, M., Ferrer, R., Kumar, A., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Nunnally, M.E., et al. (2017). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock. *Crit. Care Med.* 45, 486–552.

Rice, T.W., Wheeler, A.P., Bernard, G.R., Vincent, J.-L., Angus, D.C., Aikawa, N., Demeyer, I., Sainati, S., Amlot, N., Cao, C., et al. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis*: *Crit. Care Med.* 38, 1685–1694.

Rios-Santos, F., Alves-Filho, J.C., Souto, F.O., Spiller, F., Freitas, A., Lotufo, C.M.C., Soares, M.B.P., Dos Santos, R.R., Teixeira, M.M., and Cunha, F. de Q. (2007). Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 490–497.

Robben, P.M., LaRegina, M., Kuziel, W.A., and Sibley, L.D. (2005). Recruitment of Gr-1 + monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J. Exp. Med.* 201, 1761–1769.

Robertson, C.M., Perrone, E.E., McConnell, K.W., Dunne, W.M., Boody, B., Brahmhatt, T., Diacovo, M.J., Van Rooijen, N., Hogue, L.A., Cannon, C.L., et al. (2008). Neutrophil Depletion Causes a Fatal Defect in Murine Pulmonary Staphylococcus aureus clearance. *J. Surg. Res.* 150, 278–285.

Rode, H.N., Christou, N.V., Bubenik, O., Superina, R., Gordon, J., Meakins, J.L., and MacLean, L.D. (1982). Lymphocyte function in anergic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 47, 155–161.

Rodero, M.P., Poupel, L., Loyher, P.-L., Hamon, P., Licata, F., Pessel, C., Hume, D.A., Combadière, C., and Boissonnas, A. (2015). Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *Elife* 4, e07847.

Rodig, N., Ryan, T., Allen, J.A., Pang, H., Grabie, N., Chernova, T., Greenfield, E.A., Liang, S.C., Sharpe, A.H., Lichtman, A.H., et al. (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 33, 3117–3126.

Roger, P.-M., Hyvernats, H., Breittmayer, J.-P., Dunais, B., Dellamonica, J., Bernardin, G., and Bernard, A. (2009). Enhanced T-cell apoptosis in human septic shock is associated with alteration of the costimulatory pathway. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 28, 575–584.

Rosseau, S., Hammerl, P., Maus, U., Walmrath, H.D., Schütte, H., Grimminger, F., Seeger, W., and Lohmeyer, J. (2000). Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L25–35.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217–242.

- Rossi, A., Illouz, S., and Annane, D. (2009). Faut-il toujours utiliser les corticoïdes dans le choc septique ? *Réanimation* 18, 309–322.
- Rowe, J.H., Johans, T.M., Ertelt, J.M., and Way, S.S. (2008). PDL-1 blockade impedes T cell expansion and protective immunity primed by attenuated *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 7553–7557.
- Rudiger, A., Stotz, M., and Singer, M. (2008). Cellular processes in sepsis. *Swiss Med. Wkly.* 138, 629–634.
- Ryan, G.R., Dai, X.M., Dominguez, M.G., Tong, W., Chuan, F., Chisholm, O., Russell, R.G., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (2001). Rescue of the colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-nullizygous mouse (Csf1(op)/Csf1(op)) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood* 98, 74–84.
- Saleh, M.N., Goldman, S.J., LoBuglio, A.F., Beall, A.C., Sabio, H., McCord, M.C., Minasian, L., Alpaugh, R.K., Weiner, L.M., and Munn, D.H. (1995). CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 85, 2910–2917.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118.
- Sander, L.E., Sackett, S.D., Dierssen, U., Beraza, N., Linke, R.P., Müller, M., Blander, J.M., Tacke, F., and Trautwein, C. (2010). Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.* 207, 1453–1464.
- Santos, S.S., Brunialti, M.K.C., Rigato, O., Machado, F.R., Silva, E., and Salomao, R. (2012). Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock Augusta Ga* 38, 18–23.
- Santos, S.S., Carmo, A.M., Brunialti, M.K.C., Machado, F.R., Azevedo, L.C., Assunção, M., Trevelin, S.C., Cunha, F.Q., and Salomao, R. (2016). Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. *Intensive Care Med. Exp.* 4, 5.
- Sarkar, A., Hall, M.W., Exline, M., Hart, J., Knatz, N., Gatson, N.T., and Wewers, M.D. (2006). Caspase-1 regulates *Escherichia coli* sepsis and splenic B cell apoptosis independently of interleukin-1beta and interleukin-18. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174, 1003–1010.
- Schaaf, B., Luitjens, K., Goldmann, T., van Bremen, T., Sayk, F., Dodt, C., Dalhoff, K., and Droemann, D. (2009). Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagn. Pathol.* 4, 12.
- Schall, T.J., and Proudfoot, A.E.I. (2011). Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 355–363.
- Schefold, J.C., Hasper, D., Volk, H.D., and Reinke, P. (2008). Sepsis: time has come to focus on the later stages. *Med. Hypotheses* 71, 203–208.

- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., and Muller, W.A. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat. Immunol.* 5, 393–400.
- Schrier, R.W., and Wang, W. (2004). Acute renal failure and sepsis. *N. Engl. J. Med.* 351, 159–169.
- Secher, T., Vasseur, V., Poisson, D.M., Mitchell, J.A., Cunha, F.Q., Alves-Filho, J.C., and Ryffel, B. (2009). Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 7855–7864.
- Seo, S.-K., Jeong, H.-Y., Park, S.-G., Lee, S.-W., Choi, I.-W., Chen, L., and Choi, I. (2008). Blockade of endogenous B7-H1 suppresses antibacterial protection after primary *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* 123, 90–99.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003a). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59–70.
- Serbina, N.V., Kuziel, W., Flavell, R., Akira, S., Rollins, B., and Pamer, E.G. (2003b). Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity* 19, 891–901.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 421–452.
- Serriari, N.-E., Eoche, M., Lamotte, L., Lion, J., Fumery, M., Marcelo, P., Chatelain, D., Barre, A., Nguyen-Khac, E., Lantz, O., et al. (2014). Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases: MAIT cells in IBD. *Clin. Exp. Immunol.* 176, 266–274.
- Shahrara, S., Pickens, S.R., Mandelin, A.M., Karpus, W.J., Huang, Q., Kolls, J.K., and Pope, R.M. (2010). IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4479–4487.
- Shalova, I.N., Lim, J.Y., Chittechath, M., Zinkernagel, A.S., Beasley, F., Hernández-Jiménez, E., Toledano, V., Cubillos-Zapata, C., Rapisarda, A., Chen, J., et al. (2015). Human Monocytes Undergo Functional Re-programming during Sepsis Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Immunity* 42, 484–498.
- Shao, B.-Z., Xu, Z.-Q., Han, B.-Z., Su, D.-F., and Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front. Pharmacol.* 6, 262.
- Shaw, A.D., Vail, G.M., Haney, D.J., Xie, J., and Williams, M.D. (2011). Severe protein C deficiency is associated with organ dysfunction in patients with severe sepsis. *J. Crit. Care* 26, 539–545.
- Sherwood, E.R., Enoh, V.T., Murphey, E.D., and Lin, C.Y. (2004). Mice depleted of CD8+ T and NK cells are resistant to injury caused by cecal ligation and puncture. *Lab. Investig. J.*

Tech. Methods Pathol. *84*, 1655–1665.

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

Shindo, Y., McDonough, J.S., Chang, K.C., Ramachandra, M., Sasikumar, P.G., and Hotchkiss, R.S. (2017). Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J. Surg. Res.* *208*, 33–39.

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* *28*, 495–500.

Siddall, E., Khatri, M., and Radhakrishnan, J. (2017). Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management. *Kidney Int.* *92*, 37–46.

Silva, S.C., Baggio-Zappia, G.L., Brunialti, M.K.C., Assunção, M.S.C., Azevedo, L.C.P., Machado, F.R., and Salomao, R. (2014). Evaluation of Toll-like, chemokine, and integrin receptors on monocytes and neutrophils from peripheral blood of septic patients and their correlation with clinical outcomes. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* *47*, 384–393.

Simonsen, K.A., Anderson-Berry, A.L., Delair, S.F., and Davies, H.D. (2014). Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* *27*, 21–47.

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.-D., Cooper-Smith, C.M., et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* *315*, 801.

Solovjov, D.A., Pluskota, E., and Plow, E.F. (2005). Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alpha₅beta₂. *J. Biol. Chem.* *280*, 1336–1345.

Sônego, F., Alves-Filho, J.C., and Cunha, F.Q. (2014). Targeting neutrophils in sepsis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *10*, 1019–1028.

Souto, F.O., Alves-Filho, J.C., Turato, W.M., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., and Cunha, F.Q. (2011). Essential Role of CCR2 in Neutrophil Tissue Infiltration and Multiple Organ Dysfunction in Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *183*, 234–242.

Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., Fitting, C., Cavaillon, J.-M., and Adib-Conquy, M. (2012). NK Cell Tolerance to TLR Agonists Mediated by Regulatory T Cells after Polymicrobial Sepsis. *J. Immunol.* *188*, 5850–5858.

Souza-Fonseca-Guimaraes, P., Guimaraes, F., Natânia De Souza-Araujo, C., Maria Boldrini Leite, L., Cristina Senegaglia, A., Nishiyama, A., and Souza-Fonseca-Guimaraes, F. (2017). Natural Killer Cell Assessment in Peripheral Circulation and Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Severe Sepsis: A Case Control Study. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 616.

Stephan, F., Yang, K., Tankovic, J., Soussy, C.-J., Dhonneur, G., Duvaldestin, P., Brochard, L., Brun-Buisson, C., Harf, A., and Delclaux, C. (2002). Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients: *Crit. Care Med.* *30*, 315–322.

- Sunderkötter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J.M. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 4410–4417.
- Szabo, P.A., Anantha, R.V., Shaler, C.R., McCormick, J.K., and Haeryfar, S.M.M. (2015). CD1d- and MR1-Restricted T Cells in Sepsis. *Front. Immunol.* *6*.
- Tacke, F., Ginhoux, F., Jakubzick, C., van Rooijen, N., Merad, M., and Randolph, G.J. (2006). Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J. Exp. Med.* *203*, 583–597.
- Taneja, R., Sharma, A.P., Hallett, M.B., Findlay, G.P., and Morris, M.R. (2008). IMMATURE CIRCULATING NEUTROPHILS IN SEPSIS HAVE IMPAIRED PHAGOCYTOSIS AND CALCIUM SIGNALING: *Shock* *30*, 618–622.
- Tatura, R., Zeschneigk, M., Hansen, W., Steinmann, J., Goncalves Vidigal, P., Hutzler, M., Pastille, E., Westendorf, A.M., Buer, J., and Kehrmann, J. (2015). Relevance of Foxp3⁺ regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. *Immunology* *146*, 144–156.
- Tavares-Murta, B.M., Zaparoli, M., Ferreira, R.B., Silva-Vergara, M.L., B. Oliveira, C.H., Murta, E.F.C., Ferreira, S.H., and Cunha, F.Q. (2002). Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients*: *Crit. Care Med.* *30*, 1056–1061.
- Thomson, J.T., Brand, M.B., and FruFonteh, P. (2017). THE ROLE OF IL17-A IN THE SECOND HIT OF ACUTE PANCREATITIS. *South Afr. J. Surg. Suid-Afr. Tydskr. Vir Chir.* *55*, 51.
- Tilloy, F., Treiner, E., Park, S.H., Garcia, C., Lemonnier, F., de la Salle, H., Bendelac, A., Bonneville, M., and Lantz, O. (1999). An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.* *189*, 1907–1921.
- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., and Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* *422*, 164–169.
- Trottein, F., and Paget, C. (2018). Natural Killer T Cells and Mucosal-Associated Invariant T Cells in Lung Infections. *Front. Immunol.* *9*.
- Tschöp, J., Martignoni, A., Goetzman, H.S., Choi, L.G., Wang, Q., Noel, J.G., Ogle, C.K., Pritts, T.A., Johannigman, J.A., Lentsch, A.B., et al. (2008). Gammadelta T cells mitigate the organ injury and mortality of sepsis. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 581–588.
- Tumer, C., Bilgin, H., Obay, B., Diken, H., Atmaca, M., and Kelle, M. (2007). Effect of nitric oxide on phagocytic activity of lipopolysaccharide-induced macrophages: Possible role of exogenous l-arginine. *Cell Biol. Int.* *31*, 565–569.
- Tyagi, A., Sethi, A.K., Girotra, G., and Mohta, M. (2009). The microcirculation in sepsis. *Indian J. Anaesth.* *53*, 281–293.
- Unsinger, J., McGlynn, M., Kasten, K.R., Hoekzema, A.S., Watanabe, E., Muenzer, J.T., McDonough, J.S., Tschoep, J., Ferguson, T.A., McDunn, J.E., et al. (2010). IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol.*

Baltim. Md 1950 *184*, 3768–3779.

Van Coillie, E., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1999). The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* *10*, 61–86.

Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 88–100.

Venet, F., Pachot, A., Debard, A.-L., Bohé, J., Bienvenu, J., Lepape, A., and Monneret, G. (2004). Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit. Care Med.* *32*, 2329–2331.

Venet, F., Bohé, J., Debard, A.-L., Bienvenu, J., Lepape, A., and Monneret, G. (2005). Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit. Care Med.* *33*, 2836–2840.

Vincent, J.-L. (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA* *302*, 2323.

Viola, A., and Luster, A.D. (2008). Chemokines and Their Receptors: Drug Targets in Immunity and Inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *48*, 171–197.

Walter, J., Haller, S., Quinten, C., Kärki, T., Zacher, B., Eckmanns, T., Abu Sin, M., Plachouras, D., Kinross, P., Suetens, C., et al. (2018). Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European Union/European Economic Area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* *23*.

Wang, J.-F., Li, J.-B., Zhao, Y.-J., Yi, W.-J., Bian, J.-J., Wan, X.-J., Zhu, K.-M., and Deng, X.-M. (2015a). Up-regulation of Programmed Cell Death 1 Ligand 1 on Neutrophils May Be Involved in Sepsis-induced Immunosuppression: An Animal Study and a Prospective Case-control Study. *Anesthesiology* *122*, 852–863.

Wang, Y., Braun, O.Ö., Zhang, S., Norström, E., and Thorlacius, H. (2015b). Monocytes regulate systemic coagulation and inflammation in abdominal sepsis. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *308*, H540–H547.

Wang, Z., Holthoff, J.H., Seely, K.A., Pathak, E., Spencer, H.J., Gokden, N., and Mayeux, P.R. (2012). Development of Oxidative Stress in the Peritubular Capillary Microenvironment Mediates Sepsis-Induced Renal Microcirculatory Failure and Acute Kidney Injury. *Am. J. Pathol.* *180*, 505–516.

Ward, P.A. (2004). The dark side of C5a in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 133–142.

Weber, C., Weber, K.S., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Horuk, R., and Nelson, P.J. (2001). Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood* *97*, 1144–1146.

Weinberg, J.B., Misukonis, M.A., Shami, P.J., Mason, S.N., Sauls, D.L., Dittman, W.A., Wood, E.R., Smith, G.K., McDonald, B., and Bachus, K.E. (1995). Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* *86*, 1184–1195.

- Wen, H., Dou, Y., Hogaboam, C.M., and Kunkel, S.L. (2008). Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood* 111, 1797–1804.
- Wesselkamper, S.C., Eppert, B.L., Motz, G.T., Lau, G.W., Hassett, D.J., and Borchers, M.T. (2008). NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 5481–5489.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499.
- Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 486–499.
- White, G.E., McNeill, E., Channon, K.M., and Greaves, D.R. (2014). Fractalkine promotes human monocyte survival via a reduction in oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 2554–2562.
- Wintermeyer, P., Cheng, C.-W., Gehring, S., Hoffman, B.L., Holub, M., Brossay, L., and Gregory, S.H. (2009). Invariant natural killer T cells suppress the neutrophil inflammatory response in a mouse model of cholestatic liver damage. *Gastroenterology* 136, 1048–1059.
- Wisnoski, N., Chung, C.-S., Chen, Y., Huang, X., and Ayala, A. (2007). THE CONTRIBUTION OF CD4+ CD25+ T-REGULATORY-CELLS TO IMMUNE SUPPRESSION IN SEPSIS: *Shock* 27, 251–257.
- Witowski, J., Pawlaczyk, K., Breborowicz, A., Scheuren, A., Kuzlan-Pawlaczyk, M., Wisniewska, J., Polubinska, A., Friess, H., Gahl, G.M., Frei, U., et al. (2000). IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 5814–5821.
- Wolk, K., Döcke, W.D., von Baehr, V., Volk, H.D., and Sabat, R. (2000). Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 96, 218–223.
- Wong, H.R. (2013). Genome-wide expression profiling in pediatric septic shock. *Pediatr. Res.* 73, 564–569.
- Wu, D.-D., Li, T., and Ji, X.-Y. (2017). Dendritic Cells in Sepsis: Pathological Alterations and Therapeutic Implications. *J. Immunol. Res.* 2017, 1–9.
- Xiao, H., Siddiqui, J., and Remick, D.G. (2006). Mechanisms of Mortality in Early and Late Sepsis. *Infect. Immun.* 74, 5227–5235.
- Xiao, W., Mindrinos, M.N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A.G., Gao, H., Hayden, D.L., Hennessy, L., Moore, E.E., Minei, J.P., et al. (2011). A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.* 208, 2581–2590.
- Xiao, Z., Wilson, C., Robertson, H.L., Roberts, D.J., Ball, C.G., Jenne, C.N., and Kirkpatrick, A.W. (2015). Inflammatory mediators in intra-abdominal sepsis or injury – a scoping review. *Crit. Care* 19.
- Xiu, F., Stanojcic, M., Wang, V., Qi, P., and Jeschke, M.G. (2016). C-C Chemokine Receptor Type 2 Expression on Monocytes Before Sepsis Onset Is Higher Than That of Postsepsis

in Septic Burned Patients: A New Predictor for Sepsis in Burned Injury. *Ann. Surg.* 264, 392–398.

Yang, M.-L., Wang, C.-T., Yang, S.-J., Leu, C.-H., Chen, S.-H., Wu, C.-L., and Shiau, A.-L. (2017). IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. *Sci. Rep.* 7, 43829.

Yao, Z., Painter, S.L., Fanslow, W.C., Ulrich, D., Macduff, B.M., Spriggs, M.K., and Armitage, R.J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 155, 5483–5486.

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.

Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S.K., Appella, E., Lerman, M.I., and Leonard, E.J. (1989). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 244, 487–493.

Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D.I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 5791–5802.

Yuan, Y., Yan, D., Han, G., Gu, G., and Ren, J. (2013). Complement C3 depletion links to the expansion of regulatory T cells and compromises T-cell immunity in human abdominal sepsis: a prospective pilot study. *J. Crit. Care* 28, 1032–1038.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50–e61.

Zeerleder, S., Hack, C., Caliezi, C., Vanmierlo, G., Eerenbergelmer, A., Wolbink, A., and Wuillenmin, W. (2005). Activated cytotoxic T cells and NK cells in severe sepsis and septic shock and their role in multiple organ dysfunction. *Clin. Immunol.* 116, 158–165.

Zhang, N., Schröppel, B., Lal, G., Jakubzick, C., Mao, X., Chen, D., Yin, N., Jessberger, R., Ochando, J.C., Ding, Y., et al. (2009). Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 30, 458–469.

Zhang, Y., Zhou, Y., Lou, J., Li, J., Bo, L., Zhu, K., Wan, X., Deng, X., and Cai, Z. (2010). PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. *Crit. Care* 14, R220.

Zhao, Y., Lin, L., Xiao, Z., Li, M., Wu, X., Li, W., Li, X., Zhao, Q., Wu, Y., Zhang, H., et al. (2018). Protective Role of $\gamma\delta$ T Cells in Different Pathogen Infections and Its Potential Clinical Application. *J. Immunol. Res.* 2018, 1–15.

Zhou, D., Zhu, Y., Ouyang, M., Zhang, M., Tang, K., Niu, C., and Li, L. (2018a). Knockout of Toll-like receptor 4 improves survival and cardiac function in a murine model of severe sepsis. *Mol. Med. Rep.*

Zhou, H., Li, Y., Gui, H., Zhao, H., Wu, M., Li, G., Li, Y., Bai, Z., Yin, Z., Redmond, H.P., et al.

(2018b). Antagonism of Integrin CD11b Affords Protection against Endotoxin Shock and Polymicrobial Sepsis via Attenuation of HMGB1 Nucleocytoplasmic Translocation and Extracellular Release. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *200*, 1771–1780.

Zhou, S., Wang, G., and Zhang, W. (2018c). Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on sepsis-associated acute respiratory distress syndrome in rats, via regulation of macrophage activation and inflammatory response. *Exp. Ther. Med.*

Zigmond, E., Samia-Grinberg, S., Pasmanik-Chor, M., Brazowski, E., Shibolet, O., Halpern, Z., and Varol, C. (2014). Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. *J. Immunol.* *193*, 344–353.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* *12*, 121–127.

Zou, Q., Wen, W., and Zhang, X.-C. (2014). Presepsin as a novel sepsis biomarker. *World J. Emerg. Med.* *5*, 16–19.

