



HAL
open science

Apports de la microscopie biphotonique intravitale pulmonaire à l'étude de la physiopathologie de la maladie du charbon

Daniel Fiole

► **To cite this version:**

Daniel Fiole. Apports de la microscopie biphotonique intravitale pulmonaire à l'étude de la physiopathologie de la maladie du charbon. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENY008 . tel-00952722

HAL Id: tel-00952722

<https://theses.hal.science/tel-00952722>

Submitted on 27 Feb 2014

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Daniel FIOLE

Thèse dirigée par **Jean-Claude VIAL**
et codirigée par **Jean-Nicolas TOURNIER**

au sein de l'**Institut de Recherche Biomédicale des Armées**
dans le cadre de l'**École Doctorale de Physique**

Apports de la microscopie biphotonique intravitale pulmonaire à l'étude de la physiopathologie de la maladie du charbon

Thèse soutenue publiquement le **10 juin 2013**,
devant le jury composé de :

Dr Franck DEBARBIEUX

Maître de conférences, Aix-Marseille Université (rapporteur)

Dr Pierre GOOSSENS

Chef de laboratoire, Institut Pasteur, Paris (rapporteur)

Dr Marie-Claire SCHANNE-KLEIN

Directrice de Recherches, Ecole Polytechnique, Palaiseau (examinatrice)

Dr Marianne WEIDENHAUPT

Maître de conférences, Institut Polytechnique de Grenoble (examinatrice)

Dr Julien DOUADY

Maître de conférences, Université Joseph Fourier (directeur scientifique)

Pr Jean-Nicolas TOURNIER

Chef d'unité, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche
(codirecteur de thèse)



« Celui à qui la souffrance a été épargnée doit se sentir appelé à
soulager celle des autres. »

Albert Schweitzer, théologien protestant et médecin, prix Nobel de la Paix 1952

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu MM. Pierre Goossens et Franck Debarbieux qui ont accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs, ainsi que Mmes Marianne Weidenhaupt et Marie-Claire Schanne-Klein en tant qu'examinatrices. Merci pour le temps que cela représente, que vous avez accepté d'investir dans mon travail.

Merci à Jean-Claude Vial d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse, pour ta bienveillance envers les doctorants et pour ta participation passionnée aux réunions résultats. Merci à Julien Douady, pour avoir accepté de co-encadrer mon travail, en particulier sur les aspects physiques, et pour ton intérêt pour les applications de la microscopie biphotonique en immunologie. Merci pour ta lecture très minutieuse du manuscrit qui a beaucoup gagné en rigueur et en clarté, mais aussi pour le temps passé à me guider dans mes choix professionnels. Tes conseils sont toujours pertinents !

Merci à Jean-Nicolas Tournier de m'avoir fait confiance dès le début de mon stage de fin d'études d'ingénieur. Merci de m'avoir accueilli et enseigné tant de choses durant ces 4 années : je réalise à quel point mon passage dans l'unité interactions hôte-agents pathogènes m'aura formé à la recherche en biologie grâce à toi. De la chirurgie thoracique sur souris à la médecine en passant par ce domaine complexe qu'est l'immunologie, j'ai appris tant de choses passionnantes à ton contact que je ne pouvais rêver de meilleur cadre pour ma thèse. Merci pour avoir maintenu dans l'équipe l'émulation scientifique que je recherchais. Enfin, merci de m'avoir conforté dans ma vocation professionnelle et de m'avoir donné de ton temps sans compter. Je serai ravi de continuer à travailler avec toi si l'occasion se présente.

Je remercie Jacques Mathieu de m'avoir accueilli dans le département de Biologie des Agents Transmissibles au CRSSA et d'avoir contribué aux bonnes conditions de déroulement de ma thèse, et la Direction Générale de l'Armement de m'avoir accordé un financement pour ces trois années.

Merci à Aurélie d'avoir si bien participé à mon intégration dans l'équipe et d'avoir guidé mes premiers pas de physicien dans un labo de biologie. Merci pour ta si bonne compagnie, tu nous as beaucoup manqué après ton départ. Merci à Anne d'avoir encadré mon stage de fin d'études en 2009, qui m'a ouvert la porte de la thèse dans le même labo, et de m'avoir guidé dans l'apprentissage des techniques de biologie avec gentillesse.

J'ai eu la grande chance de co-encadrer trois stagiaires durant ma thèse : tout d'abord Sibylle que j'aurai beaucoup aimé garder en stage quelques années de plus, puis Iris qui a effectué son travail avec une jovialité et une spontanéité devenues légendaires et enfin Pierre, mon stagiaire post-doc (!). Les mois passés avec eux m'ont conforté dans ma vocation et ils savent toute l'estime que je leur porte au-delà de l'enceinte du CRSSA.

Merci à Emily pour ta rapidité à corriger mon Anglais même dans l'urgence, mais aussi pour m'avoir fait grandement apprécier cette ville de Los Angeles dans laquelle j'ai finalement décidé d'effectuer mon post-doc.

Bien sûr, merci à Kev' que j'ai rencontré dès le début de ma thèse, avec qui j'ai partagé des sessions philosophiques sur le vrai sens de la vie. La mise en application des conclusions de nos débats m'a conduit sur quelques sommets alpins ou dans des trous de neige, dans une ambiance que je garderai comme un de mes meilleurs souvenirs de ma période grenobloise. Merci aussi de m'avoir fait découvrir qu'il y a des collines autour des Cévennes. Merci aussi à Calou, Arnaud, Charlène, Yannick, Karine, pour leur agréable compagnie et avoir contribué à la bonne ambiance au CRSSA.

Enfin, merci à Julia, un peu pour m'avoir aidé et conseillé sur certaines traductions, et beaucoup pour ta présence à mes côtés et ta patience au cours de la dernière ligne droite de la thèse.

Je suis conscient que cette thèse de doctorat en physique est l'aboutissement de 10 années d'études passionnantes qui n'ont été possibles que grâce au soutien indéfectible, moral et matériel, de mes parents et de mes frères, à qui je dédie cette thèse.

Abréviations

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

BCR : *B Cell Receptor*

BPM : Battements Par Minute

cDC : *conventional Dendritic Cell*

pDC : *plasmacytoid Dendritic Cell*

CRSSA : Centre de Recherches du Service de Santé des Armées

DC : *Dendritic Cell*

EDP : Emission à Deux Photons

GFP : *Green Fluorescent Protein*

HEV : *High Endothelial Venules*

i.n. : intranasal

i.p. : intrapéritonéal

IRBA : Institut de Recherche Biomédicale des Armées

IRC : *Instantaneous Roundness Coefficient*

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

i.t. : intratrachéal

i.v. : intraveineux

LPS : LipoPolySaccharide

MALT : *Mucosa-Associated Lymphoid Tissues*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MAPKK : *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*

mDC : *myeloid Dendritic Cell*

MRC : *Mean Roundness Coefficient*

NALT : *Nasal-Associated Lymphoid Tissues*

NDD : *Non-Descanned Detector*

NET : *Neutrophil Extracellular Traps*

NK : *Natural Killer*

OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

p.i. : *post infection*

PGA : *acide poly γ -D Glutamique*

PKA : *Protéine Kinase A*

PNN : *Poly Nucléaire Neutrophile*

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

s.c. : *sous-cutané*

SPIE : *Society of Photo-optical Instrumentation Engineers*

TDM : *TomoDensitoMétrie*

TCR : *T Cell Receptor*

TLR : *Toll-Like Receptor*

TEP : *Tomographie par Emission de Positons*

VAI : *Voies Aériennes Inférieures*

VAS : *Voies Aériennes Supérieures*

Liste des figures

Figure 1. Expérience de Pouilly-le-Fort en 1881. Dessin de Damblas 1922, © Institut Pasteur.....	22
Figure 2. Forme végétative de <i>Bacillus anthracis</i> en "cannes de bambou". © Public Health Image Library.	27
Figure 3. Les différentes couches composant la surface cellulaire de <i>B. anthracis</i> sous sa forme végétative vues en microscopie électronique. m : membrane, P : peptidoglycane, S : surface-layer, C : capsule. Adapté de la référence [46].	28
Figure 4. Spore de <i>Bacillus anthracis</i> vue en microscopie électronique. Barre d'échelle : 700 nm. Kari Severson, Loyola University Medical Center.	29
Figure 5. Cycle biologique naturel de <i>B. anthracis</i>	32
Figure 6. Distribution géographique et fréquence des cas de charbon (2003). Rouge : hyperendémique. Rose : endémique. Jaune : sporadique. Vert clair : probablement non concerné. Vert : non concerné. Gris : inconnu. Extrait de la référence [67].	34
Figure 7. Schéma de formation du pore à la surface cellulaire, mécanisme d'endocytose des toxines et activité enzymatique. Extrait de la référence [110].	39
Figure 8. Charbon cutané chez une enfant de 9 ans. Extrait du <i>Dermatology Online Images Atlas</i>	45
Figure 9. Œdème facial conséquent à une infection cutanée par <i>B. anthracis</i> chez une enfant de 12 ans en Albanie. Extrait de la référence [176].	45
Figure 10. Forme gastro-intestinale de la maladie du charbon. Cas résultant de l'ingestion de viande de mouton contaminée. A : dilatation caecale au lavement baryté ; la photo en haut à droite montre des bacilles Gram-positifs formant des spores (flèches). B : aspect per opératoire du caecum. Extrait de la référence [180].	46
Figure 11. Radiographies pulmonaires d'un homme de 49 ans infecté par inhalation de spores de <i>B. anthracis</i> . A : présence d'une densité supra-hilaire au niveau du poumon droit. B : Augmentation des densités pré-hilaires et infra-hilaires après 24 h sans traitement. C : Apparition d'une infiltration au niveau du lobe pulmonaire supérieur droit après 3 h. D : Augmentation du lobe supérieur droit et effusions pleurales bilatérales. Le patient est décédé au cours des 4 h suivantes. Extrait de la référence [187].	48
Figure 12. Patient atteint de la maladie du charbon après injection d'héroïne contaminée par des spores de <i>B. anthracis</i> . Extrait de la référence [190].	49
Figure 13. La cage thoracique est assimilable en termes de mécanique ventilatoire à un cylindre.	55
Figure 14. Les voies aériennes supérieures sont constituées des fosses nasales, du pharynx et du larynx.	56

Figure 15. Les voies aériennes inférieures sont constituées de la trachée, de l'arbre bronchique et de la zone respiratoire comprenant les alvéoles pulmonaires. Photo du moulage de l'arbre bronchique d'un cheval. © C. Degueurce.	58
Figure 16. Coupe histologique de la zone respiratoire chez l'humain. Extrait de la référence [221].....	59
Figure 17. Coupe histologique d'un poumon de souris montrant de nombreux sacs alvéolaires. Image réalisée au CRSSA par K. Garraud et A. Cleret.	60
Figure 18. Section d'un poumon humain sain <i>post mortem</i> . Extrait de la référence [224]......	61
Figure 19. Coupe histologique pulmonaire. Adapté de la référence [221].	62
Figure 20. Image du réseau de capillaire alvéolaire après moulage, réalisée en microscopie électronique par balayage. Extrait de la référence [227].	63
Figure 21. Capillaire alvéolaire. Mise en évidence du noyau d'une cellule épithéliale (Ep) et endothéliale (EN) et de l'espace interstitiel (F). Image extraite de la référence [228].	63
Figure 22. Coupe histologique de poumon montrant la plèvre viscérale accolée au parenchyme. Extrait de la référence [223].	65
Figure 23. Schéma présentant le poumon et la cage thoracique séparés par les deux feuillets pleuraux. Les flèches grises et bleues représentent les forces exercées sur la cage thoracique par les muscles thoraciques (flèche bleue) et les forces élastiques de rétractation du poumon (flèche grise).	65
Figure 24. Organisation du réseau lymphatique (vert) au niveau des capillaires.....	67
Figure 25. Système de défense mécanique et biochimique de l'épithélium respiratoire des voies aériennes. Extrait de la référence [225].	71
Figure 26. Les principales composantes du système lymphatique. Adapté de la référence [248].	74
Figure 27. Pénétration des lymphocytes T naïfs dans le ganglion (en bleu, notés N) <i>via</i> les HEVs. Activation de ces cellules par les DCs (en vert) provenant d'un vaisseau lymphatique afférent. Activation des lymphocytes T par présentation d'antigènes effectuée par les DCs, conduisant à leur différenciation en cellules effectrices (en orange, notées E) et fuite vers les zones d'inflammation <i>via</i> la circulation systémique. Adapté de la référence [253].	76
Figure 28. Transport d'antigène de la lumière de la cavité nasale à travers les cellules M. Echantillonnage par les DCs. Activation de lymphocytes T CD4. Migration vers les ganglions <i>via</i> le réseau lymphatique, puis migration vers le site infecté <i>via</i> la circulation. Sécrétion d'IgA. Adapté de la référence [254].	77
Figure 29. Les différentes sous-populations de DCs pulmonaires dans le poumon à l'homéostasie (gauche) et lors d'une inflammation (droite). Adapté de la référence [266].	81
Figure 30. Répartition des DCs CX3CR1 ⁺ pulmonaires (en vert) chez la souris au niveau des bronches (gauche, échelle = 40 µm), du parenchyme (centre, échelle = 40 µm) et de la plèvre (droite, échelle = 20 µm). Imagerie confocale <i>ex vivo</i> avec excitation à 488 nm et 633 nm effectuée sur explant de poumon de souris CX3CR1 ^{+/GFP} après marquage non spécifique des structures au CMTMR.	83

Figure 31. Modèle du Cheval de Troie de pénétration des spores dans l'organisme. Adapté de la référence [286].	86
Figure 32. Modèle de « l'Evasion » expliquant la pénétration des spores dans l'organisme. Adapté de la référence [286].	88
Figure 33. Diagramme de Jablonski simplifié. S0, S1 et S2 désignent respectivement l'état fondamental singulet et le premier et deuxième état excité singulet. T1 désigne le premier état triplet. Pour chacun de ces états d'énergie des états vibrationnels et rotationnels peuvent exister.	98
Figure 34. Déplacement de Stokes de deux exemples de fluorophores. (c) Thermo Scientific.	99
Figure 35. Principe du microscope confocal. Les traits bleus représentent le faisceau excitateur, les traits rouges le signal de fluorescence émise à partir du plan focal objet de la lentille et les traits gris en pointillés le signal de fluorescence émise à partir d'un plan défocalisé de l'échantillon.	106
Figure 36. Représentation schématique du volume de l'échantillon dans lequel est générée de la fluorescence lors d'excitation monophotonique. Le rectangle noir représente le volume de l'échantillon dont la fluorescence peut être détectée en microscopie confocale de fluorescence, le reste étant filtré par le sténopé.	109
Figure 37. Spectres normalisés d'absorption monophotonique (pointillés) et d'émission (traits pleins) de la GFP (cyan) et de l'Alexa Fluor 647 (rose). Extrait du SpectraViewer de Life Technologies.	110
Figure 38. Génération du rayonnement de fluorescence par excitation à deux photons. Les flèches rouges représentent chacune un photon d'énergie deux fois inférieure à celle requise pour la transition vers l'état S1. Le photon de fluorescence (flèche verte) est généré lors du retour de la molécule à l'état fondamental. Les flèches grises en pointillés représentent les transitions non radiatives.	112
Figure 39. Représentation schématique du volume de l'échantillon dans lequel est générée de la fluorescence lors d'excitation à deux photons.	116
Figure 40. (a) Spectres d'absorption à un photon (rouge) ou à deux photons (noir) de la GFP. (b) Section efficace d'absorption à deux photons de l'eGFP (vert), CFP (cyan), YFP (jaune), dsRed (rouge) et de la GFP (noir). Extrait de la référence [351].	118
Figure 41. Sections efficaces d'absorption des Alexa Fluor 350, 488, 568 et 594 à deux photons. (c) Invitrogen Life Technologies.	118
Figure 42. Le mouvement du nuage électronique d'une molécule symétrique uniaxe (rectangle jaune) produit à la pulsation ω provoque une diffusion non linéaire à la même pulsation.	120
Figure 43. Dans une molécule asymétrique, le mouvement électronique induit par un champ sinusoïdal produit une lumière diffusée de fréquences combinées ω et 2ω .	121
Figure 44. Diffusion non linéaire (sinusoïdes rouges) en phase pour deux molécules asymétriques, identiques, parallèles et proches (haut) et en opposition de phases pour deux molécules asymétriques, identiques et antiparallèles (bas). Les rayonnements diffusés de pulsation ω ne sont pas représentés pour plus de clarté.	122

Figure 45. Diffusion non linéaire incohérente pour une population de molécules présentant des orientations aléatoires (haut) et cohérente pour une population de molécules ayant la même orientation conduisant à un signal de GSH (bas).....	123
Figure 46. Z-projection d'une tranche de poumon de souris observée selon différents contrastes. Gauche : GSH, excitation à 854 nm. Milieu : endofluorescence, excitation à 488 nm. Droite : superposition de la GSH et de l'endofluorescence. Barres d'échelle = 40 μm ..	125
Figure 47. Balayage monodirectionnel. Chaque rond noir représente un pixel, et les flèches rouges représentent la trajectoire du faisceau incident.	127
Figure 48. Balayage bidirectionnel.	127
Figure 49. Configuration des filtres accolés aux détecteurs non-descannés. Le filtre R1 a une bande passante de 660 à 730 nm, R2 de 417 à 437 nm, R3 de 500 à 550 nm et R4 de 565 à 610 nm. Le code couleur choisi est le même que celui utilisé pour coder les images 4 couleurs présentées au Chapitre 7.....	128
Figure 50. Haut : dessin d'un poumon entier de grenouille (gauche) et coupé longitudinalement (droite). Bas : dessin reproduisant l'observation microscopique d'une alvéole pulmonaire de mammifère avec ses capillaires. Extrait de la référence [391].....	133
Figure 51. Système d'illumination par transmission et positionnement du microscope lors d'observations effectuées <i>in vivo</i> . Adapté de la référence [392].....	134
Figure 52. Coupe transversale schématique de la paroi thoracique de mammifère montrant le positionnement de la fenêtre et le cathéter maintenant une dépression. Extrait de la référence [393].	135
Figure 53. Radiographie du thorax réalisée par le Docteur Béclère à la fin du XIX ^{ème} siècle.	136
Figure 54. Imagerie par Résonance Magnétique du poumon de sujets humains. © Hyperpolarized Noble Gas MRI Lab.	138
Figure 55. Exemple d'image avant transformation.....	151
Figure 56. Transformation géométrique linéaire rigide : exemple de la translation.....	152
Figure 57. Transformation géométrique linéaire rigide : exemple de la rotation d'un angle θ	152
Figure 58. Transformation géométrique linéaire non-rigide : exemple d'un cisaillement parallèle à l'axe des abscisses.	153
Figure 59. Exemple de transformation géométrique non linéaire non-rigide.....	154
Figure 60. Détection de cellules CX3CR1 sur une coupe de poumon en microscopie à 2 photons (GFP en vert) et par SHG (collagène en bleu). Les croix blanches matérialisent les centroïdes des cellules tels que déterminés par l'algorithme de suivi cellulaire.....	173
Figure 61. Détection d'un monocyte (cellule de gauche) et d'une DC (cellule de droite) sur une coupe de poumon en microscopie à 2 photons (GFP en vert) et par SHG (collagène en bleu). Les croix blanches matérialisent les centroïdes des cellules tels que déterminés par l'algorithme de suivi cellulaire.	174

Figure 62. Spores de <i>B. anthracis</i> de souche Sterne, marquées par l'Alexa Fluor 647. Imagerie confocale avec excitation à 633 nm. Barre d'échelle = 10 μ m.	178
Figure 63. Capture de spores (rouge) par une DC pleurale (vert), 1 h après infection. Z-projection d'une image tridimensionnelle réalisée en microscopie confocale. Excitation à 488 nm et 633 nm. Barre d'échelle = 10 μ m.....	180
Figure 64. Superposition du contour des cellules de l'image précédente (blanc), permettant le calcul de l'IRC (en rouge). Une valeur proche de zéro suggère une DC.....	181
Figure 65. Capture de spores (rouge) par une DC pleurale (vert), 1 h après infection. Z-projection d'une image tridimensionnelle réalisée en microscopie confocale. Excitation à 488 nm et 633 nm. Barre d'échelle = 10 μ m.....	181
Figure 66. Z-projection d'une série temporelle d'images effectuées en microscopie confocale sur un explant de poumon, montrant le comportement de DCs (vert) 3 h p.i. par des spores non marquées. Une zone d'intérêt est proposée au temps T=0, montrant par la suite le balayage de l'environnement proche par la DC. Barre d'échelle = 20 μ m.	183
Figure 67. Image de gauche : Capture d'une spore (rouge) par une cellule CX3CR1 (vert) et réseau de collagène alvéolaire (gris). Image de droite : L' <i>Instantaneous Roundness Coefficient</i> de cette cellule vaut 0.59, suggérant un monocyte. Z-projection d'une image réalisée en microscopie biphotonique, excitation à 854 nm. Barre d'échelle = 5 μ m.....	184
Figure 68. Série temporelle de la Z-projection d'images réalisées toutes les deux minutes, à partir de 1h30 p.i. en microscopie biphotonique <i>in situ</i> , montrant des cellules CX3CR1 (vert), des spores marquées à l'Alexa Fluor 568 (rouge) et le collagène en SHG (gris). Excitation : 854 nm. Barre d'échelle = 10 μ m. Série extraite de l'article de conférence SPIE publié en 2013 (référence [471]) présenté en Annexe 4.....	186
Figure 69. Possible localisation de l'épithélium alvéolaire au niveau de la zone sous-pleurale du poumon (pointillés blancs). Spores (rouge) et DC (vert), 1 h après infection. Z-projection d'une image tridimensionnelle réalisée en microscopie confocale. Excitation à 488 nm et 633 nm. Barre d'échelle = 10 μ m.....	191
Figure 70. Vue générale de l'image dont a été extraite l'animation présentée au paragraphe 6.3.2.3. Le cadre blanc représente la zone d'intérêt présentée au paragraphe précédemment cité, et le cylindre gris en pointillé précise l'emplacement probable d'une bronche.	192
Figure 71. Imagerie confocale ex vivo avec excitation à 488 nm et 633 nm effectuée sur explant de poumon de souris CX3CR1 ^{+GFP} après marquage non spécifique des structures au CMTMR. Barre d'échelle = 40 μ m. La distribution des DCs est principalement orientée le long de l'axe bronchique.	193
Figure 72. Exemple d'acquisition de deux images entre lesquelles est survenu un mouvement thoracique de type translation, provoquant une déformation rigide de type translation. DCs (GFP, vert), collagène (SHG, gris) et spores (Alexa Fluor 568, rouge). La zone de recouvrement entre les deux images est mise en évidence par les rectangles bleus. Excitation à 854 nm.....	197
Figure 73. Exemple d'acquisition d'une image durant un mouvement thoracique de type translation, provoquant une perturbation non-rigide de type cisaillement. Image de gauche :	

DCs (GFP, vert), collagène (SHG, gris) et spores (Alexa Fluor 568, rouge). Excitation à 854 nm. Image de droite : modélisation de la perturbation de type cisaillement.	198
Figure 74. Modèle affiné de pénétration des spores au niveau alvéolaire.	240

Table des matières

Introduction générale	18
Chapitre 1 <i>Bacillus anthracis</i> et maladie du charbon	25
1.1 Introduction.....	26
1.2 <i>Bacillus anthracis</i>	26
1.2.1 Caractéristiques morphologiques : bacille et spore	26
1.2.2 Cycle naturel	30
1.2.3 Ecologie.....	33
1.2.4 Premier facteur de virulence : la capsule	35
1.2.5 Second facteur de virulence : les toxines	36
1.2.5.1 Présentation des toxines	36
1.2.5.2 Mécanismes d'endocytose des toxines	37
1.2.5.3 Activité enzymatique des toxines	40
1.3 La maladie du charbon.....	44
1.3.1 Formes cliniques humaines	44
1.3.1.1 Charbon cutané	44
1.3.1.2 Forme gastro-intestinale et oro-pharyngée.....	46
1.3.1.3 Forme pulmonaire	47
1.3.1.4 Forme injectionnelle : une épidémie en cours	49
1.3.2 Mesures thérapeutiques	49
1.3.3 Vaccins.....	50
1.3.3.1 Vaccins entiers	50
1.3.3.2 Les vaccins acellulaires.....	51
Chapitre 2 Anatomophysiologie pulmonaire et immunité	53
2.1 Anatomie fonctionnelle de l'appareil respiratoire.....	55
2.1.1 Cage thoracique.....	55
2.1.2 Voies aériennes supérieures	56
2.1.3 Voies aériennes inférieures	57
2.1.4 Parenchyme pulmonaire et alvéoles	60
2.1.5 Muscles respiratoires	64

2.1.6	Rôle de la plèvre	64
2.1.7	Réseau lymphatique	66
2.1.8	Quelques spécificités du modèle animal murin	68
2.2	Immunité pulmonaire	70
2.2.1	Généralités	70
2.2.2	Epithélium et ascenseur mucociliaire	70
2.2.3	Organes lymphoïdes secondaires	73
2.2.3.1	Ganglions lymphatiques	75
2.2.3.2	NALTs	76
2.2.4	Cellules immunitaires du parenchyme	78
2.2.4.1	Macrophages pulmonaires	78
2.2.4.2	Cellules dendritiques	79
2.2.4.3	Cellules recrutables en conditions inflammatoires	83
2.3	<i>Bacillus anthracis</i> et immunité pulmonaire	85
2.3.1	Modèles de pénétration des spores inhalées	85
2.3.1.1	« Cheval de Troie » dans le poumon	86
2.3.1.2	Cheval de Troie <i>versus</i> Evasion	87
2.3.1.3	Rôle des NALTs	88
2.3.2	Interactions entre <i>B. anthracis</i> et système immunitaire	89
2.3.2.1	Cellules épithéliales	89
2.3.2.2	Macrophages pulmonaires	90
2.3.2.3	Lymphocytes B	91
2.3.2.4	Cellules NK	91
2.3.2.5	PNNs	92
2.3.2.6	DCs	93
2.3.3	Conclusion	93
Chapitre 3 Microscopies de fluorescence et génération d'harmoniques		94
3.1	Introduction	95
3.2	Interaction rayonnement-matière et fluorescence	97
3.2.1	Principes de la photoluminescence	97
3.2.2	Spectres d'absorption et d'émission	99
3.2.3	Rendement quantique d'un fluorophore et déclin de la fluorescence	100

3.2.4	Problèmes liés à l'excitation d'une molécule : photo-blanchiment, photo-dégradation, effets thermiques.....	102
3.2	Microscopie confocale de fluorescence.....	104
3.2.1	Microscopie de fluorescence à un photon.....	104
3.2.2	Principe physique.....	105
3.2.3	Performances.....	107
3.2.4	Limitations	108
3.2.5	Fluorophores utilisés.....	110
3.3	Microscopie de fluorescence par excitation à deux photons	111
3.3.1	Brève revue historique	111
3.3.2	Principe physique.....	112
3.3.3	Performances.....	114
3.3.4	Avantages et limitations	116
3.3.5	Fluorophores utilisés.....	117
3.4	Génération de seconde harmonique	119
3.4.1	Généralités	119
3.4.2	Diffusion non linéaire	119
3.4.3	Génération de seconde harmonique à l'échelle tissulaire	122
3.4.4	Sources endogènes de GSH.....	124
3.5	Instrumentation et configuration	125
3.5.1	Lasers.....	126
3.5.2	Objectif.....	126
3.5.3	Balayage	127
3.5.4	Configuration des détecteurs.....	128
3.6	Conclusion.....	129
Chapitre 4 Etat de l'art de l'imagerie microscopique dynamique du poumon.....		130
4.1	Introduction.....	131
4.2	Premières observations microscopiques <i>in vivo</i>	133
4.3	Techniques d'imagerie macroscopique dynamique du poumon <i>in vivo</i>	136
4.3.1	Imagerie par rayons X.....	136
4.3.2	Imagerie par Résonance Magnétique	137
4.3.3	Imagerie nucléaire par émission de positons	138
4.3.4	Imagerie par bioluminescence.....	139

4.4	Techniques d'imagerie microscopique dynamique du poumon <i>in vivo</i>	141
4.4.1	Imagerie microscopique <i>in situ</i>	141
4.4.2	Imagerie microscopique <i>in vivo</i>	142
4.4.2.1	Ligature d'une bronche.....	143
4.4.2.2	Fixation d'un lobe	144
4.4.2.3	Suspension de la ventilation	144
4.4.2.5	Micro-endoscopie pulmonaire	146
4.4.2.6	Autres solutions	147
4.4.3	Bilan des techniques d'imagerie microscopique dynamique <i>in vivo</i>	148
4.5	Méthodes de correction des mouvements <i>a posteriori</i>	150
4.5.1	Conséquences de mouvements dommageables à l'imagerie dynamique du poumon	150
4.5.1.1	Transformations géométriques linéaires rigides	151
4.5.1.2	Transformations géométriques linéaires non-rigides.....	153
4.5.1.3	Exemple de transformations géométriques non linéaires non-rigides	154
4.5.2	Correction des perturbations affectant une image	154
4.5.3	Recalage d'images d'une série temporelle	156
4.5.4	Extraction des images d'intérêt	156
4.6	Conclusion.....	158
	Chapitre 5 Travail expérimental : discrimination de deux populations cellulaires immunitaires exprimant la même protéine fluorescente	159
5.1	Introduction.....	160
5.2	Article : PLoS ONE 2012.....	162
5.3	Discussion	172
	Chapitre 6 Travail expérimental : étude dynamique <i>in situ</i> du comportement de DCs CD11b⁺ pulmonaires soumises à une infection par <i>Bacillus anthracis</i>	176
6.1	Introduction.....	177
6.2	Matériels et méthodes.....	178
6.2.1	Spores et infection	178
6.2.2	Recadrage sans information structurale.....	179
6.3	Résultats.....	180
6.3.1	Interactions DCs pleurales – spores.....	180
6.3.1.1	Imagerie <i>in situ</i> statique	180

6.3.1.2	Comportement dynamique <i>in situ</i>	182
6.3.2	Interactions cellules CX3CR1 parenchymales – spores.....	184
6.3.2.1	Capture par des monocytes, imagerie statique <i>in situ</i>	184
6.3.2.2	Capture par des monocytes, imagerie dynamique <i>in situ</i>	184
6.3.2.3	Article : capture par les DCs, imagerie dynamique <i>in situ</i>	187
6.4	Discussion	190
6.4.1	Capture au niveau de la plèvre.....	190
6.4.2	Capture dans le parenchyme : zone alvéolaire ou bronchique ?	191
6.4.3	Bilan	193
Chapitre 7 Travail expérimental : développement d'une technique d'imagerie microscopique pulmonaire <i>in vivo</i> et étude des interactions entre DCs et macrophages pulmonaires		195
7.1	Introduction.....	196
7.2	Stratégie d'imagerie	197
7.2.1	Mouvements thoraciques.....	197
7.2.2	Stratégie d'acquisition.....	199
7.2.3	Intérêt du signal structural et reconstitution de la dynamique cellulaire	199
7.2.4	Préparation de l'animal	200
7.3	Article.....	201
Chapitre 8 Discussion générale et perspectives		233
8.1	Discussion	234
8.2	Conclusion.....	241
8.3	Perspectives.....	243
Bibliographie		245
Annexe 1 Article de conférence <i>Proc SPIE 2011</i>		276
Annexe 2 Publication <i>PLoS Pathogens 2012</i>		285
Annexe 3 Publication <i>Infection and Immunity 2012</i>		302
Annexe 4 Article de conférence <i>Proc SPIE 2013</i>		315

Introduction générale

Sacer Ignis, le Feu Sacré, est le terme générique par lequel l'Homme désignait une affection foudroyante à une époque où l'absence apparente de cause rendait la survenue d'un événement dramatique imputable à une justice divine. La maladie du charbon n'a pas échappé à cette règle¹. Au cours des siècles, plusieurs autres noms lui furent donnés parmi lesquels « peste sibérienne », « sang de rate » ou « fléau noir » (*Black bane*²) reflétant la frayeur qu'inspirait cette maladie.

Dans la littérature antique, plusieurs descriptions d'une anthroponose coïncident avec les symptômes de la maladie du charbon. C'est le poète Homère qui aurait le premier fait allusion à cette maladie au commencement de l'Iliade, mais le nom « Charbon », *άνθρακας* en Grec, lui fut attribué par le célèbre médecin Hippocrate au V^{ème} siècle avant J.-C. en raison de la couleur noirâtre des lésions cutanées, des viscères et du sang des animaux malades. Le poète Virgile (70 – 19 avant J.-C.) en fait une description détaillée dans Les Géorgiques, notant que la maladie est transmissible à l'Homme et qu'il vaut mieux euthanasier les animaux infectés plutôt que de tenter de les guérir^{3,4} :

« Déjà la Furie abat les animaux par bandes, et entasse, dans les étables mêmes, les cadavres décomposés par une affreuse pourriture, jusqu'au moment où l'on apprend à les couvrir de terre et à les enfouir dans des trous ; car leurs peaux n'étaient d'aucun usage, et leurs viscères ne peuvent être ni purifiés par les ondes ni vaincus par la flamme; il n'est même pas possible de tondre leurs toisons rongées par la maladie et la saleté, ni de toucher des tissus qui tombent en poussière ; plus encore : quiconque essayait de revêtir ces funestes dépouilles, voyait aussitôt des pustules ardentes et une sueur immonde couvrir ses membres infects, et ne tardait plus longtemps à périr dévoré par les atteintes du feu maudit. »

Virgile, Les Géorgiques, livre III

Jusqu'au XIX^{ème} siècle la maladie du charbon reste une des principales causes de décès de troupeaux à l'échelle planétaire (cf. référence [5] pour une revue des sources écrites reportant les principales épidémies). La maladie du charbon fut

notamment responsable d'une épidémie de grande envergure au milieu du XVIII^{ème} siècle conduisant à la mort de la moitié de la population ovine européenne.

Bien que la maladie du charbon affecte principalement les herbivores, tous les mammifères y compris l'Homme sont susceptibles de la contracter. Chez l'Homme, elle peut se présenter sous trois formes naturelles selon la voie d'entrée du pathogène : cutanée, gastro-intestinale ou pulmonaire (cf. Chapitre 1 pour une description physiopathologique de ces formes). Maret, en 1752, et Fournier, en 1769, furent les premiers à consigner une description scientifique du charbon cutané, notant des « pustules malignes » chez des humains travaillant en contact avec des animaux (fermiers, vétérinaires), la contamination apparaissant *via* des lésions cutanées évoluant en une septicémie fatale en l'absence de traitement. La forme gastro-intestinale, résultant de l'ingestion de viande contaminée, est à l'origine de pertes humaines considérables durant les épidémies de charbon vétérinaire. En 1613 par exemple, la maladie provoqua la mort de 60 000 personnes dans le sud de l'Europe. La forme pulmonaire de la maladie fut quant à elle longtemps appelée « maladie des cardeurs de laine » en raison d'un risque accru d'aérosolisation du pathogène provoqué par le processus de cardage. L'inhalation du pathogène entraîne la contraction de la maladie conduisant à une mort rapide et quasi-inévitable en l'absence de traitement ^{6,7}.

L'étude scientifique de la maladie du charbon a conduit à des avancées considérables dans la compréhension des phénomènes biologiques depuis plusieurs siècles. En 1780, Chabert fut le premier à fournir une description claire de la maladie⁸ et Barthélémy à démontrer la possible transmission de la maladie par l'inoculation de sang contaminé. En 1850, alors que la maladie décime de nombreux troupeaux en Europe, Davaine et Rayer décrivent la présence de « petits corps filiformes » dans le sang de moutons atteints par la maladie du charbon. Ce n'est pourtant qu'en 1863 que Davaine prend conscience de l'importance de ses observations : il publie alors un mémoire dans lequel il soupçonne que les bâtonnets immobiles qu'il a observés sont vivants et qu'ils sont responsables de la pathologie⁹. Il montre également que le pouvoir infectieux disparaît après filtration du sang contaminé, indiquant clairement que celui-ci réside dans les particules qu'il nomme « bactériidies charbonneuses » et établissant pour la première fois un lien direct entre un micro-organisme et une maladie.

La maladie du charbon devint dans les années qui suivirent un modèle d'étude pour de nombreux chercheurs dont Louis Pasteur et Robert Koch. La première culture pure de la bactérie fut réalisée par ce dernier en 1876, qui la nomme *Bacillus anthracis* selon la classification systématique bactérienne établie par le microbiologiste Ferdinand Cohn. Robert Koch observe pour la première fois la sporulation et la germination de la bactérie, c'est-à-dire la capacité qu'a la bactérie de passer d'un état de « spore » (sphère de 1 à 2 µm de diamètre) à celui de « bacille » (bâtonnet de 5 à 6 µm de longueur) et vice-versa selon les conditions environnementales¹⁰. Suite à ses travaux sur le bacille du charbon et sur le bacille responsable de la tuberculose (qui porte son nom), Koch établit quatre principes nécessaires à la mise en évidence d'un lien de cause à effet entre un agent pathogène et une maladie. Ces postulats dits de Koch vont poser les bases de la microbiologie médicale.

Quelques années plus tard, en 1879, Jacques Chamberland, alors directeur-adjoint du laboratoire de Louis Pasteur, observe au cours de ses travaux l'existence d'un état réfractaire chez les animaux guéris d'une première atteinte du charbon ou d'une inoculation antérieure. Par la suite il développera une souche à virulence atténuée de *B. anthracis* par culture à 42 °C, induisant une forme bénigne de la maladie qui entraîne cet état réfractaire : c'est le principe de l'immunisation. En 1881, Louis Pasteur assisté des médecins Roux, Chamberland et Joubert démontre l'efficacité du vaccin atténué lors de l'expérience dite de Pouilly-le-Fort (cf. Figure 1). Ils montrèrent que l'immunisation permettait à un troupeau de moutons infectés par une souche pleinement virulente de résister à l'infection alors que les animaux non vaccinés meurent rapidement^{11,12}. Ce fut un des premiers grands succès de la vaccination, pavant la voie à son formidable développement au cours des décennies suivantes et jusqu'à nos jours. Suite à ces expériences, des campagnes massives de vaccinations furent réalisées afin de protéger le bétail dans les zones où le charbon était endémique. Ce vaccin fut toutefois reconnu par la suite comme étant susceptible de provoquer la maladie chez certaines espèces¹³.



Figure 1. Expérience de Pouilly-le-Fort en 1881. Dessin de Damblas 1922, © Institut Pasteur.

En 1890, Ilya Metchnikoff décrit les mécanismes de chimiotactisme et de phagocytose par l'observation de la capture de spores de *B. anthracis* par des cellules sanguines qu'il nomme « macrophages », mécanismes à la base de la théorie de l'immunité cellulaire¹⁴.

Ce n'est qu'au XX^{ème} siècle que des chercheurs se penchent sur l'étude du pouvoir pathogène du bacille du charbon et mettent en évidence la présence d'une capsule entourant la bactérie. Ils émettent également l'hypothèse que la bactérie produit chez l'hôte des « agressines »^{15,16}. En 1936, Max Sterne isole une souche acapsulée stable. Cette souche ayant une virulence atténuée, il démontre le rôle essentiel de la capsule comme facteur de virulence^{17,18}. Cette souche est encore utilisée à l'heure actuelle dans la vaccination du bétail. Cependant les souches acapsulées ne sont pas totalement dépourvues de virulence, et elles impliquent en fait d'autres « agressines ». C'est à Harry Smith que revint la découverte et la caractérisation de la nature et de l'activité de ces toxines^{19,20}. Il montra que *B. anthracis* est capable de sécréter deux toxines binaires, appelées toxine œdémateuse (car conduisant à la

formation d'œdèmes sur les membres infectés) et toxine létale (car provoquant la mort de l'hôte après infection intraveineuse, cf. Chapitre 1 pour une description de ces toxines).

Le XX^{ème} siècle a vu le développement de plusieurs vaccins vétérinaires, notamment aux Etats-Unis dans les années 1950²¹⁻²⁵. Ces vaccins ont toutefois des effets secondaires rédhibitoires pour une utilisation généralisée ainsi qu'une efficacité discutée²⁶⁻³⁰.

Depuis quelques dizaines d'années, les recherches sur *Bacillus anthracis* connaissent un regain d'intérêt. Au-delà de l'apparition sporadique de la maladie au sein des troupeaux et de quelques cas humains (notamment très récemment chez des toxicomanes, cf. Chapitre 1), le bacille du charbon est classé par le *Center for Disease Control* américain comme agent de catégorie A, c'est-à-dire représentant un risque majeur d'utilisation bioterroriste au même titre que le botulisme, la peste, la variole, la tularémie et les virus des fièvres hémorragiques³¹. En effet, durant la Guerre Froide, les Etats-Unis et l'Union Soviétique entretenaient des programmes secrets de recherche sur son utilisation à des fins militaires. En 1969 les Etats-Unis abandonnent le programme sous l'impulsion de Richard Nixon. La convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes biologiques est signée à Moscou, Londres et Washington par 22 gouvernements, y compris l'URSS et les Etats-Unis, le 10 avril 1972 et entre en vigueur en 1975. Cependant, en 1979, une usine de production d'armes biologiques explose à Sverdlovsk (aujourd'hui Iekaterinbourg) en URSS, prouvant la violation de la convention par l'URSS. Cet accident quelquefois surnommé « Tchernobyl biologique »³² a produit une épidémie aux alentours de la ville, causant la mort d'une centaine de personnes.

En 2001, aux Etats-Unis, des attaques bioterroristes sont perpétrées par l'envoi de lettres contenant des spores de *B. anthracis* à des personnalités américaines, causant 11 cas de charbon d'inhalation dont 5 décès. Plus généralement, la facilité d'accès à certains agents pathogènes, associée aux progrès réalisés en génétique et en biologie moléculaire, ne fait qu'accroître la menace bioterroriste³³.

Le risque civil et militaire que représente la maladie du charbon, dont la physiopathologie comporte de nombreuses zones d'ombre nonobstant les

découvertes cruciales qui furent faites grâce à son étude, justifie à l'heure actuelle les recherches effectuées par l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), antenne du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées de La Tronche. En particulier, l'équipe « Interactions Hôte-Agents Pathogènes » dirigée par le Professeur Jean-Nicolas Tournier s'est équipée en 2009 d'un laboratoire d'imagerie multiphotonique destiné à investiguer les relations complexes existant entre *Bacillus anthracis* et le système immunitaire pulmonaire. C'est dans ce cadre et en collaboration étroite avec les Docteurs Julien Douady et Jean-Claude Vial du Laboratoire Interdisciplinaire de Physique de Grenoble (UMR 5588 CNRS / Université Joseph Fourier Grenoble 1) que j'ai effectué de 2010 à 2013 mes travaux de thèse de doctorat en Physique pour les sciences du vivant, thèse qui s'intitule « Apports de la microscopie biphotonique intravitale pulmonaire à l'étude de la physiopathologie de la maladie du charbon ».

Chapitre 1

Bacillus anthracis et maladie du charbon

1.1 Introduction

Bacillus anthracis est une bactérie à Gram positif appartenant à la famille des *Bacillaceae* regroupant les bactéries capables de sporulation des genres *Bacillus* et *Clostridium*³⁴. Son origine remonterait entre 13000 et 26000 ans³⁵.

En 1946, une classification des *Bacillus* a été proposée par Smith *et al.*, basée sur la forme de l'endospore et la déformation du corps bacillaire qu'elle occasionne³⁶. Selon cette classification toujours en vigueur, *B. anthracis* appartient au groupe *B. cereus* qui fait lui-même partie d'un groupe d'espèces dont les spores en position centrale ne sont pas déformantes. Les autres espèces de ce dernier groupe sont *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides* et *B. weihenstephanensis*^{37,38}. Le groupe des *B. cereus* est phénotypement et génétiquement hétérogène, mais les différentes espèces qui le composent peuvent être phylogénétiquement mixées au niveau chromosomique.

Les phénotypes majeurs des espèces du groupe *B. cereus* sont portés par des plasmides³⁹. *B. anthracis* en possède deux : pXO1 et pXO2, contenant les gènes codant pour les facteurs de virulence.

La première partie du présent chapitre dresse le portrait de *Bacillus anthracis* à travers ses propriétés morphologiques et écologiques et ses liens avec les facteurs de virulence. La pathogénie du bacille sera évoquée en seconde partie à travers la description physiopathologique des formes naturelles du charbon. La forme injectionnelle provoquée sera également évoquée en tant qu'épidémie actuelle.

1.2 *Bacillus anthracis*

1.2.1 Caractéristiques morphologiques : bacille et spore

Au cours de son cycle naturel, *B. anthracis* existe sous deux formes bien distinctes : la spore, résistante et infectieuse, et le bacille, forme végétative qui permet la

sécrétion des toxines et la multiplication de la bactérie (cf. référence [40] pour une revue).

B. anthracis sous sa forme bacillaire mesure de 1,0 à 1,2 μm de diamètre pour 3 à 8 μm de longueur⁴¹, immobile et capsulé. Les bacilles se présentent sous une forme isolée ou en chaînettes, leur donnant l'aspect de « cannes de bambou » (cf. Figure 2). La bactérie a une croissance optimale en conditions aérobie ou anaérobie, à une température comprise entre 30 et 37 °C et à un pH compris entre 7 et 7,4. Sur milieu riche, la bactérie forme des colonies larges, plates, rugueuses et à bords dentelés alors qu'en milieu enrichi en sérum et en présence de bicarbonate et de CO₂, les colonies deviennent petites, lisses et brillantes.

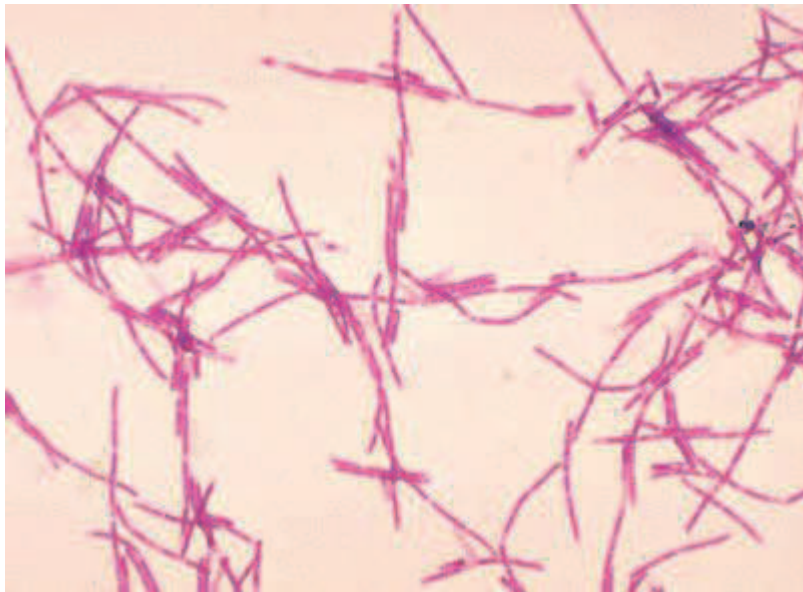


Figure 2. Forme végétative de *Bacillus anthracis* en "cannes de bambou". © Public Health Image Library.

Sous sa forme végétative, le bacille est constitué, de l'intérieur vers l'extérieur⁴² :

- 1) d'une membrane cytoplasmique (*m* sur la Figure 3) qui pourrait influencer la résistance aux peptides antimicrobiens⁴³ ainsi que la régulation et la synthèse des toxines⁴⁴ ;

- 2) d'une couche de peptidoglycane (*P* sur la Figure 3) associés à divers polymères et protéines, assurant l'intégrité cellulaire ;
- 3) d'un réseau cristallin appelé *S-layer* (*S* sur la Figure 3), exerçant une fonction de protection et intervenant au niveau de l'adhésion cellulaire et du transfert d'ions et de molécules ;
- 4) d'une capsule (*C* sur la Figure 3) constituée d'un polymère d'acide γ -D-glutamique, jouant un rôle dans la pathogénicité de la bactérie, qui lui permettent de résister à la phagocytose et ainsi de pénétrer les défenses de l'hôte, mais aussi de coller à l'endothélium vasculaire, notamment hépatique⁴⁵.

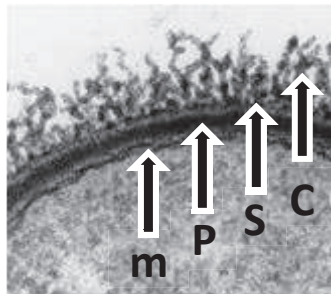


Figure 3. Les différentes couches composant la surface cellulaire de *B. anthracis* sous sa forme végétative vues en microscopie électronique. m : membrane, P : peptidoglycane, S : surface-layer, C : capsule. Adapté de la référence [46].

La bactérie est capable de former des endospores en conditions spécifiques : carence nutritionnelle, aérobic et température comprise entre 18 et 42 °C. Le processus de sporulation des bactéries du genre *Bacillus* se décompose en 7 stades nécessitant en tout 6 à 8 heures^{47,48}. La cellule végétative qui donnera naissance à la spore représente le stade 0. Le premier stade correspond à la réplication de l'ADN des deux chromosomes et à leur ségrégation polaire. Au cours des stades II et III, une division cellulaire asymétrique conduit à la formation de deux compartiments cellulaires inégaux. Le plus petit est la pré-spore localisée à un pôle de la bactérie, et le plus grand correspond à la cellule mère ou sporange. A partir de ce stade, les deux compartiments possèdent leur propre matériel génétique et leur propre devenir. Les stades IV à VI correspondent à une succession d'apposition d'enveloppes autour

de la pré-spore jusqu'à maturation complète de cette dernière. Ils donnent naissance à la spore avec ses propriétés de résistance à la chaleur, aux rayonnements et à une variété d'agents chimiques. Finalement, au stade VII, des enzymes lytiques détruisent le sporange ce qui permet la libération de la spore présentant une forme ovoïde et mesurant environ 1 à 2 μm de diamètre (Figure 4).

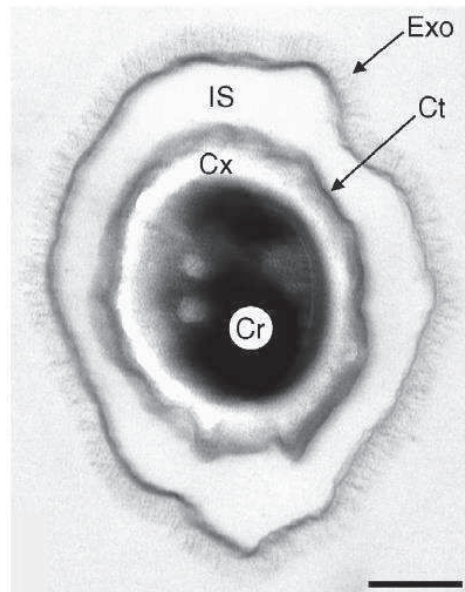


Figure 4. Spore de *Bacillus anthracis* vue en microscopie électronique.
Barre d'échelle : 700 nm. Kari Severson, Loyola University Medical Center.

Le noyau ou *core* (*Cr* sur l'image de la Figure 4) est le compartiment le plus interne de la spore et contient l'unique chromosome et les deux plasmides de la bactérie. Un complexe de protéines appelées *small acid-soluble proteins* (SASP) permet la cohésion mécanique de ce noyau⁴⁹. L'interaction entre l'ADN et les SASP, ainsi que la présence de fortes concentrations d'acide calcique dipicolinique et d'autres ions permettent la résistance du matériel génétique aux rayonnements ultraviolets ainsi qu'aux fortes chaleurs.

Une membrane entoure le noyau. Cette membrane est elle-même entourée d'une couche de peptidoglycane appelée *cortex* (*Cx* sur la Figure 4). Le rôle principal de cette membrane et du cortex est de garder le noyau intact et au sec⁵⁰.

Une multicouche protéique inhomogène appelée manteau ou *coat* (*Cf* sur la Figure 4) entoure le cortex. Le manteau agit comme une barrière moléculaire permettant de protéger la spore contre les agents chimiques ou enzymatiques^{51,52}.

La structure externe de la spore de *B. anthracis* est une coquille protéique appelée exospore (*Exo* sur la Figure 4), séparée du manteau par l'*interspace* (*IS* sur la Figure 4) au contenu encore inconnu. L'exospore est composé de protéines, lipides et carbohydrates⁵³. Les protéines de surface de l'exospore sont l'objet de récentes études en raison de leur utilisation en tant que candidats vaccins⁵⁴. Une vingtaine de protéines composent l'exospore et sont suspectées d'avoir des rôles importants dans les interactions avec l'environnement. C'est le cas notamment de BclA (*Bacillus collagen-like protein of anthracis*), une glycoprotéine *collagen-like* dont le domaine C-terminal contient les épitopes immunodominants de la spore^{55,56}. Il est également à noter que BclA joue un rôle dans l'infection par son effet sur l'adhésion aux macrophages et à la surface des cellules de l'hôte *via* les intégrines CD11b/CD18^{57,58}.

1.2.2 Cycle naturel

B. anthracis est une bactérie tellurique, c'est-à-dire qui se trouve naturellement dans le sol. Les spores, forme infectante de la bactérie, peuvent persister durant de nombreuses années dans le sol (potentiellement à des échelles de temps géologiques⁵⁹) jusqu'à ce qu'un bouleversement les fasse remonter à la surface où elles pourront être ingérées, notamment par les herbivores. Au sein de l'hôte les spores entrent en phase de germination pour donner naissance à la forme végétative de la bactérie. Les bacilles prolifèrent et synthétisent les facteurs de virulence que sont la capsule (*cf.* partie 1.2.4) et les toxines (*cf.* partie 1.2.5) qui conduisent *in fine* au décès de l'hôte conséquent à une septicémie associée à une toxémie (*cf.* partie 1.3). Après la mort de l'animal, le sang « charbonneux » noir ne coagule pas et se répand sur le sol *via* les orifices naturels. Les bacilles se trouvent alors au contact de l'air et la plupart sont lysés en quelques jours, mais une proportion d'entre eux

entame le processus de sporulation⁶⁰. Les spores alors produites peuvent commencer un nouveau cycle infectieux au contact d'un nouvel hôte. L'infection récurrente d'animaux sur certains sites leur vaut la dénomination de « champs maudits », car c'est le sol contaminé par les spores qui constitue le réservoir de *B. anthracis*.

Hormis les herbivores malades dont les excréments contiennent des germes, les carnivores et les prédateurs participent souvent à la dissémination des spores. Certaines espèces comme les tiques et les moustiques pourraient également participer au transport et à l'inoculation de spores aux animaux sains et à l'Homme⁶¹⁻⁶³. Toutefois, c'est principalement par contact avec des animaux, de la laine ou des peaux, ou par ingestion de viande contaminée que l'Homme contracte la maladie du charbon (*cf.* Figure 5).

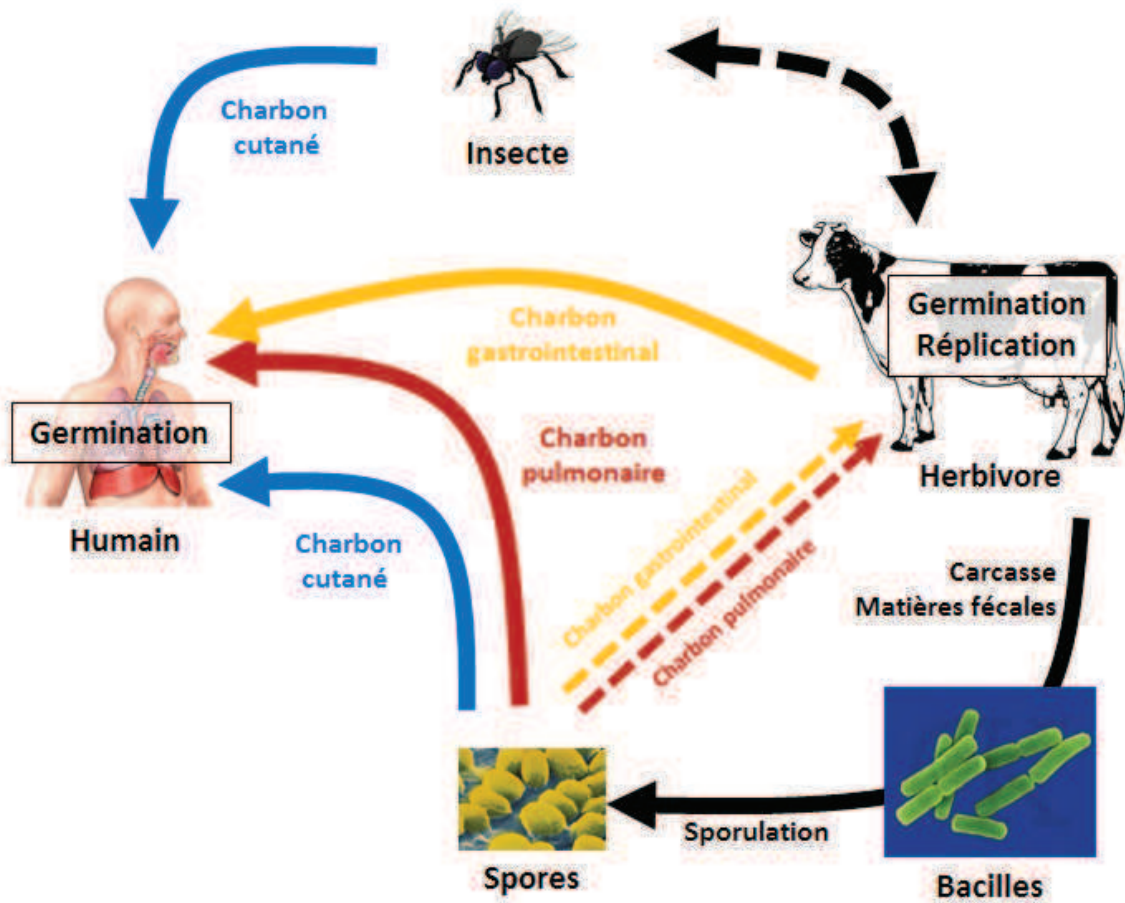


Figure 5. Cycle biologique naturel de *B. anthracis*.

1.2.3 Ecologie

De nombreux paramètres sont à même d'influencer les relations entre *B. anthracis* et l'environnement. La pluie et le vent peuvent directement disséminer les spores sur de longues distances, mais le climat peut également jouer sur le nombre d'insectes vecteurs de la maladie, la quantité et la qualité des pâturages, la santé et la fertilité des animaux susceptibles de servir d'hôtes. Les conditions climatiques peuvent également altérer l'état de santé des animaux et la capacité de leur système immunitaire à lutter contre l'infection. De plus, les variations climatiques influencent la capacité de *B. anthracis* à sporuler ou germiner. Des travaux très récents ont mis en évidence le rôle du matériel organique constituant l'exospore dans la capacité de la spore à adhérer à différents types de sol, favorisant l'adhérence à des sols favorables à la persistance du pathogène⁶⁴.

La maladie du charbon est le plus souvent rencontrée dans les régions au climat chaud, bien que des régions proches du cercle arctique (Canada, Sibérie) soient connues pour abriter le pathogène probablement en raison des conditions d'ensoleillement estival favorable à la sporulation⁶⁵. Néanmoins en présence de températures trop faibles ou trop fortes et non associée à des conditions d'humidité favorables la sporulation ne se produit pas dans des conditions optimales, rendant la forme végétative après germination fragile et mal adaptée à sa survie. L'effet de la température mais aussi du taux d'humidité joue donc un rôle prépondérant sur la sporulation⁶⁶, pouvant servir à prédire la présence de *B. anthracis* ou sa résurgence dans un environnement donné.

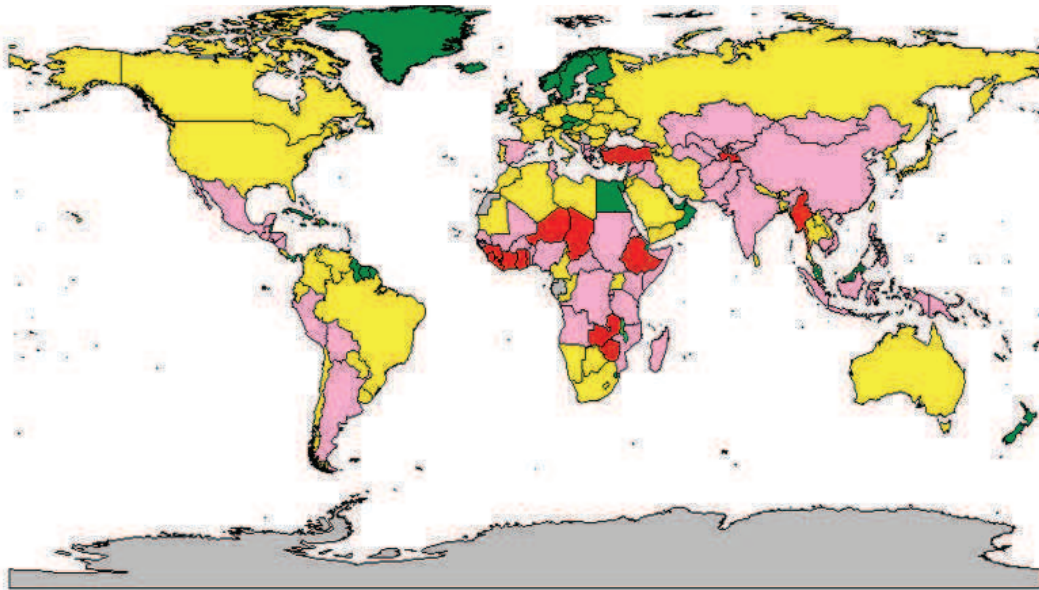


Figure 6. Distribution géographique et fréquence des cas de charbon (2003). Rouge : hyperendémique. Rose : endémique. Jaune : sporadique. Vert clair : probablement non concerné. Vert : non concerné. Gris : inconnu. Extrait de la référence [67].

Si la maladie du charbon n'a plus un impact majeur dans les pays développés, quelques foyers sont susceptibles d'apparaître occasionnellement. Ainsi, deux foyers ont été signalés en France au cours de l'année 1997 : l'un dans le Béarn (mort de 21 vaches dans 9 élevages, trois cas humains secondaires, un cas chez un chien) et l'autre en Savoie (mort d'une quarantaine de bovins, pas de cas humains)⁶⁸. En 2009, trois cas de charbon cutané humain ont été déclarés à Metz (France)⁶⁹. Dans les cheptels des pays d'Asie, d'Afrique subsaharienne et d'Amérique du sud, l'infection est endémique (cf. Figure 6). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime entre 100 000 et 200 000 le nombre de cas humains par an⁷⁰.

Les risques de voir apparaître des cas de charbons chez l'homme et chez l'animal dans les pays développés sont liés à plusieurs causes⁷¹ :

- vétérinaire : abandon de la vaccination animale dans certaines régions, méconnaissance de la maladie par certains vétérinaires et éleveurs, réintroduction de rapaces comme les vautours, insensibles au charbon mais capables de disséminer des spores ;

- économique : non-recherche de la cause de mort d'animaux dans un cheptel, non-enlèvement des carcasses par l'équarisseur lors de mort par cause inconnue, non-enlèvement des carcasses de petits ruminants ;
- sociale : reprise des abattages clandestins avec consommation familiale de la viande, reprise des enfouissements clandestins, oubli de l'emplacement des « champs maudits » ;
- terroriste : utilisation de *B. anthracis* comme arme biologique par des organisations terroristes⁷².

B. anthracis produit deux facteurs majeurs de virulence sous sa forme végétative : une capsule et deux toxines, la toxine létale (LT, *lethal toxin*) et la toxine œdémateuse (ET, *edema toxin*).

1.2.4 Premier facteur de virulence : la capsule

La synthèse de la capsule, formée d'un polymère d'acide poly-γ-D-glutamique (PGA), est gouvernée par l'opéron *capBCADE* situé sur le plasmide pXO2. Le PGA consiste en une longue chaîne polypeptidique (50 à 200 kDa) polymérisée *via* des liaisons amines entre le γ-carboxylate et les groupes α-amines des monomères adjacents⁷³. Les enzymes de synthèse du PGA sont codées par les gènes *cap* (*capB*, *capC*, *capA* et *capE*) et par le gène *dep* (ou *capD*)⁷⁴. Les rôles de ces gènes ont été déterminés par analyse biochimique *in vitro* et par comparaison de séquences avec leurs homologues retrouvés chez *B. subtilis* (respectivement PgsB, PgsC, PgsAA et PgsE). PgsB et PgsC semblent former un complexe exerçant une activité polymérase, alors que le complexe PgsAA-PgsE paraît effectuer la fonction de transport de glutamate. CapD a pour rôle de catalyser la liaison covalente entre le poly-glutamate et le peptidoglycane et est donc impliqué dans la régulation de la taille de la capsule⁷⁵.

Cette capsule est singulière car les capsules bactériennes sont généralement polyosidiques. Une deuxième particularité est qu'elle est composée de polymères linéaires présentant l'énantiomère D-glutamate uniquement, ce qui la rendrait peu immunogène^{76,77}. De plus, les liaisons γ du PGA de *B. anthracis* le rendent résistant aux protéases qui ne clivent que les liaisons α -aminées des protéines⁷⁸. *In vivo*, la capsule permet donc à la bactérie de résister à la phagocytose et d'échapper au système immunitaire^{75,79}. En plus de ses effets inhibitoires sur les interactions avec le système immunitaire, la capsule joue un rôle important dans le piégeage de la bactérie, notamment dans le foie, au niveau de l'endothélium vasculaire⁴⁵.

Des concentrations de l'ordre de 1 à 2 mg/mL de PGA sont retrouvées dans le sérum après infection⁸⁰. Alors que chez *B. anthracis* le PGA est majoritairement ancré à la surface de la bactérie, les molécules de poly-glutamate sont complètement relarguées dans le milieu extracellulaire lors d'une infection par *B. subtilis*⁷⁸.

Ces molécules libres de PGA seraient impliquées dans la régulation de la formation des pré-pores de PA et donc de l'internalisation des toxines dans les cellules cibles⁸¹ (cf. paragraphe 1.2.5.2).

Une élimination du plasmide portant les gènes de synthèse de la capsule diminue la virulence de la bactérie chez les herbivores et l'Homme : c'est le cas notamment de la souche Sterne utilisée comme vaccin vétérinaire et humain dans certains pays, ainsi que dans nos travaux expérimentaux présentés dans les chapitres 5 à 7 de cette thèse.

1.2.5 Second facteur de virulence : les toxines

1.2.5.1 Présentation des toxines

Les toxines du charbon sont de type A/B où la sous-unité A (*activity*), représentée par les facteurs œdématogène (EF pour *edema factor*, 89 kDa) ou létal (LF pour *lethal factor*, 90 kDa), exerce l'activité enzymatique de la toxine, alors que la sous-

unité B (*binding*), représentée par l'antigène protecteur (PA pour *protective antigen*, 83 kDa), se lie aux récepteurs membranaires. Ces trois facteurs sont codés génétiquement sur le plasmide pXO1 par les gènes *lef* (LF), *cya* (EF) et *pagA* (PA).

L'action toxique d'une injection du **facteur léthal** LF associé à PA a été testée et reconnue sur les modèles animaux dans les années 1960^{20,82}. Il a été montré que la toxine participe à la virulence puisqu'une souche mutée pour le gène codant LF est beaucoup moins virulente chez la souris que la souche parentale Sterne⁸³. Il a aussi été montré qu'une injection de 100 µg de LT par voie intraveineuse (i.v.) ou intrapéritonéale (i.p.) chez la souris induit des lésions de type hypoxique et la mort sans syndrome inflammatoire⁸⁴. De même chez le rat, la mort induite par l'injection i.v. de 100 µg de LT ne résulte pas de la sécrétion de cytokines mais d'une hypotension⁸⁵.

Une injection sous-cutanée du **facteur œdémogène** EF associé à PA, formant la toxine œdémateuse, induit la formation d'un œdème⁸⁶ expliquant l'étymologie de son nom. Une étude a démontré que ET s'avère hautement létal à plus faible concentration et plus rapidement que LT dans un modèle murin⁸⁷. Ainsi ET induit de nombreuses lésions associées à la maladie du charbon. Ces lésions, différentes de celles induites par LT, comprennent une hémorragie des ganglions lymphatiques et du tractus gastro-intestinal ainsi qu'une nécrose de nombreux tissus dont les organes lymphoïdes, la moelle osseuse, le cœur et les reins⁸⁷.

1.2.5.2 Mécanismes d'endocytose des toxines

EF et LF pénètrent la cellule en se liant à des récepteurs spécifiques selon deux mécanismes possibles⁸⁸ : par la formation d'un complexe associant PA à LF et/ou EF ayant lieu à la surface de la cellule cible (*cf.* Figure 7) ou après endocytose d'un complexe quasiment similaire s'étant préalablement formé dans le plasma extracellulaire. S'en suivent alors les phases d'internalisation et de translocation membranaire (*cf.* Figure 7).

1) Liaison

La première étape consiste donc en la fixation du PA₈₃ aux récepteurs cellulaires spécifiques : ANTXR1, aussi connu sous le nom TEM-8 pour *Tumor Endothelial Marker-8*, et ANTXR2 (ou CMG2 pour *Capillary Morphogenesis protein 2*)^{89,90}. Les deux récepteurs TEM-8 et CMG2 sont naturellement exprimés notamment par les cellules endothéliales et se lient à des protéines de la matrice extracellulaire^{91,92}. De ces deux récepteurs, CMG2 jouerait un rôle prépondérant dans l'internalisation des toxines par rapport à TEM-8⁹³.

La fixation du PA sur l'un ou l'autre de ces récepteurs est suivie du clivage du PA en deux sous-unités de 63 et 20 kDa par une protéine de type furine. Un pré-pore est généré par l'heptamérisation⁹⁴ ou moins fréquemment l'octamérisation^{88,95-97} des sous-unités PA₆₃ et est redistribué à la surface cellulaire vers des régions riches en cholestérol appelées radeaux lipidiques.

Un autre mécanisme de formation du pré-pore coexiste. Il résulte de l'association de 8 unités PA dans le plasma extracellulaire sous l'action de protéases plasmatiques, formant un octamère^{88,95-97} sur lequel se fixe 3 unités EF et/ou LF.

Kintzer *et al.* ont montré en 2012 que les molécules de PGA libres ou présentes sur la capsule de *B. anthracis* agissent comme un ligand régulant la formation des oligomères de PA sur lesquels se fixent EF et LF^{81,98}. Lorsque la concentration en facteur LF (et probablement EF) est suffisante, les complexes toxiques sont alors relâchés de la capsule sous l'action vraisemblablement primordiale de la CapD hydrolase⁹⁹.

2) Internalisation

Le complexe toxique est ensuite internalisé par endocytose clathrine-dépendante¹⁰⁰ *via* la liaison de celui-ci sur un récepteur TEM-8 ou CMG2^{101,102}.

3) Translocation

Au niveau de l'endosome précoce, la baisse du pH provoque la translocation des facteurs EF et/ou LF dans les corps multivésiculaires intracellulaires formant l'endosome tardif¹⁰³⁻¹⁰⁸. Les corps multivésiculaires peuvent alors fusionner avec la membrane de l'endosome tardif et relarguer LF dans le cytoplasme¹⁰¹ tandis qu'EF reste associé à l'endosome tardif¹⁰⁹.

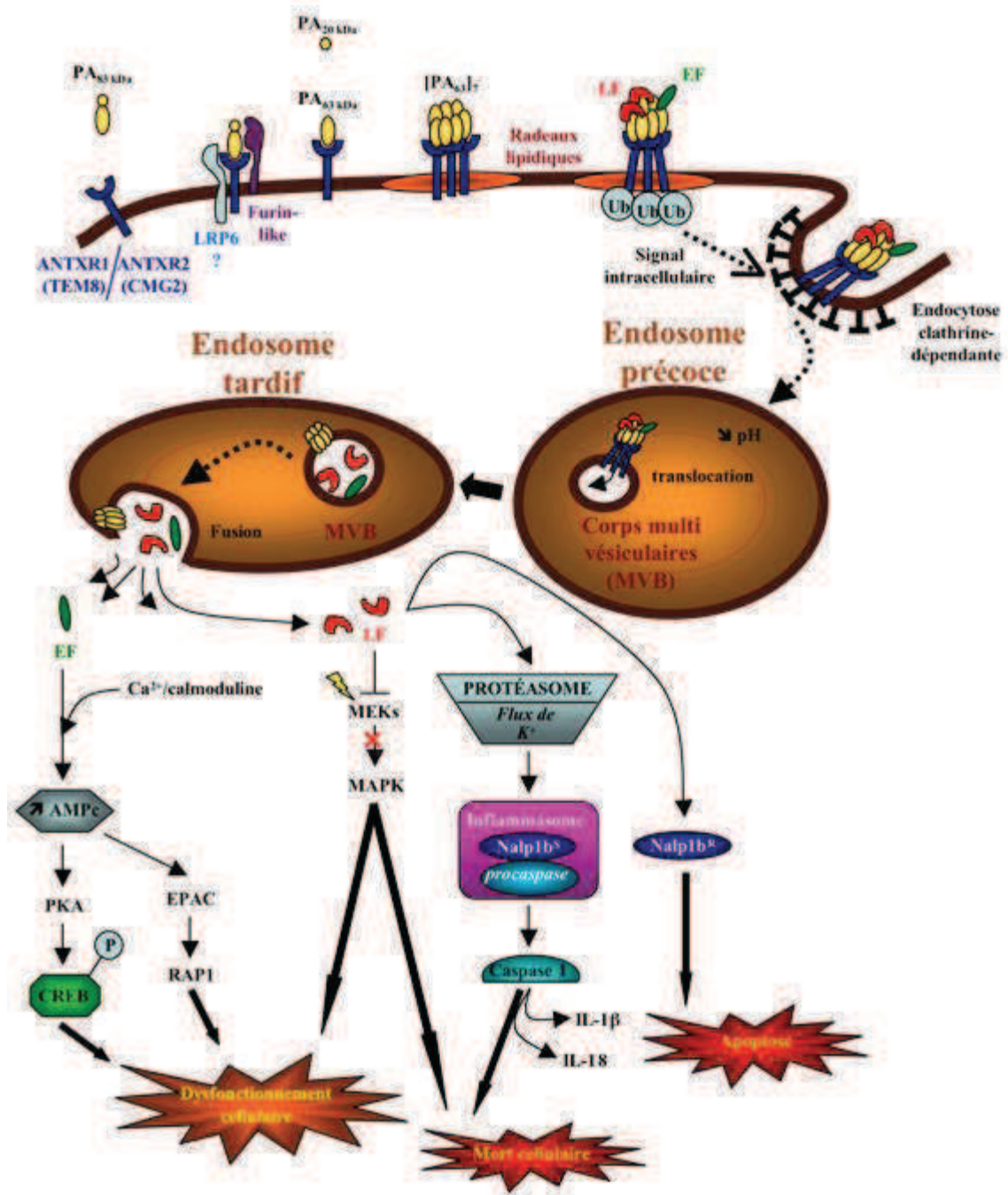


Figure 7. Schéma de formation du pore à la surface cellulaire, mécanisme d'endocytose des toxines et activité enzymatique.

Extrait de la référence [110].

1.2.5.3 Activité enzymatique des toxines

LF est une métalloprotéase à zinc¹¹¹ qui clive la partie N-terminale de certaines MAPKKs (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinases*, ou Meks) : MAPKK-1, -2, -3, -4, -6 et -7¹¹²⁻¹¹⁴ via la reconnaissance d'une région située au niveau C-terminal de celles-ci¹¹⁵. Or, la partie N-terminale des MAPKKs est essentielle à la phosphorylation des MAPKs (*MAP Kinases*). Il en résulte une dérégulation des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire ERK 1/2 (*Extracellular signal Regulated Kinases 1/2*), c-JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), p38¹¹⁶⁻¹¹⁸, mais également des voies de signalisation contrôlant l'activation et les fonctions effectrices de la réponse immunitaire^{119,120} notamment par le biais d'une sensibilité importante des macrophages à LF. Très récemment il a été montré que LF avait une activité protéasique plus large, puisqu'elle clive aussi la protéine Nlrp1b chez la souris^{121,122} et Nlrp1 chez le rat¹²³. Cette sensibilité dépend du modèle animal utilisé¹²⁴ et n'est pas pleinement comprise à l'heure actuelle, en particulier au niveau du rôle supposé du clivage des Meks¹²⁵⁻¹²⁸. Bien que les principales cibles intracellulaires de LT aient été identifiées, les conséquences de son action restent mal connues. LT exerce des effets pléiotropes sur les leucocytes, entraînant une diminution des défenses immunitaires de l'hôte. De plus, elle empêche le relargage de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les cellules dendritiques (DCs) en perturbant les voies de transduction du signal, et induit l'apoptose^{125,126,129,130}. Une fois dans le cytosol, c'est la séquence N-terminale de LF qui va déterminer sa stabilité et sa toxicité^{131,132}.

Un mécanisme primordial expliquant la cytotoxicité de LT implique le locus *Nalp1* ou *Nlrp1* (*NAcht leucine-rich repeat protein 1*) au niveau du chromosome 11 de la souris¹³³. Trois gènes orthologues *Nalp1* sont retrouvés chez la souris (*Nalp1a*, *Nalp1b* et *Nalp1c*) et seulement un chez l'Homme et un chez le rat¹³⁴. Chez la souris, *Nalp1b* a été identifié comme étant le gène contrôlant la sensibilité des macrophages à LT¹³³. *Nalp1b* est un composant clé de la voie de l'inflammasome qui entraîne la mort cellulaire chez les macrophages sensibles à LT via un mécanisme rapide appelé pyroptose. La voie de l'inflammasome est responsable du recrutement et de

l'activation protéolytique de la caspase-1, qui à son tour active les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 et induit la mort cellulaire par pyroptose¹³⁵ (cf. Figure 7). La mort des macrophages par nécrose suite à une exposition à LT requiert l'activation de la voie caspase-1. Notons toutefois que certains macrophages sont résistants à LT dans un premier temps mais finissent par succomber à l'intoxication après une période d'incubation plus longue (> 16 h)^{127,136}. Chez ces macrophages résistants la voie caspase-1 n'est alors pas activée^{133,137}. Des résultats très récents démontrent que Nlrp1b est clivé dans les deux cas, n'expliquant pas la susceptibilité à la mort cellulaire¹²¹. Enfin d'autres loci semblent être impliqués dans la susceptibilité à l'infection sur le chromosome 11 en dehors du locus Nlrp1b¹³⁸.

En plus des macrophages, les DCs sont les seules autres cellules connues à succomber à une lyse protéasome-dépendante rapide sous l'effet de LT lorsqu'elles sont porteuses d'un allèle de *Nalp1b* spécifique^{127,139}, appelé *Nalp1b^S*. LT inhibe également la sécrétion de cytokines par les DCs^{140,141}, prévient leur maturation¹³⁶ et diminue leurs capacités à la fois de présentation d'antigène et de production de facteurs participants à l'activation des lymphocytes¹⁴². Enfin, quand bien même LT ne semble pas avoir d'effet cytotoxique sur les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les lymphocytes, un arrêt de la prolifération de ces deux populations a été mis en évidence par la suppression de la voie Mek¹⁴³⁻¹⁴⁵. La question de la sensibilité des cellules épithéliales à LT¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ a été levée fin 2012 grâce à des travaux publiés par Lange *et al.* qui ont démontré l'altération par LT des fonctions de la barrière épithéliale, notamment pulmonaire, associée à une réduction de la sécrétion de surfactants pulmonaires et des réarrangements d'actine favorisant la dissémination du pathogène à des temps précoces après infection et la formation d'œdèmes à des temps plus tardifs¹⁴⁹.

EF est une adénylate cyclase calcium et calmoduline dépendante produisant une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire^{87,150-152}. L'AMPc est un second messager intracellulaire ubiquitaire jouant le rôle d'activateur enzymatique, notamment des PKA (Protéines Kinases A) et des EPACs (*Exchange Proteins Activated by cAMP*) qui phosphorylent diverses protéines et participent ainsi à la régulation des voies métaboliques où elles sont impliquées¹⁵³. Une altération de la

concentration en AMPc a des conséquences néfastes au niveau cellulaire (cf. Figure 7) et systémique.

L'effet de ET sur le système immunitaire fait l'objet de recherches depuis plusieurs dizaines d'années. En 1985, il a été montré qu'ET d'inhibe l'activité phagocytaire des PNNs humains *in vitro*¹⁵⁴. Depuis, des travaux ont montré qu'ET bloque l'activation des PNNs¹⁵⁵ et inhibe leur capacité à générer la NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced*) oxydase *via* l'augmentation d'AMPc provoquée par ET¹⁵⁶. Le rôle d'ET sur la production de cytokines (augmentation d'IL-6 et diminution de TNF- α) par les monocytes humains a également été observé¹⁵⁷, ainsi que la suppression de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T humains *in vitro*¹⁵⁸. Les DCs murines sont également altérées par ET *via* un blocage de leur sécrétion d'IL-12 et de TNF- α ¹⁴¹. En 2006, des travaux de Maldonado-Arocho *et al.* ont mis en évidence l'augmentation provoquée par ET de l'expression d'ARNm codant pour les récepteurs ANTXR-1/2 chez des macrophages murins et ANTXR-2 chez des monocytes humains, favorisant la capture des toxines¹⁵⁹. Une autre étude a révélé que ET peut inhiber l'apoptose cellulaire induite par TLR4 *via* l'activation de la PKA qui phosphoryle et active CREB (*cAMP Response Element Binding protein*)¹⁶⁰ (cf. Figure 7).

ET dérégule considérablement le chimiotactisme. En particulier, la migration spontanée des macrophages est favorisée *via* l'activation du signal AMPc, du facteur de transcription CREB et d'un gène cible de CREB (*Sdc1*) codant pour la protéine syndecan-1 (jouant un rôle au niveau de la migration cellulaire et l'organisation du cytosquelette¹⁶¹). ET peut également bloquer le chimiotactisme au niveau des cellules endothéliales *via* l'activation de deux activateurs clés EPAC et Rap1 (*Ras-related protein 1*) qui induisent des modifications du cytosquelette de ces cellules¹⁶². Le chimiotactisme des cellules de l'immunité innée et adaptative est inhibé *via* l'inhibition du signal CXCR4¹⁶³. Chez les PNNs, c'est l'altération de l'assemblage des filaments d'actine qui entraîne une dérégulation du chimiotactisme¹⁶⁴.

En raison des mécanismes précédemment décrits, ET joue un rôle important dans la virulence de la bactérie⁸³. En 2011, Dumetz *et al.* ont montré que l'infection sous-cutanée de cochons d'Inde avec une souche capsulée exprimant ET restaurait la virulence par rapport à une souche exprimant uniquement la capsule et pas les

toxines, en conduisant à une mort plus rapide des animaux¹⁶⁵. Une analyse histologique de la rate a permis de montrer que la souche sécrétant ET entraînait des lésions caractérisées par un œdème au niveau de la pulpe rouge, probablement à l'origine du nom « sang de rate » autrefois donné à la maladie du charbon. L'utilisation d'imagerie par bioluminescence a permis à cette même équipe de montrer que la progression de l'infection est modifiée en présence de la souche exprimant ET par rapport à la souche exprimant LT ou la souche non-toxinogène¹⁶⁵. En effet, avec la souche exprimant ET, les bacilles ne sont pas détectés au niveau des ganglions lymphatiques cervicaux comme c'est le cas avec les deux autres souches, alors qu'ils diffusent rapidement au niveau de la rate et des poumons. Quelques bactéries ont toutefois été dénombrées par une technique microbiologique classique, indiquant que les ganglions lymphatiques cervicaux ne sont qu'un lieu de transit dans ce cas.

Si les deux toxines de *B. anthracis* semblent chacune avoir une action intracellulaire bien spécifique, mettant notamment en déroute le système immunitaire de l'hôte infecté, leur combinaison provoque souvent des effets synergiques¹⁴¹. En effet, il a été démontré dans cet article que l'association de ET et LT altère la sécrétion de cytokines (TNF- α) par les DCs de manière non-linéaire. Cependant il a également été observé une action synergique inhibitrice. Dans ce dernier cas, soit l'action de chacune des deux toxines est inhibée mutuellement, soit l'action d'une des toxines prend le dessus sur l'autre. A titre d'exemple, alors que ET injecté seul augmente la migration spontanée des macrophages¹⁶¹, l'injection simultanée de ET et LT conduit à une diminution du chimiotactisme des macrophages en détournant le signal passant par les récepteurs aux chimiokines¹⁶³.

1.3 La maladie du charbon

Cette partie a pour objet de présenter les différentes formes de la maladie du charbon chez l'Homme et se conclut par un rapide tour d'horizon des mesures thérapeutiques utilisées dans le traitement de la maladie du charbon, et des mesures prophylactiques à travers la vaccination.

1.3.1 Formes cliniques humaines

La maladie du charbon se présente sous trois formes cliniques naturelles chez l'animal et chez l'Homme selon la voie de pénétration des spores dans l'organisme : cutanée, gastro-intestinale et pulmonaire. Une quatrième forme dite injectionnelle résulte de l'injection intraveineuse de drogues contaminées par des spores de *B. anthracis* et fait actuellement l'objet d'une épidémie en Europe de l'ouest.

1.3.1.1 Charbon cutané

La forme cutanée de la maladie du charbon touche principalement les personnes travaillant au contact de carcasses d'animaux ou de produits dérivés de leur corps dont font partie les équarisseurs, abatteurs, tanneurs et travailleurs de la laine. L'infection est le plus souvent transmise par le biais d'une plaie ou d'une piqûre d'insecte¹⁶⁶. La période d'incubation est de un à cinq jours. La majorité des lésions (60 à 90 % des cas) apparaissent au niveau des membres supérieurs (bras, mains, doigts), tandis que 6 à 30 % ont lieu au niveau du visage ou du cou. Le premier signe clinique est l'apparition d'un érythème prurigineux indolore qui évolue en un à trois jours vers une vésicule qui se rompt pour former un ulcère nécrotique, puis une escarre noire caractéristique du charbon cutané (*cf.* Figure 8)¹⁶⁷.



Figure 8. Charbon cutané chez une enfant de 9 ans. Extrait du *Dermatology Online Images Atlas*.

Environ 80 % des cas de charbon cutané guérissent spontanément même si la guérison de l'escarre peut prendre quelques semaines¹⁶⁸. Ce taux de guérison atteint 99 % sous traitement¹⁶⁹. Les complications classiques comprennent des cas d'infection bactérienne secondaire ou l'apparition de cicatrices¹⁷⁰. Un sévère œdème au niveau du visage peut également entraîner une obstruction des voies aériennes supérieures (cf. Figure 9)^{168,171-173}. La paralysie du nerf facial a également été décrite¹⁷⁴. Les complications courantes incluent méningoencéphalite, microangiopathie hémolytique anémique et dans le pire des cas la mort^{168,172,173,175}.



Figure 9. Œdème facial consécutif à une infection cutanée par *B. anthracis* chez une enfant de 12 ans en Albanie. Extrait de la référence [176].

Si les signes cliniques d'un charbon cutané peuvent être confondus avec diverses autres infections, certains indices comme l'apparition d'un ulcère indolore entouré d'une zone œdémateuse permettent toutefois d'orienter le diagnostic.

1.3.1.2 Forme gastro-intestinale et oro-pharyngée

Le charbon gastro-intestinal résulte chez l'homme de l'ingestion de viande peu cuite contaminée par des spores de *B. anthracis*. Cette forme de la maladie est peu répandue et faiblement documentée¹⁷⁷. L'infection évolue selon trois phases¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ :

- Syndrome pseudo-grippal : asthénie, fièvre, céphalées ;
- après un à trois jours : douleurs abdominales, nausées, anorexie, vomissement et diarrhées ;
- distension de l'abdomen, ascite, apparition d'escarres au niveau de la paroi intestinale (cf. Figure 10).

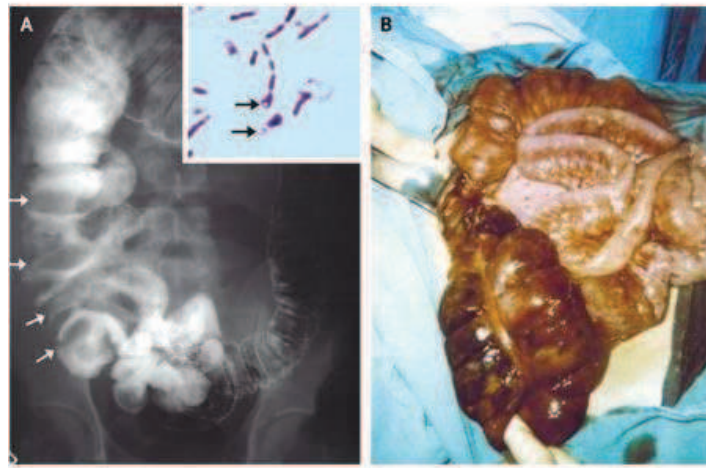


Figure 10. Forme gastro-intestinale de la maladie du charbon. Cas résultant de l'ingestion de viande de mouton contaminée. A : dilatation caecale au lavement baryté ; la photo en haut à droite montre des bacilles Gram-positifs formant des spores (flèches). B : aspect per opératoire du caecum. Extrait de la référence [180].

La mort de l'hôte peut découler de la perforation des intestins, d'une hémorragie, mais aussi des suites de l'altération de la barrière intestinale par la toxine létale qui peut provoquer une infection systémique par les bactéries entériques¹⁸¹. Bien que moins fulgurante que la forme pulmonaire, la forme gastro-intestinale est fatale dans 95 % des cas chez les herbivores sans traitement et dans 50 % des cas chez l'homme¹⁸².

Une variante de la forme gastro-intestinale, dite forme oro-pharyngée, se développe au niveau des voies aéro-pharyngées après ingestion de viande contaminée^{182,183}. Les symptômes initiaux sont un œdème cervical et une adénopathie locale pouvant entraîner dyspnée et dysphagie. L'examen de la bouche révèle généralement la présence de lésions inflammatoires (ulcérations) et un œdème asymétrique au niveau de la cavité buccale ou de l'oropharynx.

1.3.1.3 Forme pulmonaire

La forme pulmonaire du charbon résulte de l'inhalation de spores de *B. anthracis* et est à ce titre également appelée « charbon d'inhalation ». Il s'agit de la forme la plus fatale et la plus fulgurante¹⁸⁴. Après inhalation, les spores atteignent les bronchioles et les alvéoles pulmonaires. La période d'incubation, habituellement de l'ordre de un à deux jours, peut atteindre 60 jours¹⁸⁵ comme observé chez quelques patients lors de l'accident de Sverdlovsk (URSS) en 1979¹⁸⁶. C'est une maladie biphasique avec une phase prodromique mimant les effets d'un état grippal avec malaises, toux, fièvre, douleurs rétro-sternales et myalgies. Il s'ensuit une phase fulminante en l'absence de traitement due au développement d'un état septicémique et toxémique. Cette seconde phase est caractérisée par une dyspnée aiguë sévère, un épanchement pulmonaire, un état de choc et le décès en moins de 24 h (cf. Figure 11).

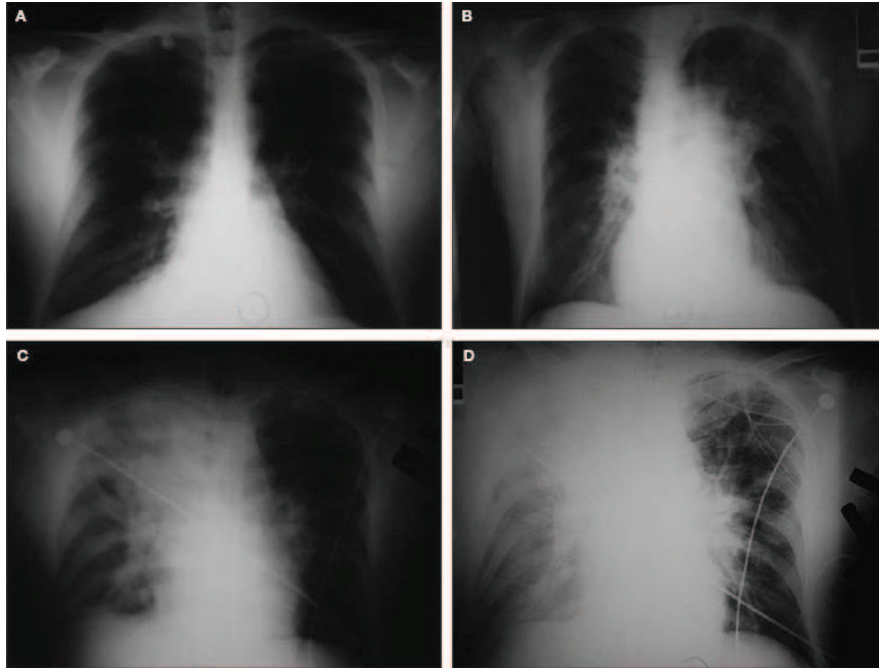


Figure 11. Radiographies pulmonaires d'un homme de 49 ans infecté par inhalation de spores de *B. anthracis*. A : présence d'une densité supra-hilaire au niveau du poumon droit. B : Augmentation des densités pré-hilaires et infra-hilaires après 24 h sans traitement. C : Apparition d'une infiltration au niveau du lobe pulmonaire supérieur droit après 3 h. D : Augmentation du lobe supérieur droit et effusions pleurales bilatérales. Le patient est décédé au cours des 4 h suivantes. Extrait de la référence [187].

Les cas humains de charbon pulmonaire étaient fréquents entre le XIX^{ème} et le début du XX^{ème} siècle chez les travailleurs de la laine et les tanneurs. De nos jours, en raison des progrès de la vaccination vétérinaire, les épidémies dues à une exposition naturelle sont relativement rares. Une revue rétrospective¹⁸⁵ a étudié les cas de charbon d'inhalation entre 1900 et 2005, pour un total de 82 patients incluant les 11 patients diagnostiqués après les événements de l'automne 2001 aux Etats-Unis suite aux attaques bioterroristes. La phase prodromique chez ces patients s'étend sur une période de 4,1 jours tandis que la phase fulminante ne dure que 1,1 jour. Il est également à noter que 38 % des patients atteints de charbons pulmonaires ont développé une leptoméningite bactérienne caractérisée par une hémorragie dite en « calotte de cardinal », signe pathognomonique du charbon d'inhalation.

Des études récentes ont montré le rôle prépondérant des NALT (*Nasal Associated Lymphoid Tissues*) dans la physiopathologie du charbon d'inhalation¹⁸⁸ (cf. Chapitre 2).

1.3.1.4 Forme injectionnelle : une épidémie en cours

Depuis le 10 décembre 2009, plus de 120 cas de charbon ont été déclarés chez l'Homme en Europe de l'ouest, principalement en Ecosse, Angleterre et Allemagne mais aussi en France (un cas à Chambéry en juillet 2012, relayé dans les médias¹⁸⁹). Ces patients ont été infectés après injection intraveineuse d'héroïne provenant d'un lot contenant des spores de *B. anthracis* pour une raison inconnue. Plusieurs dizaines de ces patients sont décédés des conséquences de l'infection (septicémie et toxémie) caractérisée par un abcès après 24 à 48 heures et une nécrose marquée des membres affectés, notamment au niveau du site d'injection¹⁹⁰⁻¹⁹⁴ (cf. Figure 12).



Figure 12. Patient atteint de la maladie du charbon après injection d'héroïne contaminée par des spores de *B. anthracis*. Extrait de la référence [190].

1.3.2 Mesures thérapeutiques

B. anthracis est sensible à de nombreux antibiotiques. La pénicilline fut longtemps l'antibiotique de choix pour le traitement de la maladie. Des souches résistantes ayant été décrites, les fluoroquinolones (ciprofloxacine, ofloxacine ou lévofloxacine) ou une tétracycline (la doxycycline) sont maintenant recommandés. La mise en application des protocoles de traitement doit se faire le plus rapidement possible

même en l'absence de signes cliniques et doit concerner toute la population exposée.

L'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) recommande une molécule de la famille des fluoroquinolones ou la doxycycline *per os* en prophylaxie de première intention chez l'adulte (pour la ciprofloxacine : 1 g/jour en deux prises). Le temps d'incubation pouvant durer 8 semaines, c'est la durée conseillée de prise du médicament en prophylaxie¹⁹⁵. Les recommandations thérapeutiques du Service de Santé des Armées sont basées sur les mêmes molécules. En thérapeutique, l'administration de ces antibiotiques est associée à un ou deux autres agents antimicrobiens tels que la rifampicine, la vancomycine, la pénicilline ou l'ampicilline.

1.3.3 Vaccins

1.3.3.1 Vaccins entiers

L'obtention d'une souche atténuée de *B. anthracis* a été essentielle pour le développement du premier vaccin vétérinaire efficace contre la maladie du charbon. Après l'expérience de Pouilly-le-Fort en 1881, un grand nombre de troupeaux étaient vaccinés en Europe et en Amérique du sud, diminuant considérablement l'impact de la maladie sur les animaux domestiques¹⁹⁶. Ce vaccin vivant était atténué par la chaleur et était constitué d'un bouillon de culture contenant des formes végétatives de la bactérie. Les vaccins atténués par la chaleur présentaient toutefois d'importantes variations de virulence entre les différents lots¹⁹⁷. De plus, les vaccins à base de bacilles s'avèrent d'une efficacité moindre par rapport à ceux à base de spores^{198,199}. Ce type de vaccin fut utilisé jusqu'en 1935, date à laquelle une nouvelle souche et un nouveau conditionnement furent mis en place.

En 1937, Max Sterne développa une souche de *B. anthracis* atténuée, acapsulée et stable. L'utilisation de ces spores comme vaccin vétérinaire fut d'une grande

efficacité et son innocuité en fait encore de nos jours le vaccin de choix pour les animaux domestiques. La virulence résiduelle de ce vaccin écarte la possibilité de son utilisation chez l'Homme, excepté pour le vaccin russe²⁰⁰.

Le vaccin russe est un vaccin à base de spores de souches atténuées et est utilisé autant chez le bétail que chez l'Homme. Il est constitué de la souche STI-1 isolée en 1940 et de la souche « n°3 » apparentée à la souche Sterne²⁰¹. L'administration chez l'Homme est réalisée par scarification ou injection sous-cutanée. Un rappel annuel est nécessaire et les deux méthodes ont montré une bonne efficacité contre la forme cutanée, mais aucune donnée concernant la forme pulmonaire ou gastro-intestinale n'est disponible (*ibid.*).

1.3.3.2 Les vaccins acellulaires

Les vaccins acellulaires sont obtenus par purification d'anticorps de surnageants de cultures de *B. anthracis*. Ces vaccins sont principalement basés sur l'obtention de la protéine PA, comme le vaccin anglais breveté en 1979³⁰. L'inoculation de PA préalablement précipité par du phosphate d'aluminium se fait par voie intramusculaire avec trois doses espacées de 3 semaines et une dose à 6 mois. Un rappel annuel est ensuite nécessaire. Des effets secondaires locaux (œdème, douleurs, érythème) et/ou systémiques notables (fièvre, malaise, syndrome pseudo-grippal) ont été relevés²⁰².

Le vaccin américain dit « AVA » (*Anthrax Vaccine Adsorbed*) fut produit pour la première fois dans les années 1960. PA est obtenu à partir du surnageant de fermentation de la souche atténuée V770-NP1-R acapsulée et non-protéolytique. Le filtrat est ensuite adsorbé sur de l'hydroxyde d'aluminium. Le protocole de vaccination comprend 3 injections par voie sous-cutanée espacées de 15 jours, puis de nouvelles injections à 6, 12 et 18 mois avec par la suite des rappels annuels. L'efficacité du vaccin a été testée sur plusieurs modèles animaux et a montré des variations notables lors d'infection par inhalation selon l'espèce et la souche utilisée^{203,204}. Des effets secondaires peuvent être observés mais restent

comparables aux effets secondaires d'autres vaccins (rougeurs, induration œdème, prurit, douleur)²⁰⁵.

Bien que les vaccins américains et anglais soient considérés relativement efficaces, ils nécessitent un protocole d'administration très lourd (plusieurs injections et rappels annuels), excluant une vaccination systématique de la population. Les efforts de recherche se dirigent donc vers l'obtention d'un vaccin efficace pour la protection contre la forme d'inhalation et autant que possible dépourvue d'effets secondaires²⁰⁶.

La plupart des vaccins en cours de développement sont à base de protéine PA recombinante²⁰⁷ (cf. référence [208] pour une revue actualisée des candidats vaccins). Certains vaccins associent PA à des anticorps de *B. anthracis* tels que des spores inactivées agissant en synergie avec PA pour augmenter le pouvoir protecteur du vaccin²⁰⁹⁻²¹¹, ou conjugué à du PGA, optimisant l'immunogénicité du vaccin²¹²⁻²¹⁶.

Chapitre 2

Anatomophysiologie pulmonaire et immunité

Le système respiratoire a pour fonction première d'assurer les échanges gazeux au niveau des capillaires permettant après transport des gaz par le réseau vasculaire l'oxygénation tissulaire, l'élimination du gaz carbonique mais aussi le maintien du pH sanguin à une valeur physiologique. Cette fonction implique l'acheminement de l'oxygène vers les poumons (inspiration) et l'expulsion du dioxyde de carbone vers l'extérieur (expiration), le tout correspondant à un phénomène appelé ventilation.

L'appareil respiratoire est composé des voies aériennes supérieures (extra-thoraciques) et des voies aériennes inférieures (intra-thoraciques). L'anatomie fonctionnelle de l'appareil respiratoire est traitée en première partie du présent chapitre, ainsi que quelques spécificités du modèle animal murin en termes d'anatomophysiologie pulmonaire.

L'appareil respiratoire et en particulier le poumon offre une très large interface entre l'organisme et l'environnement extérieur contenant des microorganismes ou particules plus ou moins toxiques. A ce titre la muqueuse pulmonaire représente une zone cruciale nécessitant un système immunitaire très spécifique dans le but de maintenir la subtile balance entre tolérance et immunité qui permet à l'organisme de vivre dans un environnement hostile tout en limitant l'inflammation. La partie 2.2 du présent chapitre a pour objet de décrire les spécificités intrinsèques du système immunitaire associé à l'appareil respiratoire et les principales cellules qui le composent. Une attention particulière sera accordée à la description des cellules dendritiques et des macrophages, deux populations cellulaires dont les interactions après infection par *B. anthracis* sont étudiées aux chapitres 5, 6 et 7.

La dernière partie de ce chapitre est dédiée à la description de deux modèles expliquant la pénétration de *B. anthracis* au niveau de l'appareil respiratoire.

2.1 Anatomie fonctionnelle de l'appareil respiratoire

2.1.1 Cage thoracique

La structure principale de la cage thoracique dont le but est à la fois de protéger l'appareil respiratoire et de permettre l'insertion de muscles est constituée d'un squelette ostéocartilagineux (côtes, sternum, clavicules, etc.) assimilable à un cylindre caractérisé par ses diamètres latéral et antéro-postérieur et à sa hauteur (cf. Figure 13) dont les modifications sous l'action des muscles respiratoires vont entraîner un changement de volume et par suite un flux d'air.

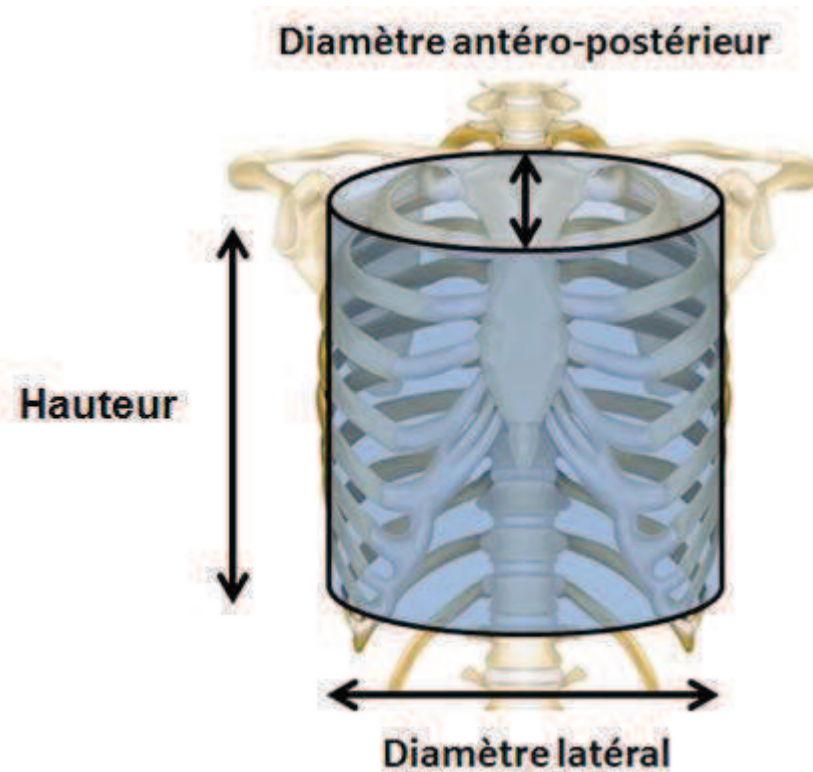


Figure 13. La cage thoracique est assimilable en termes de mécanique ventilatoire à un cylindre.

En plus du squelette, la cage thoracique est constituée de muscles, de tendons, de ligaments et de tissus adipeux qui lui confèrent ses propriétés mécaniques.

2.1.2 Voies aériennes supérieures

Les voies aériennes vont permettre à l'air du milieu ambiant de pénétrer jusque dans les alvéoles et à l'air alvéolaire d'être expulsé vers l'extérieur. Les voies aériennes sont constituées de deux étapes : les voies aériennes supérieures (VAS) constituées des fosses nasales, du pharynx et du larynx (cf. Figure 14), et les voies aériennes inférieures (VAI) dont il est question au paragraphe suivant.

Les VAS, uniquement extra-thoraciques, permettent la conduction de l'air expiré et inspiré mais jouent aussi un rôle primordial dans la défense mécanique ou immunitaire de l'organisme en étant au premier plan de l'interface avec le milieu extérieur. Outre leur rôle dans la respiration, les VAS sont indispensables à d'autres fonctions que sont la phonation et l'olfaction.

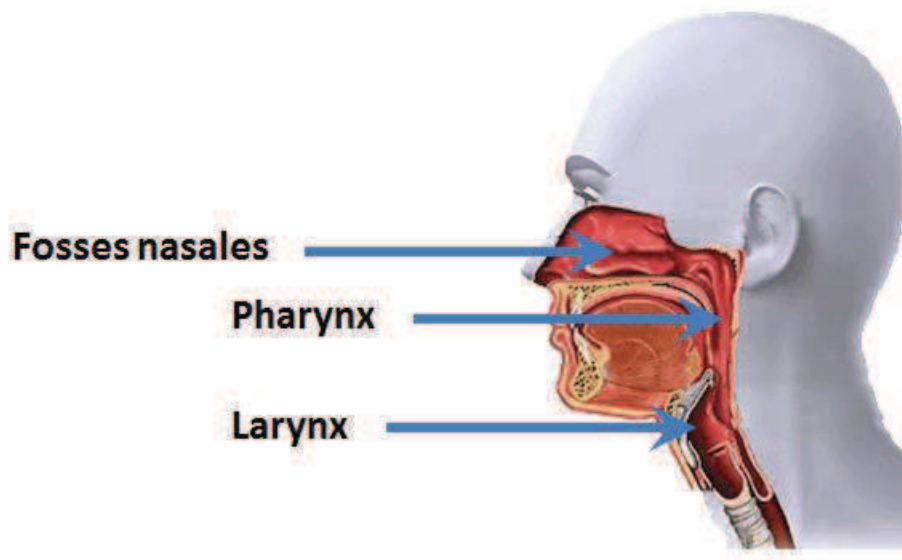


Figure 14. Les voies aériennes supérieures sont constituées des fosses nasales, du pharynx et du larynx.

Les **fosses nasales** sont constituées d'une muqueuse respiratoire très vascularisée qui contient des cellules à mucus et des cellules ciliées conditionnant l'air expiré. La muqueuse olfactive, dans la partie supérieure des fosses nasales, abrite les cellules du nerf olfactif. La muqueuse respiratoire suit les contours ostéocartilagineux en offrant une surface d'échange très importante vers le milieu extérieur permettant

ainsi des échanges thermiques, mais entraînant également une résistance au passage de l'air dont la fonction est décrite dans les paragraphes suivants.

Le **pharynx** constitué du nasopharynx, de l'oropharynx et de l'hypopharynx est un conduit musculo-membraneux situé au carrefour aéro-digestif par lequel peuvent passer de l'air ou le bol alimentaire, et est à ce titre collabable. Le pharynx ne possède pas de structure ostéocartilagineuse mais est constitué d'une vingtaine de paires de muscles squelettiques striés richement innervés.

Le **larynx** fait suite au pharynx. C'est un segment rigide des VAS constitué d'os et de cartilage reliés par des ligaments et des muscles permettant une certaine motricité et modification du calibre nécessaire à la modulation du flux respiratoire et de la parole.

2.1.3 Voies aériennes inférieures

Les VAI font suite aux VAS par la trachée, l'arbre bronchique (*cf.* Figure 15) et la zone respiratoire. La fonction principale des VAI est de conduire l'air vers les alvéoles, mais elles ont également un rôle très important dans la défense mécanique et immunitaire de l'organisme.

Les différents embranchements des VAI correspondent à des motifs géométriques remarquablement réguliers inclus dans le code génétique. La morphologie de l'arbre bronchique est en effet générée par trois schémas de branchement possibles (bifurcation rotative, plane ou orthogonale)²¹⁷ aboutissant à une structure quasi-fractale de conduction de l'air physiquement optimisée²¹⁸ aboutissant à un très grand nombre d'alvéoles pulmonaires^{219,220} au niveau desquelles ont lieu les échanges gazeux.



Figure 15. Les voies aériennes inférieures sont constituées de la trachée, de l'arbre bronchique et de la zone respiratoire comprenant les alvéoles pulmonaires. Photo du moulage de l'arbre bronchique d'un cheval. © C. Degueurce.

La **trachée** est un conduit cartilagineux composé d'une quinzaine d'anneaux, ouverts sur la partie postérieure, séparés par du tissu fibro-élastique offrant un accès chirurgical par trachéotomie permettant notamment la ventilation mécanique assistée. La paroi de la trachée est recouverte d'une muqueuse de type respiratoire comprenant des cellules ciliées et des cellules à mucus, mais aussi des glandes, artérioles, nerfs, etc.

La trachée représente la génération 0 de l'**arbre bronchique** qui en compte environ 14. Après la trachée suivent les grosses bronches (générations 1 à 7), les petites bronches (générations 7 à 10) et les bronchioles (génération 10 à 14). Ces structures sont constituées d'un épithélium respiratoire monostratifié contenant des cellules ciliées et des cellules à mucus, des cellules musculaires, du cartilage, des fibres élastiques, des tissus lymphoïdes, etc. La proportion de ces éléments varie en fonction de la topographie.

En particulier, les fibres musculaires lisses sont présentes dans la paroi de la trachée et des grosses bronches, et deviennent particulièrement abondantes au fur et à mesure des embranchements. Leur disposition devient circonférentielle autour de la lumière bronchiolaire, permettant la modification du calibre de ces voies aériennes

de conduction en se contractant. Ces fibres disparaissent au niveau de la zone respiratoire et ne sont pas présentes dans la paroi alvéolaire. Le cartilage très présent dans les fosses nasales existe sous forme d'anneaux incomplets dans la trachée et les bronches souches mais n'existe pas au-delà dans la zone respiratoire. A l'inverse, les fibres élastiques inexistantes dans les fosses nasales sont assez présentes dans la trachée et très abondantes dans les bronches et la zone respiratoire.

Après la zone de conduction de l'air inspiré et expiré se situe la **zone de respiration** participant aux échanges gazeux. Cette zone comprend les bronchioles respiratoires (générations 15 à 18, la génération 18 correspondant aux bronchioles respiratoires terminales), les canaux alvéolaires (générations 19 à 23) et finalement les alvéoles (génération 24).

La bronchiole terminale respiratoire (*cf.* Figure 16) conduit au canal alvéolaire tapissé d'alvéoles, qui débouche sur un sac alvéolaire (*cf.* Figure 17), structure sphérique dans laquelle s'ouvre un certain nombre d'alvéoles.

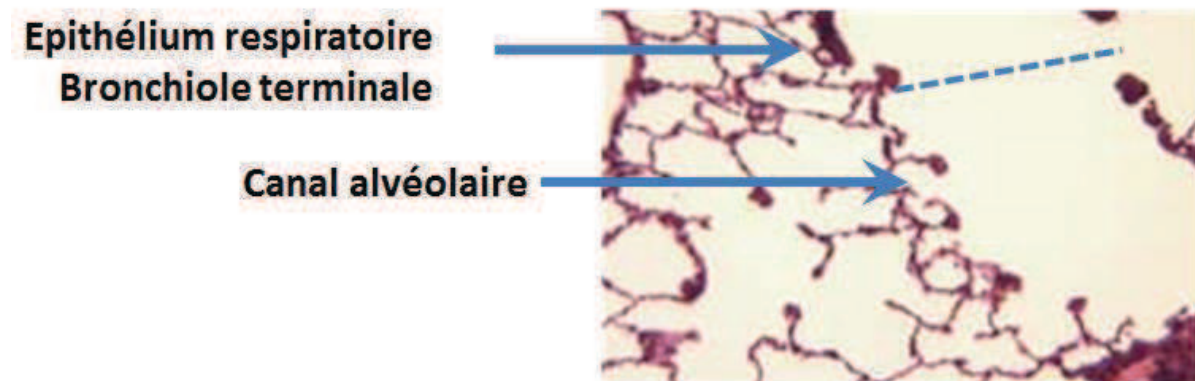


Figure 16. Coupe histologique de la zone respiratoire chez l'humain. Extrait de la référence [221].

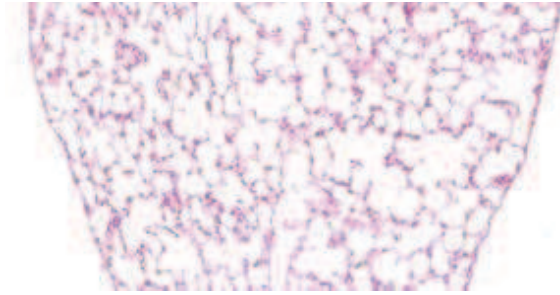


Figure 17. Coupe histologique d'un poumon de souris montrant de nombreux sacs alvéolaires. Image réalisée au CRSSA par K. Garraud et A. Cleret.

2.1.4 Parenchyme pulmonaire et alvéoles

Le parenchyme pulmonaire (*cf.* Figure 18) présente une structure spongieuse composée principalement d'air et de sang. Les canaux alvéolaires évoqués dans le paragraphe précédent débouchent sur des sacs alvéolaires contenant les alvéoles. Celles-ci sont au nombre d'environ 480 millions chez l'humain adulte²²². Leur diamètre est d'environ 300 μm . Les alvéoles présentent au total une surface alvéolo-capillaire considérable de 80 à 100 mètres carrés²²³ où ont lieu les échanges gazeux.



Figure 18. Section d'un poumon humain sain *post mortem*. Extrait de la référence [224].

Le parenchyme pulmonaire n'est toutefois pas constitué uniquement d'alvéoles. Y sont présentes les voies de conductions terminales (canaux alvéolaires), les alvéoles, les vaisseaux pulmonaires cheminant près des alvéoles, mais aussi l'espace interstitiel, ou *septa* alvéolaires, qui constitue le squelette conjonctif du poumon supportant les structures vasculaires et alvéolaires. La composition de l'espace interstitiel riche en élastine mais aussi en collagène offre la possibilité extrêmement intéressante d'être détectable en microscopie par génération de seconde harmonique grâce à sa structure non centro-symétrique dont il est question au Chapitre 3.

L'**épithélium alvéolaire** est principalement constitué de deux types de cellules appelées pneumocytes. Les pneumocytes de type I représentant 40 % des cellules épithéliales et 95% de la surface alvéolaire sont très aplatis et présentent des prolongements cytoplasmiques très fins permettant des échanges gazeux rapides entre alvéoles et capillaires (*cf.* Figure 19).

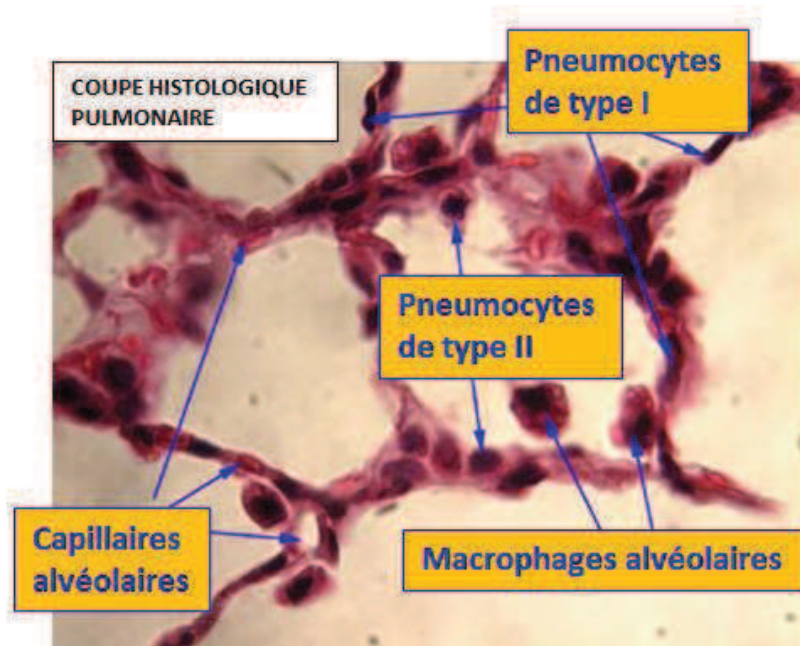


Figure 19. Coupe histologique pulmonaire. Adapté de la référence [221].

Les pneumocytes de type II (*cf.* Figure 19) ont une morphologie cubique, possédant des microvillosités au niveau de la lumière alvéolaire. Ces cellules représentent 60 % des cellules épithéliales et couvrent 3% de la surface alvéolaire. Elles sont métaboliquement actives et sécrètent le surfactant, film liquidien tensioactif qui diminue la tension superficielle à l'interface air alvéolaire/épithélium alvéolaire. Outre son rôle mécanique, le rôle biochimique du surfactant est évoqué au paragraphe 2.2.2 : Epithélium et ascenseur mucociliaire. Les pneumocytes de type II sont également des progéniteurs cellulaires de l'épithélium alvéolaire. En effet, ils peuvent se différencier en pneumocytes de type I et sont à l'origine de la régénération de l'épithélium après une lésion²²⁵.

L'épithélium alvéolaire comporte de nombreux pores reliant les alvéoles entre elles. Ces pores appelés pores de Kohn mesurent environ 8 μm de diamètre et permettent la circulation du gaz entre les alvéoles, mais aussi la circulation de liquide alvéolaire dans un certain nombre de pathologies²²⁶.

Les **capillaires** pulmonaires forment un réseau de mailles très dense longeant les alvéoles (*cf.* Figure 20 et Figure 21) et couvrant environ 75% de la surface pulmonaire. Leur rôle est principalement d'assurer les échanges gazeux en

apportant jusqu'aux alvéoles du sang veineux riche en CO₂ et pauvre en oxygène pour produire le sang artériel enrichi en oxygène et appauvri en CO₂. La paroi capillaire doit donc être mince pour favoriser les échanges gazeux et résistante pour supporter la pression intraluminale.

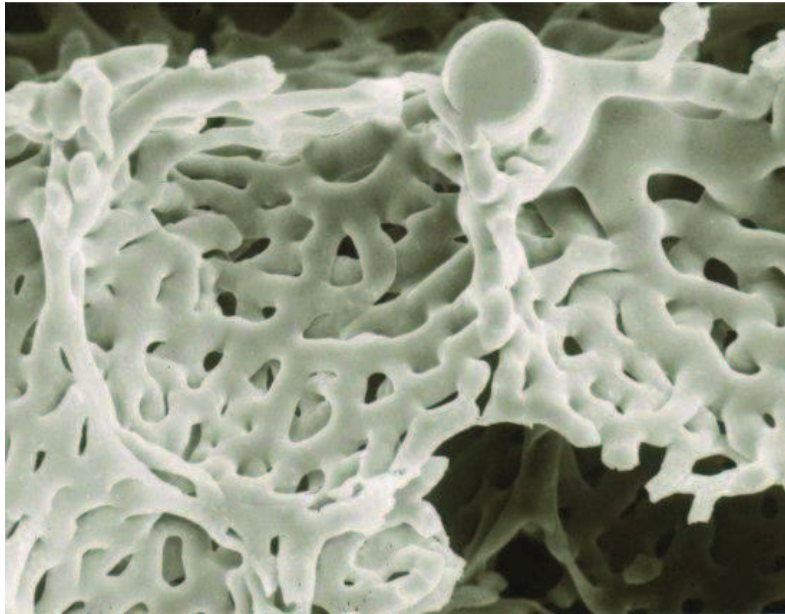


Figure 20. Image du réseau de capillaire alvéolaire après moulage, réalisée en microscopie électronique par balayage. Extrait de la référence [227].

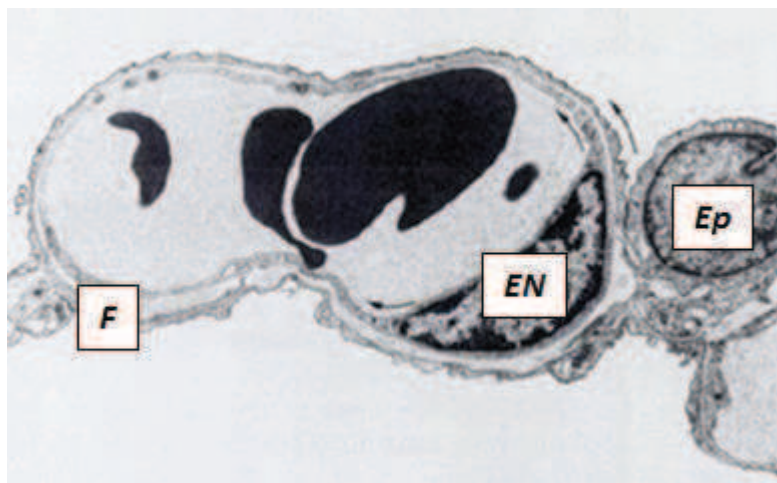


Figure 21. Capillaire alvéolaire. Mise en évidence du noyau d'une cellule épithéliale (Ep) et endothéliale (EN) et de l'espace interstitiel (F). Image extraite de la référence [228].

2.1.5 Muscles respiratoires

Les muscles respiratoires constituent le moteur principal de la ventilation pulmonaire. Il s'agit du diaphragme, des muscles intercostaux, des muscles respiratoires accessoires, des muscles abdominaux et des muscles pharyngés. La mécanique ventilatoire comportant une phase active d'inspiration et une phase généralement passive d'expiration, les muscles pulmonaires peuvent donc être classés selon leur rôle dans la ventilation.

En respiration calme, les deux muscles actifs pendant l'inspiration sont le diaphragme et les intercostaux externes. L'expiration calme étant un phénomène passif il n'y a pas de muscles actifs pendant cette phase.

En respiration ample et/ou rapide, les muscles sterno-cléido-mastoïdiens et les muscles scalènes viennent seconder le diaphragme et les intercostaux externes pour l'inspiration. Durant l'expiration, alors phénomène actif, les intercostaux internes, le muscle transverse de l'abdomen, les obliques et les grands droits permettent d'évacuer rapidement l'air par expiration forcée.

Le diaphragme est le muscle respiratoire principal. Il est constitué d'une coupole très fine s'insérant sur le pourtour de l'orifice inférieur du thorax constituant la partie inférieure de la cage thoracique, séparant la cavité thoracique de la cavité abdominale. La contraction diaphragmatique, éventuellement associée à l'activité des autres muscles évoqués ci-dessus, augmente les dimensions du cylindre modélisant la cage thoracique abordé à la Figure 13 en provoquant un flux d'air.

2.1.6 Rôle de la plèvre

Le poumon est enveloppé dans une membrane mésothéliale ou séreuse de 10 à 20 μm d'épaisseur²²⁹ appelée plèvre. La plèvre est composée de deux feuillets : la plèvre viscérale très proche des alvéoles (cf. Figure 22) recouvrant la face externe

du poumon et des grosses bronches, et la plèvre pariétale recouvrant la face externe de la cage thoracique et le médiastin (cf. schéma de la Figure 23).

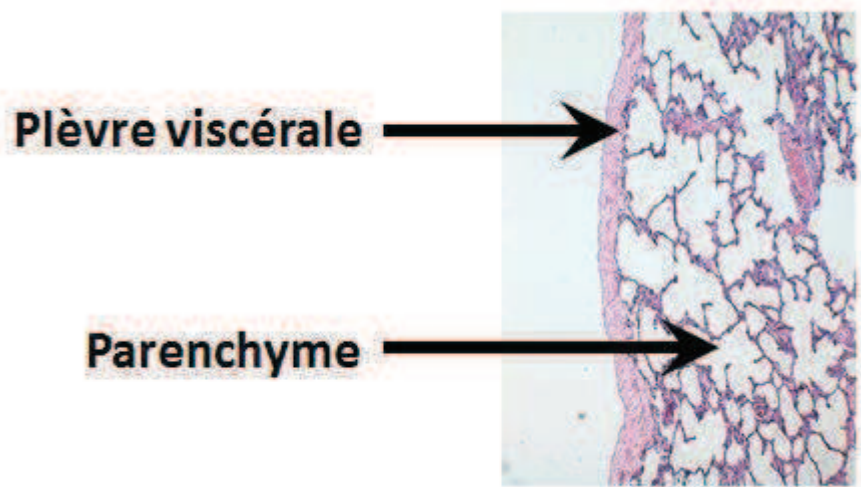


Figure 22. Coupe histologique de poumon montrant la plèvre viscérale accolée au parenchyme. Extrait de la référence [223].

La plèvre sécrète un liquide lubrifiant facilitant les frottements entre les deux feuillets au cours de la respiration. Ce liquide pleural sécrété par la plèvre est réabsorbé en permanence par les vaisseaux lymphatiques qui la recouvrent²³⁰.

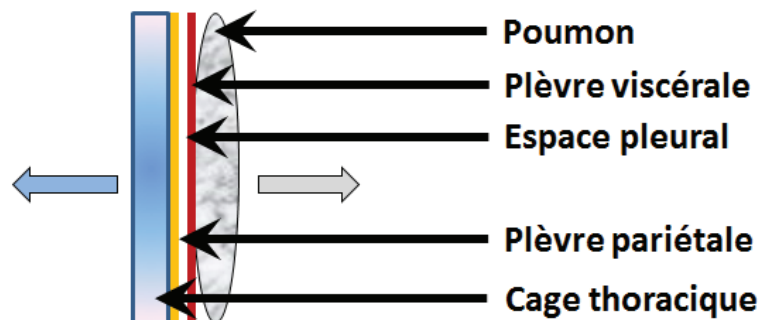


Figure 23. Schéma présentant le poumon et la cage thoracique séparés par les deux feuillets pleuraux. Les flèches grises et bleues représentent les forces exercées sur la cage thoracique par les muscles thoraciques (flèche bleue) et les forces élastiques de rétractation du poumon (flèche grise).

L'ensemble {plèvre pariétale-cage thoracique} est soumis à une pression de rétraction élastique provoquant une expansion de la cage thoracique, alors que l'ensemble plèvre viscérale-poumon est soumis à une force de rétraction élastique du poumon de direction opposée. Il résulte de ces deux forces la formation d'une dépression dans l'espace pleural, garante du maintien du contact entre les deux feuillets. Lors de la contraction des muscles durant l'inspiration, l'expansion de la cage thoracique va donc entraîner de manière indirecte l'expansion pulmonaire et l'afflux d'air.

2.1.7 Réseau lymphatique

Outre le réseau bronchique partant de la trachée et aboutissant aux alvéoles et le réseau vasculaire aboutissant aux capillaires pour former les artères à partir des veines, le poumon comporte un important réseau lymphatique.

Au niveau des capillaires sanguins se produit une transsudation du plasma depuis les vaisseaux sanguins vers le tissu interstitiel sous l'effet de la pression oncotique pour former le liquide interstitiel, appelé lymphe, dans lequel les cellules du tissu puisent une partie des substances nutritives dont elles ont besoin et rejettent leurs déchets (*cf.* Figure 24). Ce liquide interstitiel contenant d'éventuels phagocytes revient ensuite dans la circulation générale au niveau de la veine sous-clavière gauche par un réseau spécialisé, le réseau lymphatique. Ce réseau lymphatique est constitué d'un endothélium à jointures non-occlusives composé en grande partie de cellules appelées lymphangions, entouré de muscles lisses et d'un adventice liant le vaisseau au tissu environnant.

Au cours de ce trajet retour, la lymphe est filtrée dans les ganglions lymphatiques où le contrôle et le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative s'effectue grâce à la rencontre organisée entre les différents partenaires de la réponse immunitaire dans des zones spécialisées B et T. L'activation des lymphocytes T est opérée par la présentation de fragments d'antigènes peptidiques associés à des

molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II effectuée par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que différents sous-types de cellules dendritiques (DCs). Les lymphocytes T CD4 (dits auxiliaires) activés peuvent interagir avec les lymphocytes B producteurs d'anticorps et recruter et activer diverses cellules inflammatoires (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles) alors que les lymphocytes T CD8 (dits cytotoxiques) peuvent avoir une action cytotoxique directe sur des cellules infectées ou moduler l'activité fonctionnelle d'autres lymphocytes T CD4.

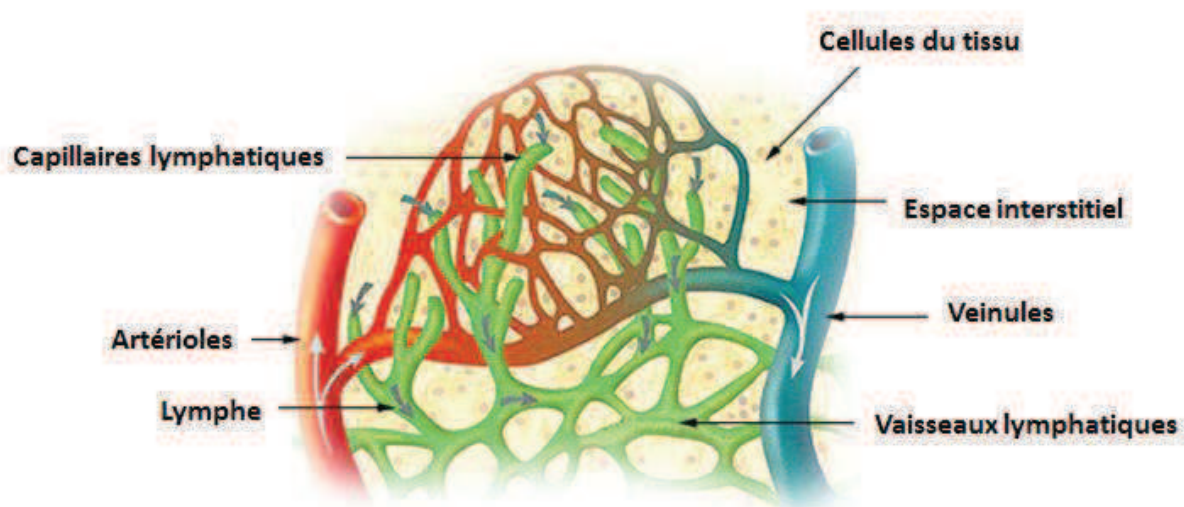


Figure 24. Organisation du réseau lymphatique (vert) au niveau des capillaires.

Etant donné le rôle primordial du réseau lymphatique dans la réponse immunitaire, celui associé à l'appareil respiratoire est très développé. La circulation lymphatique pulmonaire comprend deux réseaux quasiment indépendants : le superficiel destiné à la plèvre et le profond destiné au parenchyme. Ces deux réseaux se regroupent au niveau du hile pulmonaire où ils sont drainés par les ganglions médiastinaux. Chaque réseau est constitué de capillaires lymphatiques, dont la grande perméabilité est gouvernée par des mécanismes encore partiellement incompris²³¹⁻²³³, et de vaisseaux collecteurs plus larges et relativement imperméables.

Le réseau profond est composé de vaisseaux lymphatiques péribronchiques qui suivent le trajet des voies respiratoires conductrices jusqu'aux bronchioles terminales. Les bronchioles respiratoires, les canaux alvéolaires et les septa

interstitiels ne sont quant à eux pas pourvus de capillaires lymphatiques. Leur liquide interstitiel s'écoule passivement jusqu'aux premiers capillaires lymphatiques situés à la jonction des septa interalvéolaires et du tissu conjonctif périvasculaire, péribronchique ou pleural.

2.1.8 Quelques spécificités du modèle animal murin

Le modèle animal murin est le plus utilisé en laboratoire en raison de la disponibilité de nombreuses lignées transgéniques, de nombreux outils génétiques et immunologiques adaptés, et d'une longue expérience de la communauté scientifique en matière d'expérimentation sur le modèle souris notamment pour l'étude de la physiopathologie de la maladie du charbon²³⁴.

Bien sûr, des différences morphologiques et fonctionnelles existent entre l'humain et la souris. Des différences importantes notamment dans les paramètres ventilatoires des deux espèces tirent leur origine d'une différence d'échelle de l'ordre d'un facteur 10 000 en masse entre les deux modèles et doivent être gardées à l'esprit lors des expérimentations *in vivo* réalisées dans le cadre de cette thèse (*cf.* Chapitre 7). Il s'agit notamment de fréquences respiratoire et cardiaque plus grandes chez la souris que chez l'homme. En règle générale, la fréquence respiratoire décroît lorsque la masse typique de l'espèce animale croît, mais cette loi d'échelle reliant des paramètres physiologiques à la taille est toujours l'objet de débats dans la communauté scientifique²³⁵. La résultante de cette loi en ce qui concerne l'imagerie pulmonaire dynamique microscopique de la souris abordée dans cette thèse est non seulement une complexification des procédures chirurgicales liée à la petite taille du poumon en tant qu'objet d'étude (environ un centimètre de long chez la souris contre une vingtaine chez l'humain), mais aussi une augmentation de la fréquence des mouvements thoraciques dommageables à la stabilité de l'imagerie et avec laquelle doit composer l'expérimentateur. Ces mouvements, dont il est plus longuement question au Chapitre 4 : Etat de l'art de l'imagerie microscopique dynamique du poumon, tirent leur origine à la fois de la respiration (2.5 Hz chez la souris²³⁶ contre

0.25 Hz chez l'Humain) et des battements cardiaques (10 Hz chez la souris contre 1 Hz chez l'Humain).

Des différences fonctionnelles existent également, notamment en ce qui concerne la présence d'un organe lymphoïde secondaire nasal chez la souris appelé *Nasal-Associated Lymphoid Tissue* (NALT). Le rôle des NALTs, dont l'équivalent humain pourrait correspondre aux végétations ou aux amygdales²³⁷⁻²³⁹, est approfondi dans les paragraphes suivants qui traitent du système immunitaire associé au poumon de manière générale, et à la réponse immunitaire spécifique à l'infection par *B. anthracis*.

2.2 Immunité pulmonaire

2.2.1 Généralités

La première partie du présent chapitre a décrit le poumon comme est un organe particulier présentant une interface très étendue vers l'environnement extérieur. Cette interface a pour but d'optimiser les échanges gazeux alvéolo-capillaires, mais elle offre par la même occasion une importante porte d'entrée à la pénétration de pathogènes inhalés justifiant une surveillance immunologique accrue.

Alors que les VAS possèdent une flore commensale, les VAI demeurent stériles à l'état basal. Le système de défense associé à l'appareil respiratoire est principalement composé de défenses mécaniques telles que l'ascenseur mucociliaire et d'un système immunitaire performant assisté d'un arsenal de cellules immunitaires aux fonctions diverses et variées, qui ont pour but d'administrer la subtile balance entre **tolérance** (gestion d'un taux d'antigènes jugé faible sans provoquer d'inflammation afin de préserver la fonction respiratoire de l'organe) et **immunité** (mise en place d'une réponse immunitaire destinée à combattre activement un événement de type infectieux ou allergique jugé dangereux).

2.2.2 Epithélium et ascenseur mucociliaire

Une première ligne de défense contre les agressions extérieures est en partie mécanique. En effet, depuis les fosses nasales jusqu'aux petites bronches, les voies aériennes sont tapissées d'un revêtement composé de trois types de cellules²²⁵ : des cellules basales, des cellules ciliées et des cellules sécrétrices.

Les cellules basales sont de petites cellules ubiquitaires situées dans la partie profonde de l'épithélium. Elles ont la capacité de sécréter des molécules actives comme des cytokines ou de l'endopeptidase et ont un rôle primordial dans le

renouvellement cellulaire par leur capacité à remplacer divers types de cellules bronchiques.

Les cellules épithéliales bronchiques ciliées sont les plus abondantes et sont présentes sur tout l'épithélium bronchique. Elles permettent la clairance mucociliaire grâce aux battements coordonnés de leurs cils en évacuant le mucus vers le pharynx, à une vitesse de 5 à 20 mm par minute, où il est éliminé par voie digestive.

Le mucus est produit par les cellules sécrétrices composées des cellules caliciformes, des cellules séreuses et, au niveau des bronchioles terminales, des cellules de Clara. Le mucus a pour rôle principal d'emprisonner les impuretés présentes dans l'air inspiré et d'absorber certains gaz (dioxyde de soufre, ozone). De plus, ces cellules participent également à la défense antibactérienne, anti-oxydante et antiprotéasique de l'épithélium des voies aériennes²⁴⁰ en sécrétant de nombreuses protéines de défense (cf. Figure 25).

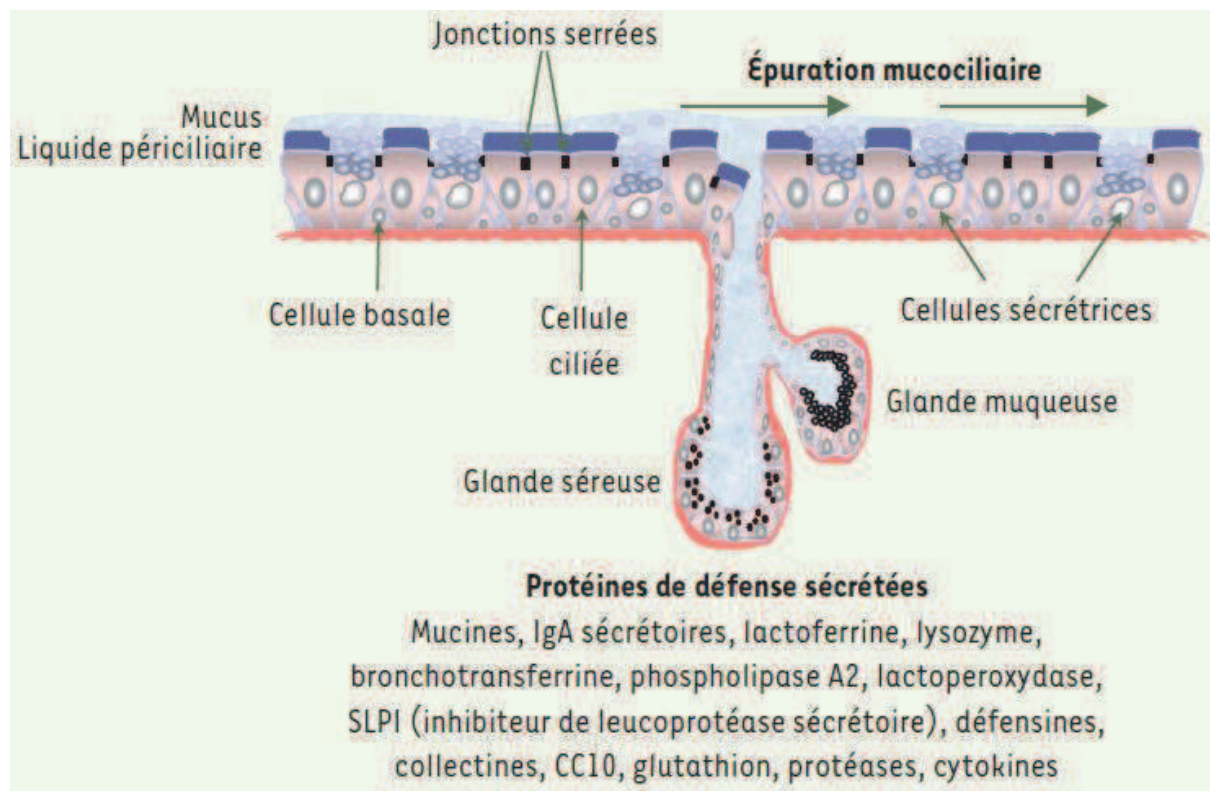


Figure 25. Système de défense mécanique et biochimique de l'épithélium respiratoire des voies aériennes. Extrait de la référence [225].

Une deuxième ligne de défense contre les particules inhalées provient des complexes jonctionnels intercellulaires responsables de l'étanchéité de l'épithélium²²⁵. Les jonctions serrées (*cf.* Figure 25) forment un réseau autour des cellules épithéliales. Elles sont principalement constituées de protéines telles que les *zonula occludens* (ZO) 1 et 2, les claudines et l'occludine qui interagissent avec le cytosquelette d'actine des cellules et régulent la perméabilité transépithéliale²⁴¹.

Enfin, les pneumocytes de type II évoqués au paragraphe 2.1.4 : Parenchyme pulmonaire et alvéoles sécrètent le surfactant, composant élémentaire du mucus. Le surfactant, en plus de ses propriétés tensio-actives facilitant l'expansion des alvéoles lors de l'inspiration, joue un rôle important dans l'immunité. Il est composé essentiellement de phospholipides et de quatre protéines appelées *surfactant-associated proteins* (SP-A, -B, -C et -D). SP-A et SP-D jouent un rôle primordial dans l'immunité, car elles peuvent se fixer à une grande quantité de micro-organismes et peuvent moduler les fonctions immunitaires²⁴². Il a été mis en évidence que SP-D favorise la phagocytose des micro-organismes par les macrophages²⁴³ et les DCs immatures en facilitant leur activation et leur fonction CPA aux lymphocytes T²⁴⁴. SP-A est capable de moduler la prolifération des lymphocytes T, de façon positive ou négative en fonction du signal d'activation²⁴⁵. Quant aux protéines SP-B et SP-C, elles jouent principalement un rôle dans les propriétés physiques du surfactant.

De nombreuses études ont démontré l'existence d'une communication croisée entre les cellules épithéliales pulmonaires et les DCs. Les cellules épithéliales pulmonaires, première ligne de défense contre les agents pathogènes, expriment à leur surface des *pattern recognition receptors* (PRR) capables de reconnaître différents motifs caractéristiques des pathogènes, allergènes ou particules inhalées. La liaison à ces récepteurs entraîne une cascade d'événements aboutissant à la production de chimiokines qui induisent le recrutement de polynucléaires neutrophiles (PNNs), de monocytes et de DCs, ainsi que la production de cytokines participant à la maturation des DCs^{246,247}.

2.2.3 Organes lymphoïdes secondaires

Le système immunitaire, dont les principales composantes sont présentées sur la Figure 26, a pour fonction la prise en charge de particules jugées dangereuses qui n'ont pas été filtrées mécaniquement par les processus évoqués au paragraphe précédent (mucus et ascenseur mucociliaire). Il est organisé en organes lymphoïdes primaires que sont la moelle osseuse, dans laquelle sont produits toutes les cellules de la lignée blanche myéloïde (monocytes, macrophages, DCs, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et lymphoïdes dont les lymphocytes T et B et où les lymphocytes B mûrissent, et le thymus qui assure la maturation des lymphocytes T. Après maturation, les lymphocytes rejoignent les organes lymphoïdes secondaires *via* la circulation. Ces organes lymphoïdes secondaires sont des lieux de passage, d'accumulation et de rencontre entre antigènes et cellules immunitaires. Au niveau de l'appareil respiratoire, il s'agit principalement des ganglions lymphatiques et des NALTs.

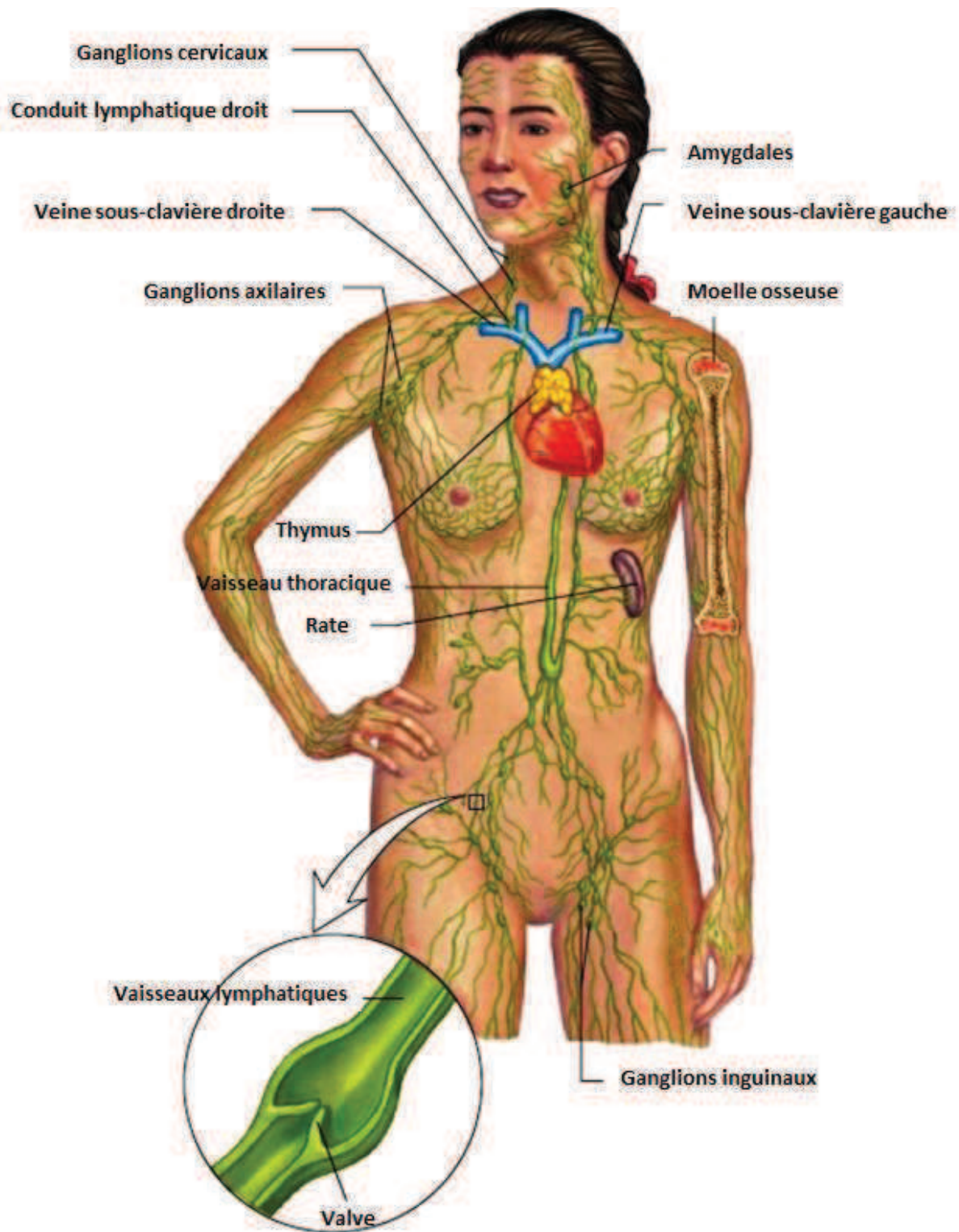


Figure 26. Les principales composantes du système lymphatique. Adapté de la référence [248].

2.2.3.1 Ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont des structures de forme ovale distribuées le long du réseau lymphatique, contenant une grande concentration de cellules immunitaires. La structure d'un ganglion se décompose en plusieurs zones : le sinus capsulaire permettant l'arrivée des antigènes par les vaisseaux afférents, le cortex, lieu de prolifération et de différenciation des lymphocytes B, le paracortex qui abrite les lymphocytes T et les cellules dendritiques (DCs), et le hile par lequel sort le vaisseau efférent.

Une des fonctions primordiales du ganglion provient du lieu de rencontre privilégié qu'il constitue pour les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les DCs. Pour cela, les lymphocytes T maturés dans le thymus rejoignent la circulation qui aboutit à de petits vaisseaux post-capillaires spécialisés appelés *high endothelial venules* (HEV), et reliés aux ganglions. Ce processus crucial de pénétration des lymphocytes T dans les ganglions permet l'activation de ces cellules par les DCs provenant du tissu *via* les vaisseaux lymphatiques (*cf.* Figure 27). Après activation, les lymphocytes T effecteurs quittent le ganglion en gagnant la circulation pour rejoindre les tissus.

Certains lymphocytes T activés se différencient en lymphocytes T CD4+ qui peuvent être Th1 (impliqués dans la clairance bactérienne et virale intracellulaire), Th2 (impliqués dans la régulation de l'inflammation liée à une infection virale ou fongique), Th17 (impliqués dans la clairance bactérienne et virale extracellulaire) ou Treg (qui contrôlent l'inflammation et maintiennent l'homéostasie mucoale)²⁴⁹. En particulier, les lymphocytes T CD4 peuvent activer les lymphocytes B par un processus appelé synapses immunologiques²⁵⁰⁻²⁵². Les lymphocytes B ainsi activés vont produire des anticorps permettant l'inhibition de l'activité des pathogènes jusqu'à ce que des phagocytes ou le système du complément provoquent la clairance du pathogène.

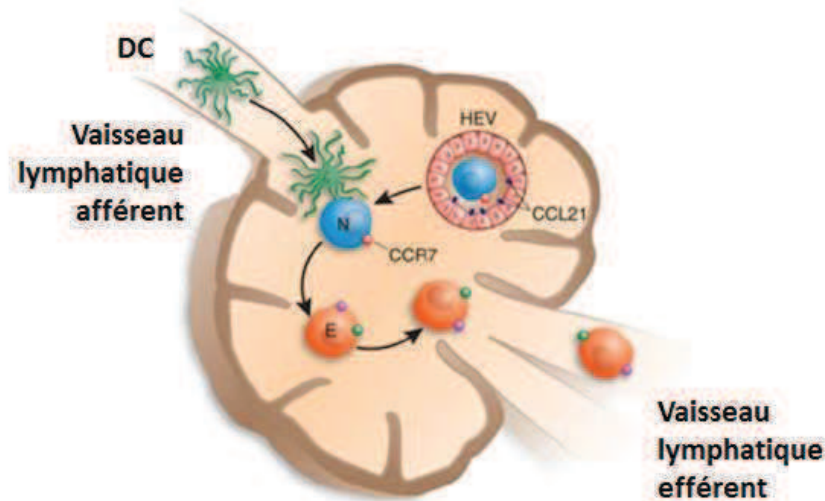


Figure 27. Pénétration des lymphocytes T naïfs dans le ganglion (en bleu, notés N) *via* les HEVs. Activation de ces cellules par les DCs (en vert) provenant d'un vaisseau lymphatique afférent. Activation des lymphocytes T par présentation d'antigènes effectuée par les DCs, conduisant à leur différenciation en cellules effectrices (en orange, notées E) et fuite vers les zones d'inflammation *via* la circulation systémique. Adapté de la référence [253].

2.2.3.2 NALTs

Des études récentes ont souligné le rôle des NALTs dans la réponse immunitaire²⁵⁴. Les NALTs sont considérées comme le seul tissu lymphoïde organisé du tractus respiratoire²⁵⁵. Cet organe lymphoïde est présent chez le rongeur et sous une forme différente chez l'Homme²³⁷⁻²³⁹, et permet aux DCs d'échantillonner à travers les cellules épithéliales M les antigènes présents dans la cavité nasale avant d'activer les lymphocytes T CD4. De manière analogue à ce qui se produit dans les ganglions, les lymphocytes T CD4 activent alors la sécrétion d'immunoglobulines de type A (IgA) par les lymphocytes B, qui migrent des NALTs vers les ganglions lymphatiques cervicaux par les vaisseaux lymphatiques efférents. Puis, les lymphocytes T CD4 et B IgA⁺ migrent vers le site de l'infection (généralement les conduits nasaux) par la circulation vasculaire. Enfin, ces cellules sécrètent des cytokines (IL-5 et IL-6)

activant la production de cellules sécrétrices d'anticorps, sous forme d'IgA, sur le site de l'infection (cf. Figure 28).

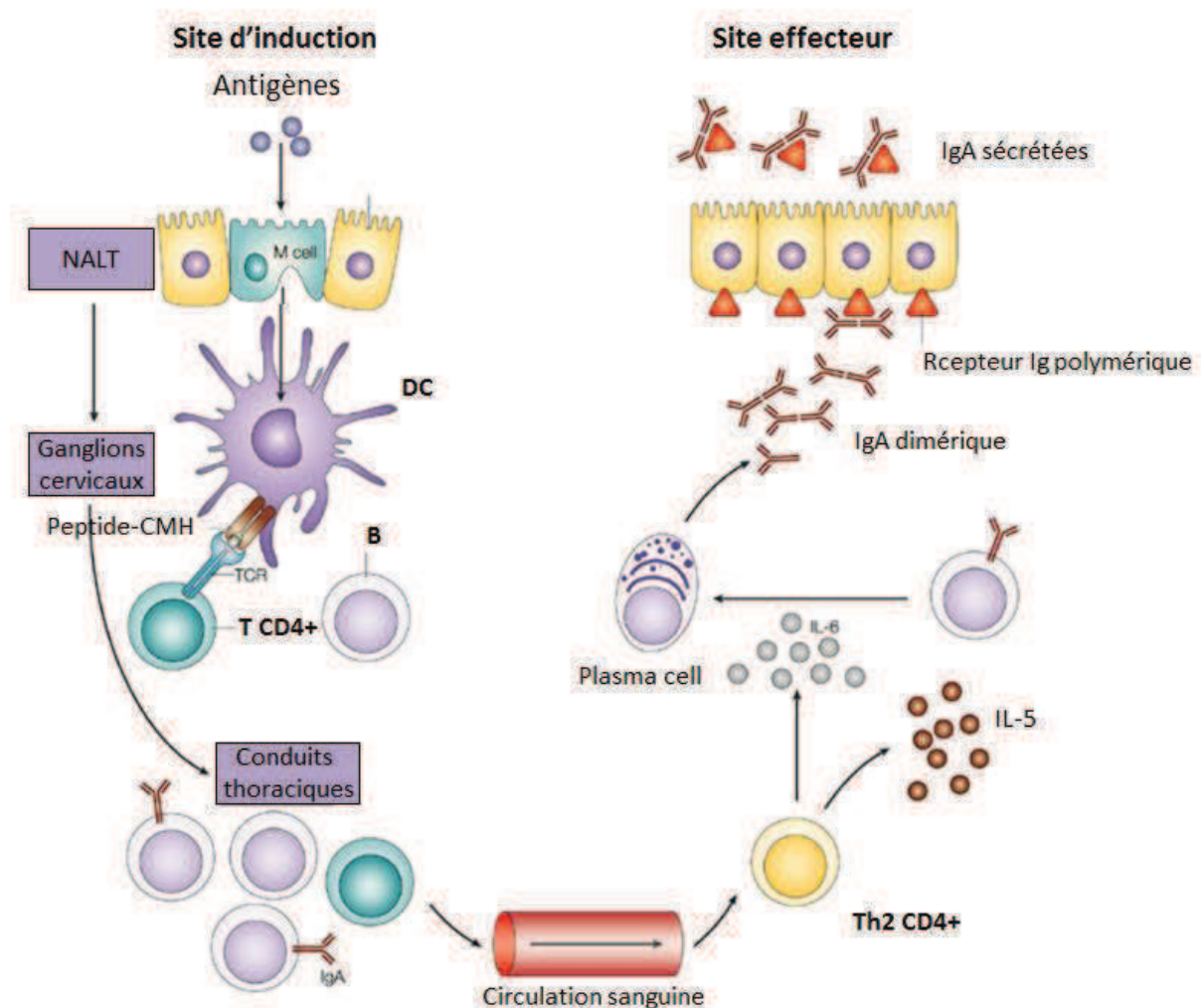


Figure 28. Transport d'antigène de la lumière de la cavité nasale à travers les cellules M. Echantillonnage par les DCs. Activation de lymphocytes T CD4. Migration vers les ganglions *via* le réseau lymphatique, puis migration vers le site infecté *via* la circulation. Sécrétion d'IgA. Adapté de la référence [254].

La formation d'un autre organe lymphoïde secondaire pulmonaire, appelé BALTs (*Broncho Associated Lymphoid Tissues*) est possible chez de nombreux mammifères dans les zones péri-bronchiques, péri-vasculaires et interstitielles. Les BALTs sont constitués d'agrégats de lymphocytes et représentent notamment des centres de prolifération et de germination des lymphocytes B. Des lymphocytes T et des DCs

sont présents autour de ces zones B. La formation des BALTs peut être déclenchée par une infection²⁵⁶ ou une inflammation mais n'advient normalement pas chez l'adulte sain²⁵⁷.

2.2.4 Cellules immunitaires du parenchyme

Le système immunitaire pulmonaire est composé d'un arsenal de cellules spécialisées, quelquefois en interaction entre elles, qui agissent globalement en synergie dans le but d'atténuer l'infection et de préserver l'hôte. Ce paragraphe dresse en particulier le portrait des **macrophages** et des **cellules dendritiques** en tant que cellules cruciales de la réponse immunitaire innée, qui participent aussi au déclenchement de la réponse adaptative, et sur lesquelles une attention particulière a été apportée durant cette thèse.

2.2.4.1 Macrophages pulmonaires

Les macrophages sont des cellules immunitaires essentielles, découvertes en 1883 par Ilya Metchnikoff¹⁴ qui observe pour la première fois le phénomène de phagocytose, ce qui lui vaudra le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908. Il distingue alors les macrophages des microphages, communément appelés de nos jours polynucléaires neutrophiles (PNNs). Les macrophages sont issus de la différenciation de monocytes originaires de la moelle osseuse²⁵⁸. Ils jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie, les défenses de l'hôte mais aussi la reconstitution tissulaire.

Dans le poumon, les macrophages sont présents dans la lumière alvéolaire (ils sont alors appelés macrophages alvéolaires), dans l'interstitium pulmonaire (macrophages interstitiels) mais également dans la plèvre (macrophages pleuraux)

où leur activité phagocytaire semble toutefois moindre que pour les deux autres populations²⁵⁹.

Les macrophages pulmonaires participent à la phagocytose des pathogènes et des particules fines qui atteignent l'espace alvéolaire ou le septum inter-alvéolaire. Ils expriment un large panel de PRRs leur permettant de détecter rapidement la présence d'agents pathogènes. Ils jouent également un rôle important dans l'élimination des cellules apoptotiques et des cellules en cours de programme de mort cellulaire. A l'homéostasie, les macrophages sont des cellules quiescentes produisant de faibles taux de cytokines pro-inflammatoires²⁶⁰ associés à quelques médiateurs (NO, IL-1RA, TGF- β) inhibant l'activation des lymphocytes T²⁶¹ et la maturation des DCs et leurs fonctions CPA²⁶².

Les macrophages peuvent activer la réponse immunitaire adaptative *via* la production de chimiokines et leur fonction CPA. Ils peuvent activer les lymphocytes T CD8 ou T CD4 qui interagissent avec les lymphocytes B producteurs d'anticorps²⁶³.

2.2.4.2 Cellules dendritiques

Les DCs sont des leucocytes issus de cellules souches hématopoïétiques myéloïdes ou lymphoïdes présentes dans la moelle osseuse²⁶⁴. Les DCs sont des CPA particulièrement performantes qui agissent comme des sentinelles du système immunitaire grâce à leur localisation stratégique dans les tissus exposés aux antigènes (peau, poumon, etc.). Les précurseurs hématopoïétiques se différencient dans la moelle avant de rejoindre la circulation sanguine pour atteindre les tissus périphériques. Les DCs ont été initialement identifiées par leur capacité à initier une réponse immunitaire impliquant les lymphocytes T. Cette réponse se fait en trois étapes²⁶⁵ :

- 1) les DCs capturent et échantillonnent les antigènes présents dans le tissu. Les DCs subissent une série de changements phénotypiques et fonctionnels appelés activation ou maturation.

2) les DCs migrent vers les organes lymphoïdes *via* les vaisseaux lymphatiques en suivant un gradient de concentration en chimiokines CCL19 et CCL21 grâce à leur récepteur CCR7.

3) une fois dans le tissu lymphoïde, les DCs présentent l'antigène et stimulent le développement de lymphocytes Th antigène-spécifiques, permettant la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique.

Différents sous-types de DCs ont été décrits chez la souris au niveau du poumon²⁶⁶. Les DCs dites conventionnelles (cDCs) expriment fortement le CD11c contrairement aux DCs plasmacytoïdes (pDCs) qui l'expriment seulement faiblement ou qui expriment Siglec-H, une protéine analogue à un récepteur endocytaire.

Deux types de cDCs ont été décrits (*cf.* Figure 29) :

- un sous-type CD11b⁻ exprimant le CD103 (une intégrine codée par le gène *ITGAE* impliquée dans la liaison à l'E-cadhérine qui est une molécule d'adhésion de certaines cellules épithéliales), la langérine (CD207) et de forts taux de récepteurs à la lymphotactine (XCR1), présent au niveau des parois épithéliales des voies aériennes^{267,268} ; ce sous-type de cDCs est connu pour former des extensions cellulaires transépithéliales s'insérant au niveau des espaces basolatéraux des cellules épithéliales et également pour sa production de cytokines ;
- un sous-type CD11b⁺ présent au niveau de la lamina propria juste sous la membrane basale ; cette sous-population exprime également SIRP1 α et le récepteur à la fractalkine CX3CR1²⁶⁶ d'une importance cruciale dans le cadre des travaux de thèse présentés aux Chapitres 5, 6 et 7.

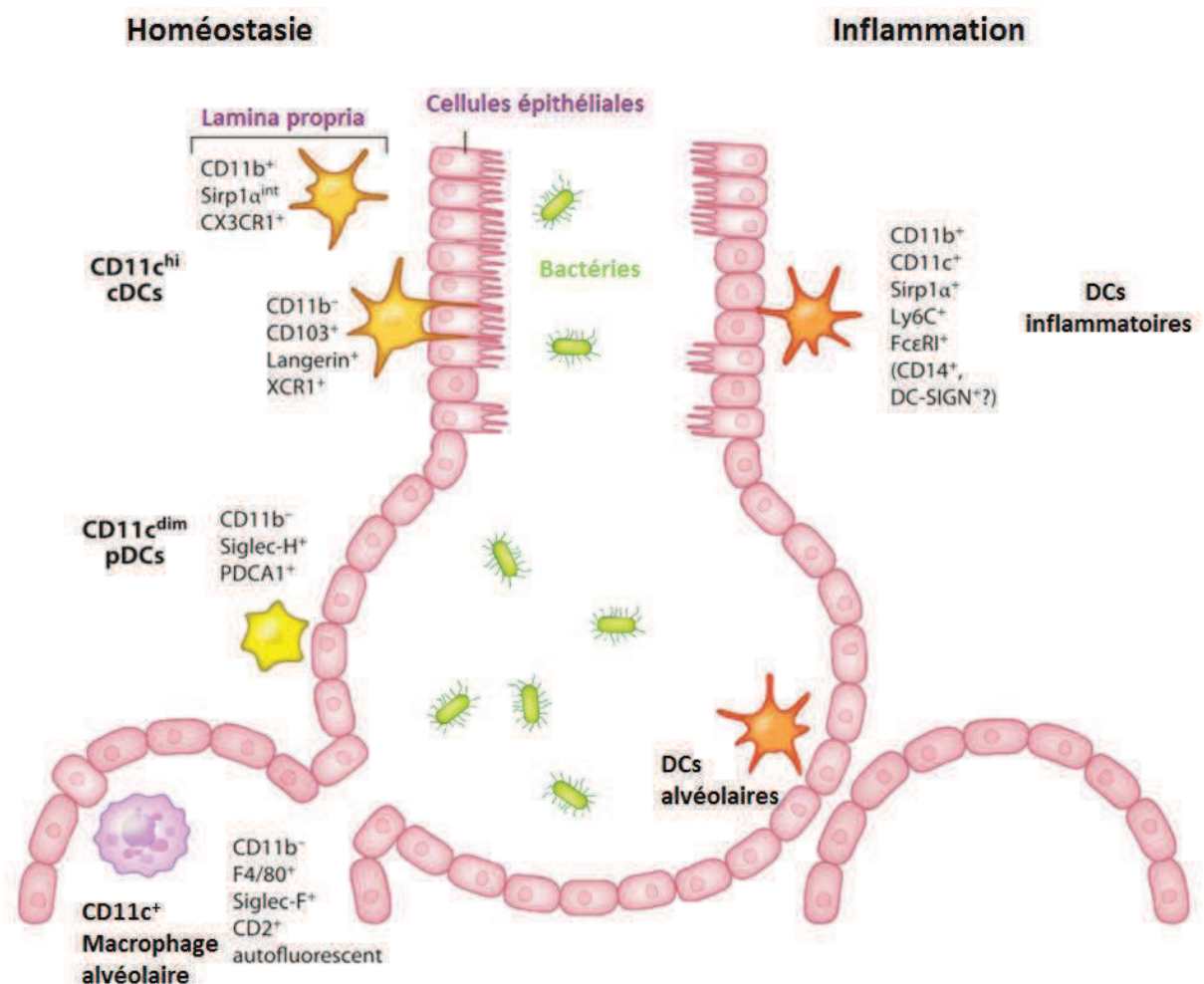


Figure 29. Les différentes sous-populations de DCs pulmonaires dans le poumon à l'homéostasie (gauche) et lors d'une inflammation (droite). Adapté de la référence [266].

Les deux sous-populations de cDCs (CD103⁺ et CD11b⁺) proviennent chacune de la différenciation d'un sous-type de monocytes issu d'un même tissu mais selon des voies différentes²⁶⁹. En effet, les monocytes Ly6C^{low}/CX3CR1⁺ vont donner les cDCs CD11b⁺, alors que les monocytes Ly6C^{high}/CCR2⁺ donneront²⁷⁰ les cDCs CD103⁺.

Les cDCs CD11b⁺ sont capables de produire un grand nombre de chimiokines et participent au développement et au maintien de la réponse immunitaire au niveau des voies aériennes effectrices et de l'inflammation, alors que les cDCs CD103⁺ produisent principalement CCL17 et CCL22 qui participent au recrutement des lymphocytes Th2 et Treg^{271,272}. Il semblerait de plus que les cDCs CD103⁺ soient le

sous-type de DCs majoritairement impliqué dans la capture et le transport des cellules apoptotiques jusqu'aux ganglions lymphatiques pulmonaires, ainsi que la présentation de l'antigène associé aux lymphocytes T CD8²⁶⁸. En revanche, des travaux récents ont montré que les cDCs CD11b⁺ ont une grande capacité à induire la formation d'IgA *via* la production d'IL-6 et d'IL-10, supérieure²⁷³ à celle des CD103⁺. En fait, il semblerait que le sous-type CD103⁺ induit préférentiellement les réponses Th1 et Th17, donc une réponse immunitaire cellulaire par l'activation des lymphocytes T CD8, alors que le sous-type CD11b⁺ entraînerait plutôt une réponse de type Th2 et serait donc impliqué dans la réponse immunitaire humorale avec l'activation des lymphocytes B²⁷⁴.

Trois populations de DCs ont été décrites chez l'Homme, exprimant fortement HLA-DR, une molécule du CMH de classe II ; les DCs myéloïdes (mDCs) de type 1 (CD11c⁺/CD1c⁺), les mDCs de type 2 (CD11c⁺/BDCA-3⁺) et les pDCs CD11c⁻/BDCA-2⁺, chacun de ces sous-types correspondant respectivement aux cDCs CD11b⁺/CD103⁻, cDCs CD11b⁻/CD103⁺CD207⁺ et pDCs chez la souris²⁷⁵.

La présence de DCs chez l'Homme a été rapportée au niveau de la trachée, des bronches, des alvéoles pulmonaires et de la plèvre viscérale^{276,277}. Des investigations portant sur la répartition des cDCs CD11b⁺ CX3CR1⁺ dans le poumon de souris ont été réalisées dans le cadre de cette thèse, montrant également une répartition de ces cellules au niveau des bronches, de l'interstitium alvéolaire et de la plèvre. La Figure 30 en partie extraite de l'article de conférence²⁷⁸ présenté en Annexe 1 illustre la répartition de ces cellules dans le poumon.

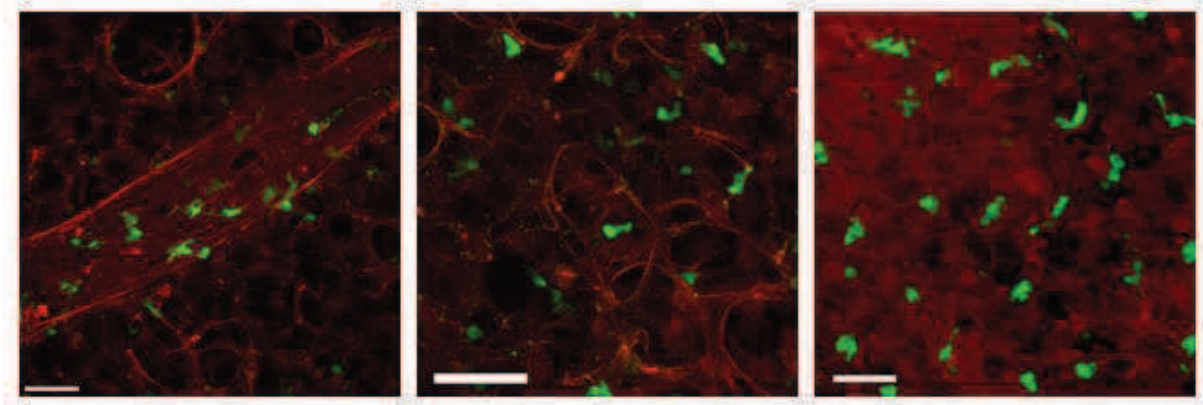


Figure 30. Répartition des DCs CX3CR1⁺ pulmonaires (en vert) chez la souris au niveau des bronches (gauche, échelle = 40 μm), du parenchyme (centre, échelle = 40 μm) et de la plèvre (droite, échelle = 20 μm). Imagerie confocale *ex vivo* avec excitation à 488 nm et 633 nm effectuée sur explant de poumon de souris CX3CR1^{+gfp} après marquage non spécifique des structures au CMTMR.

2.2.4.3 Cellules recrutables en conditions inflammatoires

Des cellules immunitaires peuvent être recrutées dans de nombreuses pathologies d'origine bactérienne ou virale, mais aussi en raison de lésions au niveau de la muqueuse. Ces cellules incluent les lymphocytes dont il a déjà été question dans les paragraphes précédents, mais aussi les monocytes et des granulocytes tels que les polynucléaires neutrophiles.

Les **monocytes** sont des cellules phagocytaires circulantes capables de se différencier en macrophages ou en DCs en fonction de leur sous-type et des stimuli environnementaux²⁷⁹. Les sous-types de monocytes sont distingués selon les récepteurs aux chimiokines et les marqueurs de surface qu'ils expriment²⁸⁰. Leur recrutement est dépendant de la sécrétion de cytokines parmi lesquelles CCL2, CCL3, CCL5, CCL7 et CCL20²⁸⁰.

Les **polynucléaires neutrophiles** (PNNs) sont des cellules phagocytaires de l'immunité innée circulant dans le sang, depuis les capillaires pulmonaires²⁸¹ avant d'être recrutés sur le site d'une infection *via* la production de chimiokines afin de participer à la clairance du pathogène. Ils peuvent agir soit en capturant le pathogène par phagocytose, soit en sécrétant des facteurs antimicrobiens sur le site de

l'infection, soit par le relargage de *neutrophils extracellular traps* (NETs)²⁸². Ces NETs, composés de chromatine décondensée, de granules et de protéines cytoplasmiques aideraient à contenir l'infection notamment en immobilisant les pathogènes.

2.3 *Bacillus anthracis* et immunité pulmonaire

La physiopathologie de l'infection par *B. anthracis* a fait l'objet de travaux dont l'intensité s'est renforcée après l'envoi de lettres contaminées par des spores de *B. anthracis* en 2001 aux Etats-Unis. En outre, la maladie du charbon représente un modèle unique d'infection par des spores immobiles mais dont les symptômes sont foudroyants chez l'Homme et dans de nombreux modèles animaux, suggérant l'existence de mécanismes de pénétration du pathogène spécifiques et mal compris à l'heure actuelle.

2.3.1 Modèles de pénétration des spores inhalées

La première étape de la dissémination est le franchissement de la barrière épithéliale par les spores, non mobiles. Les macrophages alvéolaires, dont le rôle dans la capture des spores est connu depuis longtemps²⁸³, ont été dans un premier temps soupçonnés de participer directement à ce franchissement²⁸⁴, avant que des travaux plus récents démontrent qu'il s'agit en réalité des DCs pulmonaires²⁸⁵. Ces cellules participent malgré elles à la dissémination du pathogène lors de leur migration vers les ganglions lymphatique drainants, justifiant leur appellation de « Cheval de Troie », où elles sont censées déclencher la réponse immunitaire adaptative. En réalité, les spores de *B. anthracis* peuvent résister à la dégradation durant la phagocytose et parviennent ainsi sans encombre à franchir les premières lignes de défenses immunitaires de l'hôte. Une fois parvenues dans les ganglions, les bacilles issus de la germination des spores se répandent dans la circulation et sécrètent les toxines responsables d'une partie des symptômes de la maladie du charbon.

2.3.1.1 « Cheval de Troie » dans le poumon

Le modèle classique du « Cheval de Troie » expliquant la pénétration des spores au niveau pulmonaire se présente ainsi (cf. Figure 31. Modèle du Cheval de Troie de pénétration des spores dans l'organisme. Adapté de la référence [286].Figure 31) :

- 1-2) inhalation des spores ;
- 3) phagocytose des spores à la fois dans les NALTs et dans le poumon par les DCs et macrophages ;
- 4-5) migration des phagocytes vers les ganglions drainants ;
- 6) germination des spores et multiplication bacillaire dans les NALTs et ganglions ;
- 7) dissémination des bactéries *via* la circulation et sécrétion des toxines.

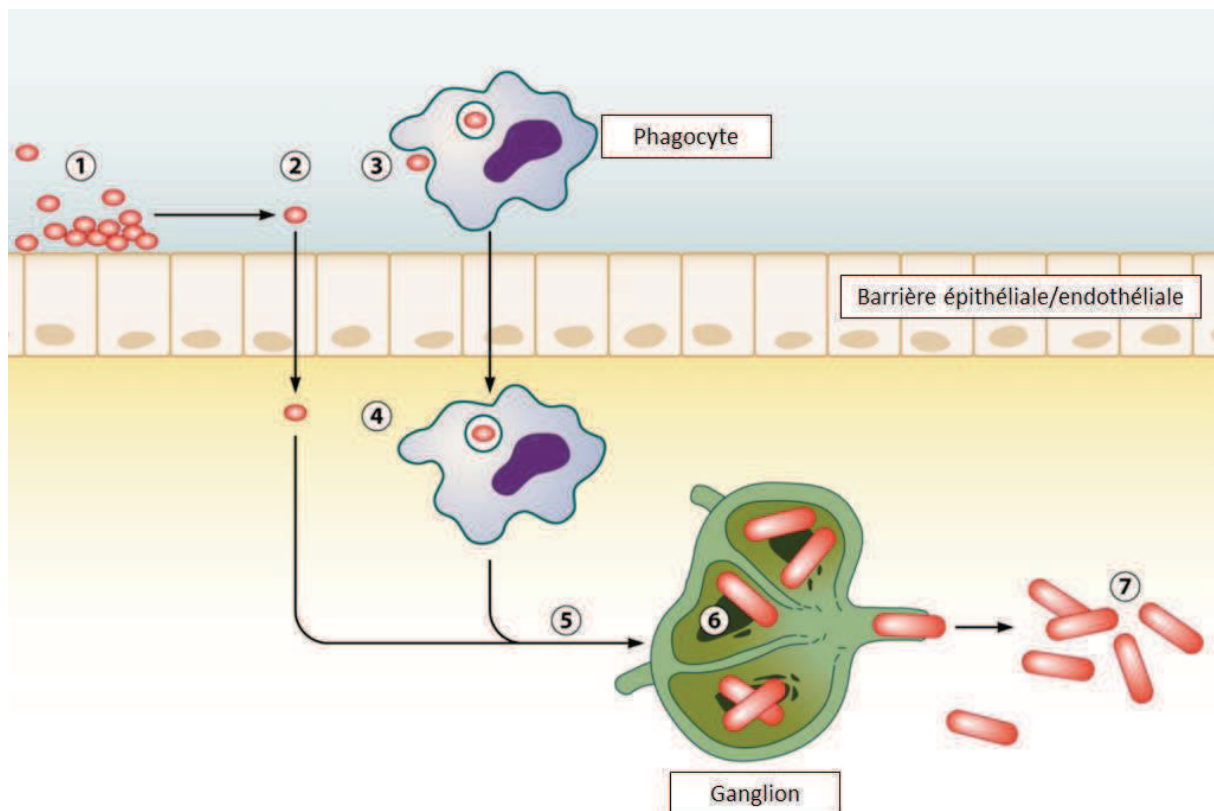


Figure 31. Modèle du Cheval de Troie de pénétration des spores dans l'organisme. Adapté de la référence [286].

En 2012, Plaut *et al.* remarquent que la cinétique d'infection varie énormément entre individus chez la souris^{287,288} et proposent un mécanisme d'échantillonnage des spores. Leur protocole expérimental a consisté à infecter des souris par un mélange constitué de trois souches en proportion stœchiométrique, identiques à l'exception que chacune d'elles exprime un marqueur fluorescent différent. Ils constatent alors que chaque organe distal infecté (notamment les ganglions cervicaux) est systématiquement colonisé par une souche majoritaire, et que les souches majoritaires sont distribuées aléatoirement chez les différents animaux. Alors que les ganglions cervicaux présentent une souche majoritaire, les auteurs notent que les ganglions médiastinaux présentent un mélange des trois souches sans souche majoritaire.

La dominance aléatoire progressive d'une souche sur les deux autres au cours de la migration des phagocytes démontre l'existence d'un mécanisme d'échantillonnage très sélectif qu'ils dénomment « goulot d'étranglement »²⁸⁹. La dominance d'une souche dans les ganglions lymphatiques proviendrait alors de la réplication de la spore ou du bacille qui aurait le premier franchi avec succès les différents niveaux de défense de l'hôte.

2.3.1.2 Cheval de Troie *versus* Evasion

Le modèle du Cheval de Troie possède des limites, notamment pour expliquer les résultats démontrant le rôle primordial des NALTs dans l'initiation de la germination et dans la fuite vers la circulation *via* le réseau lymphatique.). De plus, il n'a pas été démontré que les spores présentes dans les ganglions lymphatiques drainants sont à l'origine de la physiopathologie de la maladie¹⁸⁸. Pour ces raisons, Weiner *et al.* ont proposé en 2012 le modèle dit « d'Evasion »²⁸⁶ présenté en Figure 32. Le modèle de l'évasion se différencie du cheval de Troie dans le fait que le pathogène n'a pas besoin de moyen de transport actif. Dans ce modèle, l'infection commence directement sur le site de l'infection, c'est-à-dire les NALT dans la forme pulmonaire de la maladie.

- 1-2) Les spores inhalées germinent dans les NALTs ou les tissus lésionnels ;
- 3-5) les toxines et protéases produites affaiblissent le système immunitaire et perméabilise le tissu, permettant aux bacilles de s'infiltrer dans le réseau lymphatique pour rejoindre les ganglions ;
- 6-7) les bacilles infectent les ganglions et rejoignent la circulation, causant septicémie et toxémie engendrant la mort de l'hôte.

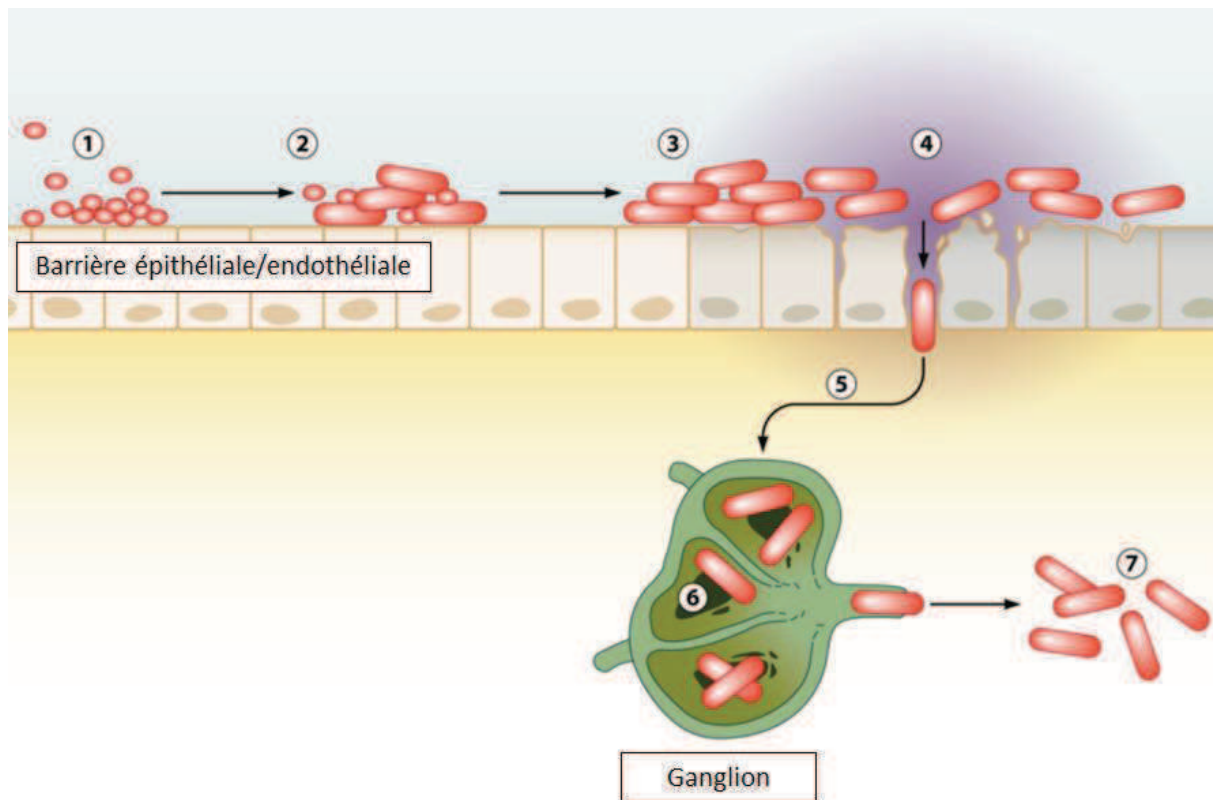


Figure 32. Modèle de « l'Evasion » expliquant la pénétration des spores dans l'organisme. Adapté de la référence [286].

2.3.1.3 Rôle des NALTs

Récemment, l'utilisation d'une souche bioluminescente capsulée et non-toxinogène de *B. anthracis*, dont les bacilles expriment fortement la luciférase alors que les spores ne l'expriment pas, a permis de présenter un modèle de pénétration des

spores après inhalation impliquant dans un premier temps les tissus lymphoïdes associés aux nasaux, les NALTs^{188,290,291}.

Vingt-deux heures après infection par voie aérosol, des bacilles sont présents dans la cavité nasale, puis dans les ganglions drainants 5h après. Alors qu'un signal de bioluminescence est visible dans les NALTs, aucun signal n'est détecté dans les poumons ni dans les ganglions médiastinaux drainant les poumons. Ces résultats suggèrent que la germination survient dans un premier temps sur le site de l'infection, dans la fosse nasale, avant d'apparaître dans les poumons.

De plus, ils observent que l'injection s.c. de spores conduit à un temps tardif après infection (24h) à la présence de bacilles non seulement dans le ganglion drainant, mais aussi dans la rate et dans le poumon 12h plus tard, suggérant que les bactéries germinant localement gagnent la circulation et sont piégées dans le poumon où sont situés les premiers capillaires rencontrés.

2.3.2 Interactions entre *B. anthracis* et système immunitaire

Le système immunitaire associé à l'appareil respiratoire est composé d'un arsenal de cellules aux fonctions variées qui peuvent être amenées à interagir avec *B. anthracis*.

2.3.2.1 Cellules épithéliales

L'épithélium des voies respiratoires répond à l'exposition à des agents pathogènes inhalés par la production de médiateurs tels que les cytokines, chimiokines et peptides antimicrobiens²⁹². Ces médiateurs sont par ailleurs connus pour influencer le comportement de DCs dans un certain nombre d'affections comme l'asthme²⁴⁷.

Des travaux publiés en 2007 ont mis en évidence le rôle des cellules épithéliales pulmonaires dans la mise en place de la réponse immunitaire innée après infection par *B. anthracis*. L'activation des cellules épithéliales provoque la production de cytokines (IL-6 et le TNF- α) et de chimiokines (IL-8, MCP-1 et MIP-1) qui conduisent à un afflux de PNNs et de monocytes par chimiotactisme²⁹³. De plus, les cellules épithéliales ont été récemment décrites comme une cible privilégiée de la toxine létale (LT) de *B. anthracis* via un réarrangement du squelette d'actine et la dérégulation de la formation de desmosomes provoquant une altération de la barrière défensive et une réduction de la production de surfactant¹⁴⁹.

Des études publiées en 2008 évoquent quant à elles la possibilité offerte par les cellules épithéliales de participer à la dissémination du pathogène par un processus de migration paracellulaire^{294,295}. Cette hypothèse est discutée par Tournier *et al.* qui suggèrent que la dissémination des spores nécessite l'action de cellules faisant office de « transporteur » (DCs et/ou macrophages) pour atteindre les ganglions lymphatiques drainants²⁹⁶.

2.3.2.2 Macrophages pulmonaires

Différentes études ont montré le rôle des macrophages dans la capture précoce de spores de *B. anthracis* au niveau alvéolaire. Bien que les macrophages aient été initialement considérés comme les cellules transportant les spores depuis les alvéoles vers les ganglions lymphatiques, justifiant leur appellation de « Cheval de Troie »^{297,298}, bien que leur rôle semble limité^{285,297,299}. Néanmoins, il a été observé que des souris déplétées en macrophages et infectées par des spores de *B. anthracis* par voie i.p. ou aérosol présentent une sensibilité à l'infection plus importante, démontrant le rôle crucial des macrophages pulmonaires dans le maintien de l'homéostasie³⁰⁰.

2.3.2.3 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont la troisième population de CPA professionnelles pulmonaires et sont également impliqués dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire^{301,302} par des mécanismes indépendants de leur *B-cell immunoglobulin receptor* (BCR). Ainsi, les lymphocytes B ont été décrits comme impliqués dans la réponse immunitaire précoce à *Mycobacterium tuberculosis*³⁰³ et *Salmonella typhimurium*³⁰⁴.

Des travaux de Rayamajhi *et al.* publiés en 2012 décrivent le rôle des lymphocytes B dans la dissémination précoce de spores de *B. anthracis* après inhalation et dans l'établissement de la maladie³⁰⁵, montrant l'existence d'un mécanisme de capture et de transport des spores indépendant des DCs et de l'expression de CCR7, conduisant à la présence de lymphocytes B infectés dans les ganglions pulmonaires drainants.

2.3.2.4 Cellules NK

Les cellules NK (*Natural Killers*) sont un type de lymphocytes cytotoxiques participant à la réponse immunitaire innée. Les cellules NK sont très importantes dans la prévention d'invasion virale et dans la dissémination de pathogènes grâce à leur cytotoxicité et la sécrétion de cytokines. Klezovich-Bénard *et al.* ont montré en 2012 que des spores de *B. anthracis* dans un modèle de charbon cutané provoque une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK. Cette sécrétion^{306,307} :

- nécessite une interaction de type RAE-1-NKG2D préalable avec des macrophages ;
- est IL-12, IL-18 et IL-15 dépendante, où l'IL-12 joue un rôle primordial dans l'activation des NKs et des macrophages ;
- requiert l'IL-18 durant un temps très court.

De plus, ces travaux démontrent que les toxines de *B. anthracis* perturbent les fonctions essentielles des cellules NK et altèrent la sécrétion d'IFN- γ dans un modèle d'infection cutanée, suggérant de possibles utilisations des toxines dans la modulation de réponses cytotoxiques excessives pathologiques.

Une partie de ces travaux a été effectuée en collaboration entre l'Institut Pasteur de Paris et l'IRBA. La publication qui en a résulté (référence [306]) est présentée en Annexe 2.

2.3.2.5 PNNs

Le rôle de ET et LT dans l'inhibition de l'action des PNNs est connu depuis 1985^{154,155}. Il a également été démontré que LT était capable d'inhiber le recrutement des PNNs, soit en inhibant la production de chimiokines par les DCs et les cellules de l'épithélium bronchique^{308,309}, soit en bloquant le chimiotactisme *via* une dépolymérisation des filaments d'actine³¹⁰.

Des travaux effectués par Garraud *et al.* en 2012 décrivent les PNNs comme la population majoritairement impliquée dans la sécrétion d'IL-17, une cytokine impliquée dans la régulation de la réponse des neutrophiles^{311,312}, après infection pulmonaire par des spores de *B. anthracis*^{110,313}. Ces travaux démontrent le rôle crucial à la fois de la voie IL-17A/F et des neutrophiles dans la survie de souris infectées par *B. anthracis*.

La publication qui a résulté de ces travaux³¹³ est présentée en Annexe 3.

2.3.2.6 DCs

Plusieurs études ont montré l'action des toxines de *B. anthracis* sur l'altération de la sécrétion de cytokines par les DCs, mais aussi sur la dérégulation des fonctions de migrations de ces cellules^{120,140,141,159,314,315}.

Une étude de Cleret *et al.* a mis en évidence que les DCs jouent un rôle primordial dans la capture des spores de *B. anthracis* et leur transport jusqu'aux ganglions lymphatiques thoraciques chez la souris²⁸⁵. En effet, les DCs interstitielles capturent les spores présentes dans les alvéoles dans les 30 minutes suivant l'infection par voie i.n. sans franchir la barrière alvéolaire, suggérant un mécanisme spécifique d'échantillonnage rapide à travers la barrière épithéliale alvéolaire par extension de dendrites transépithéliales. Toutefois, le rôle des deux sous-types de cDCs n'a pratiquement pas été étudié.

2.3.3 Conclusion

Ce chapitre a pour objet de présenter les différents travaux ayant porté sur les interactions entre *B. anthracis* et le système immunitaire. Ces interactions complexes, multifactorielles et impliquant de nombreux acteurs cellulaires immunitaires ont pour conséquence finale de conduire après inhalation de spores à la mort de l'hôte. L'existence de plusieurs modèles expliquant des mécanismes possibles de pénétration de spores reflète d'une part leur incomplétude, puisqu'aucune n'a su s'imposer à l'heure actuelle en expliquant l'ensemble des observations, et d'autre part une vraisemblable coexistence.

La présente thèse se positionne dans le cadre du modèle du Cheval de Troie. Elle a pour but de caractériser le rôle de la sous-population CD11b⁺ de cDCs dans la capture précoce de spores de *B. anthracis* au niveau de la muqueuse pulmonaire chez la souris, en utilisant des techniques d'imagerie intravitale confocale et à deux photons associées à la microscopie par génération de second harmonique, dont il est question au chapitre suivant.

Chapitre 3

Microscopies de fluorescence et génération d'harmoniques

3.1 Introduction

La microscopie optique, dont le principe se base sur l'utilisation de plusieurs lentilles pour obtenir une image agrandie d'un échantillon, a probablement été inventée au début du XVII^{ème} siècle. Un des premiers microscopes a été construit par Galilée en 1609. Son *occholino* était alors composé d'une lentille convexe et une concave. Les développements principaux qui suivirent ont consisté à la fin du XVII^{ème} siècle en la création d'un oculaire à deux lentilles, corrigé des aberrations chromatiques, par Christian Huygens. Les applications biologiques de l'imagerie microscopique ont été évoquées pour la première fois par Antoni van Leeuwenhoek au début du XVIII^{ème} siècle qui observe pour la première fois et découvre les protozoaires et les spermatozoïdes. Le fruit de ses observations microscopiques le pousse à se positionner comme l'un des premiers adversaires de la théorie de la génération spontanée.

Le principe de la photoluminescence par lequel une molécule absorbe et réémet des photons est connu depuis plusieurs siècles³¹⁶ : en 1565 déjà, Nicolas Monardes provoque pour la première fois l'émission de lumière par fluorescence dans une infusion de bois *Lignum nephriticum*. Quelques années plus tard, en 1602, Vincenzo Cascariolo décrit l'émission de lumière par phosphorescence du *phosphore de Bologne*. Durant les siècles qui suivirent, la compréhension de ce phénomène s'améliore notablement : une excitation préalable ou simultanée apparaît nécessaire et de nouveaux matériaux capables de générer de la lumière sont identifiés. La fluorescence et la phosphorescence apparaissent alors comme deux phénomènes aux propriétés bien distinctes. En 1858, Adolf von Baeyer crée la première molécule fluorescente de synthèse, la fluorescéine. Le mariage de la microscopie optique avec la fluorescence ouvre la voie au formidable développement de la microscopie à épifluorescence basée sur l'épidétection du rayonnement de fluorescence généré par l'excitation d'une molécule par un photon.

Une importante amélioration de la microscopie de fluorescence a été l'invention de la microscopie confocale, basée sur le filtrage du rayonnement provenant de plans hors focus de l'échantillon grâce à l'utilisation d'un sténopé ou diaphragme confocal. Par la suite, cette résolution axiale propre à la microscopie confocale a été concurrencée

par la microscopie biphotonique, c'est-à-dire mettant en jeu une excitation à deux photons (EDP), qui offre encore de nouvelles opportunités en termes de profondeur de tissu accessible à l'imagerie grâce à l'utilisation de photons de moindre énergie. Une autre piste pour l'imagerie des tissus biologiques est d'observer la génération de seconde harmonique (GSH) qui offre un contraste très spécifique sur certaines structures sans apport de molécules exogènes.

Le présent chapitre dresse un tableau des techniques de microscopies (confocale, biphotonique, GSH) utilisées dans le cadre de cette thèse et dont les résultats sont présentés aux chapitres 5 à 7.

3.2 Interaction rayonnement-matière et fluorescence

3.2.1 Principes de la photoluminescence

La photoluminescence correspond au phénomène d'émission de photons consécutive à l'excitation optique d'un matériau ou d'une molécule. Pratiquement tout rayonnement, en particulier de nature optique, interagit avec l'échantillon cible et provoque des conséquences différentes selon le type de rayonnement incident et les propriétés structurales physico-chimiques de la cible. Il peut s'agir notamment d'une diffusion élastique (avec conservation de l'énergie des photons) ou d'absorption du rayonnement incident par les molécules qui passent alors dans un état dit excité. Dans ce dernier cas, la tendance naturelle de la molécule sera un retour plus ou moins rapide à l'état fondamental, de moindre énergie. Cette relaxation du matériau peut se manifester par une augmentation locale de l'agitation thermique (désexcitation non radiative) ou par l'émission de photons (désexcitation radiative). Cette dernière interaction est appelée luminescence et englobe deux phénomènes : la fluorescence et la phosphorescence. Le terme photoluminescence n'est employé que dans le cas d'une excitation optique, par opposition à d'autres formes d'excitation qui peut notamment être biologique (bioluminescence), chimique (chimiluminescence) ou mécanique par frottements (triboluminescence).

La génération d'un rayonnement de photoluminescence est habituellement provoquée par absorption de photons émis par une source d'excitation dans la gamme de longueur d'onde allant du visible à l'ultraviolet. Le rayonnement dit de fluorescence correspond à l'émission de photons qui traduit la transition d'un état singulet excité vers l'état singulet fondamental (*cf.* Figure 33). Dans ce cas, le spin électronique des molécules ne change pas d'orientation et la transition est alors rapide : la durée de vie de l'état excité S_1 d'une molécule fluorescente (également appelée fluorophore) varie typiquement de quelques dizaines de picosecondes à quelques nanosecondes.

Généralement, le processus d'absorption d'un photon place la molécule dans un niveau singulet excité S_1 ou S_2 (dans lequel tous les électrons de spins opposés sont appariés deux à deux). La molécule retombe alors dans l'état singulet fondamental

en générant un photon de fluorescence principalement selon deux scénarii : soit directement après relaxation, c'est-à-dire après transition non radiative vers l'état vibrationnel le plus bas du niveau excité, soit après passage par un état d'excitation inférieur par conversion interne non radiative (cas présenté dans la Figure 33). Dans certaines situations, un troisième scénario est observé : la molécule passe par un état triplet T_1 (l'électron excité a un spin parallèle à l'électron avec lequel il était apparié à l'état fondamental) grâce à une transition non radiative due au couplage spin-orbite. Le retour de T_1 vers S_0 peut s'accompagner de l'émission d'un photon, mais la transition est bien plus lente : de plusieurs dizaines de microsecondes à plusieurs secondes, voire même davantage. Pour distinguer ce troisième scénario de ceux associés à la fluorescence, le terme approprié est celui de phosphorescence. Compte tenu des durées de vies très différentes mises en jeu, l'utilisation de la fluorescence reste beaucoup plus intéressante en microscopie que la phosphorescence. Notons toutefois que des microscopes à phosphorescence ont été présentés dans le passé, mais ceux-ci sont réservés à l'observation de cellules (en particulier certaines bactéries ou levures et des fibroblastes)³¹⁷ ou à des mesures de courbes de déclin de phosphorescence pour sonder l'environnement³¹⁸.

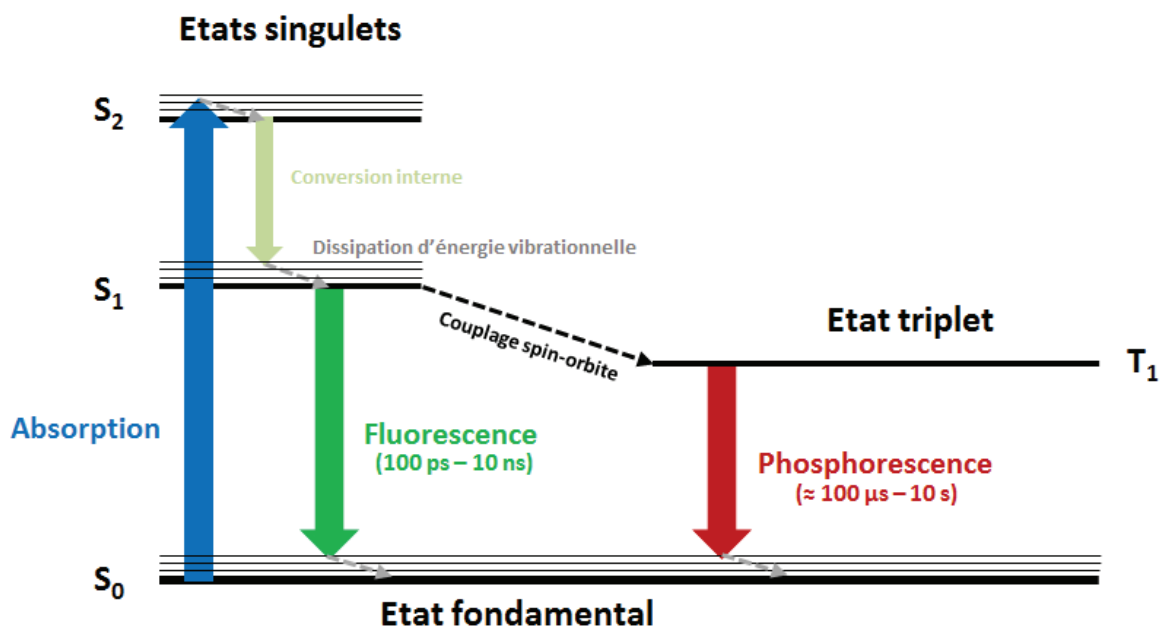


Figure 33. Diagramme de Jablonski simplifié. S_0 , S_1 et S_2 désignent respectivement l'état fondamental singulet et le premier et deuxième état excité singulet. T_1 désigne le premier état triplet. Pour chacun de ces états d'énergie des états vibrationnels et rotationnels peuvent exister.

3.2.2 Spectres d'absorption et d'émission

Les différentes relaxations vibrationnelles, rotationnelles et autres conversions internes non radiatives sont à l'origine de pertes d'énergie entre les photons d'excitation et les photons d'émission. C'est Edmond Becquerel qui observe pour la première fois en 1842 le fait que les photons émis ont une longueur d'onde supérieure aux photons excitateurs (*cf.* référence [316] pour une revue historique). Ce phénomène est appelé « déplacement de Stokes »³¹⁹ en hommage au physicien George Stokes qui l'a décrit en 1852 dans la fluorescence du minéral fluorine. Les spectres d'absorption et d'émission doivent être considérés en terme de distribution de probabilité de transition et sont caractéristiques de la structure énergétique des molécules³²⁰ : ainsi, chaque molécule possède des spectres d'absorption et d'émission propres qui reflètent les transitions énergétiques autorisées par le principe d'exclusion de Pauli.

Le déplacement de Stokes revêt une importance capitale en microscopie de fluorescence, car si ce déplacement est faible (cas des spectres de droite de la Figure 34 comparés aux spectres de gauche) il sera difficile d'isoler au moyen de filtres le rayonnement de fluorescence du rayonnement excitateur. Qui plus est, si le recouvrement de ces deux spectres est important il peut en résulter une réabsorption des photons de fluorescence, produisant des distorsions dans le spectre d'émission.

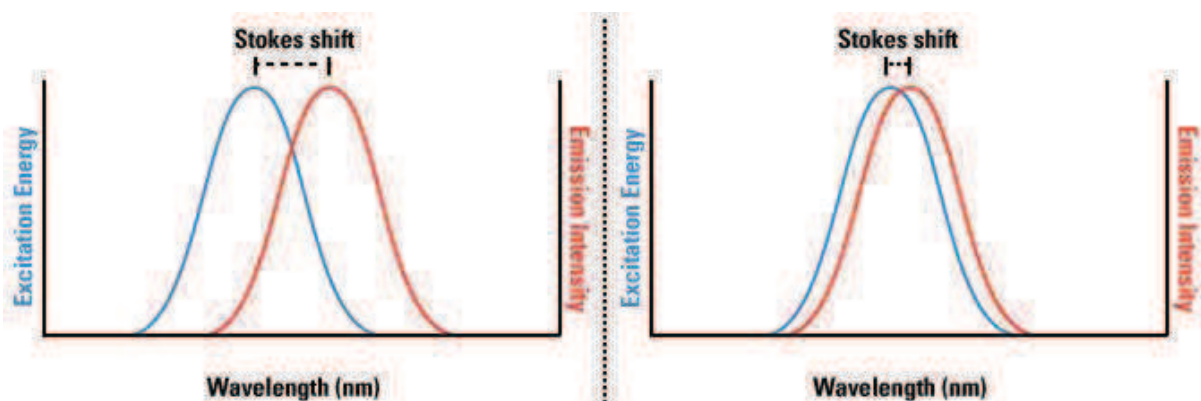


Figure 34. Déplacement de Stokes de deux exemples de fluorophores. (c) Thermo Scientific.

Généralement, le spectre d'émission d'un fluorophore est typiquement une image inversée du spectre d'absorption de la transition S_0 vers S_1 . Cela est dû au fait que l'excitation électronique n'altère quasiment pas la géométrie de la molécule et que les états vibrationnels et rotationnels des états excités sont globalement similaires à ceux de l'état fondamental³²¹. Toutefois cet effet « miroir » des spectres n'est pas systématique, notamment lorsque la molécule existe sous des formes différentes caractérisées par des longueurs d'onde d'absorption et d'émission différentes.

3.2.3 Rendement quantique d'un fluorophore et déclin de la fluorescence

L'émission de fluorescence est caractérisée par deux autres paramètres : le rendement quantique Q d'une part, défini comme le ratio de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés par la molécule, et la durée de vie de fluorescence d'autre part correspondant à la durée de l'état excité.

Suite à l'absorption d'un photon et au passage de la molécule vers un état excité, le retour à l'état fondamental se fait par une combinaison de processus radiatifs (principalement la fluorescence) et non radiatifs (relaxations et conversions internes). Ces deux types de processus sont caractérisés respectivement par les probabilités $k_0 = \tau_0^{-1}$ pour l'émission de fluorescence et k_{nr} , cette dernière englobant les probabilités de tous les processus non radiatifs.

A la suite d'une excitation impulsionnelle,, si f^* représente la fraction du fluorophore encore excitée, la variation élémentaire df^* de f^* pendant la durée dt est naturellement négative et s'exprime par :

$$\frac{df^*}{dt} = -(k_0 + k_{nr})f^*$$

Équation 1

Cette équation décrit la décroissance exponentielle de f^* et donc celle du nombre de photons émis. Ainsi, l'intensité de fluorescence émise varie selon la loi :

$$I_F(t) = I_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau_F}\right)}$$

Équation 2

où $\tau_F = \frac{1}{k_0 + k_{nr}}$ représente le temps de vie de fluorescence.

Le nombre total de photons émis est donc :

$$N_{\text{émis}} = \int_0^{+\infty} I_F(t) dt = \tau_F I_0$$

Équation 3

Immédiatement après l'impulsion excitatrice, c'est-à-dire au temps $t = 0^+$, le nombre de molécules excitées est égal au nombre de photons absorbés. Dans ce cas, l'intensité de fluorescence vaut :

$$I_0 = k_0 N_{abs}$$

Équation 4

puisque k_0 correspond autant à la probabilité d'émettre un photon de fluorescence qu'à la probabilité d'absorber un photon selon la transition opposée³²².

Le rendement quantique vaut donc :

$$Q = \frac{N_{\text{émis}}}{N_{\text{absorbés}}} = \frac{\tau_F}{\tau_0}$$

Équation 5

Si les processus de désexcitation non radiative sont lents par rapport au processus d'émission de fluorescence, c'est-à-dire si $k_{nr} \ll k_0$, alors le rendement quantique est proche de 100 % et le temps de déclin de la fluorescence est proche de la durée de vie radiative τ_0 .

En pratique, le modèle simple exposé ci-dessus n'est pas adaptable tel quel à la majorité des situations où coexistent plusieurs espèces moléculaires et pour lesquelles il est souvent nécessaire de décrire le déclin de fluorescence par une combinaison d'exponentielles. Par ailleurs, les profils de spectre dépendent également fortement de l'environnement local de la molécule (pH, viscosité, température, potentiel électrique, présence d'ions ou d'oxygène ou interactions possibles avec d'autres molécules)³²³. Ces propriétés dépendantes de l'environnement rendent justement certaines molécules fluorescentes très utiles en biologie en tant que sondes environnementales (mesure de pH, oxygénation, localisation de canaux calciques ou potassiques, étude du potentiel électrique, etc.).

3.2.4 Problèmes liés à l'excitation d'une molécule : photo-blanchiment, photo-dégradation, effets thermiques

Une molécule fluorescente excitée a tendance à être plus réactive d'un point de vue chimique³²⁴. Des réactions souvent irréversibles sont produites, conduisant à la formation de nouvelles espèces par polymérisation, oxydation, dissociation, isomérisation ou liaisons avec d'autres molécules. Ces « photo-produits » sont souvent non fluorescents ou bien caractérisés par des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence différents de ceux de la molécule initiale. Ces réactions se traduisent par une perte progressive plus ou moins rapide de la fluorescence spécifique de la molécule d'intérêt. Ce phénomène est appelé **photo-blanchiment**. De plus, les espèces créées peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement biologique : c'est la **photo-toxicité** causée notamment par la création de radicaux libres. Ces deux effets sont globalement d'autant plus importants que l'intensité incidente est élevée.

L'excitation d'une molécule par un faisceau optique intense provoque en outre une augmentation locale de l'agitation thermique des molécules traversées par le faisceau incident. Cet échauffement dépend des capacités d'absorption thermique des molécules et est généré lors des différents processus de conversion interne et

de relaxation. L'effet sur la molécule est souvent irréversible et très dommageable pour le tissu biologique.

Ces différents problèmes liés à l'excitation d'un fluorophore peuvent être atténués par la recherche d'un compromis entre une intensité du faisceau incident trop faible pour générer l'émission d'un rayonnement de fluorescence détectable dans de bonnes conditions et une intensité trop élevée occasionnant photo-blanchiment, photo-toxicité et effets thermiques.

Notons pour conclure que ces effets en général dommageables à l'imagerie classique peuvent avoir des applications intéressantes. La mesure de la décroissance de fluorescence peut être utilisée pour mesurer des paramètres liés à l'environnement moléculaire du fluorophore ou à l'état métabolique des cellules ou du tissu³²⁵. C'est l'imagerie FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*). Quant à la photo-toxicité et aux effets thermiques engendrés par l'absorption de photons, ils peuvent être recherchés dans le but de détruire spécifiquement des cellules notamment tumorales : c'est la photo-thérapie utilisée par exemple en dermatologie pour traiter les carcinomes³²⁶.

3.2 Microscopie confocale de fluorescence

3.2.1 Microscopie de fluorescence à un photon

Durant le XX^{ème} siècle, la microscopie optique est devenue un puissant moyen d'étude en biologie en entrant dans l'ère de la fluorescence. En effet, la microscopie de fluorescence permet la détection et la visualisation de cellules, particules ou tissus spécifiques inaccessibles en microscopie optique conventionnelle. Pour cela, elle a grandement bénéficié des avancées en chimie des fluorophores, immunohistochimie et manipulations génétiques. Plusieurs techniques de microscopie de fluorescence, basées sur l'excitation monophotonique dans le visible ou l'ultraviolet, ont été développées afin de révéler des processus biologiques inconnus jusqu'alors.

La **microscopie de fluorescence classique par transmission** repose sur l'excitation de l'échantillon dans sa totalité grâce à un faisceau excitateur situé du côté de l'échantillon opposé à l'objectif. Cette technique est bien adaptée à l'étude d'échantillons extrêmement fins car c'est le signal de fluorescence transmis à travers l'échantillon qui est collecté. La résolution axiale de la microscopie de fluorescence classique par transmission est grandement limitée par le fait que le signal provenant d'une zone de l'échantillon située dans le plan focal du microscope est entaché de la fluorescence provenant de tous les plans hors focus de l'échantillon.

La **microscopie à épi-fluorescence** repose sur la collection de la fluorescence émise dans la direction de l'objectif du microscope, ce dernier servant à la fois à focaliser le faisceau excitateur et à collecter le signal utile. Cette technique permet l'imagerie de tissus biologiques plus épais, même si la pénétration du faisceau excitateur est grandement perturbée par l'absorption du rayonnement visible à quelques dizaines de micromètres. De même que pour la microscopie de fluorescence classique par transmission, la résolution axiale de la microscopie à épi-fluorescence est fortement limitée par la superposition des signaux de fluorescence provenant des plans hors focus de l'échantillon.

La **microscopie confocale de fluorescence** vise justement à surmonter le problème de la superposition de l'émission de fluorescence dans le plan focal et dans les plans voisins afin d'augmenter la résolution axiale. Pour ce faire, un simple sténopé est positionné sur le chemin optique du faisceau d'émission de fluorescence, permettant de filtrer spatialement la grande majorité du signal défocalisé. Le principe, les performances et les limitations du microscope confocal sont abordés dans les paragraphes suivants.

3.2.2 Principe physique

Le principe de la microscopie confocale a été breveté en 1957 par Marvin Minsky^{327,328} puis produit commercialement à partir de 1980 suite au développement de sources lasers adaptées et aux progrès de l'instrumentation notamment en matière de balayage du faisceau excitateur sur l'échantillon³²⁹ (le balayage sera abordé à la partie 3.5.3). La microscopie confocale s'est alors largement répandue en sciences, et particulièrement en biologie, en permettant l'observation de structures tridimensionnelles dans des tissus relativement épais tels que des cultures cellulaires ou des tranches de tissus³³⁰. La Figure 35 présente le principe de fonctionnement d'un microscope confocal.

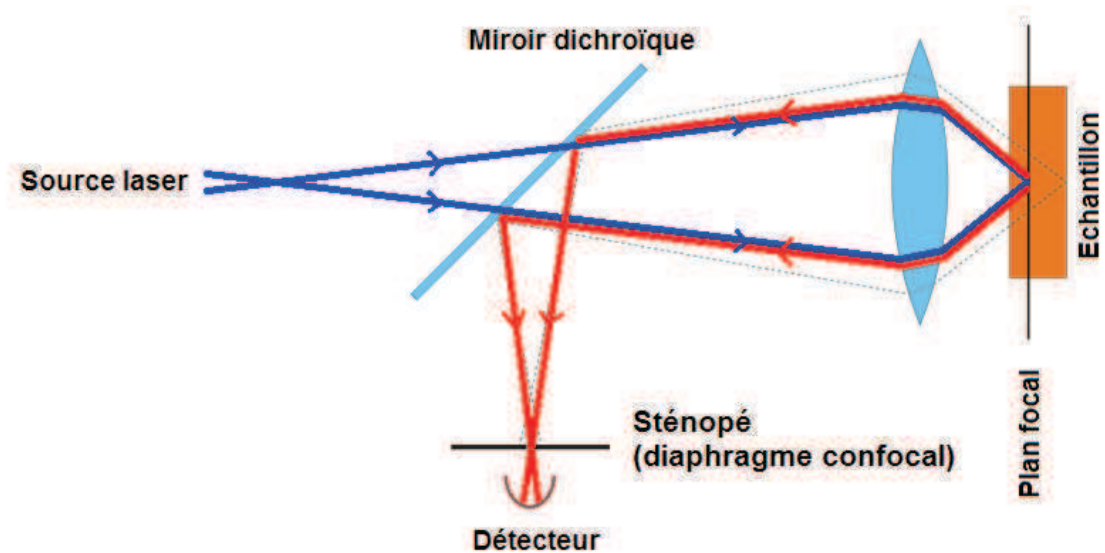


Figure 35. Principe du microscope confocal. Les traits bleus représentent le faisceau excitateur, les traits rouges le signal de fluorescence émise à partir du plan focal objet de la lentille et les traits gris en pointillés le signal de fluorescence émise à partir d'un plan défocalisé de l'échantillon.

Le faisceau d'excitation (laser ou lampe) est focalisé sur l'échantillon par l'objectif. La fluorescence émise vers l'arrière est collectée par ce même objectif et focalisée vers un détecteur après avoir été déviée par un miroir dichroïque permettant la discrimination entre le faisceau d'excitation et le faisceau d'émission. Un sténopé ou diaphragme confocal (*pinhole* en anglais) est placé dans le plan focal image de la lentille. Ce sténopé laisse passer la fluorescence émise par la zone de l'échantillon située dans le plan focal objet de la lentille (traits bleus sur la Figure 35) et bloque celle émise par les plans adjacents, donc défocalisés (traits pointillés gris sur la Figure 35). Il en résulte une très bonne résolution axiale, mais aussi une amélioration de la résolution latérale de la microscopie confocale par rapport à la microscopie classique, permettant l'imagerie tridimensionnelle d'objets par prise successive de clichés en excitant à différentes profondeurs de l'échantillon.

3.2.3 Performances

La taille du sténopé conditionne dans une certaine mesure la résolution axiale de la microscopie confocale. En effet, l'augmentation du diamètre du sténopé permet la détection d'une plus grande quantité de fluorescence au détriment de la résolution à cause de la superposition du signal provenant de plans défocalisés. La limite inférieure du diamètre du sténopé est conditionnée par la limite de diffraction. Ainsi, le diamètre optimal ϕ_{max} du sténopé offrant la meilleure résolution sera fonction de la taille de la tâche d'Airy, c'est-à-dire :

$$\phi_{max} = \phi_{Airy}\gamma$$

Équation 6

où γ est le grandissement du système optique de focalisation et ϕ_{Airy} le diamètre de la tâche d'Airy au foyer de l'objectif, dépendant de la longueur d'onde. Cette dépendance en longueur d'onde est due à la diffraction. La résolution au sens de Rayleigh, aussi appelée pouvoir séparateur (capacité à discriminer deux disques d'Airy), correspond à la distance entre deux points objets pour laquelle le maximum d'intensité du disque d'Airy du premier point correspond au premier minimum du disque d'Airy du second point.

Dans le plan x-y correspondant au plan de l'image, la résolution latérale est notée $d_{xy\ confocal}$, et sa valeur théorique est égale à :

$$d_{xy\ confocal} = \frac{0.4\lambda}{ON}$$

Équation 7

où ON désigne l'ouverture numérique de l'objectif et λ la longueur d'onde.

Dans la direction de propagation, et avec un sténopé adapté à la limite de diffraction, la résolution axiale, notée $d_{z\ confocal}$, vaut en théorie :

$$d_{z \text{ confocal}} = \frac{1.4\lambda}{ON^2}$$

Équation 8

A titre d'exemple, l'objectif utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse (objectif à immersion Carl Zeiss W Plan-Apochromatique 20×/1.0 DIC D=0.17 M27 75mm) fournit pour une longueur d'onde de 500 nm une résolution axiale théorique de 700 nm et une résolution latérale théorique de 200 nm. Cette excellente résolution axiale de la microscopie confocale, de l'ordre du micromètre, la rend parfaitement adaptée à l'imagerie tridimensionnelle d'échantillons de quelques dizaines de micromètres. En pratique, ces valeurs théoriques sont rapidement dégradées par la diffusion du faisceau excitateur lorsque le point focal s'enfonce dans l'échantillon. Cette dégradation est d'autant plus grande que la longueur d'onde est faible et que le tissu est diffusant.

Une bibliographie complète présentant les travaux détaillant les considérations théoriques des performances de la microscopie confocale est disponible en annexe de la référence [331].

3.2.4 Limitations

Une première limitation de la microscopie confocale provient du large volume de l'échantillon dans lequel se produit l'absorption monophotonique comparé au volume dont la fluorescence est détectée, en dehors duquel le signal est filtré par le sténopé (cf. Figure 36). Il en résulte un **photo-blanchiment** prématuré de l'échantillon dommageable à l'imagerie.

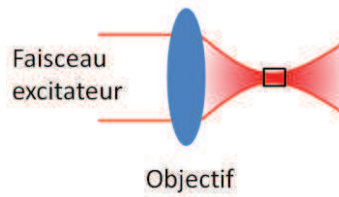


Figure 36. Représentation schématique du volume de l'échantillon dans lequel est généré de la fluorescence lors d'excitation monophotonique. Le rectangle noir représente le volume de l'échantillon dont la fluorescence peut être détectée en microscopie confocale de fluorescence, le reste étant filtré par le sténopé.

Le fait que le volume de l'échantillon absorbant le faisceau incident soit largement plus grand que le volume dont l'émission de fluorescence peut être détectée engendre également une potentielle **photo-toxicité** importante, notamment lors du balayage de l'échantillon en profondeur où la même zone est excitée à plusieurs reprises³³².

Cependant, la limitation principale de la microscopie confocale reste la très rapide dégradation de la résolution lorsque le point focal s'enfonce dans l'échantillon. Les courtes longueurs d'onde d'excitation (UV ou visible) rendent le phénomène de diffusion rédhibitoire dès que la profondeur d'imagerie dépasse quelques dizaines de micromètres.

3.2.5 Fluorophores utilisés

Les fluorophores utilisés en microscopie confocale dans le cadre de cette thèse sont la protéine de fluorescence verte (GFP) et l'Alexa Fluor 647 dont les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont présentés en Figure 37.

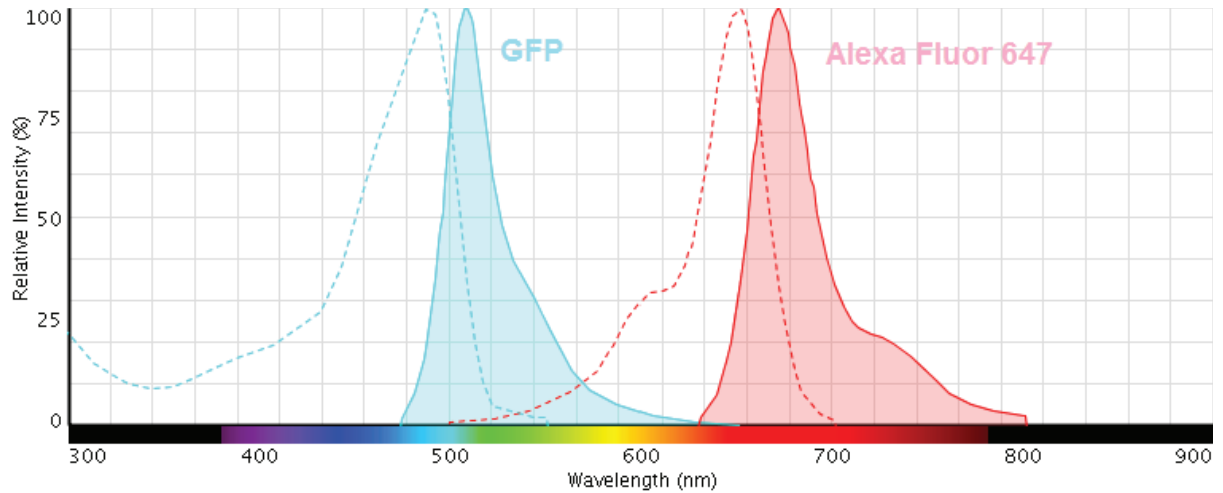


Figure 37. Spectres normalisés d'absorption monophotonique (pointillés) et d'émission (traits pleins) de la GFP (cyan) et de l'Alexa Fluor 647 (rose). Extrait du SpectraViewer de Life Technologies.

3.3 Microscopie de fluorescence par excitation à deux photons

3.3.1 Brève revue historique

La possibilité de générer des processus nonlinéaires par des faisceaux optiques intenses est reconnue depuis de nombreuses années. En particulier, le processus d'EDP a été prédit pour la première fois par Maria Göppert-Mayer en 1929 dans sa thèse de doctorat sur les transitions quantiques à deux photons dans les atomes^{333,334}. Ces travaux d'une importance capitale ont été récompensés par le prix Nobel de physique en 1963. Le travail expérimental en optique non linéaire n'a cependant réellement débuté qu'après la mise au point du premier laser, en 1960³³⁵. Dès 1961, les travaux de Franken et de son équipe portent sur la génération de seconde harmonique³³⁶ dont il sera question plus en détail au paragraphe 3.4 Génération d'harmoniques. Deux ans après la publication de l'article de Franken *et al.*, Kaiser et Garret décrivent la première observation d'EDP³³⁷ à travers la fluorescence de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$. Par la suite, ils démontrent que l'EDP est capable d'exciter la fluorescence de colorants organiques. Depuis, les spectres d'absorption par EDP de nombreuses molécules ont été mesurés (*cf.* référence [338] pour une revue). La spectroscopie à deux photons a alors été largement employée pour étudier la structure électronique des états excités de molécules, apportant par l'expérience la vérification ultime de la théorie de Maria Göppert-Mayer 32 ans après sa formulation théorique.

Par analogie avec les processus à deux photons, la spectroscopie par excitation à trois photons a été décrite par Singh et Bradley en 1964³³⁹, posant les bases de la microscopie de fluorescence par excitation à trois photons (*cf.* références [340,341] pour une revue). Le terme générique de microscopie multiphotonique englobe dorénavant les microscopies de fluorescence par excitation à deux (microscopie biphotonique), trois, ou encore quatre photons³⁴².

La microscopie par EDP a connu un essor spectaculaire en biologie depuis les travaux de Denk *et al.* en 1990³⁴³. Depuis, de nombreuses applications et développements de cette technique ont été publiés, conduisant à des avancées significatives dans la compréhension de différents champs de la biologie moderne

dont l'immunologie^{344,345}, la cancérologie³⁴⁶, les neurosciences³⁴⁷ ou encore la biologie du développement³⁴⁸.

3.3.2 Principe physique

L'EDP de molécules est un processus non linéaire mettant en jeu l'absorption quasi-simultanée de deux photons chacun possédant une énergie deux fois inférieure à celle nécessaire pour provoquer la transition vers un état excité (cf. Figure 38).

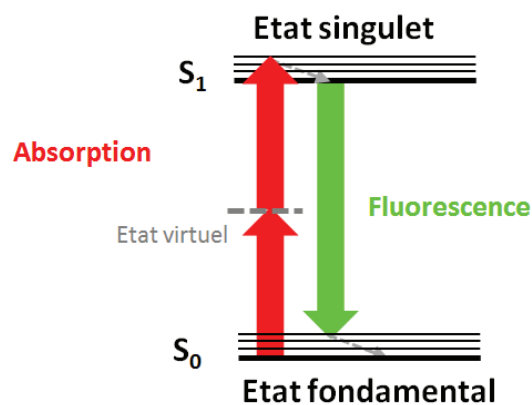


Figure 38. Génération du rayonnement de fluorescence par excitation à deux photons. Les flèches rouges représentent chacune un photon d'énergie deux fois inférieure à celle requise pour la transition vers l'état S_1 . Le photon de fluorescence (flèche verte) est généré lors du retour de la molécule à l'état fondamental. Les flèches grises en pointillés représentent les transitions non radiatives.

D'un point de vue quantique, le premier photon excite la molécule qui passe dans un état virtuel intermédiaire : c'est un état instable à très faible durée de vie (quelques fs). L'absorption d'un second photon, si elle a lieu durant les quelques femtosecondes suivantes, lui apporte finalement l'énergie nécessaire pour accéder à l'état excité. Une telle densité spatio-temporelle de photons nécessite des faisceaux très intenses, et en pratique, ce processus d'absorption à deux photons ne se produira qu'aux points de focalisation.

Dans le cas de l'EDP, le nombre de photons absorbés par unité de temps varie quadratiquement avec l'intensité incidente^{349,350} :

$$N_{2P} = \delta C I_0^2$$

Équation 9

où C est la concentration en fluorophore, exprimée en molécules.cm⁻³, I_0 l'intensité incidente (en photons.cm⁻².s⁻¹), et δ la section efficace d'absorption à deux photons (en cm⁴.s.molécule⁻¹.photon⁻¹). Ce paramètre est souvent exprimé en Göppert-Mayer (1 GM = 10⁻⁵⁰ cm⁴.s.molécule⁻¹.photon⁻¹).

Le flux de photons détectés, noté Fl_{2P} et exprimé en photons/cm⁻².s⁻¹, vaut :

$$Fl_{2P} = KC \frac{Q}{2} \delta I_0^2$$

Équation 10

où K est une constante dépendant des conditions expérimentales (efficacité de détection, sensibilité en fonction de la longueur d'onde, etc.), d est la distance sur laquelle l'échantillon absorbe (en cm) et Q le rendement quantique de fluorescence. Le facteur 1/2 associé provient du fait que deux photons sont nécessaires à l'excitation d'une molécule, contre un seul photon généré.

Par comparaison, et en l'absence de saturation et de photo-blanchiment, le nombre de photons absorbés par unité de temps et de volume dans le cas d'absorption monophotonique est proportionnel à l'intensité incidente :

$$N_{1P} = \sigma_{1P} C I_0$$

Équation 11

où σ_{1P} est la section efficace d'absorption à un photon (exprimée en cm².molécule⁻¹). Le flux de photons de fluorescence détecté, noté Fl_{1P} vaut quant à lui :

$$Fl_1 = KC\sigma_{1P}QdI_0$$

Équation 12

Le flux de photons de fluorescence détecté, et donc l'intensité de fluorescence, varie donc quadratiquement avec l'intensité incidente dans le cas de l'EDP, alors que cette même grandeur varie linéairement pour le cas de l'excitation monophotonique.

3.3.3 Performances

Les sections efficaces d'absorption à deux photons étant relativement faibles, il convient de respecter certaines conditions afin d'optimiser l'excitation des fluorophores. En particulier, le flux de photons incident doit être très élevé afin d'obtenir la meilleure efficacité d'excitation de fluorescence. C'est pourquoi l'utilisation de sources lasers impulsionnelles ultra-courtes s'est imposée dans les microscopes biphotoniques.

Pour des impulsions de profils spatio-temporels gaussiens, l'intensité en un point de coordonnées (x, y, z) et au temps t est donnée par la relation suivante :

$$I(x, y, z, t) = I_0 \exp\left[-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_0^2}\right] \exp\left[-\frac{2z^2}{z_0^2}\right] \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^2\right]$$

Équation 13

où I_0 est l'intensité du faisceau incident, w_0 le *waist* du faisceau et τ la durée des impulsions. Dans le plan d'intensité maximale ($z=0$), l'énergie E d'une impulsion vaut :

$$E = \frac{P}{f} = \iint IdSdt$$

Équation 14

où $dS=dx dy$ est l'élément de surface, P la puissance moyenne de la source et f la fréquence des impulsions. Cette énergie s'exprime donc par :

$$E = \pi \sqrt{\pi} I_0 \frac{w_0^2}{2} \tau$$

Équation 15

Ces équations nous permettent de relier les paramètres de la source laser (P, f, τ), les paramètres de focalisation (w_0), et I_0 , l'intensité incidente :

$$I_0 = \frac{2}{\pi \sqrt{\pi}} \frac{P}{f} \frac{1}{\tau w_0^2}$$

Équation 16

D'après cette dernière expression, l'intensité incidente, et donc l'efficacité d'excitation, est d'autant plus importante que la durée des impulsions est brève et que le *waist* du faisceau est petit, pour une puissance moyenne donnée. Cela explique l'utilisation d'une source laser avec des impulsions les plus courtes possibles (typiquement 150 fs pour le laser Chameleon Coherent utilisé dans le cadre de ces travaux de thèse) et d'un objectif possédant une grande ouverture numérique de façon à minimiser la tâche d'Airy. En effet, le nombre de photons absorbés, et donc le flux de fluorescence émise, est inversement proportionnel à τ^2 et w_0^4 (d'après Équation 16).

La résolution de la microscopie par EDP dépend de la fonction d'étalement du point (*Point Spread Function* en anglais).

En reprenant l'expression de l'Équation 13, le volume d'excitation V vaut alors :

$$V = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} w_0^2 z_0$$

Équation 17

Pour un objectif d'ouverture numérique $ON = 1.0$ et pour $\lambda = 800 \text{ nm}$, les résolutions axiale (z_0) et latérale (w_0) théoriques valent environ 900 nm et 400 nm, et sont donc du même ordre de grandeur que pour la microscopie confocale (cf. 3.2.3).

3.3.4 Avantages et limitations

Par rapport à la microscopie confocale à excitation monophotonique, la microscopie par EDP possède de nombreux avantages et quelques inconvénients.

Premièrement, le fait que la probabilité d'absorption quasi-simultanée de deux photons dépende de manière quadratique de l'intensité incidente engendre le fait que la fluorescence n'est émise que dans une zone très localisée de l'échantillon (cf. Figure 39). Cette zone est caractérisée par la fonction d'étalement du point qui dépend notamment de l'instrumentation et de la longueur d'onde du rayonnement. De ce fait, l'utilisation d'un sténopé est rendue dans la plupart des cas superflue car la totalité de la fluorescence générée peut être collectée sans dégradation de la résolution comme c'est le cas en microscopie de fluorescence conventionnelle.

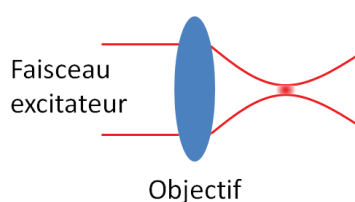


Figure 39. Représentation schématique du volume de l'échantillon dans lequel est générée de la fluorescence lors d'excitation à deux photons.

Le fait que le volume excité soit de taille comparable au voxel de détection entraîne une diminution importante du photo-blanchiment et de la photo-toxicité propres à la microscopie confocale.

Un autre avantage de l'EDP est sa capacité à détecter la fluorescence dans des échantillons biologiques épais, en raison de la diffusion et de l'absorption réduite du rayonnement proche infrarouge utilisé pour l'excitation. Dans le cas de la diffusion quelquefois évoquée sous le terme « diffusion Rayleigh », les centres de diffusion ont une taille caractéristique de beaucoup inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente, et la section efficace de diffusion est inversement proportionnelle à la puissance quatrième de la longueur d'onde incidente³³⁸. Si des longueurs d'onde de fluorescence équivalentes sont générées en microscopie à un photon et à deux photons, un événement de diffusion durant la transition à deux photons a une probabilité environ 10 fois moindre de survenir en comparaison de son équivalent à un photon. Il en résulte une bien meilleure pénétrabilité du faisceau excitateur dans des échantillons diffusants, tels que les tissus biologiques. Même si cette diffusion est seulement une approximation du comportement réel de la propagation de la lumière dans les tissus biologiques, la proportionnalité inverse entre diffusion et longueur d'onde excitatrice demeure valide³³⁸.

Enfin, la microscopie par EDP possède par rapport à la microscopie confocale un avantage quant au fait que les spectres d'émission et d'absorption sont beaucoup moins proches, rendant leur discrimination plus simple d'un point de vue pratique en réduisant le risque d'atténuation du signal utile.

La microscopie par EDP ne possède toutefois pas que des avantages. Parmi ses inconvénients, le principal est la nécessité d'une source laser impulsionnelle, souvent complexe et onéreuse. Un autre aspect négatif tient aux résolutions axiale et latérale légèrement dégradées par rapport à la microscopie confocale.

3.3.5 Fluorophores utilisés

Les fluorophores utilisés en microscopie par EDP dans le cadre de cette thèse sont la variante améliorée de la protéine de fluorescence verte (eGFP) et l'Alexa Fluor 568 dont les spectres d'absorption et de fluorescence sont présentés sur les Figure 40 et Figure 41. Le spectre de l'Alexa Fluor 633, également employée dans ces

3.4 Génération de seconde harmonique

3.4.1 Généralités

La Génération de Seconde Harmonique (GSH, souvent évoquée sous son acronyme anglais SHG pour *Second Harmonic Generation*) est un processus optique non linéaire de doublage de fréquence par lequel deux photons de fréquence donnée sont convertis en un photon unique à la fréquence double. Ce phénomène a été observé pour la première fois en 1961³³⁶ par Franken *et al.* qui ont montré que la propagation d'un faisceau provenant d'un laser à rubis dans un cristal de quartz génère un rayonnement optique à la fréquence harmonique double. Cette technique est passée relativement inaperçue durant plusieurs décennies en raison du faible nombre de matériaux connus capables de générer ce signal³⁵²⁻³⁵⁴. C'est la découverte de marqueurs endogènes pouvant conduire à la GSH qui a provoqué un intérêt pour l'utilisation de cette technique en biologie, d'autant plus que les résolutions spatiales de la microscopie par EDP et par GSH sont comparables. Toutefois, GSH et microscopie par EDP sont par nature fondamentalement différents. En effet, la GSH est basée sur une diffusion non linéaire alors que l'imagerie par EDP repose sur une absorption non linéaire précédant la génération de fluorescence. Ainsi, la GSH est une technique cohérente alors que l'EDP ne l'est pas. Nous verrons dans les paragraphes suivants que la GSH repose, au niveau moléculaire, sur une diffusion non linéaire.

3.4.2 Diffusion non linéaire

Dans un premier temps, intéressons-nous à la diffusion radiative d'une molécule isolée, caractérisée par un simple dipôle électrique. Le moment dipolaire $\vec{\mu}$ s'écrit :

$$\vec{\mu} = q\vec{r}$$

Équation 18

où q est la charge du dipôle moléculaire et \vec{r} son déplacement relatif. Les forces, notamment électriques, appliquées aux électrons de la molécule occasionnent des modifications du moment dipolaire. Ces forces électriques sont caractérisées par des énergies d'interaction W de la forme :

$$W = \vec{\mu} \cdot \vec{E}$$

Équation 19

où \vec{E} est le champ électrique appliqué.

Dans ce modèle simplifié, la molécule symétrique est considérée comme une tige le long de laquelle le nuage électronique se déplace. Lors de l'illumination, le nuage électronique est soumis à une force sinusoïdale de pulsation ω , projetée le long de l'axe de la molécule. Il en résulte une déformation symétrique du nuage électronique, dont la décomposition en série de Fourier est gouvernée par un terme principal de pulsation ω , et générant ainsi une radiation diffusée à cette même pulsation ω (cf. Figure 42). Dans cette configuration, aucune GSH n'est possible puisque la décomposition en série de Fourier d'un signal symétrique ne comporte que des termes impairs.

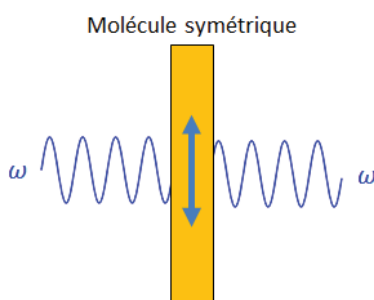


Figure 42. Le mouvement du nuage électronique d'une molécule symétrique uniaxe (rectangle jaune) produit à la pulsation ω provoque une diffusion non linéaire à la même pulsation.

Lorsque la molécule présente une dissymétrie de charge, par exemple en présence d'un groupe donneur d'électrons (D) à une extrémité et un groupe accepteur (A) à

l'autre, le mouvement électronique est favorisé dans la direction $D \rightarrow A$. Le mouvement électronique occasionné par la présence d'un champ excitateur sinusoïdal est toujours périodique, mais n'est plus symétrique (cf. Figure 43).

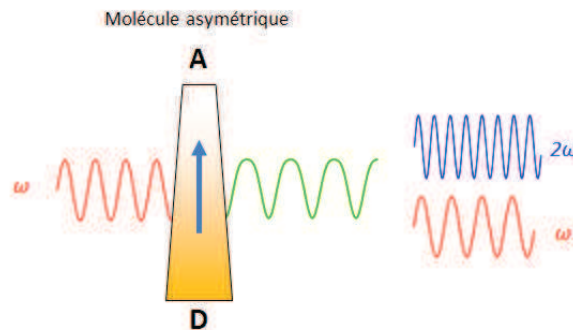


Figure 43. Dans une molécule asymétrique, le mouvement électronique induit par un champ sinusoïdal produit une lumière diffusée de fréquences combinées ω et 2ω .

Cette dissymétrie fait apparaître des termes pairs dans la décomposition en série de Fourier. L'accélération du nuage électronique induite par le champ sinusoïdal produit donc des composantes fréquentielles supplémentaires de rayonnement diffusé : en plus de la composante de pulsation ω , la radiation diffusée contient aussi des composantes non linéaires de pulsation 0 (champ statique) et 2ω (premier ordre de perturbation). Le rayonnement diffusé de pulsation 2ω peut être à l'origine de la GSH sous certaines conditions.

La question se complexifie lorsque plusieurs molécules, modélisées par des dipôles asymétriques, sont présentes côte-à-côte, à une distance bien inférieure à la longueur d'onde du rayonnement incident. Lorsque ces molécules sont excitées, leurs mouvements électroniques respectifs sont identiques et le rayonnement non linéaire diffusé sera en phase (cf. Figure 44).

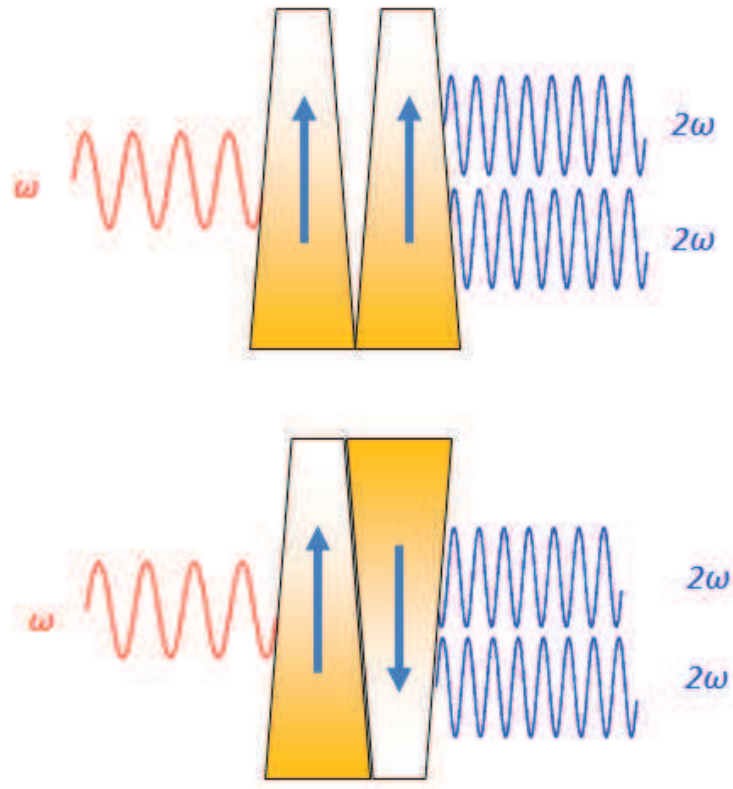


Figure 44. Diffusion non linéaire (sinusoïdes rouges) en phase pour deux molécules asymétriques, identiques, parallèles et proches (haut) et en opposition de phases pour deux molécules asymétriques, identiques et antiparallèles (bas). Les rayonnements diffusés de pulsation ω ne sont pas représentés pour plus de clarté.

Si les deux molécules proches sont orientées en sens opposé (cf. Figure 44), les composantes asymétriques des mouvements des nuages électroniques sont inversées. Les rayonnements non linéaires diffusés qui en résultent présentent un déphasage de π et s'annulent.

3.4.3 Génération de seconde harmonique à l'échelle tissulaire

Les applications biologiques ont généralement pour cible un tissu composé non pas d'une ou deux molécules mais d'une population plus fournie. Considérons donc une population de N molécules en solution, donc présentant des orientations aléatoires (cf. Figure 45, haut). Dans ce cas, les contributions individuelles ont des phases indépendantes et la résultante est incohérente. La puissance totale du rayonnement non linéaire diffusé est proportionnelle à N .

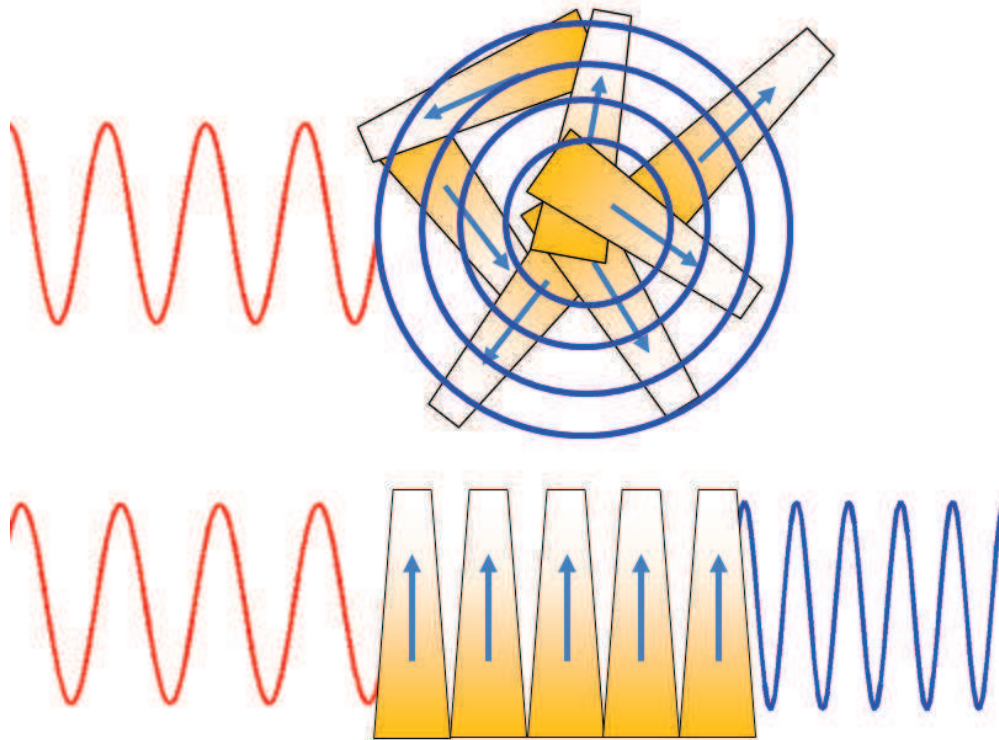


Figure 45. Diffusion non linéaire incohérente pour une population de molécules présentant des orientations aléatoires (haut) et cohérente pour une population de molécules ayant la même orientation conduisant à un signal de GSH (bas).

Lorsque les molécules sont alignées dans la même direction (cf. Figure 45, bas), les phases des contributions individuelles non linéaires sont conditionnées par la phase du champ incident. La résultante est donc cohérente. Lorsque ces rayonnements non linéaires diffusés est produite avec cohérence par un ensemble structuré de molécules, elle est appelée génération de seconde harmonique (GSH)³⁵⁶. Puisque la GSH est cohérente, sa puissance totale est proportionnelle à N^2 alors que le rayonnement non linéaire diffusé non cohérent conserve une puissance proportionnelle à N .

La GSH étant cohérente sa distribution angulaire n'est pas isotrope, contrairement à la diffusion non linéaire non cohérente. Le maximum d'intensité de GSH sera détecté dans la direction du champ exciteur.

3.4.4 Sources endogènes de GSH

La GSH permet donc l'observation de structures organisées de molécules non-centrosymétriques sans apport de sources exogènes comme il est souvent le cas en microscopie de fluorescence. Ces macrostructures denses sont relativement rares dans le tissu vivant, ce qui confère à la technique une spécificité très intéressante. Les sources endogènes de GSH en biologie sont principalement le collagène fibrillaire^{357–362}, les filaments de myosine^{358,363–365}, les faisceaux polarisés de microtubules^{366–368}.

La détection du **collagène fibrillaire** pulmonaire est un point clé de la technique d'imagerie pulmonaire *in vivo* dont il est question au chapitre 7 de la présente thèse. Il s'agit d'une famille de protéines présente dans la matrice extracellulaire des organismes, conférant aux tissus sa résistance mécanique. En particulier, la structure du chorion de la muqueuse pulmonaires est constituée de fibres de collagène fibrillaire résistantes à l'étirement et de fibres élastiques d'élastine, qui constituent par ailleurs une source importante de fluorescence endogène. Le collagène fibrillaire de type I est particulièrement capable de générer un signal de seconde harmonique^{369–373}. Notons que la détection du collagène par GSH offre de grandes possibilités en matière d'étude ou de diagnostic de maladies de type fibrose, notamment pulmonaire^{374,375} ou rénale³⁷⁶, mais aussi dans l'étude de la cornée, de la peau ou du cancer (*cf.* référence [377] pour une revue des applications de la GSH dans le diagnostic).

Le panel de gauche de la Figure 46 (extraite de l'article de conférence²⁷⁸ présenté en annexe 1) expose le signal de GSH du collagène fibrillaire d'un explant de poumon de souris présentant des alvéoles et une bronchiole. L'image du milieu de la même figure présente le signal d'endofluorescence du même échantillon, et l'image de droite la superposition de ces signaux.

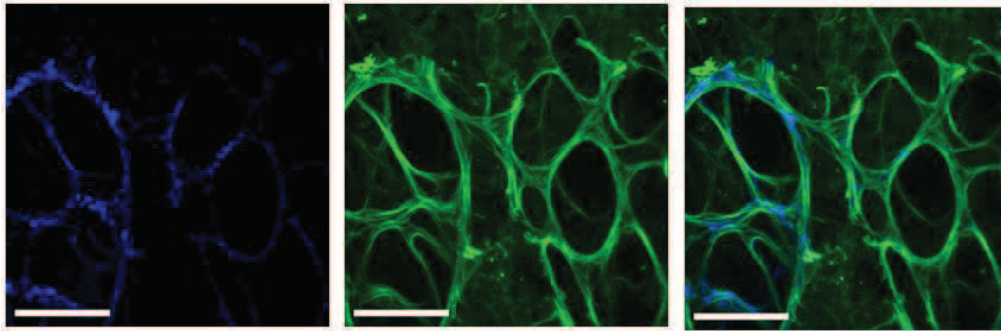


Figure 46. Z-projection d'une tranche de poumon de souris observée selon différents contrastes. Gauche : GSH, excitation à 854 nm. Milieu : endofluorescence, excitation à 488 nm. Droite : superposition de la GSH et de l'endofluorescence. Barres d'échelle = 40 μm .

3.5 Instrumentation et configuration

Le développement de microscopes à deux photons a connu un essor considérable depuis les travaux de Denk *et al.* en 1990³⁴³ jusqu'à l'heure actuelle où cette technique s'est imposée dans les laboratoires réalisant l'imagerie de tissus biologiques épais³⁷⁸. Bien que de nouvelles techniques d'imagerie à base de fluorescence soient constamment en cours de développement³²⁰, les sociétés spécialisées commercialisent dorénavant d'excellents systèmes de microscopie par EDP.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a été effectué sur un microscope développé et commercialisé par la société Carl Zeiss™, placé en laboratoire de niveau 2 de sécurité biologique (NSB-2) permettant la manipulation d'agents pathogènes de classe 2 (souche Sterne de *Bacillus anthracis*). Le LSM 710 NLO™ (LSM pour *Laser Scanning Microscope*, NLO pour *Nonlinear Optics*), couplé à un laser Chameleon Coherent™ et à trois lasers visibles permet de réaliser de l'imagerie par balayage en mode confocal, biphotonique et de générer le signal de seconde harmonique. Des détecteurs internes ou délocalisés permettent de collecter les signaux d'intérêt et de réaliser des images en 3 ou 4 dimensions (c'est-à-dire 3 dimensions spatiales au cours du temps).

3.4.4 Sources endogènes de GSH

La GSH permet donc l'observation de structures organisées de molécules non-centrosymétriques sans apport de sources exogènes comme il est souvent le cas en microscopie de fluorescence. Ces macrostructures denses sont relativement rares dans le tissu vivant, ce qui confère à la technique une spécificité très intéressante. Les sources endogènes de GSH en biologie sont principalement le collagène fibrillaire³⁵⁷⁻³⁶², les filaments de myosine^{358,363-365}, les faisceaux polarisés de microtubules³⁶⁶⁻³⁶⁸.

La détection du **collagène fibrillaire** pulmonaire est un point clé de la technique d'imagerie pulmonaire *in vivo* dont il est question au chapitre 7 de la présente thèse. Il s'agit d'une famille de protéines présente dans la matrice extracellulaire des organismes, conférant aux tissus sa résistance mécanique. En particulier, la structure du chorion de la muqueuse pulmonaires est constituée de fibres de collagène fibrillaire résistantes à l'étirement et de fibres élastiques d'élastine, qui constituent par ailleurs une source importante de fluorescence endogène. Le collagène fibrillaire de type I est particulièrement capable de générer un signal de seconde harmonique³⁶⁹⁻³⁷³. Notons que la détection du collagène par GSH offre de grandes possibilités en matière d'étude ou de diagnostic de maladies de type fibrose, notamment pulmonaire^{374,375} ou rénale³⁷⁶, mais aussi dans l'étude de la cornée, de la peau ou du cancer (*cf.* référence [377] pour une revue des applications de la GSH dans le diagnostic).

Le panel de gauche de la Figure 46 (extraite de l'article de conférence²⁷⁸ présenté en annexe 1) expose le signal de GSH du collagène fibrillaire d'un explant de poumon de souris présentant des alvéoles et une bronchiole. L'image du milieu de la même figure présente le signal d'endofluorescence du même échantillon, et l'image de droite la superposition de ces signaux.

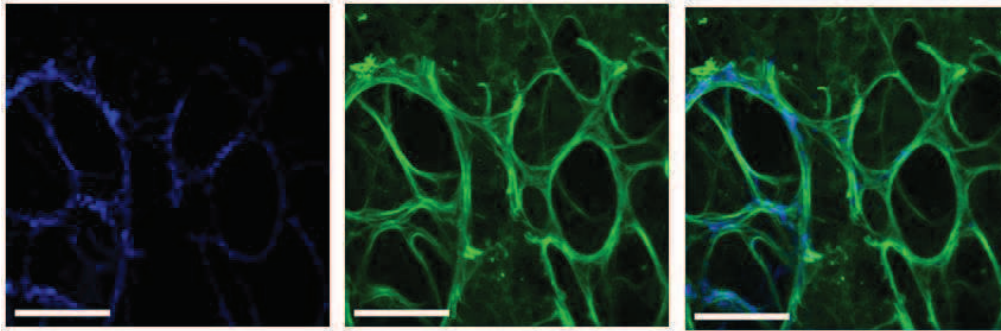


Figure 46. Z-projection d'une tranche de poumon de souris observée selon différents contrastes. Gauche : GSH, excitation à 854 nm. Milieu : endofluorescence, excitation à 488 nm. Droite : superposition de la GSH et de l'endofluorescence. Barres d'échelle = 40 μ m.

3.5 Instrumentation et configuration

Le développement de microscopes à deux photons a connu un essor considérable depuis les travaux de Denk *et al.* en 1990³⁴³ jusqu'à l'heure actuelle où cette technique s'est imposée dans les laboratoires réalisant l'imagerie de tissus biologiques épais³⁷⁸. Bien que de nouvelles techniques d'imagerie à base de fluorescence soient constamment en cours de développement³²⁰, les sociétés spécialisées commercialisent dorénavant d'excellents systèmes de microscopie par EDP.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a été effectué sur un microscope développé et commercialisé par la société Carl Zeiss™, placé en laboratoire de niveau 2 de sécurité biologique (NSB-2) permettant la manipulation d'agents pathogènes de classe 2 (souche Sterne de *Bacillus anthracis*). Le LSM 710 NLO™ (LSM pour *Laser Scanning Microscope*, NLO pour *Nonlinear Optics*), couplé à un laser Chameleon Coherent™ et à trois lasers visibles permet de réaliser de l'imagerie par balayage en mode confocal, biphotonique et de générer le signal de seconde harmonique. Des détecteurs internes ou délocalisés permettent de collecter les signaux d'intérêt et de réaliser des images en 3 ou 4 dimensions (c'est-à-dire 3 dimensions spatiales au cours du temps).

Le but de ce paragraphe est de présenter les principales caractéristiques instrumentales de l'appareillage utilisé dans le cadre de la présente thèse.

3.5.1 Lasers

L'excitation à deux photons est réalisée par un laser pulsé Ti:Sa Chameleon Ultra commercialisé par la société Coherent™. Ce laser de classe 4, accordable en longueur d'onde de 690 à 1020 nm présente une puissance moyenne supérieure à 2.5 W à 800 nm pour une puissance crête supérieure à 200 kW. Le taux de répétition est de 80 MHz pour une durée d'impulsion d'environ 140 fs (données constructeurs).

L'excitation à un photon pour la microscopie confocale est effectuée grâce à l'utilisation de trois lasers visibles :

- un laser He-Ne à 633 nm de 5 mW (classe 3b), dédié à l'excitation de molécules du type Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 633, Cy5, etc. ;
- un laser He-Ne à 543 nm de 1 mW (classe 3b), pour l'excitation de la rhodamine B, Cy3, etc. ;
- un laser Argon à 488 nm de 25 mW (classe 3b), pour l'excitation de la GFP, fluorescéine, etc.

3.5.2 Objectif

Que ce soit en mode confocal ou biphotonique, l'objectif à immersion utilisé présente les caractéristiques principales suivantes (données constructeur) :

- nom commercial : Zeiss W Plan-Apochromat 20×/1.0 DIC M27 75mm ;
- grandissement : 20× ;
- ouverture numérique : 1.0 ;
- distance de travail : 1.8 mm ;

3.5.3 Balayage

Le ou les faisceaux lasers sont projetés sur l'échantillon à travers l'objectif *via* une tête de balayage dont la fonction est à la fois de focaliser le faisceau excitateur sur chacun des pixels de la zone d'intérêt mais aussi de permettre la collecte du rayonnement de fluorescence ou de GSH par les détecteurs. Deux stratégies de balayage sont utilisées : monodirectionnelle ou bidirectionnelle.

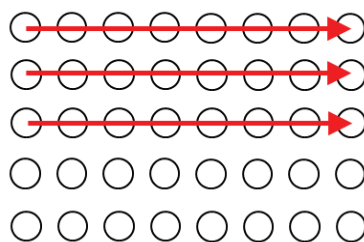


Figure 47. Balayage monodirectionnel. Chaque rond noir représente un pixel, et les flèches rouges représentent la trajectoire du faisceau incident.

Le balayage monodirectionnel (*cf.* Figure 47) présente une vitesse de balayage plus faible qu'en mode bidirectionnel en raison de la durée que nécessite le changement de ligne et de colonne, durée pendant laquelle aucune acquisition n'est réalisée.

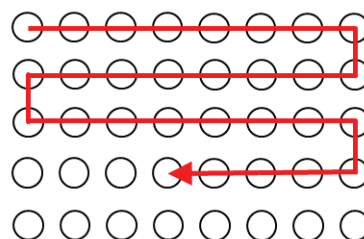


Figure 48. Balayage bidirectionnel.

En mode bidirectionnel (*cf.* Figure 48) le temps d'acquisition est optimisé, car le déplacement « inutile » de la tête de balayage est minimal. Ce mode entraîne toutefois un léger décalage entre les lignes de l'image résultante qui peut altérer la résolution. De nombreuses autres stratégies de balayage existent mais ne seront

pas détaillées dans cette thèse, comme l'illumination à feuille de lumière³⁷⁹ ou l'illumination multifocale^{380,381}.

3.5.4 Configuration des détecteurs

En microscopie confocale, le rayonnement de fluorescence épicollecté (la composante transmise n'étant pas accessible sur tissu épais) est focalisé séquentiellement sur des détecteurs internes *via* la tête de balayage pendant une durée de l'ordre de quelques microsecondes par pixel et par détecteur (*dwell time*).

En microscopie par EDP et GSH, le signal généré est dévié par un miroir dichroïque vers des détecteurs non-descannés (NDDs) après séparation par un jeu de filtres adaptés aux fluorochromes observés (*cf.* Figure 49 pour un exemple de configuration utilisé dans les expérimentations présentées au chapitre 7). Le fait de ne pas retraverser la tête de balayage permet d'améliorer la sensibilité de détection.

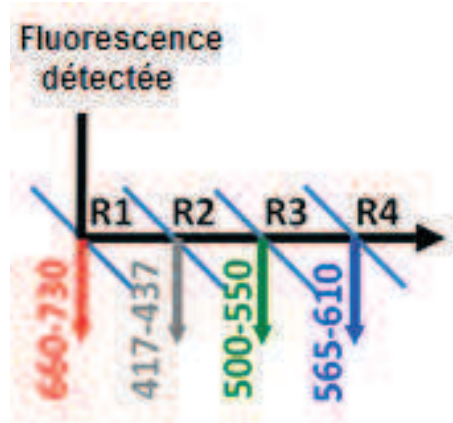


Figure 49. Configuration des filtres accolés aux détecteurs non-descannés. Le filtre R1 a une bande passante de 660 à 730 nm, R2 de 417 à 437 nm, R3 de 500 à 550 nm et R4 de 565 à 610 nm. Le code couleur choisi est le même que celui utilisé pour coder les images 4 couleurs présentées au Chapitre 7.

3.6 Conclusion

Ce chapitre avait pour vocation de présenter les techniques de microscopies utilisées dans cette thèse (microscopie confocale, biphotonique et par GSH). Il faut toutefois garder à l'esprit que de nombreuses autres techniques d'imagerie de fluorescence non linéaire coexistent ou sont en cours de développement. Sans chercher à toutes les citer, ces techniques peuvent consister en une géométrie originale permettant d'améliorer la résolution axiale (c'est le cas du microscope 4Pi³⁸²), en une stratégie d'illumination par feuillet de lumière permettant entre autres de diminuer le photo-blanchiment et d'augmenter la vitesse d'acquisition (SPIM^{383,384} pour *Selective Plane Illumination Microscopy*), en la détection spécifique d'ondes évanescentes pour augmenter contraste et rapport signal sur bruit (microscopie TIRF³⁸⁵ pour *Total Internal Reflection Fluorescence*) ou encore en la désactivation successive des fluorophores dans l'environnement proche d'une molécule pour améliorer la résolution (microscopie STED³⁸⁶ pour *STimulated Emission Depletion*).

En microscopie par EDP, des travaux récents ont montré la possibilité d'exciter un fluorophore par absorption quasi-simultanée de deux photons de longueur d'onde différente, permettant d'observer trois fluorophores de spectres d'absorption très différents à l'aide de deux faisceaux lasers^{387,388}.

Enfin, citons les possibilités offertes par la génération de troisième harmonique qui permet l'imagerie des interfaces à fort gradient d'indice comme les membranes et gouttelettes lipidiques^{369,389,390}.

Chapitre 4

Etat de l'art de l'imagerie

microscopique dynamique du poumon

4.1 Introduction

L'invention des premiers microscopes optiques a naturellement ouvert la voie à l'étude microscopique de l'anatomie animale et humaine. Le poumon a alors bénéficié d'une attention particulière : les premières observations du poumon de petits animaux vivants ont été décrites à la fin du XVII^{ème} siècle et ont conduit à d'importantes découvertes en biologie et en médecine. Il s'agissait d'observations microscopiques statiques sur explants d'organes (imagerie *ex vivo*), ou bien sur explants maintenus dans des conditions favorables à la préservation de l'activité moléculaire et cellulaire (imagerie *in situ*), ou bien encore sur petits animaux anesthésiés ou immobilisés (imagerie *in vivo*). Certaines des premières observations historiques en microscopie *in vivo* sont décrites en première partie du présent chapitre.

Par la suite, de nombreuses techniques d'imagerie pulmonaire, statiques ou dynamiques, sont nées d'une volonté d'étudier le poumon à des fins diagnostiques. Il s'agit de techniques d'imagerie médicale complémentaires les unes des autres, et souvent combinées, où les effets secondaires liés à l'imagerie seront minimisés dans la mesure du possible. Les principales de ces méthodes, brièvement décrites en deuxième partie, permettent l'étude dynamique du poumon à l'échelle macroscopique, mais plus difficilement à l'échelle microscopique.

Plus tard, à la fin du XX^{ème} siècle, le développement de la microscopie de fluorescence, notamment à excitation multi-photonique, a permis l'étude *in vivo* du poumon à l'échelle cellulaire sur petit animal. Ces techniques permettent dorénavant l'acquisition d'images microscopiques en quatre dimensions (trois dimensions spatiales au cours du temps) au détriment de l'intégrité physique dégradée par la préparation plus ou moins invasive de l'animal. Une constante de toutes les techniques d'imagerie dynamique pulmonaire *in vivo*, macroscopiques et microscopiques, réside dans la difficulté d'obtenir au cours du temps des images stables d'un organe dont la fonction physiologique impose un perpétuel mouvement. Un bilan des techniques permettant d'atténuer *a priori* cet obstacle majeur, c'est-à-dire par une préparation optimisée de l'animal en termes de stabilisation du poumon mais au détriment de son intégrité, est présenté en troisième partie. Le traitement *a*

posteriori des images obtenues est souvent nécessaire afin de compenser les mouvements résiduels de l'organe. Les techniques usuelles de post-traitement des images pulmonaires effectuées *in vivo* sont présentées en quatrième partie.

4.2 Premières observations microscopiques *in vivo*

La première description d'une observation microscopique du poumon d'un animal vivant est due à Marcello Malpighi (1628-1694). En 1661, il écrit deux lettres à son ami et mentor Giovanni Alfonso Borelli dans lesquelles il présente ses observations de poumons de grenouilles vivantes, après thoracotomie, à l'aide d'un des premiers modèles de microscope optique³⁹¹.

Dans sa première lettre, il explique avoir observé que la trachée se termine en "petits vaisseaux dilatés", posant les bases anatomiques correctes des échanges gazeux dans le poumon. Dans sa deuxième lettre il décrit la présence de "petits canaux reliant les artères aux veines", structures connues à présent sous le nom de capillaires sanguins, démontrant pour la première fois que la circulation sanguine se fait en circuit fermé.

La Figure 50 extraite de son ouvrage présente deux schémas de certaines de ses observations effectuées *in vivo* et *in situ*.

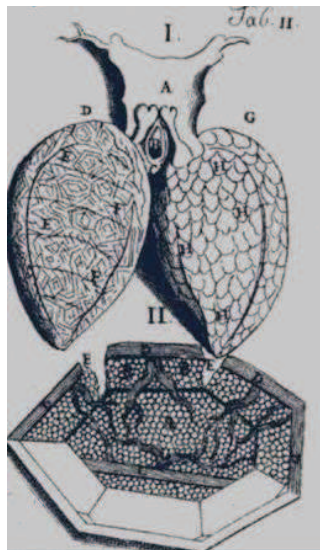


Figure 50. Haut : dessin d'un poumon entier de grenouille (gauche) et coupé longitudinalement (droite). Bas : dessin reproduisant l'observation microscopique d'une alvéole pulmonaire de mammifère avec ses capillaires. Extrait de la référence [391].

La méthode dite malpighienne, adaptée de la technique développée par Marcello Malpighi, a continué à être utilisée au cours des siècles suivants. Elle consiste en un système d'illumination par transmission à travers le diaphragme (cf. Figure 51) permettant la visualisation du flux sanguin par microscopie en champ clair de l'extrémité du poumon distal³⁹².

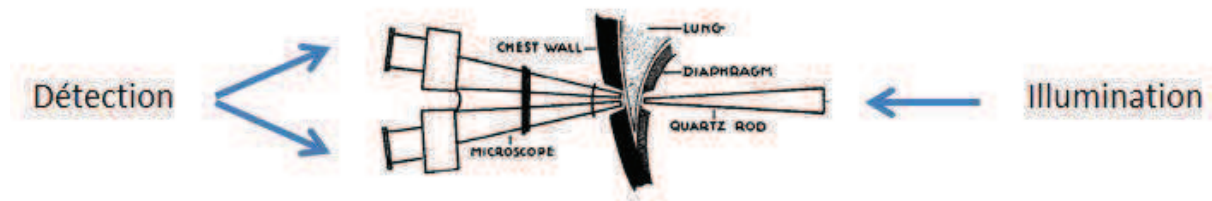


Figure 51. Système d'illumination par transmission et positionnement du microscope lors d'observations effectuées *in vivo*. Adapté de la référence [392].

Au début du XX^{ème} siècle, les techniques chirurgicales de plus en plus perfectionnées ont permis la pose de "fenêtres" de verre sur la cage thoracique de chats anesthésiés ayant subi une thoracotomie d'environ un centimètre de diamètre. Cette fenêtre est principalement destinée à éviter le collapsus pulmonaire. En effet, une pression intra-thoracique physiologique est maintenue *via* un cathéter intra-thoracique³⁹³. L'imagerie peut alors être effectuée directement à travers la fenêtre, car la dépression maintenue *via* le cathéter provoque un contact entre l'organe et celle-ci comme illustré par la Figure 52. Cette technique est encore largement utilisée de nos jours pour l'imagerie biphotonique *in vivo* notamment du système nerveux central (moelle épinière^{394,395} ou cerveau³⁹⁶⁻⁴⁰¹), de la peau⁴⁰² ou encore des organes abdominaux⁴⁰³ de petits animaux.

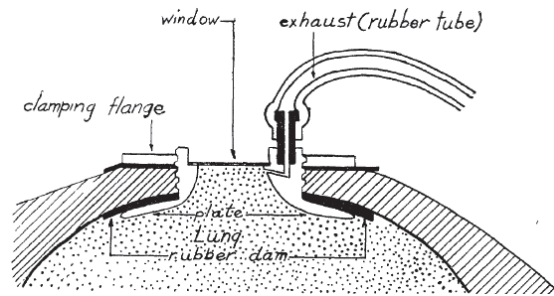


Figure 52. Coupe transversale schématique de la paroi thoracique de mammifère montrant le positionnement de la fenêtre et le cathéter maintenant une dépression. Extrait de la référence [393].

Cependant les mouvements physiologiques cardiaques et respiratoires empêchent l'acquisition rapide d'images et l'étude quantitative à l'échelle microscopique de phénomènes dynamiques au niveau pulmonaire sur animal vivant. L'étude dynamique repose alors principalement sur des techniques d'imagerie à l'échelle macroscopique où les mouvements physiologiques sont relativement moins significatifs par rapport à la résolution de l'acquisition.

4.3 Techniques d'imagerie macroscopique dynamique du poumon *in vivo*

4.3.1 Imagerie par rayons X

L'imagerie pulmonaire de sujets vivants à des fins médicales trouve son origine dans la découverte des rayons X par Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923) en 1895⁴⁰⁴. L'invention de la **radiographie par rayons X** qui lui a valu l'obtention du prix Nobel de physique en 1901 consiste en la mesure de l'atténuation d'un faisceau de rayons X traversant l'organe étudié. Le contraste de cette technique dépend à la fois de l'épaisseur et du coefficient d'atténuation des structures traversées. Cette mesure conduit à la réalisation de clichés en transmission permettant l'observation des tissus profonds.

La radiographie a été démocratisée par la communauté médicale internationale en quelques mois seulement. La France se dote dès 1897 d'un laboratoire de radiologie au sein du service de médecine générale de l'hôpital Tenon, grâce au Docteur Bécclère qui y réalise les premières radioscopies du thorax, permettant le dépistage systématique de la tuberculose (*cf.* Figure 53).



Figure 53. Radiographie du thorax réalisée par le Docteur Bécclère à la fin du XIX^{ème} siècle.

La **tomodensitométrie (TDM)** est née dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle grâce aux travaux d'Allan MacLeod et Godfrey Hounsfield, qui reçurent le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1979 pour le « développement de la tomographie axiale calculée ». En hommage à Hounsfield, l'unité d'absorption des rayons X porte son nom. Son développement a été rendu possible par l'association de systèmes d'imagerie par rayons X à des calculateurs suffisamment puissants pour permettre de réaliser rapidement les calculs, basés sur la transformée de Radon, nécessaires à la reconstruction tridimensionnelle à partir des images bidimensionnelles. L'ajout de la troisième dimension a apporté une information souvent cruciale qui manquait aux clichés réalisés par projection bidimensionnelle du signal collecté.

Cependant, les techniques d'imagerie pulmonaire par rayons X restent limitées à l'étude de phénomènes à l'échelle macroscopique (résolution spatiale de l'ordre du millimètre *in vivo*) et d'évolution lente en raison de leur résolution temporelle limitée et des effets secondaires indésirables engendrés par l'absorption de doses de rayons X importantes et rapprochées dans le temps.

4.3.2 Imagerie par Résonance Magnétique

Une technique d'imagerie *in vivo* non ionisante permettant de pallier ce dernier point est l'**Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM)**.

Née dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle tout comme la TDM, l'IRM découle d'une application de travaux portant sur le couplage entre le moment magnétique du noyau des atomes et le champ magnétique externe, couplage décrit par Felix Bloch et Edward Mills Purcell en 1946⁴⁰⁵. L'IRM repose sur l'utilisation d'un puissant champ magnétique continu provoquant l'alignement des moments magnétiques de spin des atomes du tissu. La superposition de gradients de champs magnétiques oscillants entraîne un phénomène de précession dont la mesure de la fréquence renseigne à la

fois sur la localisation de l'atome dans le tissu et sur la concentration locale en protons, de laquelle est issu le contraste de la technique. Paul Lauterbur et Peter Mansfield reçurent le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2003 pour l'invention du principe de l'IRM.

Cette technique permet l'imagerie de tissus profonds, notamment pulmonaires, de sujets vivants avec ou sans injection préalable de produits de contraste (cf. Figure 54 présentant deux exemples de contraste en IRM pulmonaire). Les développements de l'IRM ces vingt dernières années ont conduit à la commercialisation de systèmes permettant l'imagerie dynamique 2D et 3D de poumons humains, à une fréquence d'acquisition de l'ordre de 10 Hz pour une résolution sub-centimétrique⁴⁰⁶. Ces techniques permettent l'étude dynamique *in vivo* des fonctions respiratoires à l'échelle macroscopique sans utilisation de rayonnements ionisants.



Figure 54. Imagerie par Résonance Magnétique du poumon de sujets humains. © Hyperpolarized Noble Gas MRI Lab.

4.3.3 Imagerie nucléaire par émission de positons

Différentes techniques d'imagerie dites nucléaires ont vu le jour au cours du XX^{ème} siècle, consistant en l'administration de traceurs radioactifs par voie entérale ou

parentérale selon la technique employée et l'organe cible. Il s'agit des techniques d'imagerie par émission comme la **Tomographie par Emission de Positons** (TEP).

La TEP est une technique de scintigraphie permettant l'imagerie pulmonaire par perfusion ou ventilation d'un traceur marqué par un atome radioactif (carbone, fluor, azote, oxygène...) émettant des positons, dont l'annihilation produit elle-même deux photons gamma. La détection de ces photons permet la localisation de leur zone d'émission, conférant à la technique son contraste dépendant de la concentration en traceur.

La TEP, largement utilisée en imagerie médicale, permet habituellement la recherche d'embolies pulmonaires aiguës de manière non invasive avec une résolution centimétrique⁴⁰⁷.

4.3.4 Imagerie par bioluminescence

L'**imagerie par bioluminescence** est une technique d'imagerie du petit animal non invasive, basée sur la détection des photons émis lors de la catalyse de la luciférine par l'enzyme luciférase. Cette méthode nécessite classiquement soit l'utilisation d'animaux ou agents pathogènes transgéniques exprimant la luciférase et son substrat, soit l'injection d'une cible capable d'émettre le rayonnement de luminescence.

La résolution spatiale millimétrique de l'imagerie par bioluminescence la rend compatible avec le suivi sur animal entier de la migration de cellules cancéreuses ou l'étude des organes cibles de l'accumulation d'agents pathogènes responsables de maladies infectieuses dans l'organisme⁴⁰⁸. Dans le poumon, la résolution spatiale est limitée par les mouvements respiratoires de l'animal et l'absorption des photons par l'hémoglobine.

La quantification de l'accumulation de cibles luminescentes est possible sous réserve de définir l'influence de paramètres tels que la profondeur des cibles luminescentes

dans le tissu, le traitement chirurgical et la voie d'injection des cibles lumineuses ou encore le positionnement de l'animal afin de les intégrer au calcul de quantification⁴⁰⁹.

4.4 Techniques d'imagerie microscopique dynamique du poumon *in vivo*

Alors que l'imagerie macroscopique du poumon est peu sensible aux mouvements physiologiques de l'organe, ce n'est plus le cas lorsque l'observation est effectuée à l'échelle microscopique. En conséquence, le suivi dynamique *in vivo* du poumon à l'échelle microscopique impose le développement de techniques destinées à stabiliser l'organe, sans quoi les mouvements du poumon gênent de façon rédhibitoire l'acquisition d'images précises de l'organe au cours du temps.

Le développement des microscopies de fluorescence (confocales et multiphotoniques) dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle a ouvert la voie à l'imagerie d'échantillons tridimensionnels à l'échelle microscopique *in situ* mais aussi *in vivo*, bénéficiant largement de la possibilité d'observer des tissus épais offerte par l'imagerie à excitation multiphotonique (cf. Chapitre 3) avec une résolution spatio-temporelle bien supérieure à la TEP ou à l'IRM^{410,411}.

Les techniques présentées ci-dessous sont destinées à supprimer ou atténuer les mouvements physiologiques du poumon, provenant principalement de la respiration et des battements cardiaques, de manière à faciliter l'étude de la dynamique des phénomènes observés à l'échelle microscopique.

4.4.1 Imagerie microscopique *in situ*

Une première étape vers l'imagerie microscopique *in vivo* du poumon est l'étude d'explants d'organes fraîchement prélevés maintenus dans des conditions favorables à la préservation de la dynamique cellulaire. Les paramètres cruciaux sont la température du milieu nutritif dans lequel est placé l'explant et l'oxygénation des tissus⁴¹². Cette méthode possède l'avantage de permettre la réalisation de coupes du poumon de seulement quelques micromètres d'épaisseur à l'aide d'un vibratome⁴¹³. L'injection dans la trachée de gélose à faible température de fusion quelques

secondes après euthanasie est souvent utilisée car facilitant la réalisation de ces coupes⁴¹², même si les conséquences de l'injection d'une grande quantité de gélose (typiquement 1 mL) dans la trachée d'une souris, notamment sur la distribution des particules ou pathogènes dans le poumon, n'a pas été investiguée.

A noter également la possibilité de travailler sur poumon isolé après euthanasie, perfusé et ventilé, notamment pour des études portant sur la distribution de particules (thérapeutiques ou non) dans le poumon mais aussi sur la physiologie de l'organe⁴¹⁴⁻⁴¹⁶.

Ces techniques ont permis la réalisation de nombreuses études *in situ* sur la compréhension de mécanismes cellulaires pulmonaires⁴¹⁷ notamment en matière de réponse immunitaire et de trafic de leucocytes^{418,344,419}.

Toutefois, le prélèvement de l'organe supprime définitivement toute interaction avec l'environnement (voies aériennes, flux sanguin, flux lymphatique, communication nerveuse) et à ce titre perturbe de nombreux comportements cellulaires⁴²⁰, en plus de provoquer une activation des leucocytes par le contact avec une surface étrangère⁴²¹. C'est pourquoi l'imagerie *in vivo* sera plus à même de permettre l'étude de l'organe dans les conditions les plus proches de son environnement physiologique.

4.4.2 Imagerie microscopique *in vivo*

Trois stratégies principales ont été développées afin de permettre l'imagerie microscopique dynamique du poumon par la stabilisation mécanique de l'organe. Il s'agit principalement de la ligature d'une bronche, du collage d'un lobe ou du maintien d'un lobe du poumon sous l'objectif par utilisation d'un système d'aspiration. Le développement récent de la micro-endoscopie confocale sera enfin évoqué puisque cette dernière permet de s'affranchir dans une certaine mesure des mouvements thoraciques avec certaines limitations. Cette partie a pour but de présenter ces quatre techniques de stabilisation du poumon utilisées à l'heure

actuelle pour l'imagerie intravitale du poumon de petits animaux. Pour conclure, quelques autres leviers sur lesquels il est possible de jouer seront décrits.

4.4.2.1 Ligature d'une bronche

Hall a publié en 1925 ses observations de poumon de chats et de lapins réalisées *in vivo*⁴²² en microscopie conventionnelle. Afin de stabiliser l'organe de l'animal anesthésié et ventilé mécaniquement, la bronche ipsilatérale est pincée à l'aide d'un clamp après thoracotomie de manière à éliminer tout mouvement respiratoire. Le poumon ainsi immobilisé est extrait et maintenu à l'extérieur de la cage thoracique permettant l'imagerie microscopique stable, pendant que l'autre poumon réalise seul la fonction respiratoire avec apport de dioxygène permettant à l'animal de rester en vie. L'utilisation de cette méthode a permis d'affiner au début du XX^{ème} siècle la description du flux sanguin dans les artérites, les capillaires et les veines, et son comportement en présence d'épinéphrine.

Plus récemment, cette technique d'imagerie microscopique après arrêt de la ventilation d'un poumon a été réutilisée dans le cadre de l'étude de l'accumulation de lymphocytes T CD4⁺ au niveau pulmonaire dans des modèles d'asthme, démontrant leur rôle critique dans l'initiation du phénotype asthmatique chez la souris⁴²³.

Toutefois la ligature d'une bronche entraîne l'arrêt de la fonction ventilatoire de l'organe. L'atélectasie qui en résulte peut provoquer des liaisons irréversibles⁴²⁴ incompatibles avec la réduction de l'invasivité recherchée dans la plupart des expérimentations.

4.4.2.2 Fixation d'un lobe

D'autres équipes ont procédé en extrayant légèrement le poumon de la cage thoracique de rongeurs et en le collant sur une lamelle de verre, en prenant soin de ne pas provoquer de rupture des voies aériennes au niveau des bronches ni d'interruption du flux vasculaire et lymphatique. Le poumon est fixé par un anneau de colle à usage vétérinaire et conservé dans une chambre maintenue à 37 °C durant la durée de l'expérimentation, pendant laquelle l'animal est placé sous ventilateur mécanique.

Kreisel *et al.* ont pu observer en utilisant cette technique en 2010 l'extravasation de neutrophiles de manière monocyte-dépendante, durant une inflammation pulmonaire. Ces travaux ont montré pour la première fois le rôle central des monocytes circulants dans la régulation du recrutement de neutrophiles au niveau pulmonaire⁴²⁵.

L'étude du maintien de l'intégrité physiologique du poumon dans ces conditions nécessite toutefois des investigations supplémentaires⁴²⁶.

4.4.2.3 Suspension de la ventilation

Une autre technique consiste à synchroniser les acquisitions d'imagerie avec la phase dite de plateau expiratoire. Cette phase durant laquelle la pression pulmonaire est maintenue supérieure à la pression atmosphérique lors de ventilation artificielle est provoquée dans le but à la fois d'empêcher le collapsus pulmonaire et d'augmenter le temps d'échange gazeux entre l'alvéole et le capillaire en maintenant l'alvéole ouverte plus longtemps. Cette stabilité du poumon dure classiquement environ 300 ms chez la souris mais peut être maintenue 2 secondes⁴²⁰, et même jusqu'à 5 secondes⁴²⁷ dans certaines conditions, permettant une imagerie microscopique tridimensionnelle stabilisée.

Cette procédure a été utilisée dès 1934 par Wearn *et al.* pour des études sur la vascularisation du poumon de chats en microscopie conventionnelle³⁹² mais aussi

plus récemment par Tabuchi *et al.* qui ont présenté en 2008 une technique optimisée permettant l'étude quantitative en vidéomicroscopie de la vasoconstriction consécutive à l'hypoxie chez la souris⁴²⁷.

Cependant, l'interruption de la ventilation n'est pas une solution idéale pour l'imagerie *in vivo* du petit animal en raison de probables effets négatifs engendrés par l'altération non seulement des taux de gaz sanguins mais aussi des pressions systémiques et pulmonaires⁴²⁰.

4.4.2.4 Stabilisation de la surface du poumon par succion

L'utilisation d'un système de succion créant une dépression entre la surface du poumon et l'objectif du microscope permet également de stabiliser le poumon. Dans cette technique, l'organe est « aspiré » sous l'objectif, et de ce fait nettement moins sensible aux mouvements physiologiques, qu'ils soient respiratoires ou cardiaques^{412,420,426,428–430}.

Cette technique a permis récemment à l'équipe de Matthew Krummel d'observer le comportement de cDCs CD11b pulmonaires en microscopie biphotonique, démontrant le rôle distinct des DCs alvéolaires par rapport aux DCs des régions bronchiques. Ces deux sous-populations spatialement et fonctionnellement distinctes agissent toutefois en synergie : la capture d'antigènes par les DCs alvéolaires provoque l'accumulation et la rétention de DCs dans les régions bronchiques. Ces DCs permettent alors l'activation de lymphocytes T antigène-spécifiques accumulés dans la même région⁴²⁹.

4.4.2.5 Micro-endoscopie pulmonaire

La récente miniaturisation des microscopes confocaux permet maintenant l'imagerie *in vivo* des voies aériennes supérieures et inférieures et des alvéoles pulmonaires par les voies naturelles. Le micro-endoscope confocal repose sur l'utilisation d'un faisceau de fibres optiques à l'entrée duquel est située la tête de balayage laser, et dont la sortie est insérée dans la trachée du patient ou de l'animal de laboratoire^{431,432}.

Un tel système a été commercialisé par la société Mauna Kea Technologies (France) sous le nom de Cellvizio® et permet la micro-endoscopie confocale d'organes tels que l'appareil digestif ou le poumon, comme l'ont démontré les récentes études effectuées sur des rats infectés par *Aspergillus fumigatus*⁴³³.

L'avantage de la micro-endoscopie confocale tient au fait que le mouvement thoracique induit par la ventilation provoque un mouvement synchrone de l'extrémité de l'endoscope, rendant possible le suivi d'une même zone du poumon.

Cependant, des limitations existent encore à l'heure actuelle pour l'utilisation généralisée d'un tel système : difficulté d'aligner plusieurs lasers et donc d'observer plusieurs fluorophores, accès à une zone très confinée de l'appareil respiratoire (l'alvéole) et faible profondeur accessible en raison de l'excitation monophotonique. Certaines de ces limitations sont en train d'être levées, notamment grâce au développement technologique de la micro-endoscopie multiphotonique⁴³⁴. Il demeure toutefois l'impossibilité d'observer les phénomènes apparaissant à une échelle spatiale supérieure à la taille typique d'une alvéole, tels que la migration cellulaire, ou encore les phénomènes apparaissant dans la zone interstitielle du poumon (vascularisation, extravasation, etc.).

4.4.2.6 Autres solutions

Afin de limiter encore les perturbations dues aux mouvements respiratoires et cardiaques et/ou de diminuer l'invasivité des méthodes précédemment décrites, il est possible d'agir sur certains autres paramètres.

Alors que la physiologie d'un petit animal impose une fréquence respiratoire d'environ 150 bpm⁴³⁵, plusieurs équipes ont **diminué ce rythme respiratoire** chez la souris à 130 bpm⁴²⁰, 120 bpm^{425,426} ou 100 bpm⁴²⁷, améliorant significativement la stabilité des images. Dans certaines études, la bradycardie est associée à l'inhalation de dioxygène pur⁴²⁰ afin d'éviter l'hypoxie.

Il est possible de **mettre en place une membrane** en polyvinyle sur la partie excisée de la cage thoracique⁴²⁷. Cette membrane transparente scellée au cyanoacrylate permet le maintien d'une pression intra-thoracique à -3 mm Hg grâce à un cathéter trans-diaphragmatique. Cette dépression établit un contact direct entre la surface du poumon et la membrane, et permet aussi de maintenir une pression physiologique diminuant la probabilité de collapsus pulmonaire.

L'utilisation d'un **microscope inversé** permet dans une certaine mesure de stabiliser l'organe, ou en tout cas de maintenir le contact entre l'objectif du microscope et l'organe^{428,430,436}. Cependant les mouvements respiratoires demeurent (*cf.* supplément en ligne de la référence [430]). Dans le cas des deux articles précédemment cités des mesures de diamètre de vaisseaux ont été effectuées à la même phase du cycle respiratoire afin d'éviter les distorsions dues aux contraintes mécaniques inhérentes à la respiration.

Le **relâchement musculaire par curarisation**, provoqué par injection de bromide de pancuronium, permet de limiter les mouvements résiduels de l'animal placé sous ventilateur mécanique⁴²⁸.

4.4.3 Bilan des techniques d'imagerie microscopique dynamique *in vivo*

A l'exception de la micro-endoscopie confocale dont le champ d'observation est malheureusement limité à la taille d'une alvéole, les techniques évoquées ci-dessus ont toutes pour objectif de limiter *a priori* les mouvements de la cage thoracique par une stabilisation mécanique du poumon (fixation, interruption provisoire ou non de la fonction ventilatoire, succion). Cette stabilisation mécanique a des effets néfastes qui ont été relevés dans la littérature, comme par exemple une atélectasie probable⁴²⁴ pour la ligature d'une bronche ou une altération des taux de gaz sanguins⁴²⁰ ou bien une vasoconstriction⁴²³ pour l'interruption de la ventilation. Par ailleurs, il n'y a pas de données quantitative sur les conséquences de la technique de fixation d'un lobe⁴²⁶.

Malgré ces critiques publiées, les contrôles, limités à des aspects globaux ou très spécifiques, n'ont à ce jour pas permis de démontrer sans ambiguïté les effets néfastes de la stabilisation mécanique d'un organe dont la fonction impose le mouvement. A ce stade, il est difficile de conclure définitivement sur la non-invasivité de ces techniques, et la prudence impose une certaine réserve quant aux résultats produits.

La succion du poumon sous l'objectif semble à ce jour la technique publiée présentant le meilleur compromis entre non-invasivité et stabilisation. La vérification de l'absence de dommages causés à l'organe a été effectuée selon deux critères : pas d'augmentation significative de la perméabilité vasculaire (pas d'extravasation de dextrans injectées en i.v.) et pas de formation d'œdème pulmonaire (contrôlé *a posteriori* par la mesure du rapport poids humide/poids sec dont la valeur anormalement élevée peut être symptomatique d'une accumulation d'eau dans l'organe, donc d'un œdème)⁴²⁶. Toutefois, les conséquences dues aux contraintes non physiologiques d'une succion de 20 à 25 mm Hg exercées sur la surface du poumon durant plusieurs heures sont difficilement quantifiables. Ces contraintes sont à même de produire un effet révulsif dommageable à l'activité physiologique, d'autant plus que la succion est produite précisément sur la zone étudiée, en surface du poumon. Même si la vitesse du flux vasculaire ne semble pas modifiée par la succion de l'organe, une détérioration du flux lymphatique consécutive à la modification des paramètres ventilatoires est probable⁴³⁷⁻⁴³⁹ bien qu'encore sujette à

discussion chez les praticiens⁴⁴⁰. Le système lymphatique étant logiquement lié à la réponse immunitaire notamment grâce au transport de CPAs, l'enjeu de développer une technique de microscopie dynamique *in vivo* du poumon sans stabilisation mécanique de l'organe apparaît crucial dans des études impliquant la réponse immunitaire consécutive à une infection.

Pour ce faire, le traitement *a posteriori* des données sera d'une importance capitale. Des stratégies de recalage ou d'élimination des artefacts dus aux mouvements respiratoires ont été développées en grande partie dans le but d'affiner des techniques d'imagerie pulmonaire dynamique macroscopique *in vivo* utilisées en imagerie médicale, mais aussi plus anecdotiquement en imagerie microscopique pulmonaire *in vivo*.

4.5 Méthodes de correction des mouvements *a posteriori*

Le traitement des images acquises *in vivo* présentant des mouvements artéfactuels conduit à une amélioration de la résolution des techniques d'imagerie conventionnelle, et revêt une importance capitale notamment dans le cadre de l'imagerie médicale à visée diagnostique et thérapeutique. Le post-traitement peut être de plusieurs ordres : recalage des images effectuées au cours du temps, correction des artefacts affectant une même image, sélection des images selon leur intérêt. Ces techniques de traitement *a posteriori* seront choisies en fonction du type d'artefact apparaissant sur l'image ou la série temporelle.

4.5.1 Conséquences de mouvements dommageables à l'imagerie dynamique du poumon

Plusieurs types de perturbations peuvent apparaître lors de l'imagerie au cours du temps d'un échantillon, d'un organe ou d'un sujet vivant. Il peut s'agir d'une perturbation au cours de l'acquisition d'une image (cas de la microscopie par balayage ou des acquisitions nécessitant un temps d'exposition supérieur à la durée typique de la perturbation), ou affectant tout ou partie de la série temporelle d'images (cas d'une dérive de l'échantillon).

Cette partie présente de manière non exhaustive les exemples les plus courants de perturbations liées à l'imagerie microscopique d'un sujet vivant, en particulier lorsque l'imagerie est effectuée par balayage, ou d'un échantillon dont les propriétés évoluent durant la phase d'imagerie. Ces perturbations peuvent être modélisées par des **transformations géométriques** au sens mathématique du terme, c'est-à-dire à des bijections d'une partie de l'ensemble géométrique de départ (l'image exempte d'artefacts) dans lui-même, résultant en une image « transformée ». Une telle transformation géométrique sera qualifiée de linéaire si elle peut s'écrire sous forme d'un polynôme de degré 1, éventuellement sous une forme matricielle ; elle sera en revanche qualifiée de non linéaire dans les autres cas.

Quelques transformations géométriques modélisant les perturbations usuelles résultant de l'imagerie par balayage d'un explant pulmonaire dont les propriétés physiques évoluent au cours de l'imagerie, ou du poumon d'un animal vivant subissant les mouvements cardiaques et respiratoires, sont illustrées par les exemples ci-dessous. Bien souvent ces transformations se combinent et coexistent au sein d'une même série d'image.

Pour la suite de cette partie, l'image avant transformation, c'est-à-dire exempte d'artefact, est choisie assez simple à titre d'illustration (cf. Figure 55. Exemple d'image avant transformation. Figure 55).

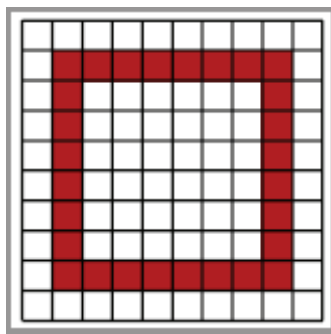


Figure 55. Exemple d'image avant transformation.

4.5.1.1 Transformations géométriques linéaires rigides

Les transformations géométriques dites rigides (translation et rotation) préservent la distance entre chaque paire de points de l'image. Il s'agit de transformations linéaires car elles peuvent être exprimées sous forme matricielle.

La **translation** est une transformation qui apparaît lorsque l'échantillon subit une dérive dans le plan (x, y) . Il en résulte une transformation illustrée par la Figure 56. La dérive peut être exprimée par une simple matrice de translation (cf. Équation 20).

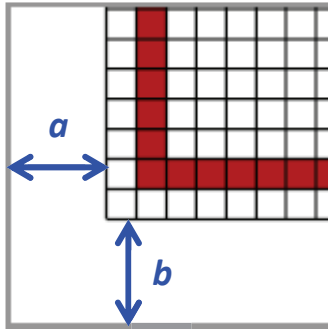


Figure 56. Transformation géométrique linéaire rigide : exemple de la translation.

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix}$$

Équation 20. Cas général d'une transformation géométrique linéaire de type translation en 2D.

Une légère **rotation** de l'image (cf. Figure 57) peut apparaître sous l'effet du mouvement cardiaque ou respiratoire et des contraintes exercées sur le poumon par la cage thoracique dont le mouvement n'est pas isotrope.

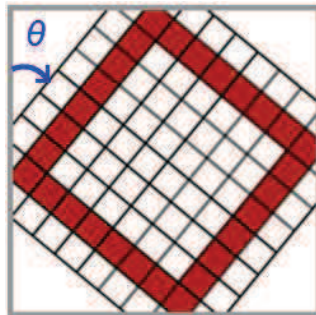


Figure 57. Transformation géométrique linéaire rigide : exemple de la rotation d'un angle θ .

La matrice de rotation d'un angle θ dans le sens anti-trigonométrique est exprimée par l'Équation 21 :

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & \sin \theta \\ -\sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$$

Équation 21. Cas d'une transformation géométrique linéaire de type rotation d'un angle θ dans le sens anti-trigonométrique.

4.5.1.2 Transformations géométriques linéaires non-rigides

Les transformations géométriques linéaires non-rigides peuvent être exprimées sous forme matricielle mais ne conservent pas les distances. Dans le cadre de l'imagerie microscopique par balayage, il peut s'agir de **cisaillement**, en particulier lorsque l'échantillon subit une perturbation de type translation d'une durée typique du même ordre de grandeur que la durée d'acquisition de l'image par balayage. Le résultat d'une telle transformation est illustré par la Figure 58.

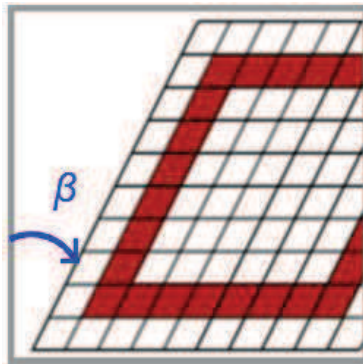


Figure 58. Transformation géométrique linéaire non-rigide : exemple d'un cisaillement parallèle à l'axe des abscisses.

Le cas d'un cisaillement d'angle β parallèle à l'axe des abscisses comme illustré ci-dessus peut s'écrire sous forme matricielle de la façon suivante (Équation 22) :

$$\begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & \tan \beta \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$$

Équation 22. Cas d'un cisaillement d'angle β parallèle à l'axe des abscisses.

4.5.1.3 Exemple de transformations géométriques non linéaires non-rigides

L'imagerie microscopique *in vivo* d'un organe tel que le poumon subit également des perturbations dont la modélisation s'avère plus complexe. Il s'agit des perturbations dues aux mouvements thoraciques, provenant en majeure partie de la respiration et des battements cardiaques. Les transformations géométriques qui en résultent et qui pourraient modéliser ces perturbations sont de type non-rigide et non linéaire, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas être exprimées sous forme matricielle. La Figure 59 illustre un tel cas de perturbation non linéaire.

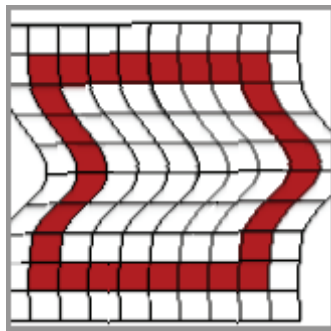


Figure 59. Exemple de transformation géométrique non linéaire non-rigide.

4.5.2 Correction des perturbations affectant une image

Une première étape dans le traitement *a posteriori* des données issues d'imagerie pulmonaire dynamique *in vivo* est la correction des perturbations affectant chaque image de la série temporelle⁴⁴¹. Le but de cette étape est d'estimer les paramètres de la transformation subie par l'image. Cette estimation est souvent réalisée par la mesure aussi précise que possible des paramètres de la perturbation ayant provoqué la transformation. Dans le cas de l'imagerie pulmonaire, la perturbation est provoquée principalement par les battements cardiaques et la ventilation du sujet qui entraînent un mouvement de la cage thoracique et du poumon.

Ainsi, de nombreuses stratégies d'imagerie médicale sont basées sur la mesure des paramètres ventilatoires du sujet. Le monitoring des déplacements de la cage thoracique et des battements cardiaques *via* un ECG permet alors de corriger les perturbations dues à ces mouvements par application d'une estimation de la **transformation inverse**, durant l'acquisition⁴⁴² notamment pour le guidage par imagerie de radiothérapie^{443,444} mais aussi *a posteriori* lorsque l'imagerie est réalisée à des fins diagnostiques (imagerie TEP, TDM ou IRM)⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁷.

Lorsque qu'il n'y a pas de moyen d'estimer les paramètres physiologiques ayant provoqué une perturbation non-rigide, la recherche d'un modèle de transformation non linéaire peut être effectuée par utilisation d'un certain nombre de points ou régions de contrôle définis par les experts sur une image de référence, ou automatiquement à l'aide d'une segmentation (*cf.* référence [448] pour une revue de ces techniques). Une autre méthode se base sur la mise en correspondance par blocs, notamment utilisée dans le cas de l'imagerie du thorax par TDM^{449,450}. Dans ce genre de méthode, la déformation est estimée localement puis propagée à l'ensemble de l'image en utilisant des modèles d'interpolation notamment par des fonctions *B-splines*⁴⁵¹. La très riche littérature sur la correction d'images médicales a été synthétisée récemment dans la thèse de doctorat de Z. Ouksili⁴⁵². Ces techniques de correction des perturbations physiologiques sont particulièrement bien adaptées à l'imagerie macroscopique d'une résolution comparable en ordre de grandeur à l'amplitude typique des mouvements cardiaques et respiratoires (respectivement de l'ordre du millimètre et du centimètre).

Toutefois, cette stratégie de correction des perturbations dues aux mouvements thoraciques a également été utilisée afin de corriger les images effectuées à l'échelle microscopique sur des rats anesthésiés et ventilés⁴²⁰. Dans cet article, les auteurs ont utilisé une grille uniforme sur les images collectées, et les déformations entre les différents nœuds de la grille au cours du temps ont été modélisées par des fonctions *B-splines* optimisées de manière à minimiser les dissimilarités entre images⁴⁵³. Le fait que les auteurs aient eu recours à une stabilisation mécanique du poumon des rats par succion (*cf.* Page 145) révèle les limites de cette technique de correction des perturbations à l'échelle microscopique.

4.5.3 Recalage d'images d'une série temporelle

Le recalage des images d'une série temporelle consiste à estimer les paramètres qui maximisent la ressemblance entre deux images successives, en établissant un modèle de transformation linéaire ou non. Cette ressemblance peut être définie selon plusieurs critères selon les situations. Dans le cas d'un recalage de structures subissant un mouvement d'ensemble (cas d'une dérive de l'échantillon, c'est-à-dire une translation en terme de transformation géométrique), une transformation linéaire rigide est suffisante et peut être estimée par calcul de cross-corrélation. Mlodzianoski *et al.* ont publié en 2012 une technique basée sur le calcul du coefficient de cross-corrélation spatiale entre plusieurs zones de l'échantillon au cours du temps⁴⁵⁴. Cette technique leur a permis de corriger une dérive temporelle avec une résolution spatiale de l'ordre de 5 nm en microscopie hyper-résolue.

4.5.4 Extraction des images d'intérêt

Dans les premières expériences de microscopie pulmonaire *in vivo*³⁹¹, c'est le cerveau de l'expérimentateur qui filtre les informations d'intérêt en éliminant les images où l'organe subissait une déformation, lui permettant de dessiner la structure observée exempte de toute perturbation d'origine physiologique ou non. Cette méthode subjective implique un temps d'observation significativement plus long que la seule acquisition des images. Elle n'est applicable que dans les cas où l'on peut raisonnablement effectuer un grand nombre d'acquisitions, et la difficulté à définir un critère objectif rendant compte de l'intérêt d'une image complique son automatisation. Toutefois une étude récente suggère l'utilisation d'un seuil de coefficient de cross-corrélation afin de « trier » les images d'intérêt, produisant des résultats comparables au tri manuel effectué par plusieurs opérateurs indépendants analysant des images TDM⁴⁵⁵.

La méthode complémentaire consiste non plus à sélectionner les images d'intérêt mais à éliminer celles qui présentent une déformation jugée trop importante. En

pratique, cela nécessite d'effectuer plusieurs séries temporelles et d'éliminer les images qui présentent un coefficient de cross-corrélation inférieur à une valeur seuil déterminée en fonction de la moyenne des séries temporelles. Cette méthode a été utilisée dans le cadre d'imagerie microscopique dynamique *in vivo* et a permis une amélioration remarquable du rendu dynamique (*cf.* figure supplémentaire 1 de la référence [426]). Toutefois, la technique utilisée est à l'heure actuelle dépendante d'une stabilisation *a priori* de l'organe (*cf.* page 145).

4.6 Conclusion

Ce chapitre visait à présenter différentes techniques courantes d'imagerie permettant l'étude dynamique du poumon *in vivo*. Si la plupart de ces techniques sont utilisées en imagerie médicale à des fins diagnostiques et/ou thérapeutiques (TDM, IRM, TEP), les techniques qu'elles utilisent pour corriger les déformations provenant des mouvements inhérents à l'étude d'un organe en perpétuel déplacement peuvent parfois être utilisées dans le cadre de l'imagerie pulmonaire microscopique dynamique (technique de correction par fonctions de *B-splines* ou technique de tri des images selon leur déformation). Ces mouvements thoraciques qualifiés de « bête noire » (*sic*) de l'imagerie du poumon *in vivo*⁴⁵⁶ représentent à l'heure actuelle un challenge majeur pour son étude microscopique *in vivo*.

Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune technique d'imagerie pulmonaire microscopique dynamique *in vivo* n'a pu s'affranchir d'une stabilisation *a priori* de l'organe aux dépens du maintien de son intégrité physique et biologique, même si cette dernière est difficile à quantifier. Le but de cette thèse est de présenter l'utilisation d'une nouvelle méthode d'imagerie biphotonique pulmonaire sur souris anesthésiée et ventilée sans stabilisation *a priori* de l'organe, méthode qui a été appliquée avec succès à l'étude d'interactions entre cellules immunitaires pulmonaires dans un modèle d'infection par le bacille du charbon.

Chapitre 5

Travail expérimental :

discrimination de deux populations

cellulaires immunitaires exprimant la

même protéine fluorescente

5.1 Introduction

Le modèle animal de référence choisi dans le cadre de ces travaux de thèse, traitant du rôle de la sous-population CD11b de cDCs dans la physiopathologie de la maladie du charbon pulmonaire, est la souris CX3CR1^{+gfp}. En effet, la majorité de la sous-population CD11b de cDCs exprime le récepteur CX3CR1²⁷⁰ à la fractalkine, aussi appelée neurotectine. La fractalkine est une protéine transmembranaire et une chimiokine impliquée dans l'adhésion et la migration de leucocytes⁴⁵⁷. La description initiale de la lignée de souris CX3CR1^{+gfp} indique que la protéine de fluorescence verte (eGFP) est exprimée par plusieurs lignées cellulaires myéloïdes dans différents organes, comme les cellules de Küpfer du foie ou les cellules gliales du cerveau. Dans les organes lymphoïdes, l'eGFP est exprimée dans des populations de DCs, de monocytes et de cellules NK⁴⁵⁸. Dans le poumon, les deux populations principales exprimant l'eGFP sont les monocytes résidents Gr-1^{low} (références [459–461]) et les cDCs CD11b⁺ (référence [462]). En conséquence, l'utilisation de cette lignée ne permet pas une détection spécifique de cDCs CD11b.

Dans ce chapitre, nous présentons un outil développé dans le cadre de cette thèse, dont le but est de permettre une discrimination systématique des cDCs CD11b par rapport aux autres populations cellulaires exprimant le même marqueur fluorescent, en particulier les monocytes. Nous montrons que la définition d'un critère morphologique adapté permet de discriminer les « cellules dendritiformes » des autres cellules exprimant l'eGFP. De plus, nous montrons par comparaison avec des expérimentations quantitatives effectuées en cytométrie en flux que la population dendritiforme mise en évidence par l'utilisation du critère morphologique est effectivement représentative de la population de cDCs CD11b, alors que l'autre population est constituée principalement de monocytes.

Le critère morphologique que nous définissons est appelé *Mean Roundness Coefficient* (MRC). Il est intégré à un code de suivi cellulaire développé sous Matlab, adapté du code de Blair et Dufresne⁴⁶³, permettant de calculer des paramètres tels que la vitesse, le confinement ou le déplacement total des cellules selon la population à laquelle elles appartiennent.

Nous avons appliqué cette méthode à la comparaison du comportement des monocytes et des DCs suite à une infection par des bactéries Gram-négatives, infection simulée par l'injection intra-trachéale de lipopolysaccharides (LPS). Pour cela, nous avons réalisé des expérimentations en microscopie à 2 photons *in situ*, c'est-à-dire sur coupes pulmonaires maintenues dans des conditions favorables à la préservation de la dynamique cellulaire, après injection de LPS ou de PBS comme contrôle. Afin de mettre en évidence le plus rigoureusement possible des déplacements cellulaires lents (de l'ordre de 1 μm / minute), nous avons développé une technique originale de recadrage des images utilisant l'information structurelle provenant des fibrilles de collagènes détectées grâce à la génération d'un signal de seconde harmonique. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence la faisabilité de l'observation du comportement différent de deux populations cellulaires pulmonaires, monocytes et cDCs CD11b, exprimant le même fluorophore.

5.2 Article : PLoS ONE 2012

Ce paragraphe présente un article publié en 2012 dans la revue PLoS One, et intitulé « *Shape-based tracking allows functional discrimination of two immune cell subsets expressing the same fluorescent tag in mouse lung explant* ».

Shape-Based Tracking Allows Functional Discrimination of Two Immune Cell Subsets Expressing the Same Fluorescent Tag in Mouse Lung Explant

Daniel Fiole^{1,2}, Cédric Touvrey¹, Anne Quesnel-Hellmann¹, Julien Douady^{2,3}, Jean-Nicolas Tournier^{1,3*}

1 Unité Interactions Hôte-Agents Pathogènes, Département de Microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France, **2** Laboratoire Interdisciplinaire de Physique UMR 5588, Univ. Grenoble 1/CNRS, Grenoble, France, **3** Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France

Abstract

Dendritic Cells (DC) represent a key lung immune cell population, which play a critical role in the antigen presenting process and initiation of the adaptive immune response. The study of DCs has largely benefited from the joint development of fluorescence microscopy and knock-in technology, leading to several mouse strains with constitutively labeled DC subsets. However, in the lung most transgenic mice do express fluorescent protein not only in DCs, but also in closely related cell lineages such as monocytes and macrophages. As an example, in the lungs of CX₃CR1^{+/gfp} mice the green fluorescent protein is expressed mostly by both CD11b conventional DCs and resident monocytes. Despite this non-specific staining, we show that a shape criterion can discriminate these two particular subsets. Implemented in a cell tracking code, this quantified criterion allows us to analyze the specific behavior of DCs under inflammatory conditions mediated by lipopolysaccharide on lung explants. Compared to monocytes, we show that DCs move slower and are more confined, while both populations do not have any chemotactism-associated movement. We could generalize from these results that DCs can be automatically discriminated from other round-shaped cells expressing the same fluorescent protein in various lung inflammation models.

Citation: Fiole D, Touvrey C, Quesnel-Hellmann A, Douady J, Tournier J-N (2012) Shape-Based Tracking Allows Functional Discrimination of Two Immune Cell Subsets Expressing the Same Fluorescent Tag in Mouse Lung Explant. PLoS ONE 7(6): e39831. doi:10.1371/journal.pone.0039831

Editor: Jan-Hendrik Niess, Ulm University, Germany

Received: February 11, 2012; **Accepted:** May 27, 2012; **Published:** June 22, 2012

Copyright: © 2012 Fiole et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grant 09co301-1 from the Direction Générale de l'Armement (DGA) and by grant ANABio from the Agence Nationale de la Recherche. Daniel Fiole was supported by a fellowship from the DGA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jntournier@gmail.com

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The lung immune system is very efficient: constantly exposed to pathogens and pollutants, the lower respiratory airways are nevertheless maintained sterile, while inflammation is kept at the lowest level [1]. This *tour de force* is a result of strong evolutionary constraints to maintain the delicate architecture of alveoli intact and functional, allowing gas exchange at the alveolar-capillary interface. The lung immune system is then formed by individual cells dispersed along the surface of the respiratory tract [2]. The dynamics of this system have been approached only recently at the microscopic level by imaging technologies, mainly because the lung movements *in vivo* or the drift *ex vivo* do not accommodate an easy microscopic analysis [3].

Among the most important immune cells in the lungs are monocytes, alveolar macrophages and dendritic cells (DCs) [1]. Structurally, macrophages are mostly residing on the external side of the alveoli, while DCs lie in the interstitium [4]. Both alveolar macrophages and DCs are resident cells. In contrast, monocytes are mainly patrolling cells, forming in the case of infection an on-site, ready to use, and rapidly mobilizable subset. They are also known as precursors of macrophages and DCs in mouse lung [5]. To make the picture more accurate, DCs are not a unique population. Classically DCs are categorized as plasmacytoid DCs

and conventional DCs [6]. In the lung at least two functionally distinct subsets of conventional DCs have been described, expressing either the integrins CD11b or CD103 [7,8]. Most CD11b+ DCs are found in the submucosae, while CD103+ DCs are intraepithelial. Functionally, CD103+ are related to CD8 α + DCs and specialize in capturing apoptotic cells as well as activating CD8 T cells [9,10]. CD11b DCs are prone to activate CD4 T cells and produce a wide array of chemokines [11,12]. The CD11b subset will require a special attention here, because a majority of them express CX₃CR1 [13]. As a result, transgenic CX₃CR1^{+/gfp} mice form a good model for imaging a major DC population in the lung [14]. Interestingly, initial description of the CX₃CR1^{+/gfp} mouse strain clearly showed that the enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) is expressed in different organs in various myeloid cells such as Küpfer cells in the liver, and glial cells in the brain. Within lymphoid organs EGFP is expressed in different cell subtypes including DCs, monocytes and NK cells [15]. In the lung, two main subsets including resident Gr-1^{low} monocytes [5,16,17] and CD11b+ DCs express EGFP in CX₃CR1^{+/gfp} mice [18]. Using this strain for imaging studies does not allow a systematic discrimination of these two cell populations. So far, *ex vivo* analysis of DCs subsets by two-photon microscopy have been performed using MHCII-EGFP [19], and CD11c-YFP [20,21]

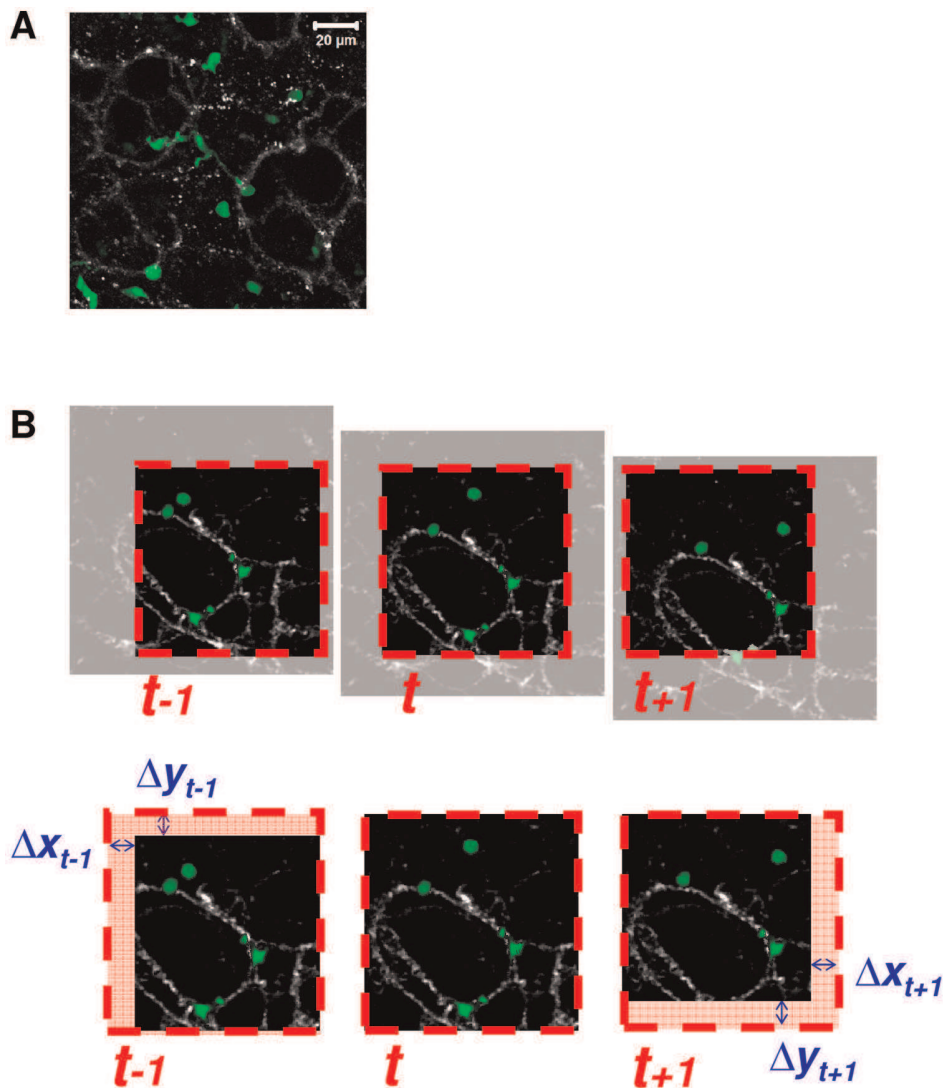


Figure 1. Schematic representation of the drift correction strategy. A: Maximum intensity projection of a lung slice z-stack. Pulmonary CX₃CR1-GFP cells (green) and alveolar collagen mesh detected by collection of SHG signal (gray). Two-photon excitation wavelength = 896 nm. B: Dashed red squares show the optic field imaged by the microscope (CX₃CR1-GFP in green and SHG in grey). The realignment phase consists in calculating the tissue drift using the maximization of SHG signal cross-correlation. doi:10.1371/journal.pone.0039831.g001

knock-in mouse strains, in trachea and lung explant, respectively. However the same issue about the discrimination of macrophages and DCs arises with these two models, due to their shared marker expression in the lung.

The aim of the present study is to show how to overcome the non-discrimination of different subsets sharing the same fluorescent tag expression in dynamic studies. Here, we demonstrate the feasibility of an automated discrimination of two main CX₃CR1-positive cell populations using a criterion based on the cell shape: the roundness. In order to separate Round-shaped cells (RSCs) and Dendritic-shaped Cells (DSCs), we suggest to introduce two novel coefficients: the Instantaneous Roundness Coefficient (IRC) measured in each frame and the Mean Roundness Coefficient (MRC) calculated as the mean of the IRC on the total tracking time for each cells. Using this strategy implemented in a cell tracking code, we show that different behaviour can be observed between the Round-shaped Cell (RSCs) and Dendritic-shaped

Cell (DSCs) subsets. This novel approach may be generalized to other transgenic animal strains (e.g. MHCII-EGFP and CD11c-YFP knock in mice). This could lead to a better understanding of DC behaviour and a better analysis of the lung immune system during infection.

Methods

Ethics Statement

All experimental procedures were performed in accordance with the French Government guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the *Institut de Recherche Biomédicale des Armées* ethics committee (approval number: 2010/28.0).

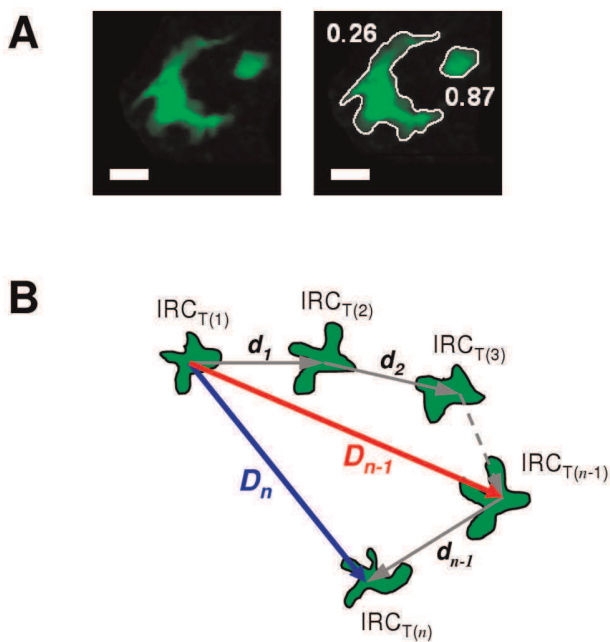


Figure 2. Parameters used for individual cell analysis. A: Edge detection of two CX₃CR1⁺ pulmonary cells and their roundness coefficient. Scale bar = 10 μm. B: The relevant parameters used in this work are: i) the Mean Roundness Coefficient (MRC), calculated for each cell by meaning Instantaneous Roundness Coefficient (IRC) at each consecutive observable time; ii) the Maximal Distance (MD) of a cell (red arrow) is the longest distance covered from the first position; iii) the Meandering Index (MI) is the final distance from the first position D_n divided by the total length covered.
doi:10.1371/journal.pone.0039831.g002

Animal Care Guidelines

CX₃CR1^{+/gfp} mice (further referred as CX₃CR1 mice) were maintained under specific pathogen-free conditions at the *Plate-Forme de Haute Technologie Animale* (Institut Jean Roget, La Tronche, France). Mice were kept under anesthesia during all manipulations using ketamine-xylazine and all efforts were made to minimize suffering. The working solution is composed of 20% Ketamine 1000 (Vibrac) and 5% Rompun (Bayer Healthcare) diluted in PBS and was injected by intraperitoneal route (i.p.). To mimic the effects of Gram-negative bacteria lung infection, 120 μg of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (LPS-EB ultrapure, InvivoGen) in a total volume of 55 μL diluted in PBS were delivered by intratracheal route (i.t.). Control mice received an equivalent volume of PBS.

Sample Preparation for microscopy

Mice were euthanized either 30 minutes ('early stage' group) or 4 hours ('late stage' group) post administration of PBS or LPS. Left lobes of lung explants were cut in the middle with a vibratome (Leica). The bottom of lung lobes was carefully glued on a Petri dish filled up with phenol-red free RPMI medium (RPMI 1640, PAN Biotech GmbH) at 37°C. Medium was refreshed every hour. Explants were kept for one hour at 37°C in a 5% CO₂ environment before imaging and kept at 37°C during the whole experiment. This phase was aimed to stabilize the explant by emptying out most of the air from the alveoli.

Flow Cytometry

Lungs were harvested after mouse euthanasia, mechanically disrupted using gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec) according to manufacturer instructions, enzymatically digested with 1 mg/mL Collagenase I (Worthington) for 30 min at 37°C in 50U/mL DNase I (Sigma)-containing DMEM. Then, the solution was filtered with 70 μm cell strainers (Becton Dickinson) to obtain single-cell suspensions.

Inhibition of nonantigen-specific binding of immunoglobulins to Fc receptors was performed using a rat antimouse CD16/CD32 antibody (2.4G2 BD Biosciences). Cells were subsequently stained for 30 min at 4°C with the following monoclonal antibodies: Alexa Fluor 700 conjugated anti-CD45 (30-F11; Biolegend), PE-Cy7 conjugated anti-CD11b (M1/70; eBioscience), APC conjugated anti-CD11c (HL3; BD Biosciences), PE conjugated anti-NK1.1 (PK136; BD Biosciences), PercPCy5.5 anti-CD3e (145-2C11; eBioscience), Alexa Fluor 700 conjugated anti-MHC II (MC-114-15.2; eBioscience), PercPCy5.5 anti-F4/80 (BM8; Biolegend), PE conjugated anti-CD80 (16-10A1; BD Biosciences), PE conjugated anti-CD103 (2E7; eBioscience).

Dead cells were excluded by staining for 30 min at 4°C with Blue LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stains (Invitrogen) following the manufacturer instructions.

Cells were then fixed with Cellfix (BD Biosciences). Cell acquisition was directly performed with an LSR-II machine using FACSDiva software (BD Biosciences) and the data were analysed with FlowJo software (TreeStar). Cell doublets were excluded using FSC-A and FSC-H.

Microscopy Setup

Both second-harmonic generation (SHG) and two-photon excitation fluorescence (TPEF) imaging were performed on a Zeiss LSM 710 microscope equipped with a W Plan-Apochromat 20× NA 1.0 DIC M27 75mm water immersion objective (Zeiss). Two-photon excitation was produced at 896 nm by a femtosecond Ti:Sa laser (Chameleon Ultra, Coherent). SHG and EGFP signals were both epidected by two dedicated non-descanned detector, one is coupled with a 500–550 nm band-pass system for EGFP and the other with a 448 nm ± 20 nm band-pass filter for SHG. Z-stacks were acquired every two minutes during one hour. Images size was 512 by 512 pixels, corresponding to a field of view of 280 by 280 μm.

Cell Tracking

Data processing was performed under Matlab using a multiple particle tracking code by Blair and Dufresne (available on <http://physics.georgetown.edu/matlab/>).

Statistical analysis

For the four experimental conditions (mixing early/late stage and PBS/LPS delivery), results from three mice were pooled. Comparisons between groups were performed using Mann-Whitney test, using GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc.).

Results

Drift Correction

Sample drift due to the presence of air in the lung is a major issue [22], as shown by the common use of trachea, a more rigid tissue used as an alternative to lung tissues. In other organs, the drift may be negligible compared to cell speed, but in the lung it has the same range. We used the collagen SHG signal as a spatial reference to correct this drift. The realignment of 2D-projected

Figure 3

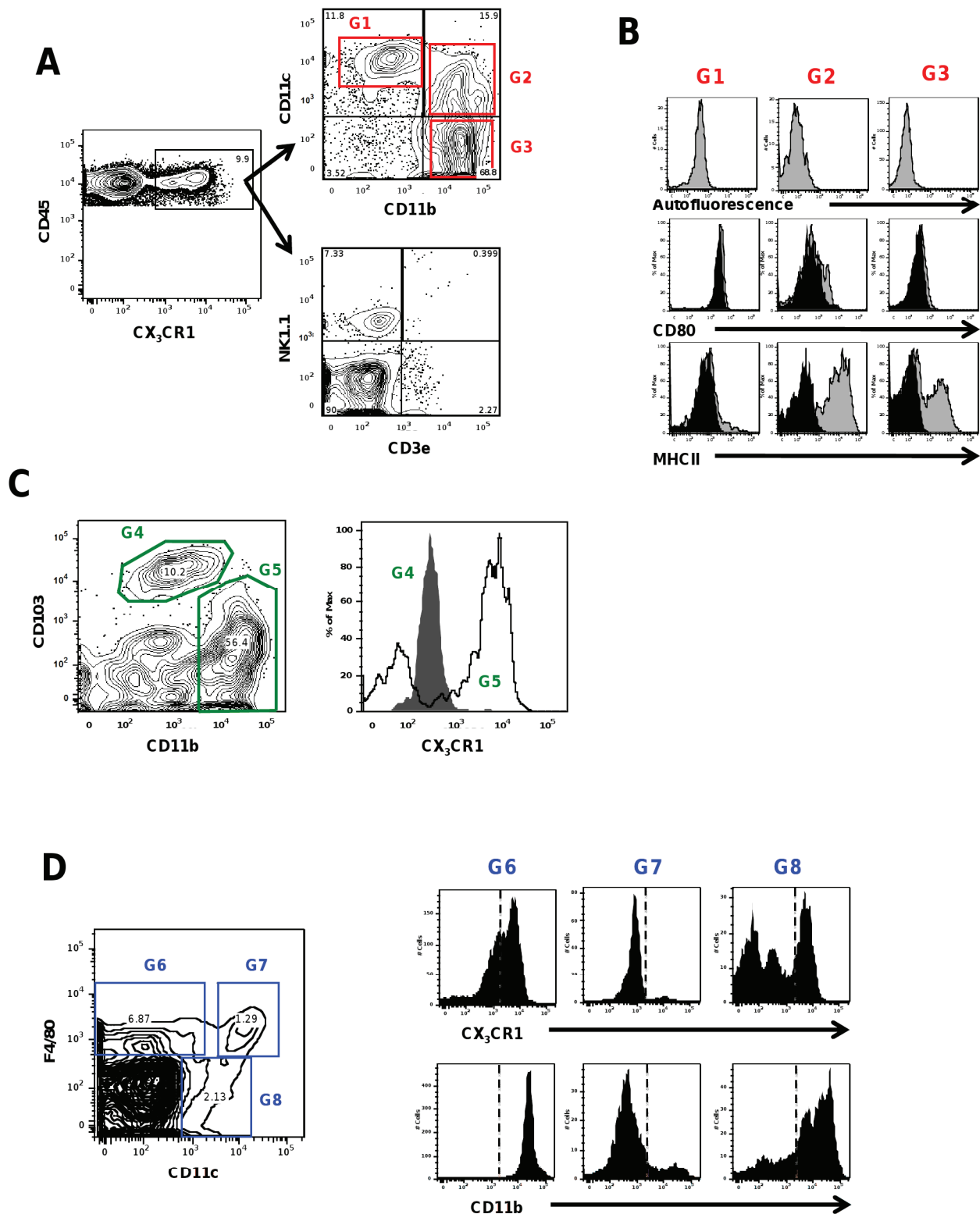


Figure 3. Phenotype of CX₃CR1-GFP cell subsets in the lung. A: Total lung cells of CX₃CR1^{+/GFP} mice were gated on CX₃CR1 and analyzed for NK1.1, CD3e, CD11c, and CD11b expressions. B: Autofluorescence, CD80 and MHCII expressions on gate G1, G2 and G3 of panel A. Black histogram, isotype control; grey histogram, positive staining. C: Total lung cells were pre-gated on CD11c⁺ low autofluorescent cells and analyzed for the expression of CD11b and CD103. The expression of CX₃CR1 is shown on the left panel for gate G4 (CD11b⁻CD103⁺ DCs, grey histogram) and for gate G5 (CD11b⁺CD103⁻ DCs, black line). D: Total cells were pre-gated on CD45 cells and analyzed for the expression of F4/80 and CD11c. Expression of CX₃CR1 and CD11b is shown on the left panels for gate G6 (CD11c^{low}F4/80^{high}), G7 (CD11c^{high}F4/80^{high}) and G8 (CD11c^{high}F4/80^{low}). Data from flow

cytometry, performed on one CX₃CR1^{+gfp} mouse lung harvested 30 minutes after intratracheal PBS injection. Data are representative of two distinct experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0039831.g003

frames was based on maximization of the spatial cross-correlation function of SHG signal using a custom made Matlab (MathWorks) code (Figure 1A and 1B).

Cell tracking strategy

The Matlab code was implemented with an edge detection custom-made routine aimed to determine the roundness coefficient of each cell. Instantaneous Roundness Coefficient (IRC) is defined as follow:

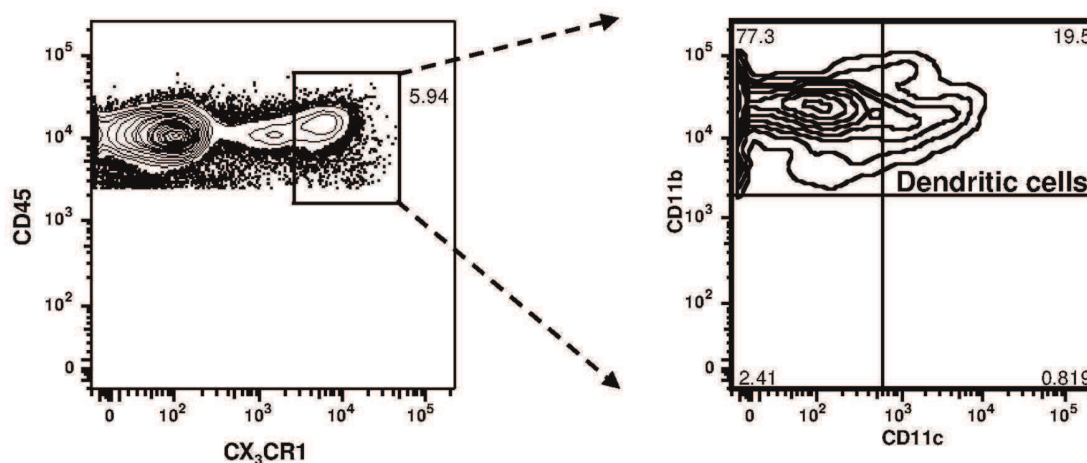
$$IRC = \frac{4\pi \text{ Area}}{\text{Perimeter}^2}$$

The IRC indicates the index of circularity of any object: from 0 (line-shaped) to 1 (round-shaped) (Figure 2A). Because the IRC of a particular cell changes along its displacement in pulmonary tissue all over the experiment, we suggested to use the Mean Roundness Coefficient (MRC) attributed to the cell according to the following formula (Figure 2B) where n is the number of consecutive frames on which the cell is observed:

$$MRC = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n IRC_{T(i)}$$

The Meandering Index (MI) yields information about the directionality of the cell movement [22] and is defined as the

A



B

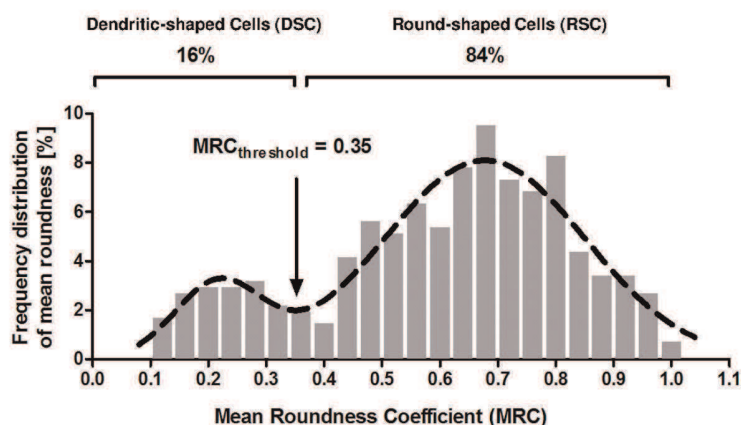


Figure 4. Discrimination of two CX₃CR1-GFP cell subsets using flow cytometry or roundness. A: Expression of CX₃CR1 vs CD45 receptors in pulmonary cells and CD11c vs CD11b by CX₃CR1^{high} cells. Data from flow cytometry, performed on one CX₃CR1^{+gfp} mouse lung harvested 30 minutes after intratracheal PBS injection. Data representative of two distinct experiments. B: Frequency distribution of Mean Roundness Coefficients (MRC) over 1h of CX₃CR1+ pulmonary cells in lung slices harvested from 6 mice, 1h30 (3 mice) and 5h (3 mice) after PBS injection. N = 406. Cells are followed for a mean time of 32 minutes, corresponding to 16 frames. Dashed line: sum of two Gaussian fitting the histogram. R² = 0.89.
doi:10.1371/journal.pone.0039831.g004

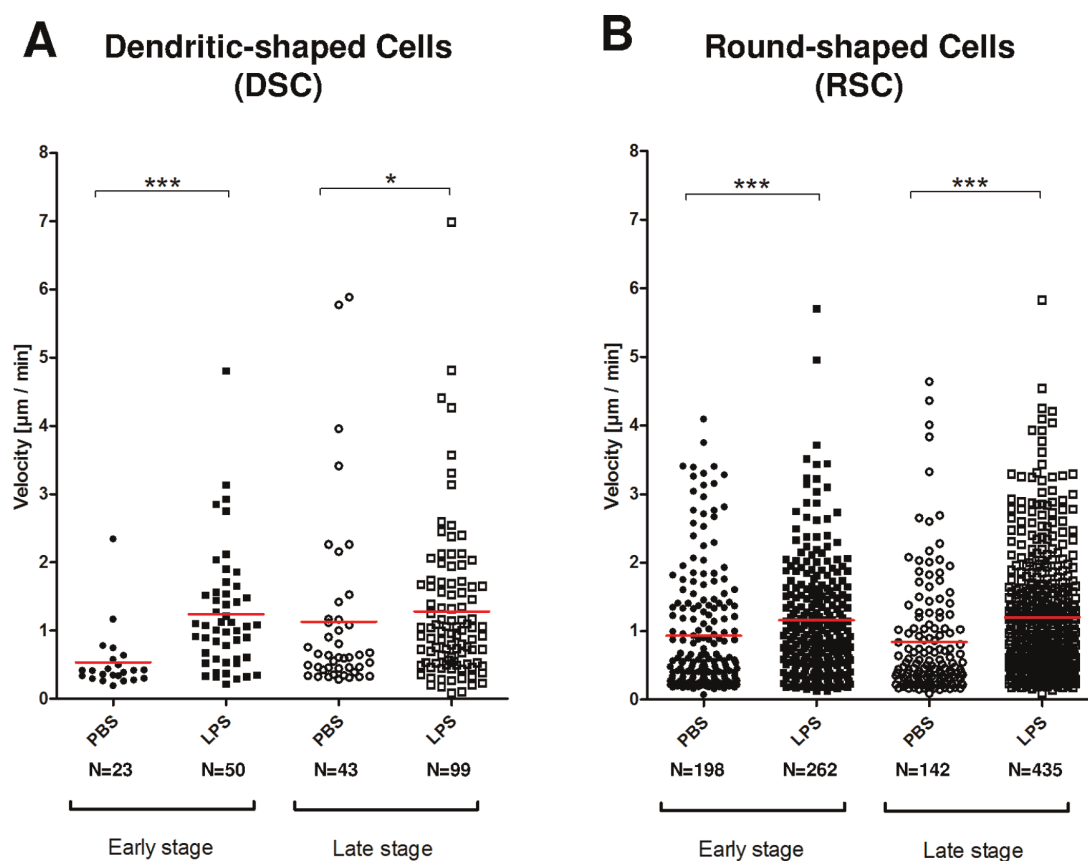


Figure 5. Velocity of CX₃CR1-GFP positive pulmonary Dendritic-shaped and Round-shaped cells. A: Dendritic-shaped cells and B: Round-shaped cells at an early stage (average values from 1h30 to 2h30 post injection, closed symbols) and a late stage (average values from 5h to 6h post injection, open symbols) after injection of PBS (rounds) or LPS (squares). Three mice in each group, one symbol by cell. * for p<0.05; ** for p<0.01; *** for p<0.0001; ns for not significant. doi:10.1371/journal.pone.0039831.g005

following (Figure 2B):

$$MI = \frac{D_n}{\sum_{i=1}^{n-1} d_i}$$

This parameter being inappropriate to fully characterize a random walk path [23], we also used the Maximal Distance (MD), which is for a cell the highest distance reached from its first position, to improve the cell confinement description (Figure 2B):

$$MD = \max \{ D_i ; i = 1 \dots n \}$$

Discrimination of lung CX₃CR1⁺ Round-shaped Cells and Dendritic-shaped Cells subpopulations

First, we assessed the different lung phagocyte subpopulations by flow cytometry analysis (Figure 3). Initially, we demonstrated that CX₃CR1 is expressed at high level within a subset of NK1.1 cells, CD3e cells, CD11b⁺CD11c⁻ monocytes, and CD11c⁺CD11b⁺ DCs (Figure 3A). However, this expression was not observed on CD11c^{high}CD11b⁻ macrophages (Figure 3B, gate G1), as the CX₃CR1 intermediate levels of fluorescence corre-

spond to autofluorescence. As two main subsets of DCs have been described in the lung, we also demonstrated that CX₃CR1 is expressed in a subset of CD11b⁺CD103⁻ DCs, but not in the CD11b⁻CD103⁺ population (Figure 3C). Utilizing F4/80 in conjunction with CD11c we were able to confirm that DC defined as CD11c⁺F4/80⁻ cells express various level of CX₃CR1 as previously shown (Figure 3D) [24]. F4/80⁺CD11c⁻ myeloid cells expressed low level of CX₃CR1 while CD11c^{high}F4/80^{high} alveolar macrophages did not expressed CX₃CR1 as expected. In the microscopy analysis, we focused on the CX₃CR1^{high} population, excluding CX₃CR1^{int} population that contains macrophages. In accordance with previous studies, CX₃CR1⁺ population represents about 6% of total CD45⁺ lung cells [13] (Figure 4A). Using classical double CD11b/CD11c staining we could differentiate in CX₃CR1-positive cells, two subpopulations expressing either CD11b only (mostly monocytes, about 77%), or CD11b and CD11c (DCs, about 19.5%).

To validate our imaging analysis approach, we first looked at the representation of distribution frequency of MRC at homeostasis (Figure 4B). Interestingly, we could observe two populations. We applied a double Gaussian fit on the distribution, which exhibited a local minimum, splitting the total population into two subpopulations for a MRC threshold at 0.35. The dendritiform cells (MRC<0.35) will be further mentioned as Dendritic-shaped Cells (DSCs), (about 16% of the total CX₃CR1 population), and the round cells (MRC>0.35) will be further mentioned as Round-

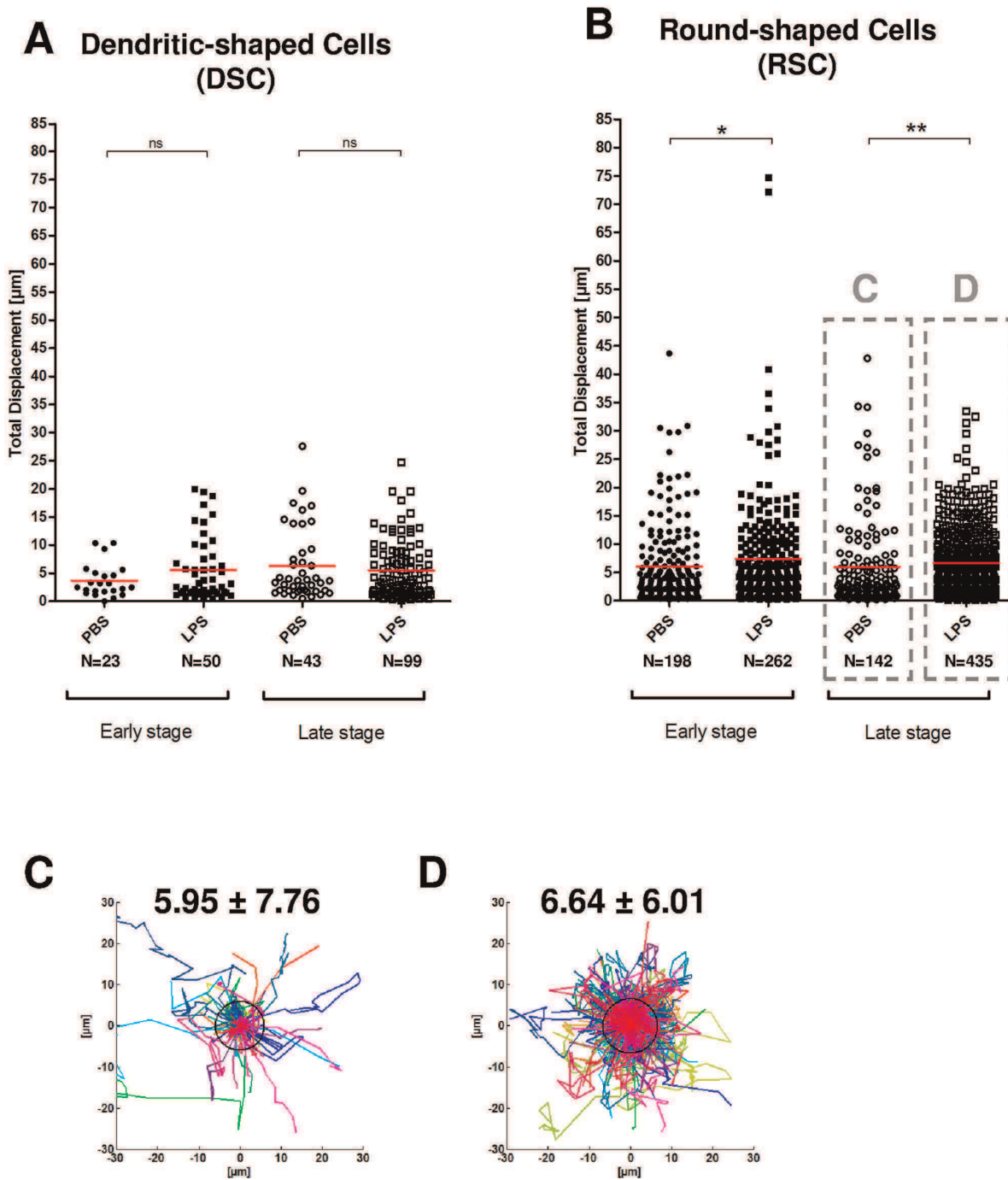


Figure 6. Maximal Distance of CX₃CR1-GFP positive pulmonary Dendritic-shaped and Round-shaped cells. A: Dendritic-shaped cells and B: Round-shaped cells at an early stage (average values from 1h30 to 2h30 post injection, closed symbols) and a late stage (average values from 5h to 6h post injection, open symbols) after injection of PBS (rounds) or LPS (squares). Three mice in each group, one symbol by cell. C, D: Overlay of Round-shaped cell tracks after late PBS (C) and LPS injection (D), after aligning their first coordinates. One color by track. Values of black circle radii in μm , equal to average cell Maximal Distance, are indicated \pm standard deviation. * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.0001$; ns for not significant. doi:10.1371/journal.pone.0039831.g006

shaped Cells (RSCs) (about 84% of the total CX₃CR1 population, including primarily monocytes, but also NK and T cells).

Therefore, subpopulations of DC and monocytes in flow cytometry were in the same range as DSC and RSC in microscopic analysis. We decided to set the MRC threshold to 0.35 for the rest of the analysis.

LPS differentially increases RSCs and DSCs velocity

Previous studies by two-photon excited fluorescence (TPEF) showed that LPS could activate tracheal DCs [19]. In accordance, in our model, intratracheal injection of LPS induced at the early stage a very significant increase of the velocity of both DSCs and

RSCs ($p < 0.0001$), as compared to PBS injection (Figure 5A and 5B). At the late stage we observed an increase of velocity more significant for RSCs ($p < 0.0001$) than for the DSCs ($p = 0.0416$).

LPS differentially modifies the confinement of RSCs and DSCs

The Maximal Distance (MD) of DSCs was not affected by LPS (Figure 6A). In contrast, RSC's MD is increased and seems to be stage-dependent, from $p = 0.0259$ up to $p = 0.0018$ (Figure 6B). The maximum effect is observed for RSC at the late stage, with a 12% increase of MD after LPS that after PBS delivery (Figure 6C and Figure 6D).

Finally, we compared the Meandering Index (MI) of RSCs and DSCs. Even though LPS increased MD for RSCs, neither of the two populations presented a MI altered by LPS. Furthermore, MI values for all groups were less than 0.4, suggesting that movements observed were not directed by chemotactism [25] (data not shown).

Discussion

In this study, we show for the first time that we could systematically discriminate two cell populations present in an organ explant and sharing the same staining, using a shape criterion. This may be of paramount importance for the DC subset analysis, as so far no fluorescent protein knock-in mouse strain available is expressed only in a defined DC lineage. To our knowledge the separation of different subsets expressing the same fluorescent tag has been seldomly studied, although it can be a major issue.

In a very recent report on lung exploration by TEPF of CD11c-YFP mouse, Veres *et al.* noted that they could observe two different populations: dendritiform for the DCs, and rounded for presumably macrophages in this particular case [21]. In their study, they could not discriminate those cell behaviors. Our methods improve clearly the time-lapse analysis and could be adapted to very general cases, when cells can be differentiated according to their shape.

In fact, the shape is not a poorly defined character of a cell, as stressed by the fact that DCs were identified and described for the first time only by their shape [26,27,28,29]. The very specific hairy DC shape has been for a very long time the only way to characterize those 'golden' cells, before powerful flow cytometer methodology was developed. We propose thus a renewed use for this primordial character.

Thanks to that, we analyze here the effects of LPS instillation by intra-tracheal route on cell motility. Intra-tracheal instillation was chosen in spite of its invasivity (a consequence may be the increase of velocity of DSCs at the early *versus* late stage in Figure 4) in order to improve the reproducibility of injection compared to nasal instillation (data not shown). However, every comparison was performed between PBS and LPS groups in order to focus on

the specific effects of LPS, excluding effects of tracheotomy and/or of a rather big volume of liquid injected in the lungs.

LPS is a Gram-negative outer membrane component known to elicit strong immune responses via the Toll-like receptor (TLR) 4 [30]. A previous study, using TLR4^{-/-} adoptive transfer has shown that LPS stimulates indirectly lung DCs through the activation of epithelial cells [19]. Interestingly, lung monocytes and DCs also express TLR4 [31]. We then inferred that DCs and monocytes would respond differentially to a LPS trigger. We have shown here that LPS activation increased more significantly the velocity of RSCs and induced them to go significantly farther. This is consistent with what is known of lung monocyte and DC biology. Lung monocytes are smaller, more mobile cells that respond to an infection alarm. We show here, based on a shape criterion, that RSCs respond very rapidly while DSCs with long, hairy extensions are more prone to move in a very swift manner [5]. The increase of velocity of both populations at the early stage after LPS injection proves that both populations are strongly activated by LPS. The difference between RSCs and DSCs occurs at the late stage after LPS activation, where DSCs move slower than RSCs. This difference of velocity may be due to functional difference between monocytes and DCs: monocytes as circulating cells recruited rapidly on inflammatory sites could benefit from an increased velocity, when DCs including CX₃CR1 are residing cells involved in sampling task and do not need to migrate faster.

Our results prove the feasibility of the shape-based discrimination of two functionally distinct cell populations, monocytes and DCs, both expressing EGFP via the promoter CX₃CR1, under LPS mediated inflammatory conditions. The results we present are in accordance with the expected functionality of these two major immune cell populations. DCs movements induced by LPS have been already reported [19]. However, we show that LPS has a stronger effect on RSCs than on DSCs. The shape-based criterion herein described should be taken into account for studying the behaviour in fluorescence microscopy of immune cells subject to infection or inflammatory conditions using transgenic mice expressing the same fluorescent protein in distinct populations.

The new imaging tool we have developed in this study more accurately discriminates DC population from closely related lineages. It could be more universally applied to improve our knowledge of the lung immune system.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Jean-Claude Vial for his precious advice and mentorship and Drs. Bradley Stiles and Jeffrey Froude for reading and editing the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DF JD JNT. Performed the experiments: DF. Analyzed the data: DF CT AQH JD JNT. Contributed reagents/materials/analysis tools: CT. Wrote the paper: DF JD JNT.

References

- Holt PG, Strickland DH, Wikstrom ME, Jahnsen FL (2008) Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 8: 142–152.
- Tournier JN, Mohamadzadeh M (2010) Key roles of dendritic cells in lung infection and improving anthrax vaccines. *Trends Mol Med* 16: 303–312.
- Bhattacharya J (2011) Seeing is believing. *Nat Methods* 8: 57–58.
- von Garnier C, Filgueira L, Wikstrom M, Smith M, Thomas JA, et al. (2005) Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* 175: 1609–1618.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, et al. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656–661.
- Heath WR, Carbone FR (2009) Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol* 10: 1237–1244.
- Lambrecht BN, Hammad H (2009) Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31: 412–424.
- GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN (2008) Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol* 1: 442–450.
- Desch AN, Randolph GJ, Murphy K, Gautier EL, Kedl RM, et al. (2011) CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J Exp Med* 208: 1789–1797.
- Edelson BT, Ke W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, et al. (2010) Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207: 823–836.

11. del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Forster R (2007) CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 178: 6861–6866.
12. Beaty SR, Rose CE Jr., Sung SS (2007) Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 178: 1882–1895.
13. Jakubzick C, Tacke F, Ginhoux F, Wagers AJ, van Rooijen N, et al. (2008) Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103-pulmonary dendritic cell populations. *J Immunol* 180: 3019–3027.
14. Cleret A, Quesnel-Hellmann A, Vallon-Eberhard A, Verrier B, Jung S, et al. (2007) Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route. *J Immunol* 178: 7994–8001.
15. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, et al. (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.
16. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, et al. (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317: 666–670.
17. Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, et al. (2007) Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204: 171–180.
18. Landsman L, Varol C, Jung S (2007) Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178: 2000–2007.
19. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, et al. (2009) House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15: 410–416.
20. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, et al. (2004) Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 5: 1243–1250.
21. Veres TZ, Voedisch S, Spies E, Tschernig T, Braun A (2011) Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy. *Am J Pathol* 179: 603–609.
22. Beltman JB, Marec AF, de Boer RJ (2009) Analysing immune cell migration. *Nat Rev Immunol* 9: 789–798.
23. Benhamou S (2004) How to reliably estimate the tortuosity of an animal's path: straightness, sinuosity, or fractal dimension? *J Theor Biol* 229: 209–220.
24. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, et al. (2009) Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest* 119: 3723–3738.
25. Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, et al. (2010) In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18073–18078.
26. Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142–1162.
27. Steinman RM, Cohn ZA (1974) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 139: 380–397.
28. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA (1974) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 139: 1431–1445.
29. Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA (1975) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 141: 804–820.
30. Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, et al. (2000) Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 105: 497–504.
31. Schneberger D, Aharonson-Raz K, Singh B (2011) Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung. *Cell Tissue Res* 343: 97–106.

5.3 Discussion

Le critère morphologique a été utilisé pour définir les DCs lors de la découverte de celles-ci en 1974 par Ralph Steinman et Zanvil Cohn⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁷, qui vaudra à Ralph Steinman le prix Nobel de médecine en 2011. De plus, l'aspect dendritiforme des DCs a longtemps été le seul moyen de les discriminer des autres cellules, avant que le développement de la cytométrie permette une étude plus poussée des récepteurs et molécules exprimées en surface. Dans cet article nous avons présenté une procédure automatisée utilisant un critère morphologique adapté et quantifié, permettant de discriminer DCs de monocytes lorsque ces populations expriment le même fluorophore, comme c'est le cas dans la lignée murine CX3CR1^{+gfp}.

L'application de cette technique à l'étude de monocytes et DCs soumis à des conditions inflammatoires simulées par l'injection de LPS a mis en évidence des comportements différents de ces deux populations. Les deux populations subissent une augmentation de leur vitesse suite à l'injection de LPS, mais les monocytes réagissent par une augmentation de leur vitesse supérieure à celle des DCs, et en présentant un confinement moins important. Ces deux aspects du comportement de monocytes par rapport aux DCs est cohérent avec leur rôle fonctionnel. En effet, les monocytes sont de petites cellules circulantes qui doivent répondre rapidement à un signal d'alerte, tandis que les DCs résidentes, présentant de longues extensions dendritiques, sont moins enclines à des déplacements rapides⁴⁵⁹.

Etant données les particularités à la fois de la structure du poumon, des vitesses typiques faibles des cellules et de la morphologie des DCs, des précautions ont dû être prises pour mener à bien cette étude.

- 1) Le poumon est un organe spongieux, rendant délicate la coupe fine de l'organe à des fins d'études au niveau du parenchyme. Alors que la procédure classiquement adoptée nécessite l'injection *peri mortem* d'agarose dans la trachée de manière à rigidifier l'organe pour faciliter la coupe et stabiliser l'imagerie^{412,413,468}, nous avons décidé de conserver le poumon dans des conditions les plus physiologiques possible. Il en résulte une difficulté accrue de réalisation de coupes mais aussi une dérive substantielle de l'organe au

cours de l'imagerie, en raison de la fuite continue de microbulles d'air. Cette dérive pouvant atteindre plusieurs micromètres par minute, soit l'ordre de grandeur des vitesses que nous souhaitons mesurer, cela nous a conduit à développer une technique de recadrage basée sur l'information structurale présentée dans l'article, utilisant le collagène des alvéoles pulmonaires, de manière à mettre en évidence des vitesses cellulaires de l'ordre du micromètre par minute tout en s'affranchissant d'une dérive du même ordre de grandeur.

- 2) La morphologie dendritiforme des cellules dendritiques rend leur détection automatisée délicate, notamment dans le cadre du suivi cellulaire. Les paramètres de suivi (distance minimale « autorisée » entre cellules, taille caractéristique d'une cellule, distance maximale parcourue entre deux images, paramètres de détermination du centroïde tel que le seuil d'intensité de détection) doivent être judicieusement choisis de manière différencier deux monocytes en contact d'une DC présentant une extension. La Figure 60 présente un résultat obtenu avec des paramètres optimisés pour la détection de cellules ne présentant pas d'extension importante et suffisamment espacées entre elles.

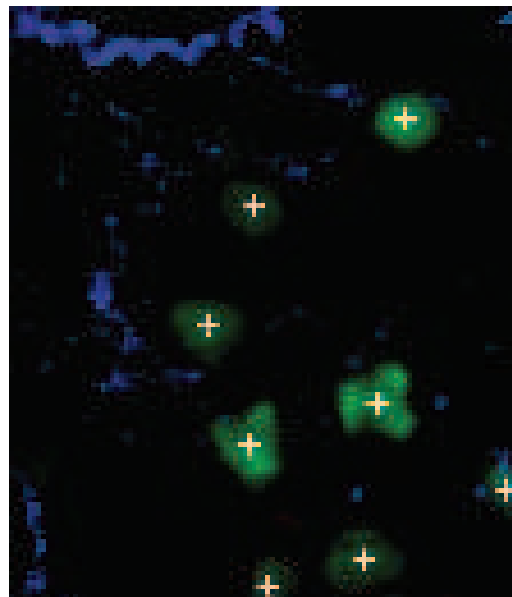


Figure 60. Détection de cellules CX3CR1 sur une coupe de poumon en microscopie à 2 photons (GFP en vert) et par SHG (collagène en bleu). Les croix blanches matérialisent les centroïdes des cellules tels que déterminés par l'algorithme de suivi cellulaire.

La Figure 61 présente quant à elle un artefact de détection : les extensions de la cellule dendritique de droite sont considérées comme des cellules différentes en contact les unes avec les autres (image du haut). La correction des paramètres de suivi permet une détection optimisée (image du bas). Un contrôle visuel effectué par l'expérimentateur permet de corriger au besoin les paramètres numériques utilisés par l'algorithme, mais des limitations demeurent lors de situations extrêmes comme en cas de grande concentration de cellules, et donc cellules très proches les unes des autres, lors d'un recrutement massif consécutifs à une infection ou inflammation.

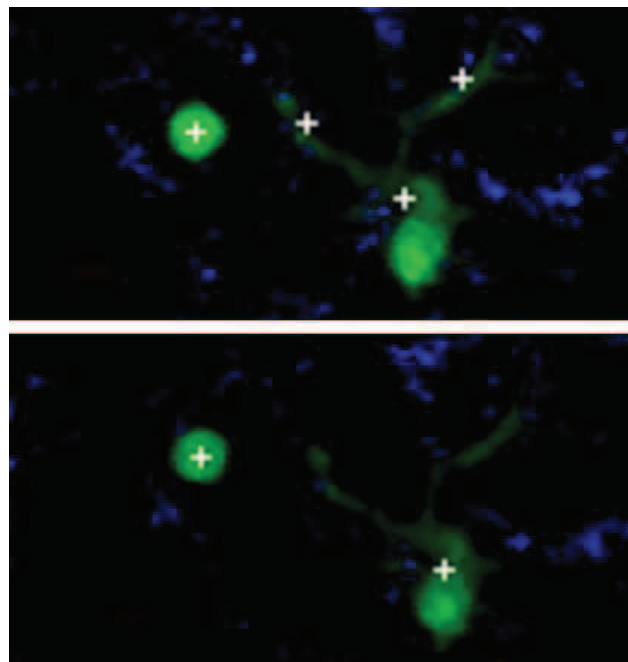


Figure 61. Détection d'un monocyte (cellule de gauche) et d'une DC (cellule de droite) sur une coupe de poumon en microscopie à 2 photons (GFP en vert) et par SHG (collagène en bleu). Les croix blanches matérialisent les centroïdes des cellules tels que déterminés par l'algorithme de suivi cellulaire.

En conclusion, cette méthode optimisée de discrimination basée sur un critère de forme pourrait être appliquée à d'autres études impliquant l'utilisation de modèles animaux transgéniques où l'expression d'un marqueur fluorescent n'est pas spécifique d'une lignée cellulaire. C'est le cas notamment des lignées MHCII-EGFP⁴⁶⁹ où l'expression du marqueur est partagée dans le poumon entre DCs, macrophages et lymphocytes B ou CD11c-YFP^{419,470} où l'expression du marqueur

est partagée entre macrophages et DCs. Dans ce dernier modèle, un coefficient morphologique statique a justement été utilisé par l'équipe de Matthew Krummel pour discriminer DCs et macrophages, dans un article⁴²⁹ publié quasiment en même temps que celui que nous avons présenté au paragraphe précédent.

Dans le cadre de cette thèse, le critère morphologique permettra d'étudier le comportement spécifique de cDCs CD11b+ CX3CR1+ soumises à une infection par *B. anthracis*.

Chapitre 6

Travail expérimental :

étude dynamique *in situ* du

comportement de DCs CD11b⁺

pulmonaires soumises à une infection

par *Bacillus anthracis*

6.1 Introduction

Des travaux effectués au CRSSA dans l'unité Interactions Hôtes-Agents pathogènes par Cleret *et al.* en 2007²⁸⁵ ont mis en évidence le rôle des DCs pulmonaires dans la capture et le transport des spores vers les ganglions médiastinaux dans les premières dizaines de minutes après infection. Cette étude préliminaire avait été effectuée par une corrélation de données de cytométrie de flux et d'imagerie statique en microscopie confocale. Jusqu'à présent l'imagerie du poumon était peu développée, et l'analyse de ces données à l'aune de ces techniques nouvelles a justifié l'essentiel de mon travail doctoral dévoué à la caractérisation plus approfondie en microscopie dynamique du rôle de ces cellules, en particulier le sous-type CD11b, confrontées à l'infection.

Une première étape dans l'étude du comportement dynamique des cDCs CD11b pulmonaires soumises à une infection par *B. anthracis* consiste en l'étude *in situ* de leurs interactions en microscopie confocale et biphotonique. Pour cela, un protocole spécifique de couplage des spores à un fluorophore est utilisé de façon à permettre leur détection en microscopie de fluorescence. Les deux zones principales du poumon dans lesquelles se trouvent des DCs sont examinées : la plèvre et le parenchyme.

Ces différentes études, décrites dans les paragraphes suivants, démontrent non seulement l'implication des cDCs CD11b pleurales et parenchymales dans la capture de spores de *B. anthracis* inhalées, mais indiquent aussi pour la première fois que le phénomène advient dans un temps très court et se produit à différents étages de l'arbre pulmonaire.

6.2 Matériels et méthodes

6.2.1 Spores et infection

Les spores de *B. anthracis* de souche Sterne sont couplées à l'Alexa Fluor 647 pour leur détection en microscopie confocale (cf. Figure 62) et à l'Alexa Fluor 568 pour leur détection en microscopie à 2 photons, selon le protocole de marquage utilisé par Cleret *et al.*^{285,299}. Les spectres associés à ces fluorophores sont présents dans les paragraphes dédiés du Chapitre 3.

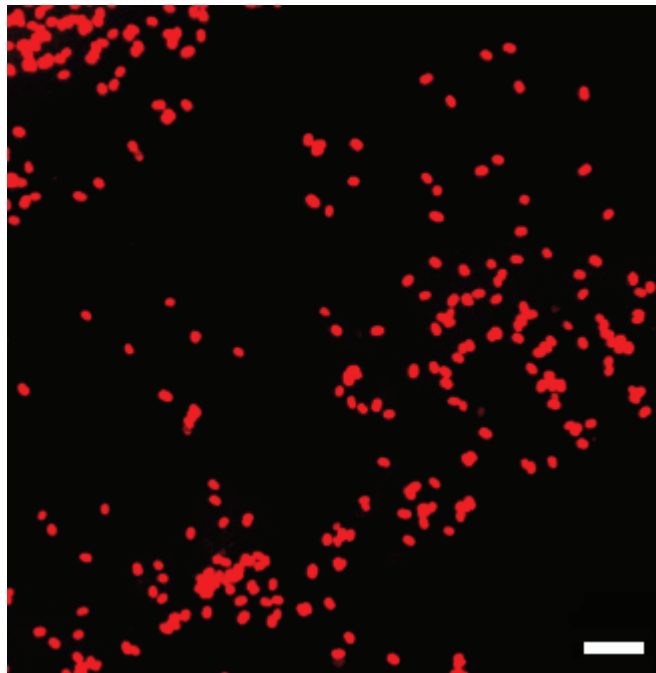


Figure 62. Spores de *B. anthracis* de souche Sterne, marquées par l'Alexa Fluor 647. Imagerie confocale avec excitation à 633 nm. Barre d'échelle = 10 μm .

L'infection est réalisée sous anesthésie par injection intratrachéale de 2×10^8 spores dans 50 μL de PBS, après mise en place chirurgicale d'une canule endotrachéale souple. L'animal est sacrifié de 2 minutes à 4 heures après infection.

Pour l'étude de la population de DCs pleurales, le poumon est prélevé, positionné entier dans une boîte de Pétri remplie de milieu nutritif RPMI, et maintenu à 37 °C durant toute la durée de l'expérimentation. Pour l'étude des populations de DCs parenchymales, bronchiques ou interstitielles, le poumon est coupé en deux à l'aide d'un vibratome (Leica), les deux fractions sont ensuite placées dans les mêmes conditions que le poumon entier. L'imagerie débute après 1 heure d'incubation dans une étuve à 37 °C contenant 5 % de CO₂, durée pendant laquelle le poumon se stabilise en évacuant la majeure partie des bulles d'air présentes dans les alvéoles qui pourraient sans cela s'accumuler sous l'objectif et diffuser la lumière.

6.2.2 Recadrage sans information structurelle

Nous avons décrit au chapitre précédent une procédure de recadrage qui permet de compenser la dérive de l'échantillon au cours de la phase d'imagerie. Cette méthode utilise l'information structurelle issue de la génération de seconde harmonique (GSH) du collagène pour estimer les paramètres de la transformation rigide que subit l'échantillon. Cette estimation est réalisée en optimisant la corrélation croisée entre les différentes composantes temporelles du signal structurel. Cette méthode est particulièrement pertinente pour les images réalisées en microscopie par EDP, mais n'est toutefois pas utilisable en tant que telle sur des images réalisées en microscopie confocale, puisque nous ne disposons alors pas du signal de GSH.

Pour réaliser le recadrage nécessaire à l'analyse d'images pulmonaires réalisées en microscopie confocale *in situ*, la référence servant au calcul de corrélation croisée est constituée du signal provenant des DCs. En effet, même si ces dernières sont mobiles, si le champ est suffisamment grand, si le mouvement des cellules est isotrope et si leur déplacement est faible sur la durée de l'expérimentation, nous constatons que la transformation rigide qui modélise la dérive d'ensemble de la population de cellules CX3CR1 de l'échantillon permet de corriger celle-ci.

6.3 Résultats

6.3.1 Interactions DCs pleurales – spores

6.3.1.1 Imagerie *in situ* statique

La Figure 63 présente un événement de capture de deux spores par une DCs pleurale. Sur cette image, une spore a été capturée par l'extension dendritique de la cellule (en bas à gauche) alors que l'autre est probablement en train d'être capturée (au centre).

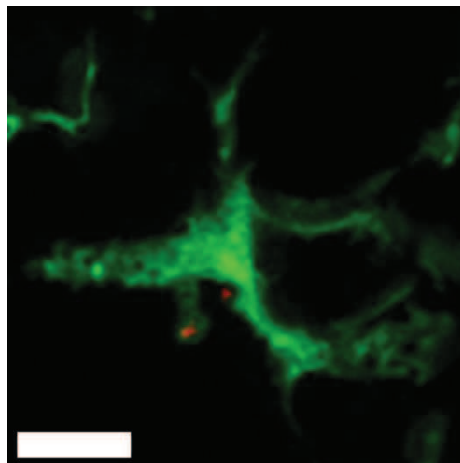


Figure 63. Capture de spores (rouge) par une DC pleurale (vert), 1 h après infection. Z-projection d'une image tridimensionnelle réalisée en microscopie confocale. Excitation à 488 nm et 633 nm. Barre d'échelle = 10 μ m.

Le coefficient morphologique IRC tel que défini au Chapitre 5 démontre clairement, par sa faible valeur, que la cellule est dendritique (*cf.* Figure 64). Notons que la cellule n'ayant pas été suivie au cours du temps, nous ne pouvons pas calculer de moyenne sur l'IRC, ce qui nous donnerait le MRC. Nous utilisons donc le seuil estimé par des moyennes, et portant sur le MRC, en l'appliquant à une mesure

unique. La valeur extrêmement faible de l'IRC mesuré nous permet toutefois d'affirmer sans crainte que cette cellule est résolument dendritiforme.

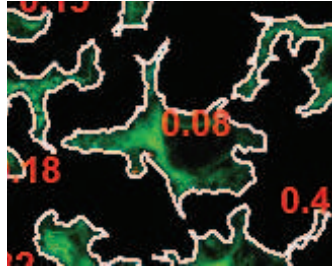


Figure 64. Superposition du contour des cellules de l'image précédente (blanc), permettant le calcul de l'IRC (en rouge). Une valeur proche de zéro suggère une DC.

La Figure 65 présente un autre exemple de capture d'une spore par une DC pleurale, environ 1 heure après infection. Là encore, la capture a lieu à l'extrémité d'une extension dendritique.

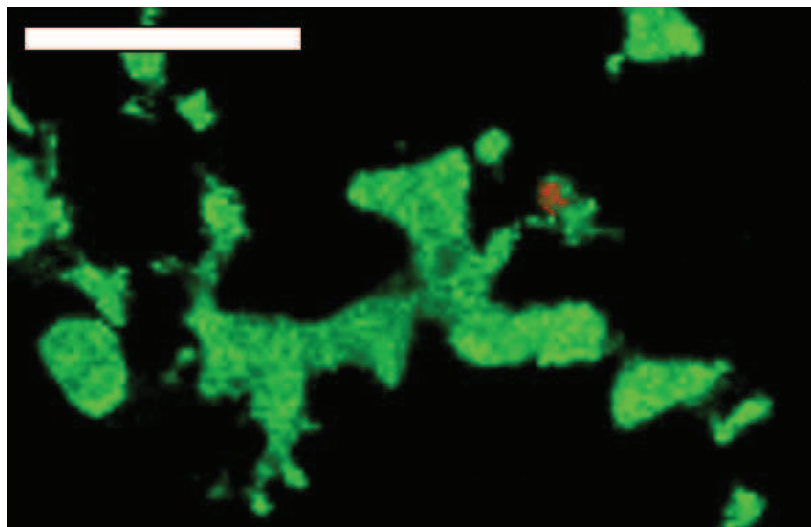


Figure 65. Capture de spores (rouge) par une DC pleurale (vert), 1 h après infection. Z-projection d'une image tridimensionnelle réalisée en microscopie confocale. Excitation à 488 nm et 633 nm. Barre d'échelle = 10 μ m.

6.3.1.2 Comportement dynamique *in situ*

La Figure 66 présente au cours du temps la population CX3CR1 pleurale 4 heures après infection. Sur cette image, il apparaît très clairement que la grande majorité de ces cellules présente l'aspect dendritiforme typique des DCs. De plus, on observe que ces cellules balayent continuellement l'environnement proche grâce à un mouvement de leurs extensions dendritiques sans se déplacer elles-mêmes, malgré l'infection.

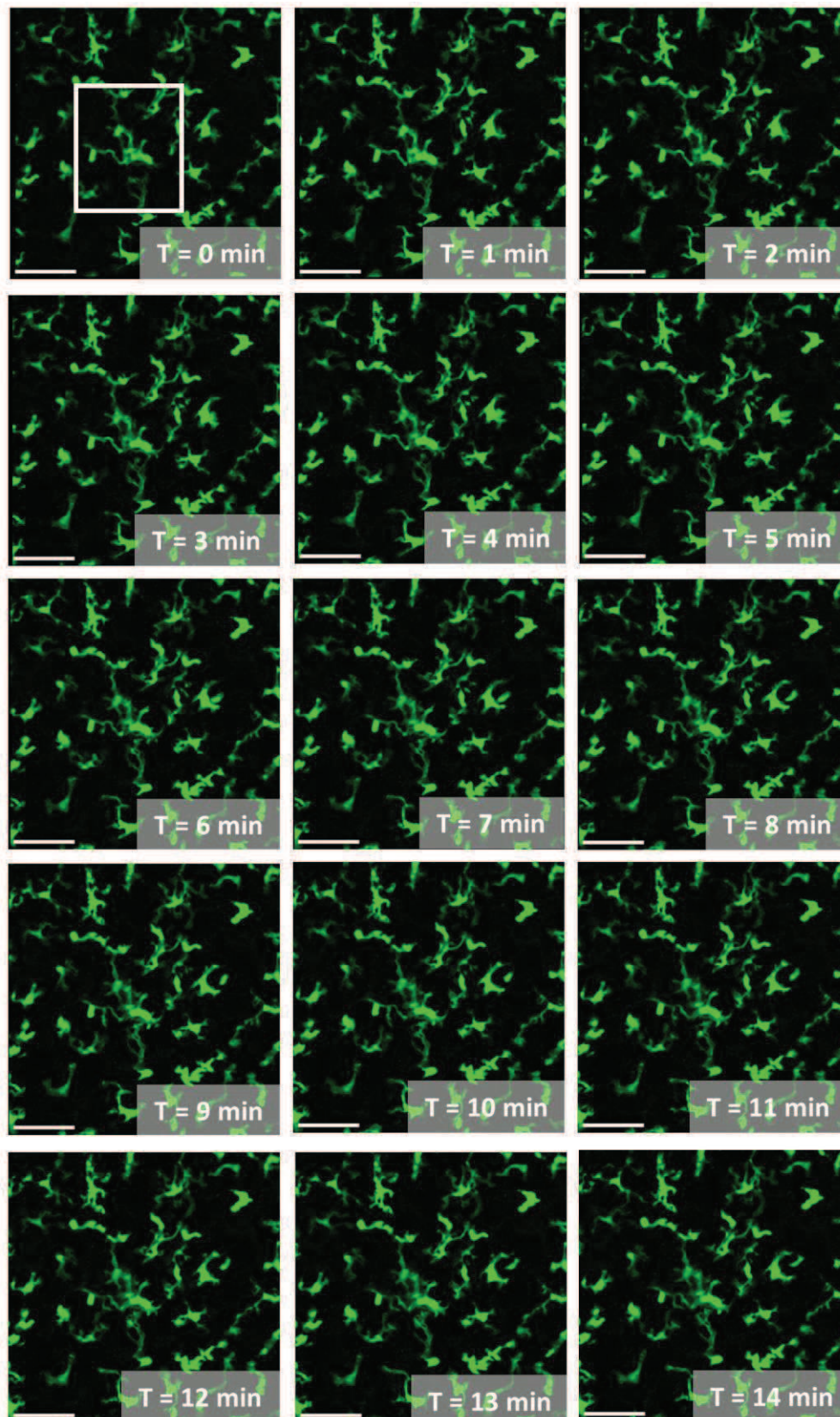


Figure 66. Z-projection d'une série temporelle d'images effectuées en microscopie confocale sur un explant de poumon, montrant le comportement de DCs (vert) 3 h p.i. par des spores non marquées. Une zone d'intérêt est proposée au temps T=0, montrant par la suite le balayage de l'environnement proche par la DC. Barre d'échelle = 20 μ m.

6.3.2 Interactions cellules CX3CR1 parenchymales – spores

6.3.2.1 Capture par des monocytes, imagerie statique *in situ*

Des événements de capture de spores par des cellules CX3CR1 sont observés sur coupe de poumon, dans la zone alvéolaire. C'est le cas notamment de la Figure 67, effectuée en microscopie à 2 photons *in situ* environ 4 h après infection. D'après la morphologie de la cellule et son IRC supérieur à la valeur seuil déterminée au Chapitre 5, il s'agit d'un monocyte alvéolaire. Notons que là encore, nous appliquons le seuil déterminé sur des moyennes, soit $IRC_{seuil} = 0.35$ dans les conditions de l'expérience, à une mesure unique ; mais la valeur franchement élevée de cette mesure nous permet de le faire sans crainte.

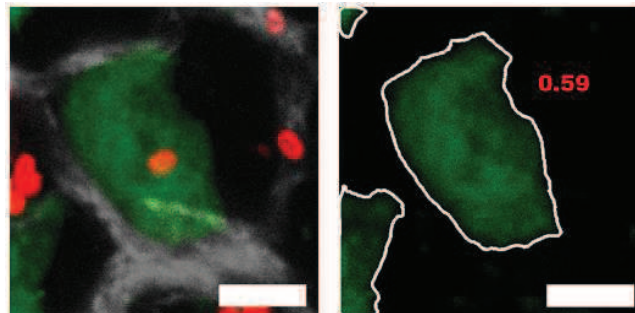
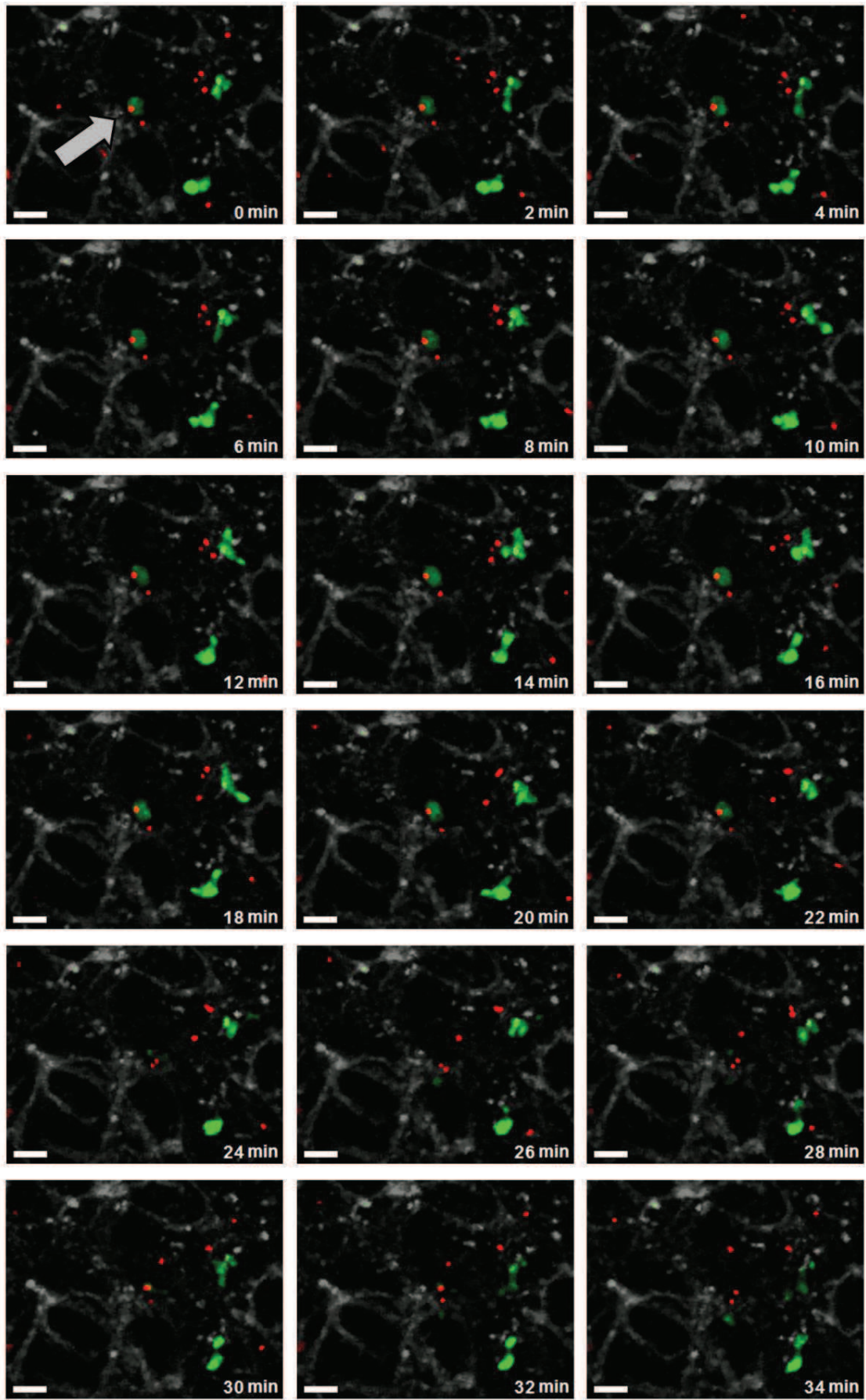


Figure 67. Image de gauche : Capture d'une spore (rouge) par une cellule CX3CR1 (vert) et réseau de collagène alvéolaire (gris). Image de droite : L'*Instantaneous Roundness Coefficient* de cette cellule vaut 0.59, suggérant un monocyte. Z-projection d'une image réalisée en microscopie biphotonique, excitation à 854 nm. Barre d'échelle = 5 μm .

6.3.2.2 Capture par des monocytes, imagerie dynamique *in situ*

La Figure 68 présente la dynamique de la capture d'une spore par une cellule CX3CR1 alvéolaire. Sa morphologie suggère fortement un monocyte ($MRC = 0.79 > MRC_{seuil}$).



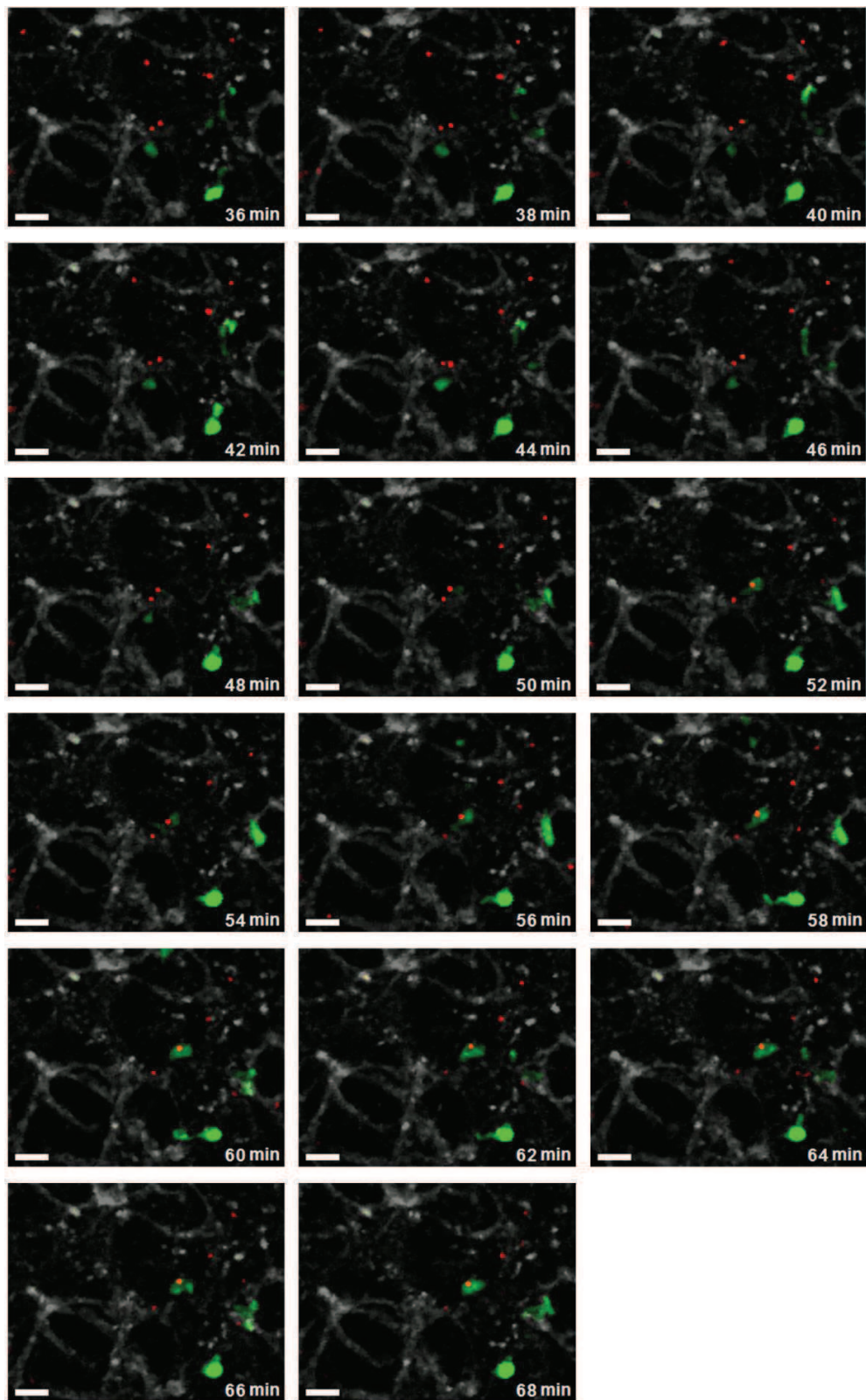


Figure 68. Série temporelle de la Z-projection d'images réalisées toutes les deux minutes, à partir de 1h30 p.i. en microscopie biphotonique *in situ*, montrant des cellules CX3CR1 (vert), des spores marquées à l'Alexa Fluor 568 (rouge) et le collagène en SHG (gris). Excitation : 854 nm. Barre d'échelle = 10 μ m. Série extraite de l'article de conférence SPIE publié en 2013 (référence [471]) présenté en Annexe 4.

6.3.2.3 Article : capture par les DCs, imagerie dynamique *in situ*

Ce paragraphe présente une publication parue en 2012 dans la revue *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, et intitulée « *Dynamics of Rapid Spore Capture by Dendritic Cells in the Lung Alveolus* ».

Cet article présente la description d'un événement de capture rapide d'une spore de *B. anthracis* par une cellule CX3CR1 du parenchyme pulmonaire dont la morphologie suggère fortement une DC ($MRC = 0.3 < MRC_{\text{seuil}}$).

Dynamics of Rapid Spore Capture by Dendritic Cells in the Lung Alveolus

Daniel Fiole^{1,2}, Julien Douady², Jean-Claude Vial², Anne Quesnel-Hellmann¹, and Jean-Nicolas Tournier^{1,3}

¹Unité Interactions Hôte-Agents pathogènes, Département de Microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France;

²Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, UMR 5588 CNRS/Université Joseph Fourier Grenoble 1, St-Martin-d'Hères, France; and ³Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France

The first sentinels of the lung immune system are organized into a cellular mesh, mainly consisting of alveolar macrophages and dendritic cells (DCs). CX3CR1^{+ /gfp} mice expressing green fluorescent protein (GFP) under the CX3CR1 promoter allow visualization of the CX3CR1-DCs subtype, distinct from GFP-negative macrophages (1), lying mainly on fibrillar collagen in the lung (Figure 1A). Intriguingly, the dynamics of alveolus sampling by DCs upon infection have, thus far, not been imaged at the microscopic level, suggesting the scarce probability of visualizing this event. We provide here a three-dimensional time-lapse (Figures 1B and 1C; see also the online supplement) and orthogonal slices (Figure 1D) documenting the rare event of *Bacillus anthracis* spore (red spots) capture by a DC (grayscale), which has already captured another spore. This was accomplished by using confocal analysis of a mouse lung slice maintained under physiological conditions. Some of these results have been previously presented as a poster and referenced in the conference proceedings (2).

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

References

1. Landsman L, Varol C, Jung S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 2007;178:2000–2007.
2. Fiole D, Douady J, Cleret A, Garraud K, Mathieu J, Quesnel-Hellmann A, Tournier JN. Multimodal 4D imaging of cell-pathogen interactions in the lungs provides new insights into pulmonary infections. *Proc SPIE* 2011;8086:18.

Figure 1. High-speed *Bacillus anthracis* spore capture by pulmonary CX3CR1-positive dendritic cells. Data were acquired using LSM 710 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Image processing was performed using ZEN (Zeiss), ImageJ, and Matlab (Mathworks, Natick, MA) softwares. (A) Typical spatial localization of CX3CR1 cells along alveoli fibers. Merge from CMTMR vital nonspecific staining (red), second harmonic generation signal collagen specific (blue), and CX3CR1-positive cells expressing GFP (green). Two-photon excitation fluorescence imaging (excitation wavelength = 860 nm). Scale bar: 20 μm. (B) Time-lapse imaging of spore uptake (red spot on the upper half, gray arrow) by a CX3CR1-positive cell (grayscale) on a mouse lung slice maintained at 37°C in nutritive medium for 210 minutes after intratracheal infection. Z-projection of the original three-dimensional z-stack, acquired on confocal mode. Scale bar: 10 μm; 3 minutes between each frame. (C) Multi-axis projections of the three-dimensional capture event. The captured spore (red spot) in the upper half is highlighted by a gray arrow on frame 15. Scale on the grid. (D) Orthogonal optical slices of the three-dimensional capture event between frames 18 and 21. The phagocytosed spore (red spot, gray arrows) is totally surrounded by black in frame 21 in the three axis, in sharp contrast to frame 18 (uncaptured spore).

Supported by grant 09co301-1 from the Direction Générale de l'Armement (DGA). D.F. was supported by a fellowship from the DGA.

Author Contributions: Conceiving and designing the experiments, D.F., J.D., J.-C.V., A.Q.-H., J.-N.T.; performing the experiments, D.F.; analyzing the data, D.F., J.D., J.-C.V., A.Q.-H., J.-N.T.; writing the paper, D.F., J.-N.T.

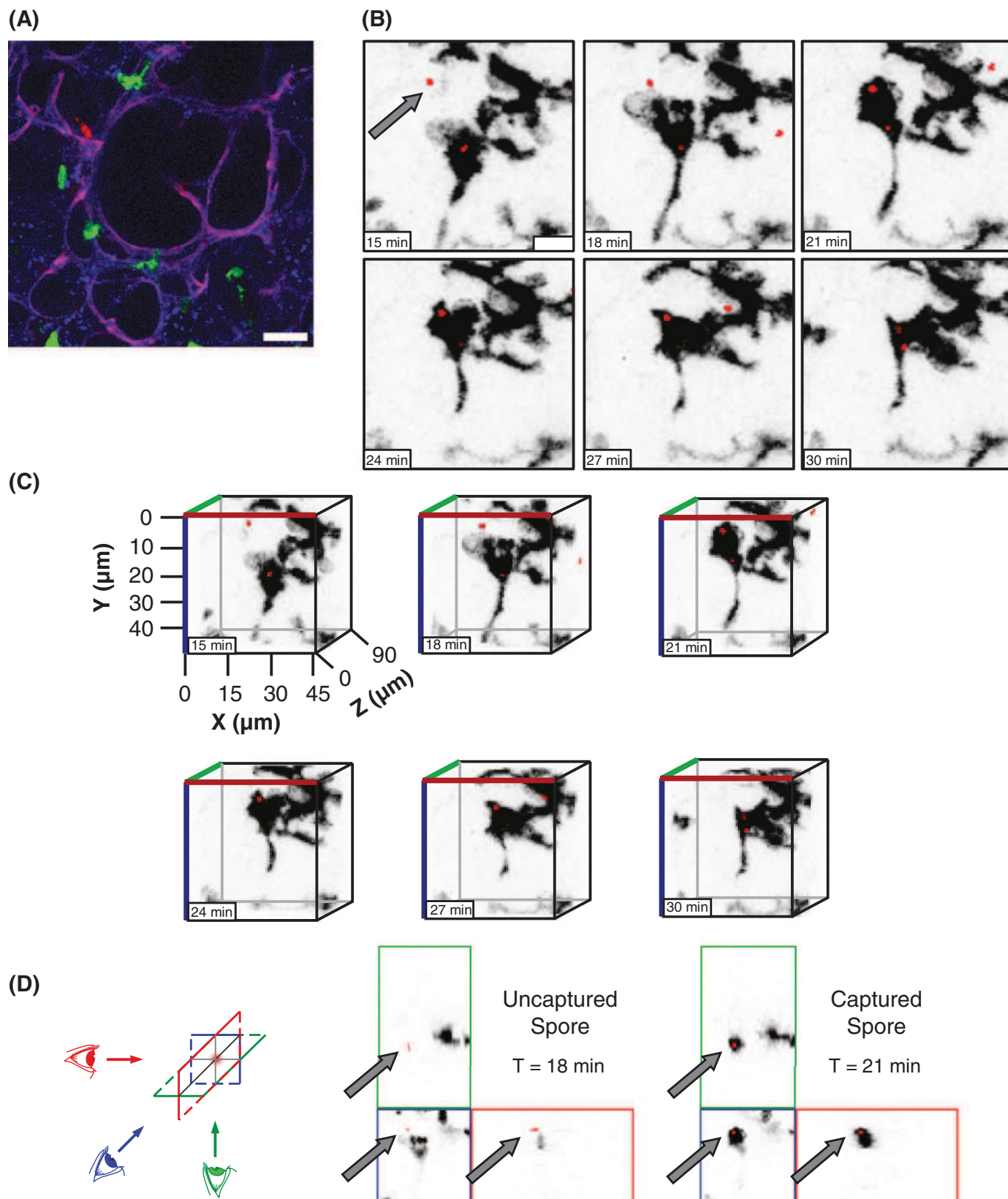
This article has a video supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 186, Iss. 2, pp e2–e3, Jul 15, 2012

Copyright © 2012 by the American Thoracic Society

DOI: 10.1164/rccm.201110-1782IM

Internet address: www.atsjournals.org



6.4 Discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre, obtenus en microscopie confocale et biphotonique *in situ*, démontrent indiscutablement l'implication des DCs CD11b dans la capture des spores de *B. anthracis* à différents niveaux de l'arbre pulmonaire.

6.4.1 Capture au niveau de la plèvre

Très peu de spores parviennent à la **plèvre** où sont situées une majorité de DCs et très peu de monocytes. Les DCs qui y sont présentes, quasiment immobiles (*cf.* Figure 66), participent à la capture des spores grâce à leurs extensions dendritiques (*cf.* Figure 63 et Figure 65). La forme de ces extensions laisse apparaître une boursouffure terminale inhabituelle, mais cependant observée en 2006 par Chieppa *et al.* qui la nomment « *balloon-bodies* »⁴⁷². Dans cette étude, les auteurs ont étudié le comportement de DCs de l'intestin. Ils montrent que les DCs de la *lamina propria* située sous l'épithélium de l'intestin grêle émettent des extensions à travers l'épithélium afin de capturer des salmonelles présentes dans la lumière intestinale. Ils montrent également que le processus d'émission d'extensions transépithéliales est généré principalement en réponse à un signal MyD88-dépendant (MyD88 étant une protéine adaptatrice utilisée par la plupart des TLRs pour activer le facteur transcriptionnel NF-κB) exprimé par les cellules épithéliales de l'intestin.

La morphologie des DCs capturant les spores présentes au niveau de la plèvre démontre non seulement l'implication de la population cellulaire CD11b pleurale dans la capture des spores, mais suggère également un possible mécanisme d'émission d'extensions transépithéliales destiné à l'échantillonnage de spores présentes dans la lumière alvéolaire au niveau pleural ou sous-pleural (*cf.* Figure 63 et Figure 65). Ce phénomène semble toutefois assez rare. Au vue du faible nombre d'événements de capture et de spores observés au niveau pleural, il est probable que la plus grande partie des spores injectées n'y parviennent pas mais restent localisées dans la zone parenchymale (alvéolaire ou bronchique).

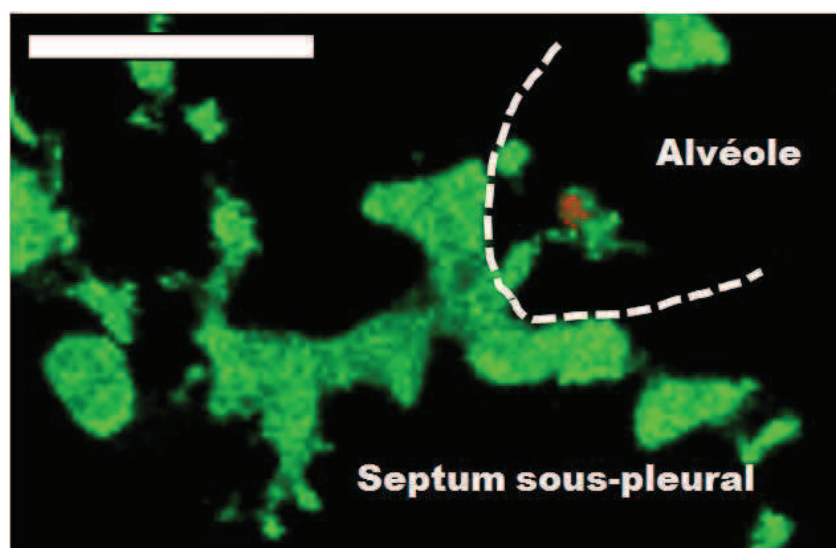


Figure 69. Possible localisation de l'épithélium alvéolaire au niveau de la zone sous-pleurale du poumon (pointillés blancs). Spores (rouge) et DC (vert), 1 h après infection. Z-projection d'une image tridimensionnelle réalisée en microscopie confocale. Excitation à 488 nm et 633 nm. Barre d'échelle = 10 μ m.

6.4.2 Capture dans le parenchyme : zone alvéolaire ou bronchique ?

Un nombre plus important d'événements de capture de spores par des cellules CX3CR1 a été observé *in situ* au niveau du parenchyme pulmonaire, sur coupes de poumon de souris infectées. L'utilisation de la discrimination basée sur un coefficient morphologique défini au Chapitre 5 (IRC ou MRC) a permis d'observer l'implication des monocytes alvéolaires dans la capture de spores (*cf.* Figure 67 et Figure 68). L'article publié dans la revue *Am J Respir Crit Care Med* présenté au paragraphe 6.3.2.3 décrit la capture très rapide d'une spore par une DC pulmonaire sur coupe, donc au niveau du parenchyme. Aucune information structurelle n'est présente sur cette image effectuée en microscopie confocale, mais l'étude approfondie de la distribution des cellules CX3CR1 en fonction de leur morphologie laisse apparaître une inhomogénéité sur une vue plus large de la zone considérée. En effet, on observe que les cellules dendritiformes sont distribuées le long de la deuxième

diagonale, permettant de situer l'emplacement probable d'une bronche dont les contours sont superposés à l'image sur la Figure 70.

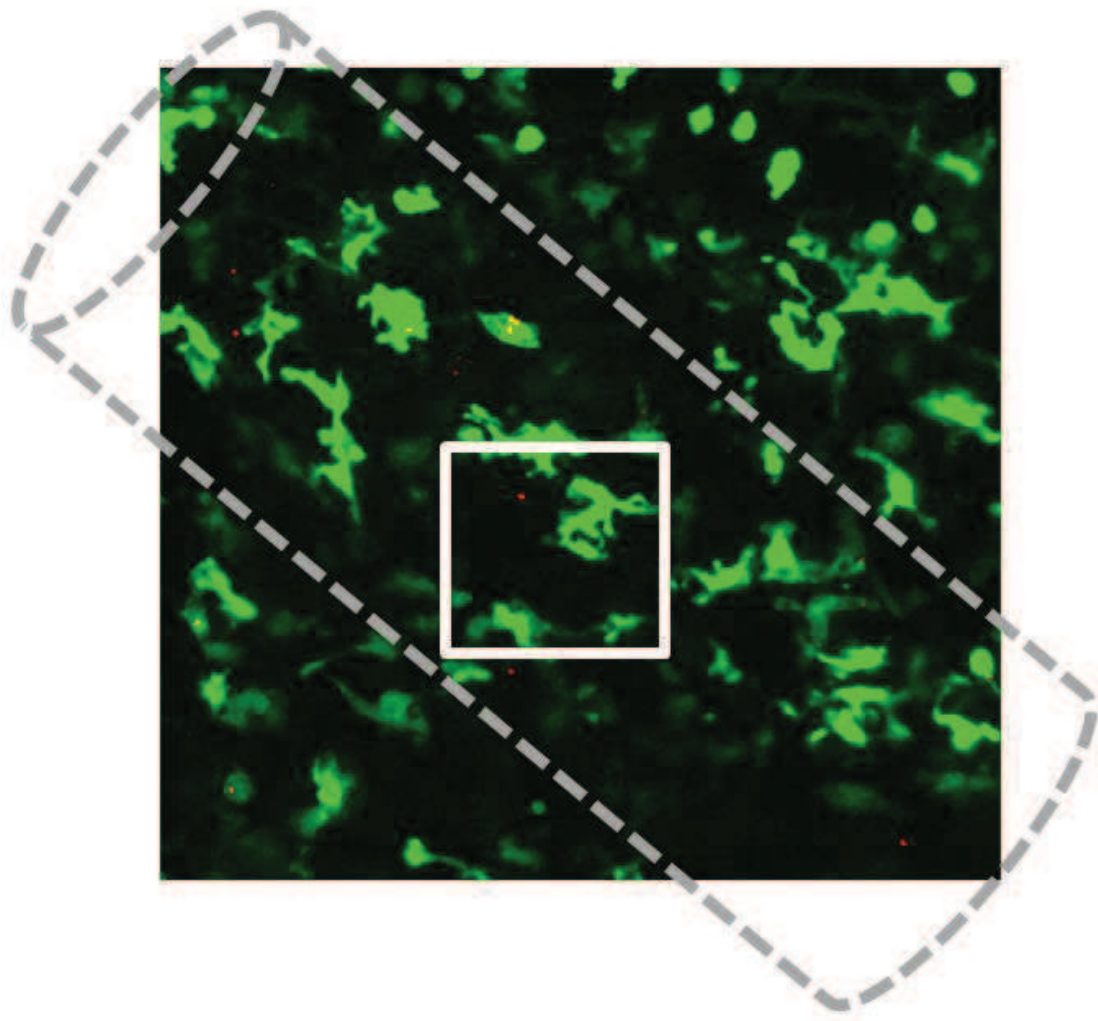


Figure 70. Vue générale de l'image dont a été extraite l'animation présentée au paragraphe 6.3.2.3. Le cadre blanc représente la zone d'intérêt présentée au paragraphe précédemment cité, et le cylindre gris en pointillé précise l'emplacement probable d'une bronche.

De plus, cette image peut être mise en correspondance avec l'image présentée au paragraphe 2.2.4.2 sur la distribution des DCs dans le poumon et reproduite à la Figure 71, notamment le long des bronches, suggérant que l'événement de capture décrit n'apparaît pas dans la zone alvéolaire mais dans la zone bronchique du parenchyme pulmonaire.

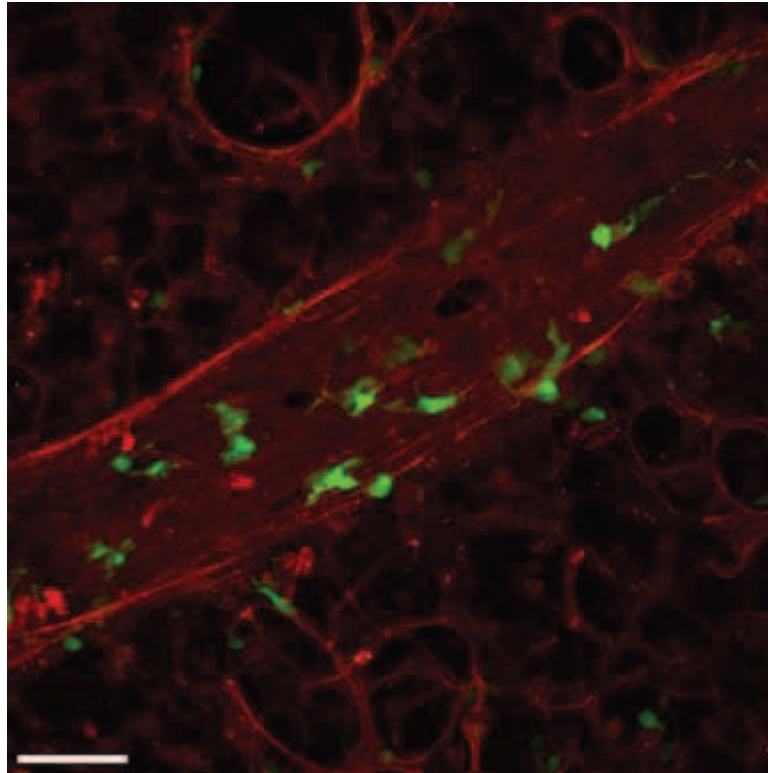


Figure 71. Imagerie confocale ex vivo avec excitation à 488 nm et 633 nm effectuée sur explant de poumon de souris $CX3CR1^{+/gfp}$ après marquage non spécifique des structures au CMTMR. Barre d'échelle = 40 μm . La distribution des DCs est principalement orientée le long de l'axe bronchique.

6.4.3 Bilan

Les résultats décrits dans ce chapitre présentent la première visualisation dynamique de la capture d'un agent pathogène pulmonaire dans un laboratoire confiné de niveau 2, et démontrent le rôle primordial de la population de DCs CD11b à tous les étages de l'arbre pulmonaire dans la capture de pathogène inhalé (plèvre, bronches, alvéoles). Ce phénomène, à même d'expliquer la présence de spores dans les ganglions pulmonaires drainants précédemment rapportée²⁸⁵, semble toutefois relativement peu fréquent au vu de la faible occurrence d'événements observés et ne permet pas une étude statistique à l'heure actuelle.

Une étape clé dans la compréhension de ce mécanisme est l'étude non plus sur explant d'organe maintenu dans des conditions favorables à la préservation de la

dynamique cellulaire, mais sur petit animal infecté, anesthésié et ventilé afin de respecter la physiologie de l'organe et d'étudier le comportement cellulaire non biaisé par l'euthanasie préalable de l'animal. Le développement d'une technique de microscopie à deux photons du poumon de souris anesthésiées et ventilées, ainsi que les avancées dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie du charbon font l'objet du chapitre suivant, dédié à l'imagerie pulmonaire *in vivo* de souris infectées par *B. anthracis*.

Chapitre 7

Travail expérimental :
développement d'une technique
d'imagerie microscopique pulmonaire
in vivo et étude des interactions entre
DCs et macrophages pulmonaires

7.1 Introduction

L'imagerie microscopique du poumon a longtemps consisté en l'étude statique *ex vivo* de coupes fixées ou en l'étude dynamique *in situ* d'explants de poumon maintenus dans des conditions favorables à la préservation de la dynamique cellulaire tel qu'abordé dans le Chapitre 4. Dans ce même chapitre, nous avons décrit les techniques qui ont permis de surmonter au cours des dernières années le problème majeur des mouvements du tissu pulmonaire causés par la respiration et les battements cardiaques de petits animaux anesthésiés. Ces méthodes, basées sur une stabilisation mécanique du poumon plus ou moins invasive, sont susceptibles d'engendrer des effets secondaires pouvant biaiser le phénomène observé, même si ces biais restent difficilement quantifiables.

Le présent chapitre décrit une méthode développée au cours de ces travaux de thèse, permettant l'imagerie dynamique du poumon sans stabilisation mécanique de l'organe. Cette technique est donc moins invasive que les autres techniques existantes, et est par conséquent plus à même de mettre en évidence des phénomènes significatifs. Nous utilisons un sur-échantillonnage temporel du poumon qui permet d'acquérir un grand nombre d'images dont certaines sont exemptes de toute perturbation. La stratégie que nous décrivons consiste en l'utilisation d'un signal structurel, provenant du collagène alvéolaire détecté par GSH ou du réseau vasculaire sur un modèle de souris transgénique, comme un référentiel servant à la sélection des images d'intérêt et au recadrage de ces images.

Cette méthode a été utilisée dans le but de caractériser *in vivo* le comportement des DCs pulmonaires confrontées à l'infection par *B. anthracis* en s'affranchissant des nombreux biais expérimentaux conséquents au prélèvement de l'organe. Contrairement à ce qui était attendu, nos résultats montrent non seulement que les spores interagissent avec les DCs, mais aussi que cette interaction se produit préférentiellement grâce à la coopération d'un autre partenaire : le macrophage alvéolaire. Nous montrons pour la première fois l'implication de cette population cellulaire, cruciale dans la réponse immunitaire innée, par l'établissement de synapses immunologiques avec des DCs CD11b au niveau pulmonaire.

7.2 Stratégie d'imagerie

7.2.1 Mouvements thoraciques

La cage thoracique de la souris, anesthésiée et ventilée, est en constant mouvement en raison des battements cardiaques de fréquence élevée (environ 10 Hz) mais d'amplitude limitée (< 1 mm) et de la respiration de fréquence plus faible (environ 2.5 Hz) mais provoquant des mouvements plus amples (plusieurs millimètres). Il résulte de la combinaison de ces perturbations deux catégories d'artefacts :

- Déformation rigide : survenue d'une perturbation entre deux images provoquant un déplacement de l'organe et un décalage entre deux images successives. Ces images présentent un pourcentage de recouvrement potentiellement non nul (cf. Figure 72) et peuvent être utilisées pour extraire une information pertinente.

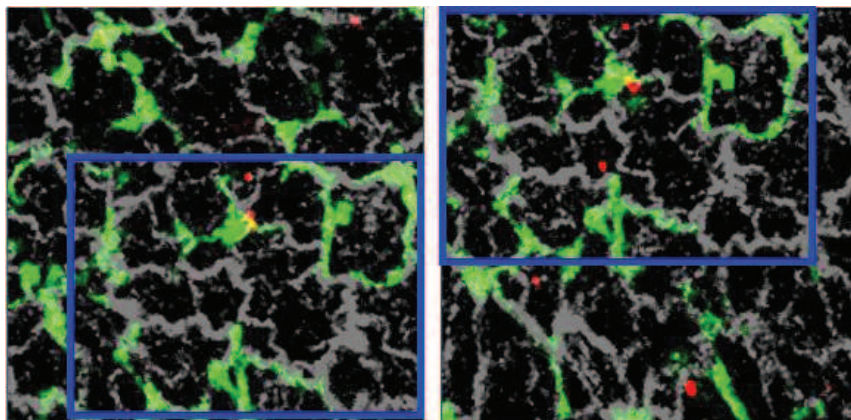


Figure 72. Exemple d'acquisition de deux images entre lesquelles est survenu un mouvement thoracique de type translation, provoquant une déformation rigide de type translation. DCs (GFP, vert), collagène (SHG, gris) et spores (Alexa Fluor 568, rouge). La zone de recouvrement entre les deux images est mise en évidence par les rectangles bleus. Excitation à 854 nm.

- Déformation non-rigide : survenue d'une perturbation durant l'acquisition d'une image par balayage, provoquant sa déformation comme illustrée sur la Figure 73 et conduisant à rejeter l'image.

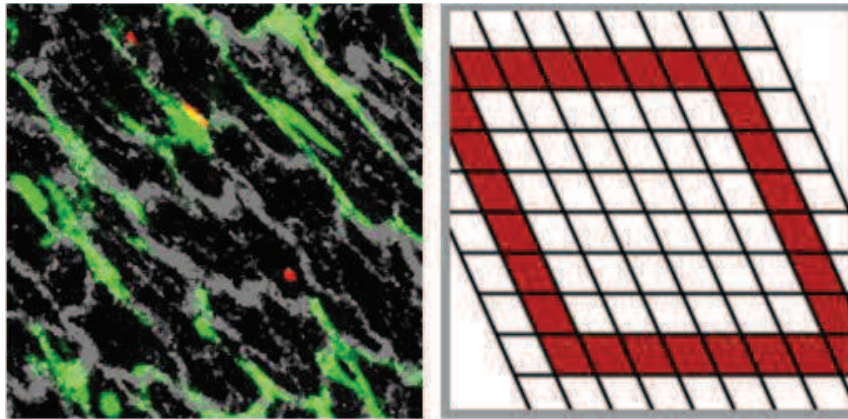


Figure 73. Exemple d'acquisition d'une image durant un mouvement thoracique de type translation, provoquant une perturbation non-rigide de type cisaillement. Image de gauche : DCs (GFP, vert), collagène (SHG, gris) et spores (Alexa Fluor 568, rouge). Excitation à 854 nm. Image de droite : modélisation de la perturbation de type cisaillement.

7.2.2 Stratégie d'acquisition

Pour surmonter le problème des mouvements thoraciques, plusieurs équipes ont choisi de contraindre mécaniquement l'organe afin de limiter les perturbations (*cf.* Chapitre 4). La stratégie que nous avons choisie est différente en ceci que nous utilisons les mouvements physiologiques de l'organe comme un moyen très performant de balayer une surface importante de l'organe tout en maintenant des conditions proches de sa physiologie normale, et donc à même de permettre l'observation pertinente du comportement des cellules.

Pour ce faire, la fréquence d'acquisition des images est choisie de façon à obtenir un grand nombre d'images (typiquement 50), dont certaines sont exemptes de perturbations non-rigides, en un temps court. La fréquence d'acquisition dépend de plusieurs paramètres dont le principal est la préparation de l'animal qui conditionne la stabilité de l'acquisition et qui sera abordée au paragraphe 7.2.4. En pratique, la fréquence d'acquisition est choisie proche du double de la plus haute fréquence de perturbations, c'est-à-dire de 10 à 20 Hz, de manière à acquérir suffisamment d'images entre deux perturbations cardiaques.

Les images ainsi acquises forment une « séquence temporelle » d'une cinquantaine d'images. L'acquisition de séquences temporelles est réitérée à une fréquence choisie par l'expérimentateur (typiquement une minute) afin de reconstituer par la suite la dynamique de la population observée par la sélection d'images d'intérêt par comparaison du signal structurel.

7.2.3 Intérêt du signal structurel et reconstitution de la dynamique cellulaire

La composante structurelle du signal, provenant du collagène alvéolaire détecté par GSH (ou du réseau vasculaire si l'animal est modifié génétiquement pour exprimer un fluorophore au niveau des cellules endothéliales), sert de référentiel par rapport auquel les cellules se déplacent.

L'expérimentateur choisit une image d'intérêt, dont le signal structurel va servir à la sélection d'une seule image au sein de chaque série temporelle, sur un critère de maximisation du coefficient de corrélation croisée. Cette sélection conduit à la sélection d'images ne présentant pas ou peu de déformation non-rigide, une déformation rigide (dérive dans le plan) limitée et très peu de dérive en profondeur.

La dérive planaire résiduelle est corrigée par une nouvelle maximisation du coefficient de corrélation croisée, mais cette fois-ci entre les différentes images sélectionnées, comme décrit dans l'article présenté au Chapitre 5.

Enfin, notons que la réitération de l'opération en choisissant d'autres images de référence permet de reconstituer la dynamique dans des zones voisines.

7.2.4 Préparation de l'animal

La préparation de l'animal est un point clé du protocole expérimental, et se déroule en quatre étapes :

- Anesthésie par administration i.p. d'un cocktail kétamine-xylazine (80 mg / kg de masse corporelle). Par la suite l'anesthésie est maintenue en continu par un cathéter i.p. posé à demeure relié à un pousse-seringue délivrant 40 mg/kg de kétamine par heure.
- Pose chirurgicale d'une sonde endotrachéale par trachéotomie. L'animal est placé sous ventilation mécanique et maintenu à 37 °C par une couverture chauffante.
- Thoracotomie : 2 à 3 côtes sont retirées du côté gauche de l'animal placé en décubitus latéral droit
- Un hublot de verre est posé sur la cage thoracique afin de protéger l'organe et d'éviter le collapsus pulmonaire en maintenant une dépression intra-thoracique.

7.3 Article

L'article présenté dans ce chapitre est intitulé « *Two-photon intravital imaging of lung reveals immunological synapses between macrophages and dendritic cells* » et est en cours de soumission dans la revue *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Il décrit dans un premier temps la méthode d'imagerie microscopique pulmonaire *in vivo* développée au cours de cette thèse, et dans un second temps l'interaction triangulaire entre DCs, macrophages et spores observée au niveau pulmonaire après infection par *B. anthracis*

1. Two-photon intravital imaging of lung reveals immunological synapses between macrophages and dendritic cells.

2. Authors

Daniel Fiole^{1,2}, Pierre Deman¹, Yannick Trescos¹, Jean-François Mayol³, Jacques Mathieu¹, Jean-Claude Vial², Julien Douady², Jean-Nicolas Tournier^{1,4}

3. Affiliations

¹Unité Interactions Hôte-Agents pathogènes, Département de Microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France ;

²Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, UMR 5588 CNRS/Université Joseph Fourier Grenoble 1, St-Martin-d'Hères, France

³Unité de Radiobiologie Tissulaire, Département des Effets Biologiques des Rayonnements, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France ;

⁴Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France

4. Correspondence and requests for reprints should be addressed to Jean-Nicolas Tournier, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 24 avenue des maquis du Grésivaudan, 38702 La Tronche cedex, France. E-mail: jntournier@gmail.com

5. Authors contribution. Conceived and designed the experiments: DF PD JD JNT. Performed the experiments: DF PD YT JFM JM JNT. Analyzed the data: DF PD JM JD JNT. Wrote the paper: DF JNT.

6. Supported by grant PDH-2-NRBC-4-B-203 from the Direction Générale de l'Armement (DGA) and the grant ANR-11-ASTR-022 01 from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR). Daniel Fiole was supported by a fellowship from DGA.

7. Running head: Imaging of lung macrophage-dendritic cell synapses

8. Descriptor number: 7.18 Mucosal Immunity of the Respiratory Tract

9. Total word count: (must not exceed 3500)

10. At a glance commentary: Very little is known about the dynamics of lung immune system in contrast to many other organs. We have developed a novel strategy based on post-processing of time-series images using second harmonic generation as a reference for frame registration instead of invasive mechanical stabilization of the organ. We describe for the first time synapses between macrophages and CD11b-positive dendritic cells that may participate in the coordination of lung immune responses.

11. This article has an online data supplements, which is accessible from this issue's table of content online at www.atsjournals.org.

ABSTRACT

The dynamics of the lung immune system at the microscopic level is still largely unknown because of the lack of an efficient method to get rid of chest motion during image acquisition. In this study, we developed an alternative lung two-photon microscopy approach on living mice based uniquely on *a posteriori* parenchymal tissue motion correction. We took advantage of the fibrillar collagen pattern given by second harmonic generation (SHG) signal as a reference for frame registration. We describe here for the first time a detailed dynamic account of two major lung immune cell populations, alveolar macrophages and CD11b-positive dendritic cells, at the homeostasis and under infection by spores of *Bacillus anthracis*, the agent of anthrax. We show that after the first line of sentinels formed by alveolar macrophages capturing spores, CD11b-positive dendritic cells came in prolonged contact with them over period of over 30 minutes. This intimate synapses formed between these two lines of defense may participate in the coordination of the immune response at the lung level.

INTRODUCTION

The lung is a crucial organ mainly dedicated to gas exchange through a thin alveolar-capillary wall (1). The obscure side of this highly efficient system is the constitutive fragility of its extensive exchange surfaces. The *tour de force* of lung-associated immune system consists in its ability to protect against infection and pollutant, while maintaining anti-inflammatory environment (2). This delicate balance is achieved by a network of scattered cells such as alveolar macrophages on the outer side of the alveoli and different subsets of interstitial dendritic cells (DCs) (3).

Recent advances in intravital microscopy (IVM) using two-photon excitation fluorescence (TPEF) have profoundly improved our understanding of the immune system dynamic in most organs, but lungs (4). A detailed account of host-pathogen interactions has been given in diverse tissues (5–12), but lung immune system IVM has lagged behind due the lack of an effective and non-invasive method.

Recent studies have addressed rigorous lung parenchyma IVM using TPEF in inflammation models (13). Two alternative *a priori* stabilization methods were used to restrain movement compatible with imaging, based either on gluing the parenchyma on a frame (14), or on a suction system stabilizing the lung under a glass window (15). These techniques, although efficient, do not seem optimal as they do not preserve the physiological motion and may provoke unexpected reactions.

We develop here an alternative lung IVM TPEF approach based uniquely on a *posteriori* tissue motion correction. We take advantage of the fibrillar collagen pattern given by second harmonic generation (SHG) signals as a reference for frame registration and removing of wobbling images. This method allows two-dimensional over the time acquisitions of immune cells moving along the alveolar collagen mesh on the lung of anesthetized mice without chest mechanical stabilization.

When previous studies mainly focused on microvascularisation (15), and/or inflammation (14, 16), we describe here for the first time the dynamic cross-talk of two major immune cell populations (macrophages and DCs) after infection by *Bacillus anthracis*, a pathogen causing anthrax, a zoonosis affecting livestock and occasionally human.

When infecting by respiratory route, *B. anthracis* causes a fulminant form of infection (17). Lung phagocytes, mainly formed by DCs transport inhaled spores to the draining distant lymph nodes, where germination occurs and give rise to an septicemia and toxemia, leading swiftly to death (2, 18). In the lung at the cellular level, we have previously shown that alveolar macrophages capture spores within minutes in a first step, while conventional DCs take over after 30 min and transport the spores to the lymph nodes (19). By using confocal microscopy ex vivo, we have shown that spores are taken up by CD11b DC subset expressing the fractalkine receptor CX3CR1 (19, 20).

Here, we dissect the early steps of *B. anthracis* infection, by using an improved IVM method using TPEF on the lung. We show that the response to the infection includes scanning of macrophages surface by DCs expressing CX3CR1, suggesting novel immune synapse that may participate in the coordination of the immune response.

METHODS

Animal care

All experimental procedures were performed in accordance with governmental guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by our institutional ethics committee. CX3CR1^{+gfp} mice further referred as CX3CR1 (Jackson Laboratory, MA), and Flk-1^{gfp} mice (obtained from Dr. J.-L. Thomas, INSERM, Paris, France) were maintained under pathogen-free conditions (Institut Jean Roget, La Tronche, France). Mice were kept under anesthesia by 20% Ketamine 1000 (Virbac, Carros, France) and 5% Rompun (Bayer Healthcare GA, Monheim, Germany) diluted in PBS, and injected by intraperitoneal route during manipulations. All efforts were made to minimize animal suffering.

***Bacillus anthracis* spores staining and infection**

Avirulent *B. anthracis* Sterne 7702 strain spores were chemically labeled with Alexa Fluor 568 or 633 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) following a method previously published (19). Mice were surgically administered with either 10⁸ spores per mouse or PBS (50 μ L) via an intra-tracheal flexible canule.

Imaging setup

TPEF imaging was performed on a Zeiss LSM 710 NLO microscope equipped with a W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC M27 75 mm water immersion objective. Excitation was produced at 854 nm by a tunable pulsed laser (Chameleon, Coherent, Santa Clara, CA). SHG was epicollected by a dedicated non-descanned detector (NDD) coupled with a 427 \pm 20 nm band-pass filter, GFP by a 500-550 nm NDD, rhodamine B or Alexa Fluor 568 by a 565-610 nm NDD and Alexa Fluor 633 by a 660-730 nm NDD (See Figure E1A in the online data supplement).

***In situ* experiments**

Lung explants were bisected with a vibratome (Leica). Samples were glued on a Petri dish filled up with 37 °C RPMI medium without phenol red using Vetbond (3M Co., Maplewood, MN) (21). Sample drift was corrected using a strategy previously described (22).

Macrophage staining and flow cytometry

Five hours prior to experiments, mice are intranasally administered with 500 µg of rhodamine B-Dextran 10 kDa or FITC-Dextran 10 kDa diluted in 30 µL of warm PBS (23). Bronchoalveolar lavage fluids and lung-derived cells were collected. Cells were incubated with phycoerythrin labeled anti-CD11b and allophycocyanin labeled anti-CD11c antibodies (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). After 45 min incubation at 4°C, cells were washed and resuspended in a Hoechst 33258 solution prior to analysis. Cells were analyzed on a LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and data were interpreted with Flowjo software (Treestar, Ashland, OR). All interpretations were performed after doublet and dead cells exclusion.

Surgical preparation for *in vivo* imaging

Anesthetized mice were placed in the right lateral decubitus position under a flexiVent mechanical ventilator (SCIREQ Inc., Montreal, Canada) and ventilated at 120 breaths per minute with a 2 cm H₂O positive end-expiratory pressure. Two to three ribs were surgically removed revealing the left, anterior lung surface (15, 21). A 12 mm diameter glass coverslip was placed upon the resected ribs and gently maintained using a window system adapted from a previous study (24) (See Figure E1B in the online data supplement). Care was taken not to limit lung motion due to ventilation.

RESULTS

***In vivo* image post-processing**

Our strategy aimed at acquiring *in vivo* series of images without mechanical stabilization of the lung, and at extracting only one image every minute among each series in order to get rid of tissue motion by *a posteriori* processing.

Five-second TPEF imaging sequences were performed on a living mouse at 10 frames per second every minute, resulting in the acquisition of fluorescent markers of cells (GFP for CX3CR1-DCs), and of second harmonic generation (SHG) signals from fibrillar collagen in the lung providing information on alveoli structures. In the resulting time series of images showing important deformations due to thoracic motion for most of them, we chose an attention-grabbing image exhibiting no deformation and potentially revealing a thought-provoking phenomenon. The collagen signal pattern coming from SHG (Figure 1A) was used as a frame of reference for the following image registration phase.

The normalized 2D cross-correlation coefficient (25) between the frame of reference and every single SHG frame was computed using Matlab (Mathworks, Natick, MA). The frame maximizing this coefficient was extracted in each time series (Fig. 1B). The residual (x , y)-drift was corrected using a rigid estimation of the transformation between each selected frames (22, 26) (Fig. 1C). (See Movie E1 performed on a naïve CX3CR1 mouse in the online data supplement)

We further tested if our procedure could induce a vascular leak, which would have indicated lung lesions, as previously shown. Flk-1 mice were ventilated for 2 hours and injected intravenously with 70 kDa dextran-rhodamine B. The mice were then used for *in vivo* imaging with an adapted procedure using the GFP for the frame of reference. We could not detect any extra-vascular leak of dextran-rhodamine B (See Figure E2 and Movie E2 in the online data supplement).

***In vivo* imaging of spore-DC contacts**

We applied this method to *in vivo* imaging of the lung of CX3CR1 mice 5 hours after infection by *B. anthracis* spores (Fig. 2A, and Movies E3 and E4 on the online data

supplement). We selected this time as we had previously shown it was appropriate for imaging capture of spores by running *in situ* experiments (20). *In vivo* time-lapse experiments showed spores close to CX3CR1-dendritic-like cells spread on the collagen grid. We and others have previously shown that DCs could be differentiated along their roundness coefficient (16, 22). Using the instantaneous roundness coefficient defined as a normalized ratio between area and perimeter, we could assess that those cells were CX3CR1-DCs (Fig. 2B). In contrast to our expectations, we did not see any direct capture of spore by CX3CR1-DCs. A closer analysis of spore movements along the DCs clearly revealed a synchronous movement of at least two spores along the CX3CR1-DC (Fig. 2C red and white tracks). As spores do not have any mean to move by themselves, we hypothesized that those two spores were already phagocytized in an unstained cell. The spores may move simultaneously because they were in the same phagosome of an unstained cell of a different lineage in close contact to the CX3CR1-DCs. The most efficient phagocytes in the lung are the alveolar macrophages, which represented at this stage the best candidate for this cell making contact with CX3CR1-DCs *in vivo*. Some images taken later on during the infection, showed a large amount of spores packed in phagosomes of unstained cells very close to CXCR1-DCs (Fig. 3). Taken together, all these data led us to suspect CX3CR1-DC and macrophage contacts in lung *in vivo*.

***In vivo* imaging of macrophage and DC behaviors**

We next tried to determine what cell population had captured spores and made contacts with CX3CR1-DCs. We administered CX3CR1 mice with FITC-Dextran (MW 10 kDa) by intranasal route prior the infection to perform *in vivo* staining of macrophages (23). We then checked by flow cytometry that more than 90 % of dextran-loaded cells exhibited a phenotype of CD11b-negative CD11c-positive macrophages in total lung population as well as in broncho-alveolar lavages (Fig. 4A). For microscopy experiments we used rhodamine B-dextran (MW 10 kDa) instead of FITC-Dextran (MW 10 kDa) as the FITC NDD was used for GFP of CX3CR1-cells. This four colors TPEF *in situ* imaging setting allowed us to discriminate the specific signal from macrophages that co-localized exactly with

Alexa-stained spores after infection (Fig. 4B). Interestingly, after infection we observed macrophages filled with spores intermingled with DCs.

Functional role of macrophage and CX3CR1-DC contacts

We next tried to address whether lung infection would increase the number of contacts between CX3CR1-DCs and macrophages, as this would strongly suggest that they play a role in the coordination of the immune defense. As infection induces the recruitment of different cell populations, including CX3CR1-monocytes in the lung, we compared the numbers of contact by using a normalized ratio. This normalized ratio was defined as the number of contacts divided by the product between the number of macrophages by the number of CX3CR1 cells. The normalized ratio of contact was calculated as an average of 10 randomly chosen *in situ* images (200 μm \times 200 μm \times 100 μm) performed in the same mouse. Z-stacks were not projected so as to avoid taking into account false-positives. The normalized ratio was not affected by the recruitment of one or both of these populations enabling a rigorous evaluation of a possible variation. Interestingly, we observed a significant increase of the normalized ratio of contact induced by *B. anthracis* spores infection (Fig. 5A). This increase of contact was not correlated with an increase of the mean cell velocity in both CX3CR1 cells and macrophages 5 hours post infection (Fig. 5B).

Dynamic imaging of macrophage - CX3CR1-DC contacts

Then, we tried to analyze the dynamics of macrophage and DC contacts by performing *in situ* imaging in favorable conditions for preserving cell dynamics. We observed that most contacts were related to movements of CX3CR1-cells to macrophages (See Fig. 6 and Movies E5 and E6 on the online data supplement) and not from macrophages to CX3CR1 cells as suggested by the velocity of CX3CR1 cells that were almost three times higher than macrophages (Fig. 5B). We hypothesized that macrophages may transfer spores or antigenic material to CX3CR1-DCs, as suggested by *in vitro* previous work (27), but we could neither observe it, nor could rule that out, as infected macrophages appeared to be in close contact with DCs (see Figure 7 and Movie E7 on the online data supplement). In

several instances, CX3CR1 cells behaved as if they were scanning the surface of the macrophages over period of time longer as long as 30 min, compatible with exchanges of information between cells.

Eventually, we tried to observe the CX3CR1-DC and macrophage synapses by performing in vivo experiments on an infected mouse. We observed that this contact in vivo could occur over a period as long as 15 min (See Figure 8 and Movie E8 on the online data supplement), suggesting that significant signals may be exchanged between those two cells over this period of time.

DISCUSSION

Intravital microscopy of the lung of small rodents such as mice has only been scarcely achieved during the past decade due to the manifest tissue motion coming from both breathing and heartbeat movement of the chest of living animals (13, 28). So far, the only way to overcome this major obstacle has been the use of systems stabilizing the lung mechanically. While gluing the parenchyma (14) or generating a negative pressure between the organ and a glass window (15, 16, 21) could lead to observations of cell behavior under inflammatory stimulus or in an asthma, to our knowledge nothing has been published concerning the immune response following an infection by a pathogen.

In our study, we have not only demonstrated that mechanical stabilization of the lung is dispensable to achieve IVM, but we have also provided novel insights into the triangular interactions between *Bacillus anthracis* spores, macrophages and DCs, showing for the first time in vivo synapses between these major immune cell populations confronted to a bacterial infection. Our approach, exclusively based on post-processing of time oversampled acquisitions, utilizes SHG signal coming from fibrillar collagen as a reference for frame registration (Fig. 1). The main limitation consists in the inability of the method to perform 3D experiments over time, as information on depth in the sample is lost due to unforeseeable chest motion. Future work could address this issue by synchronizing breathing and acquisition.

This lung IVM method was combined with in situ experiments performed on lung slices maintained in conditions favorable to cell dynamics. Precision-cut lung slices were prepared according to previously published procedures (29, 30), with the exception that we did not fill the lungs with agarose (22). This method may avoid possible artifacts in alveolar cell behavior, making it more appropriate in the detection of slight cell displacements.

Using these methods on CX3CR1 mice we have witnessed close interactions between *B. anthracis* spores and DCs in vivo (Fig. 2) as well as in situ (Fig. 3). These observations led to two comments. On the one hand, the expected capture of spores by CX3CR1-DCs previously reported (20) appeared to be very scarce. On the other hand, the synchronous motion of spores alongside DC's surface (Movie E3 on the online data supplement) in addition to the gathering of multiple spores bordering DCs

(Fig. 3) strongly infer a previous capture of these spores by a CX3CR1-negative phagocyte. Specific *in vivo* staining of macrophages by Rhodamine B (Fig. 4) offered the possibility of simultaneous TPEF imaging of both macrophages and GFP-expressing DCs after infection with Alexa Fluor stained *B. anthracis* spores and imaging of fibrillar collagen by SHG detection. This multicolor imaging set-up allowed a further statistical documentation of DC and macrophage populations following infection, revealing a significant increase of macrophage-DC contacts after infection (Fig. 5A). These data provide compelling evidence on the functional role of macrophage-DC contacts in the lung. Interestingly, the contact ratio increase does not appear to be correlated to any change in cell speed (Fig. 5B).

Altogether, these data require re-examination of not only the path of entry of *B. anthracis* spores in the lungs but also of the cooperative role of interactions between macrophages and DCs.

After inhalation of *B. anthracis* spores, a fraction of spores enters the host immune system via the nasal-associated lymphoid tissues (31, 32) while another fraction reaches the alveoli. They enter the host immune system via draining lymph node, predominantly transported by DCs (2). In the lung at the cellular level, we have previously shown that alveolar macrophages capture spores within minutes in a first step, while DCs take over after 30 min and transport the spores to the lymph nodes (19). Our data tend to refine this model and demonstrate a cooperative role of macrophages and DCs. Triggered by the infection, the crosstalk between macrophages and DCs may result in an exchange of information. Although we never observed spore transfer it is plausible that macrophages and DCs might exchange pathogen-derived particles *in vivo*, which could not be seen because of the spatial resolution of our system. This mechanism was recently suggested *in vitro* (27). Nevertheless, directed cytokine release or ligand-receptor triggering during long (up to 30 min) macrophage-DC contact is most likely and may participate in the subtle balance between tolerance and immunity characteristics of the lung. Synapses are defined as close cell-cell contacts, whereby information is selectively transmitted. Immunological synapses have been first described in the immune system at the interface between innate and adaptive cells, but has been recently extended to NK cells and more recently to phagocytes (33). We describe here a novel type of synapse occurring at a mucosal surface. The putative role of such

synapses is still to be refined, but the fact that they increase with infection strongly suggests it plays a role in infection control. Such synapse between macrophages and DCs could also occur at diverse sites, such as the gut mucosa, but also in secondary lymphoid organ, between subcapsular macrophages and migrating DCs.

This study, which aimed to remove the need for mechanical stabilization in lung IVM and therefore diminishing its invasivity, highlights for the first time macrophage-DC synapses in the lung. These synapses may be the missing link to the elaboration of the description of a triangular interaction between macrophages, DCs and inhaled pathogens, eventually leading to pathogen sampling by DCs and triggering an adaptive immune response.

REFERENCES

1. Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 2008;8:142–52.
2. Tournier J-N, Mohamadzadeh M. Key roles of dendritic cells in lung infection and improving anthrax vaccines. *Trends Mol Med* 2010;16:303–12.
3. Lambrecht BN, Hammad H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 2012;30:243–70.
4. Germain RN, Robey EA, Cahalan MD. A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. *Science (New York, NY)* 2012;336:1676–81.
5. Chtanova T, Han S-J, Schaeffer M, Van Dooren GG, Herzmark P, Striepen B, Robey EA. Dynamics of T cell, antigen-presenting cell, and pathogen interactions during recall responses in the lymph node. *Immunity* 2009;31:342–55.
6. Filipe-Santos O, Pescher P, Breart B, Lippuner C, Aebischer T, Glaichenhaus N, Späth GF, Bousso P. A dynamic map of antigen recognition by CD4 T cells at the site of *Leishmania major* infection. *Cell Host Microbe* 2009;6:23–33.
7. Chieppa M, Rescigno M, Huang AYC, Germain RN. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* 2006;203:2841–52.
8. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Winter N, Sher A, Germain RN. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity* 2008;28:271–84.
9. Hickman HD, Takeda K, Skon CN, Murray FR, Hensley SE, Loomis J, Barber GN, Bennink JR, Yewdell JW. Direct priming of antiviral CD8⁺ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nat Immunol* 2008;9:155–65.

10. John B, Harris TH, Tait ED, Wilson EH, Gregg B, Ng LG, Mrass P, Roos DS, Dzierszynski F, Weninger W, Hunter CA. Dynamic Imaging of CD8(+) T cells and dendritic cells during infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000505.
11. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Horwitz MA, Sher A, Germain RN. Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas. *Immunity* 2011;34:807–19.
12. Kim J V, Kang SS, Dustin ML, McGavern DB. Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis. *Nature* 2009;457:191–5.
13. Bhattacharya J. Seeing is believing. *Nat Meth* 2011;8:57–8.
14. Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, Pless R, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *P Natl Acad Sci USA* 2010;107:18073–8.
15. Looney MR, Thornton EE, Sen D, Lamm WJ, Glenn RW, Krummel MF. Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nat Meth* 2011;8:91–6.
16. Thornton EE, Looney MR, Bose O, Sen D, Sheppard D, Locksley R, Huang X, Krummel MF. Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *J Exp Med* 2012;209:1183–99.
17. Goossens PL. Animal models of human anthrax: the Quest for the Holy Grail. *Mol Aspects Med* 2009;30:467–80.
18. Tournier J-N, Quesnel-Hellmann A, Cleret A, Vidal DR. Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cell Microbiol* 2007;9:555–65.

19. Cleret A, Quesnel-Hellmann A, Vallon-Eberhard A, Verrier B, Jung S, Vidal D, Mathieu J, Tournier J-N. Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route. *J Immunol* 2007;178:7994–8001.
20. Fiole D, Douady J, Vial J-C, Quesnel-Hellmann A, Tournier J-N. Dynamics of rapid spore capture by dendritic cells in the lung alveolus. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:e2–3.
21. Thornton EE, Krummel MF, Looney MR. Live imaging of the lung. *Current protocols in cytometry* 2012;Chapter 12:Unit12.28.
22. Fiole D, Touvrey C, Quesnel-Hellmann A, Douady J, Tournier J-N. Shape-based tracking allows functional discrimination of two immune cell subsets expressing the same fluorescent tag in mouse lung explant. *PLoS One* 2012;7:e39831.
23. Veres TZ, Zoltán Veres T, Voedisch S, Spies E, Tschernig T, Braun A. Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy. *Am J Pathol* 2011;179:603–9.
24. Presson RG, Brown MB, Fisher AJ, Sandoval RM, Dunn KW, Lorenz KS, Delp EJ, Salama P, Molitoris B a, Petrache I. Two-photon imaging within the murine thorax without respiratory and cardiac motion artifact. *Am J Pathol* 2011;179:75–82.
25. Haralick RM, Shapiro LG. Computer and Robot Vision, volume II. Addison-Wesley; 1992. p. 316–317.
26. Mlodzianoski MJ, Schreiner JM, Callahan SP, Smolková K, Dlasková A, Santorová J, Ježek P, Bewersdorf J. Sample drift correction in 3D fluorescence photoactivation localization microscopy. *Opt Express* 2011;19:15009–19.
27. Blank F, Wehrli M, Lehmann A, Baum O, Gehr P, Von Garnier C, Rothen-Rutishauser BM. Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology* 2011;216:86–95.

28. Nava RG, Li W, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ, Kreisel D. Two-photon microscopy in pulmonary research. *Seminars in immunopathology* 2010;32:297–304.
29. Henjakovic M, Sewald K, Switalla S, Kaiser D, Müller M, Veres TZ, Martin C, Uhlig S, Krug N, Braun a. Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicol Appl Pharm* 2008;231:68–76.
30. Ressmeyer AR, Larsson AK, Vollmer E, Dahlèn SE, Uhlig S, Martin C. Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. *ERJ* 2006;28:603–11.
31. Glomski IJ, Piris-Gimenez A, Huerre M, Mock M, Goossens PL. Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax. *PLoS Pathog* 2007;3:e76.
32. Dumetz F, Jouvion G, Khun H, Glomski IJ, Corre J-P, Rougeaux C, Tang W-J, Mock M, Huerre M, Goossens PL. Noninvasive imaging technologies reveal edema toxin as a key virulence factor in anthrax. *Am J Pathol* 2011;178:2523–35.
33. Dustin ML. Signaling at neuro/immune synapses. *J Clin Invest* 2012;122:1149–55.

Fig. 1

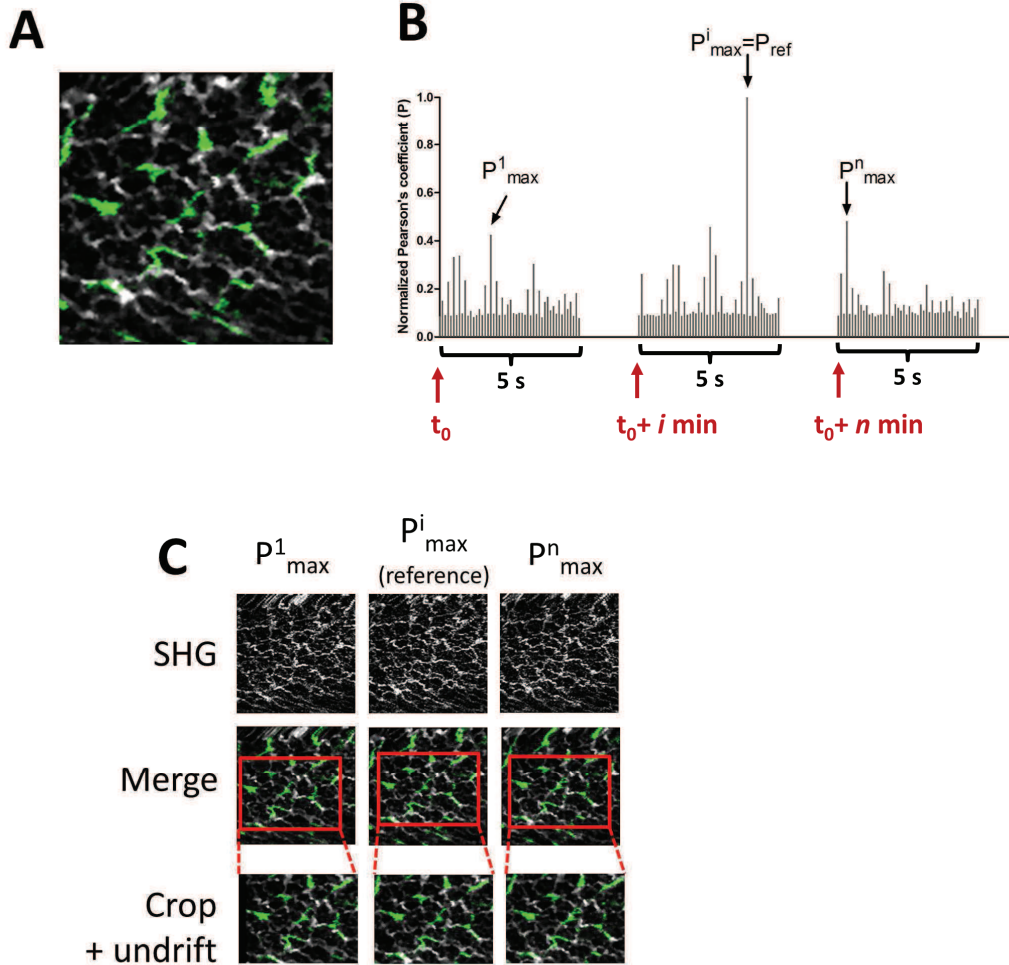


Figure 1.

Post-processing applied to a naive CX3CR1 mouse. (A) Example of a frame of reference. (B) Five-seconds sequences of acquisition are performed every minute, resulting in 50 frames in each time series. The 2D cross-correlation coefficient between the collagen pattern of the frame of reference (grey) and every frame from the 1st to the nth 5s-time series is computed, and the frame maximizing this coefficient is selected in each time series. (C) The residual (x, y)-drift is corrected by estimation of the rigid transformation parameters using comparison of their collagen patterns (SHG). See Movie E1 in the online data supplement. Green: CX3CR1 cells (GFP). Grey: fibrillar collagen (SHG).

Fig. 2

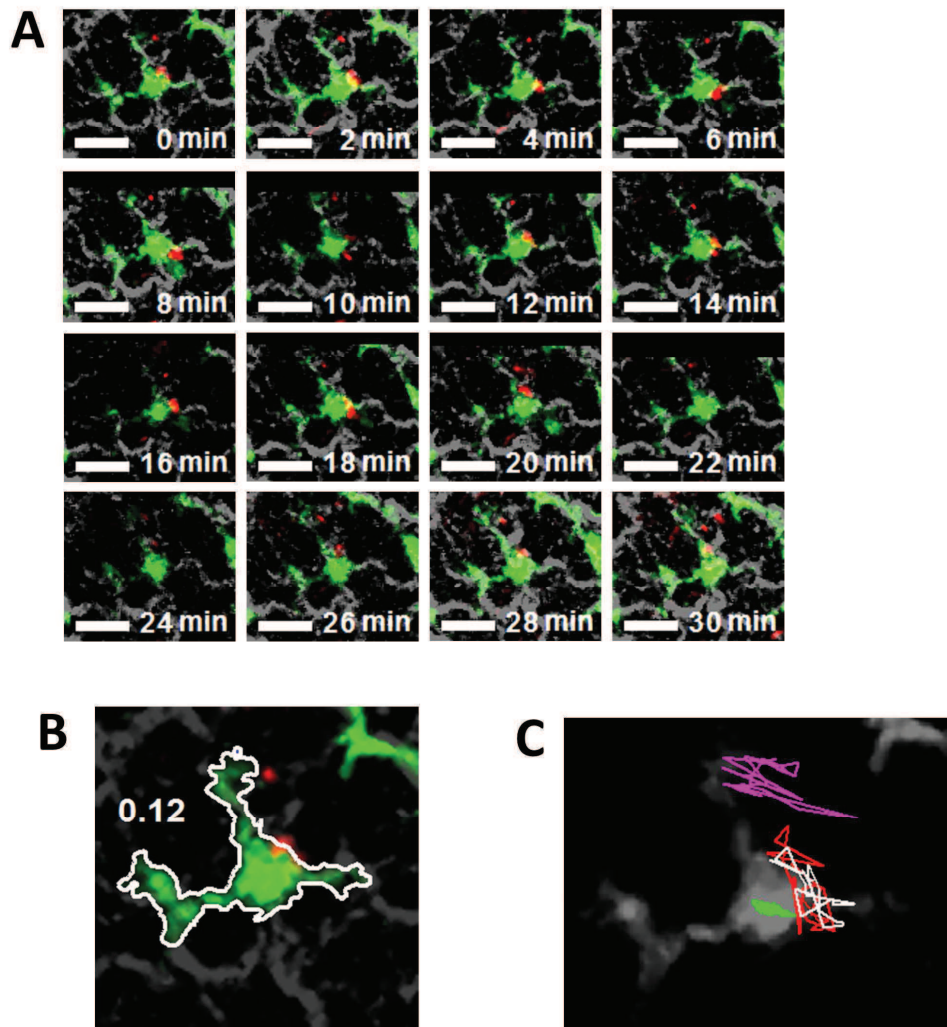


Figure 2.

TPEF lung *in vivo* imaging of an anthrax infected CX3CR1 mouse. (A) Time-lapse of a CX3CR1 cell and *B. anthracis* spores interactions during 30 minutes (See Movie E2 in the online data supplement). Scale bar: 10 μm . (B) Edge of the CX3CR1 cell (white line) showing an Instantaneous Roundness Coefficient equals to 0,12; (C) Tracking of three spores (purple, white and red lines) and of the CX3CR1 cell (green line) during the experiment. Green: CX3CR1 cells (GFP). Red: *Bacillus anthracis* spores (Alexa Fluor 568). Grey: fibrillar collagen (SHG).

Fig. 3

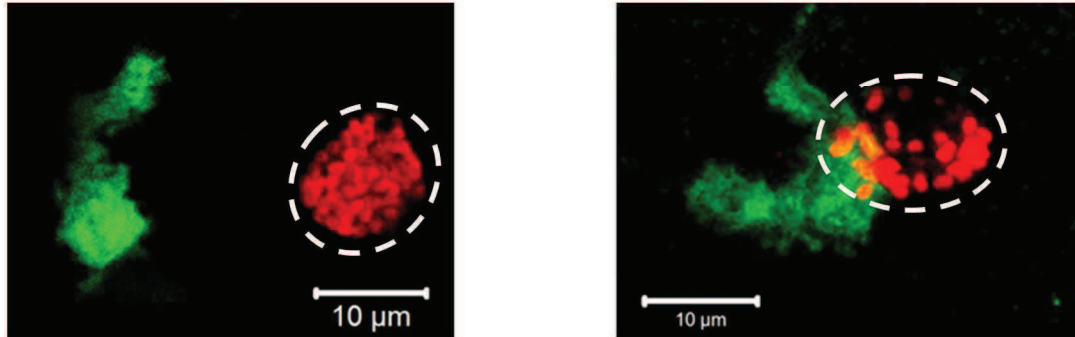


Figure 3.

Projection of 2PEF z-stacks performed *in situ* on a CX3CR1 mouse, 18 hrs after infection. Green: CX3CR1 cells (GFP). Red: *Bacillus anthracis* spores (Alexa Fluor 568).

Fig. 4

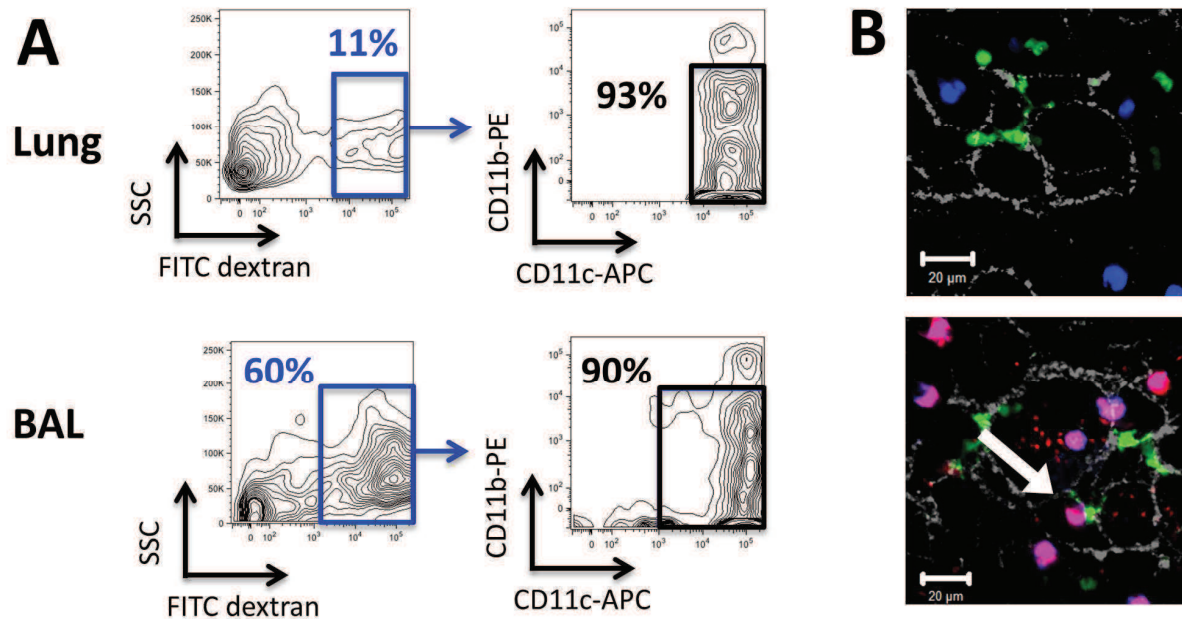


Figure 4.

(A) Flow cytometry graphs performed on total lungs or broncho-alveolar lavages (BAL) of mice administered with FITC-Dextran, gated on FITC-positive cells. More than 90% of Dextran-loaded cells exhibit a CD11b-negative CD11c-positive phenotype. (B) Projection of 2PEF z-stacks performed *in situ* on naive (up) and infected CX3CR1 mice (down). Green: CX3CR1 cells (GFP). Red: *Bacillus anthracis* spores (Alexa Fluor 633). Blue: Macrophages (Rhodamine B-Dextran). Grey: fibrillar collagen (SHG). Spore-loaded macrophages appear in pink. The white arrow on the lower image highlights contact between infected macrophage and a CX3CR1 cell. Scale bar: 20 µm.

Fig. 5

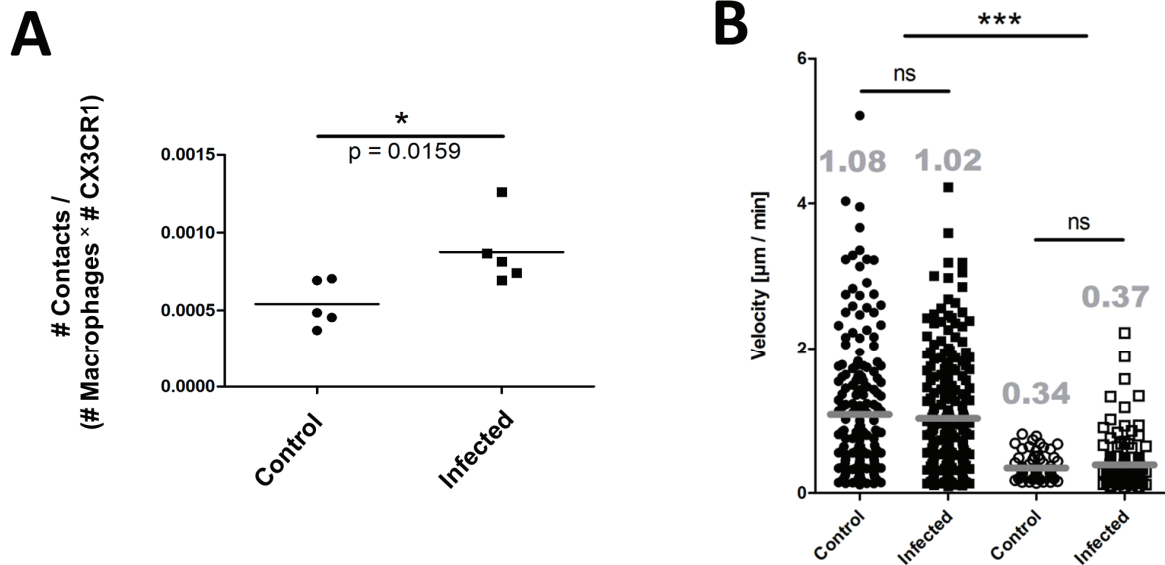


Figure 5.

(A) Normalized ratio of CX3CR1 cell – macrophage contacts in control (PBS) and infected (spores) mice. Each point represents the total number of contacts divided by the product between the number of CX3CR1 cells and macrophages on 10 randomly chosen *in situ* non-projected z-stacks performed in the same mouse. Five mice per group. (B) Velocity of CX3CR1 cells (filled symbols) and macrophages (open symbols) performed *in situ* from 5 to 6 h post-infection (rounds) or injection of PBS (squares). Each point represents one cell. Three mice per group.

Fig. 6

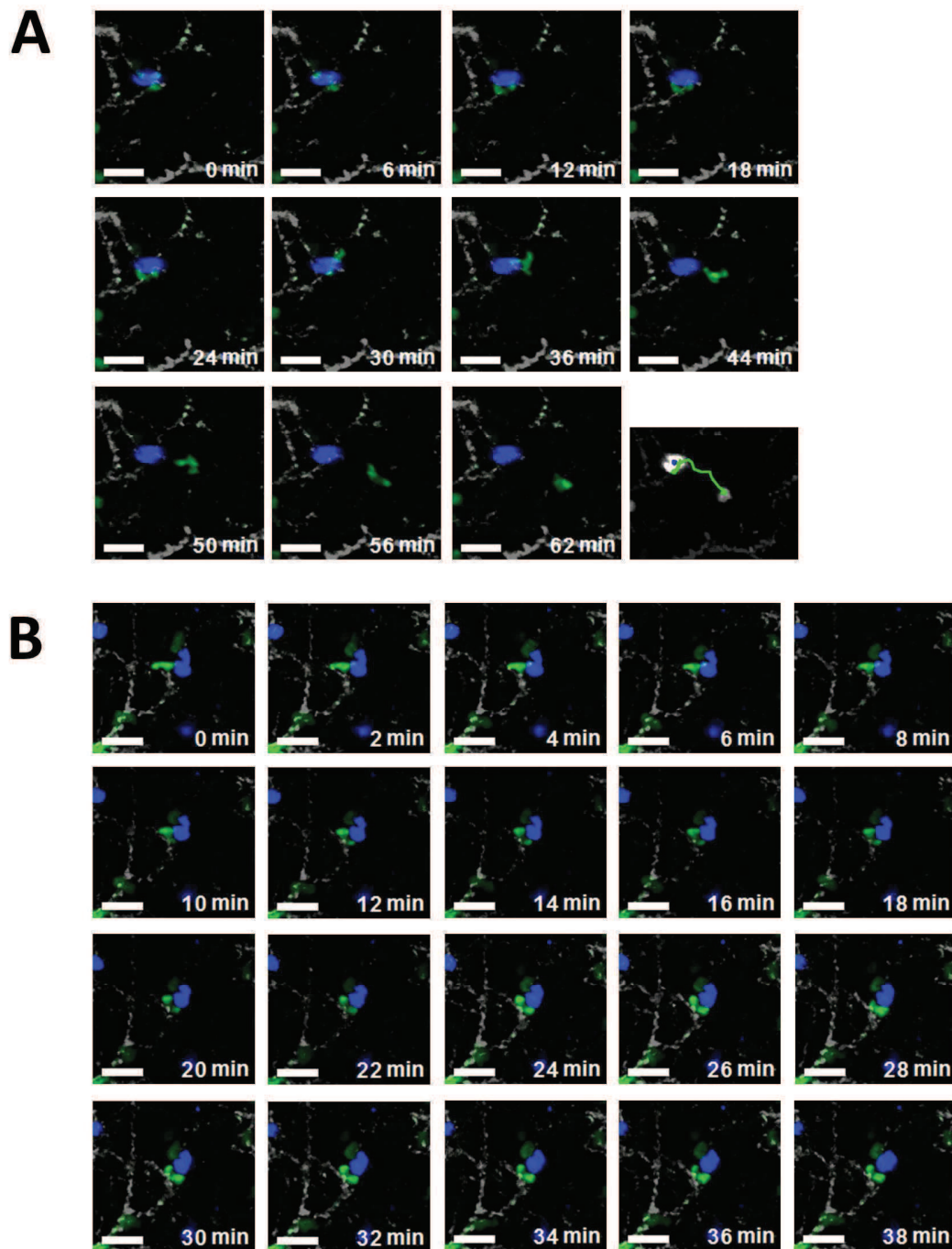


Figure 6.

(A) *In situ* 2PEF z-projected time-lapse of contact between a CX3CR1 cell and a macrophage from 5 to h after infection by non-stained spores. The last frame shows the trajectories of the CX3CR1 cell (green line) and the macrophage (blue line) during the whole experiment. (See Movie E5 on the online data supplement). (B) Two

CX3CR1 cells in contact with one macrophage from 5 to h after infection by non-stained spores. (See Movie E6 on the online data supplement). Green: CX3CR1 cells (GFP). Blue: Macrophages (Rhodamine B-Dextran). Grey: fibrillar collagen (SHG). Scale bars: 10 μm .

Fig. 7

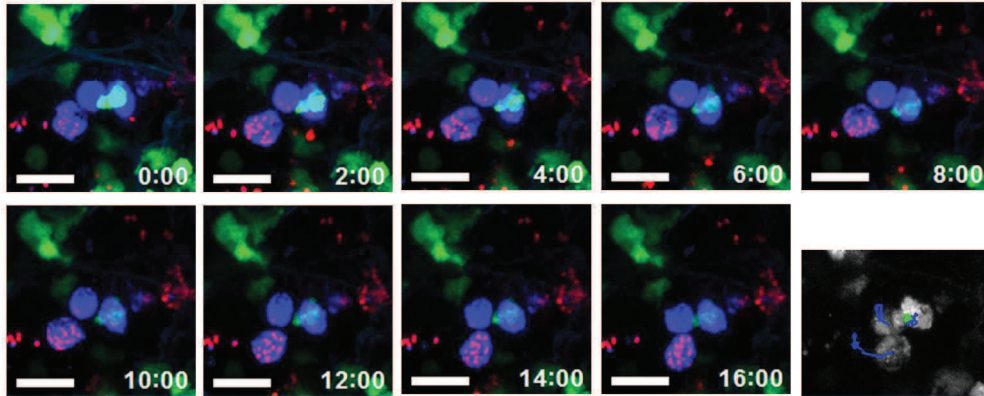


Figure 7.

In situ confocal z-projected time-lapse of infected macrophages and CX3CR1 cells. Time in minutes. Green: CX3CR1 cells (GFP). Blue: Macrophages (Rhodamine B-Dextran). Red: *Bacillus anthracis* spores (Alexa Fluor 633). Scale bar: 10 μ m. (See Movie E7 on the online data supplement).

Fig. 8

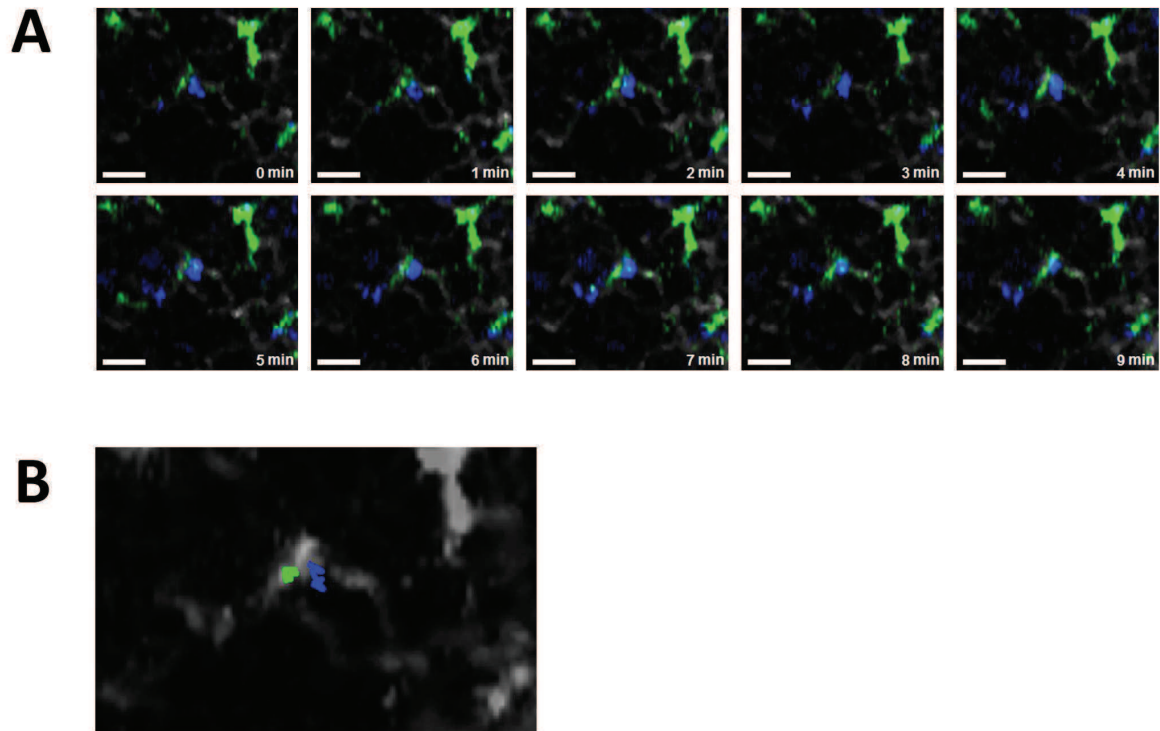


Figure 8.

(A) *In vivo* time-lapse of macrophage-CX3CR1 cell interaction 5 h after infection by non-stained spores. Green: CX3CR1 cells (GFP). Blue: Macrophages (Rhodamine B-Dextran). Grey: fibrillar collagen (SHG). Scale bar: 10 μm . (See Movie E8 on the online data supplement). (B) Trajectories of the CX3CR1 cell (green line) and the macrophage (blue line) during the whole experiment.

Figure E1

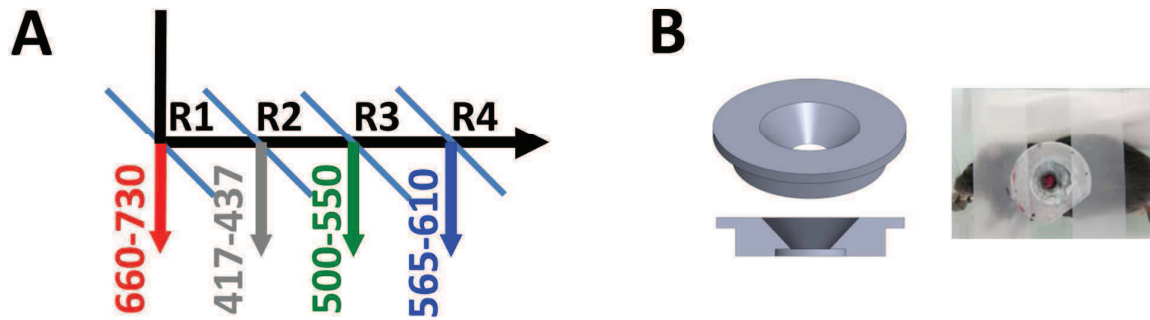


Figure E1.

(A) Configuration of NDD filters allowing detection of SHG (R2), GFP (R3), Rhodamine B or Alexa Fluor 568 (R4) and Alexa Fluor 633 (R2). (B) Design of the window system holding a 12 mm diameter glass coverslip (left) and positioning on a ventilated mouse (right).

Figure E2

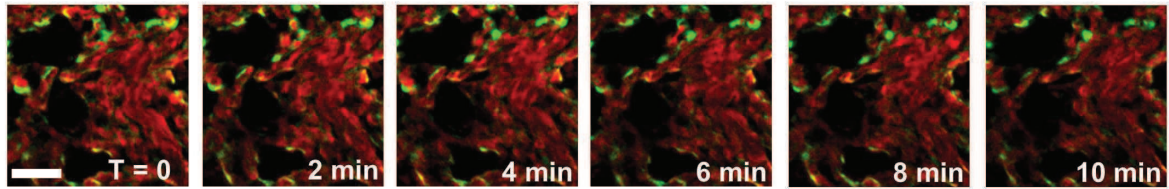


Figure E2.

In vivo TPEF time-lapse of a Flk1^{gfp} mouse lung after i.v. administration of rhodamine B dextran following 2 hours of ventilation. Green: Flk1 endothelial cells (GFP). Red: rhodamine B dextran. Scale bar: 10 μ m.

Movie E1.

In vivo TPEF time-lapse of a naive CX3CR1 mouse. Green: CX3CR1 cells (GFP). Grey: fibrillar collagen (SHG). Scale bar: 10 μm .

Movie E2.

In vivo TPEF time-lapse of a Flk1^{gfp} mouse lung after i.v. administration of rhodamine B dextran following 2 hours of ventilation. Green: Flk1 endothelial cells (GFP). Red: rhodamine B dextran.

Movie E3.

In vivo TPEF time-lapse of a CX3CR1 cell and *B. anthracis* spores interaction during 32 minutes. Scale bar: 10 μm . Green: CX3CR1 cells (GFP). Red: *Bacillus anthracis* spores (Alexa Fluor 568). Grey: fibrillar collagen (SHG).

Movie E4.

In vivo TPEF time-lapse of a CX3CR1 cell and *B. anthracis* spore interaction (upper right quarter) during 30 minutes. Scale bar: 10 μm . Green: CX3CR1 cells (GFP). Red: *Bacillus anthracis* spores (Alexa Fluor 568). Grey: fibrillar collagen (SHG).

Movie E5.

In situ TPEF z-projected time-lapse of contact between a CX3CR1 cell and a macrophage from 5 to h after infection by non-stained spores. Green: CX3CR1 cells (GFP). Blue: Macrophages (Rhodamine B-Dextran). Grey: fibrillar collagen (SHG). Scale bar: 10 μm .

Movie E6.

In situ TPEF z-projected time-lapse of contact between CX3CR1 cells and a macrophage from 5 to h after infection by non-stained spores. Green: CX3CR1 cells (GFP). Blue: Macrophages (Rhodamine B-Dextran). Grey: fibrillar collagen (SHG). Scale bar: 10 μ m.

Movie E7.

In situ confocal z-projected time-lapse of infected macrophages and CX3CR1 cells. Time in minutes. Green: CX3CR1 cells (GFP). Blue: Macrophages (Rhodamine B-Dextran). Red: *Bacillus anthracis* spores (Alexa Fluor 633). Scale bar: 10 μ m.

Movie E8.

In vivo time-lapse of macrophage-CX3CR1 cell interaction 5 h after infection by non-stained spores. Green: CX3CR1 cells (GFP). Blue: Macrophages (Rhodamine B-Dextran). Grey: fibrillar collagen (SHG). Scale bar: 10 μ m.

Chapitre 8

Discussion générale et perspectives

8.1 Discussion

La maladie du charbon est une très ancienne anthroponose due à *B. anthracis*, une bactérie utilisée comme modèle d'étude en microbiologie durant des dizaines d'années et qui a conduit à des découvertes capitales en biologie et en médecine. Citons l'établissement des postulats de Koch qui sont à la base de la microbiologie scientifique, le développement de la vaccination ou la découverte des mécanismes de l'immunité à médiation cellulaire.

Toutefois, et malgré l'utilisation de *B. anthracis* dans des études scientifiques depuis plus de 150 ans, la physiopathologie de la maladie du charbon n'est pas parfaitement connue et des zones d'ombre demeurent. En particulier, les voies de pénétration du pathogène selon la forme de la maladie (cutanée, gastro-intestinale ou pulmonaire) semblent faire intervenir des mécanismes bien différents au vu des divergences dans l'évolution de la maladie et du pronostic vital de l'individu infecté. Un état des connaissances sur *B. anthracis* et la maladie du charbon est proposé au Chapitre 1.

La forme pulmonaire de la maladie du charbon est la plus sévère. En effet, l'organisme hôte ne semble pas capable de surmonter l'infection par ses propres dispositifs de défense, ce qui suggère l'existence de spécificités propres à l'arbre respiratoire dans les mécanismes de pénétration des spores après inhalation. Outre le rôle des NALTs dans la propagation du pathogène dans l'organisme, le modèle généralement accepté de pénétration des spores au niveau pulmonaire requiert leur capture préalable à la migration vers les ganglions lymphatiques drainants (modèle du « Cheval de Troie »), à partir desquels les bacilles se répandent de manière systémique dans le réseau vasculaire et provoquent les symptômes associés à la maladie (toxémie, septicémie). Les cellules incriminées dans ce transport ont initialement été décrites comme étant des macrophages. Or, les dernières études citées au Chapitre 2 décrivent un rôle primordial des DCs dans ce transport sans que le mécanisme de capture ni le phénotype précis de ces cellules n'aient été investigués.

La présente thèse se positionne précisément dans ce contexte. Elle a pour but de caractériser le type de DCs impliqué dans la capture de spores au niveau

pulmonaire, et en particulier de préciser le rôle de la sous-population de cDCs CD11b, ainsi que d'analyser les mécanismes de capture. Ce travail a pu être effectué grâce à l'utilisation des microscopies de fluorescence confocale ou par excitation à deux photons, ainsi que par la génération de second harmonique, cette dernière permettant de détecter le collagène alvéolaire sans apport de fluorophore exogène (techniques décrites au Chapitre 3).

Le modèle animal utilisé est la souris CX3CR1^{+gfp} dont le sous-type CD11b de cDCs ainsi que les monocytes expriment constitutivement la GFP. Un des premiers objectifs est le développement d'une méthode permettant de discriminer les DCs des monocytes, afin d'étudier leur rôle spécifique. Cette discrimination est basée sur un critère morphologique appelé *MRC* pour *Mean Roundness Coefficient*. Il prend en compte la morphologie particulière des DCs présentant un contour dendritiforme alors que les monocytes sont des cellules plutôt rondes, ainsi que la déformation des cellules au cours du temps lors de leur migration. Le Chapitre 5 présente la technique développée et un exemple d'étude du comportement spécifique de DCs *versus* monocytes en conditions inflammatoires simulées par l'injection i.t. de LPS. Ces résultats, publiés en 2012 dans la revue PLoS ONE⁴⁷³, utilisent à un algorithme de suivi cellulaire dans lequel a été implémenté la méthode de discrimination cellulaire basé sur le *MRC*. Ils apportent la preuve de la possibilité d'étude automatisée du comportement spécifique des DCs exprimant le même fluorophore qu'une autre population cellulaire immunitaire. Cette méthode a ensuite été appliquée à l'étude des cDCs CD11b dans la physiopathologie de la maladie du charbon.

Un aspect capital de cette étude réside dans la composante dynamique des processus examinés. Pour observer ces mécanismes, il a été nécessaire de développer une technique permettant de se placer dans des conditions favorables au maintien de la dynamique cellulaire. Deux possibilités ont été utilisées : l'imagerie *in situ*, c'est-à-dire sur explant de poumon, coupé ou non, maintenu à 37 °C dans du milieu nutritif ; et l'imagerie *in vivo* sur souris anesthésiée et ventilée dont les mouvements thoraciques étaient jusqu'à récemment rédhitoires à l'imagerie microscopique.

L'utilisation d'un protocole d'imagerie pulmonaire *in situ* adapté à l'étude de la dynamique de la population de cDCs CD11b, développé au cours de cette thèse, a permis de visualiser pour la première fois et de manière dynamique la capture directe et rapide d'une spore de *B. anthracis* par une cDC CD11b pulmonaire. Ce résultat a fait l'objet d'une publication dans la revue *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* en 2012 (présenté au Chapitre 6). L'étude des interactions entre cDCs CD11b et spores a été effectuée au niveau de la plèvre et au niveau du parenchyme. Plusieurs observations ont été faites :

- quelques spores sont capturées dans le parenchyme par des cDCs CD11b et monocytes ;
- les cDCs CD11b bronchiques sont probablement impliquées dans la capture directe et rapide des spores présentes dans les bronches ;
- peu de spores parviennent dans la zone pleurale, et celles qui y parviennent sont capturées par des cDCs CD11b présentes en grande concentration *via* les extensions dendritiques de type « *balloon-body* ».

Bien que le rôle des DCs soit reconnu comme primordial dans le transport des spores vers les ganglions, il est frappant de constater que les événements de capture observés sont relativement rares en comparaison de la grande quantité de spores injectées.

Une étape clé dans la compréhension du mécanisme de capture est l'étude non plus sur explant d'organe mais sur petit animal infecté, anesthésié et ventilé afin de respecter au mieux la physiologie de l'organe et d'étudier les comportements cellulaires sans les biais causés par l'euthanasie préalable de l'animal.

La technique développée au cours de ces travaux de thèse, décrite au Chapitre 7, permet de surmonter le problème des mouvements thoraciques de l'animal vivant. Ces mouvements provenant de la ventilation et des battements cardiaques de la souris ont été largement éliminés dans des études très récentes par une forte contrainte mécanique exercée sur l'organe, aux effets indésirables mal définis. Notre technique repose quant à elle sur un sur-échantillonnage rapide par imagerie biphotonique du poumon libre de ses mouvements physiologiques, et sur une sélection des images dignes d'intérêt par comparaison de leur composante structurelle (provenant généralement de la GSH émis par le collagène des alvéoles)

avec une image de référence choisie par l'expérimentateur. Les différentes stratégies d'acquisition (*in situ*, *in vivo* avec contraintes mécaniques ou *in vivo* sans contrainte mécanique) sont comparées dans le Tableau 1 ci-dessous :

Stratégie d'imagerie	Type d'acquisition	Résolution	Invasivité	Zone accessible	Références
<i>in situ</i>	3D+T	Bonne	Très invasive	Plèvre et parenchyme	412,413
<i>in vivo</i> avec contraintes mécaniques	3D+T	Moyenne	Invasive	Plèvre	412,420,423,425,427,429
<i>in vivo</i> sans contrainte mécanique	2D+T	Moyenne	Peu invasive	Plèvre	Article en cours de soumission (cf. partie 7.3)

Tableau 1 : comparaison des différentes stratégies d'imagerie pulmonaire microscopique évoquées dans cette thèse. En bleu clair sont mises en évidence les stratégies utilisées dans ces travaux de thèse et en gris les stratégies décrites dans la littérature scientifique.

L'utilisation de notre méthode d'imagerie *in vivo* peu invasive a permis d'observer l'interaction entre spores et cDCs CD11b au niveau pleural, mais sans capture directe. Ce dernier point sera crucial dans la compréhension du phénomène de capture. En effet, puisque les spores ne sont pas mobiles, leur mouvement observé *in vivo* implique une capture préalable par un phagocyte non fluorescent et très performant, à en juger par la formation d'amas de spores très denses.

Le meilleur candidat pour capturer les spores est le macrophage alvéolaire, qui représente la population majoritaire au niveau des alvéoles et présente les meilleures performances en matière de phagocytose. Pour affirmer ou infirmer cette hypothèse, nous avons marqué les macrophages alvéolaires par injection i.n. de rhodamine-dextran 10 kDa et réalisé des séquences d'imagerie en 4 couleurs (GSH, GFP, rhodamine, Alexa Fluor 633). Les résultats présentés dans le Chapitre 8, et

soumis dans la revue *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, effectués *in situ* et *in vivo*, démontrent :

- que les macrophages capturent très largement les spores ;
- qu'il existe des contacts entre macrophages et DCs durant plusieurs dizaines de minutes ;
- que ces contacts ont un rôle fonctionnel car ils sont favorisés par l'infection ;
- qu'ils ne sont pas associés à une augmentation de la vitesse cellulaire.

Ces éléments suggèrent fortement l'établissement d'un processus d'échange entre macrophages et cDCs CD11b.

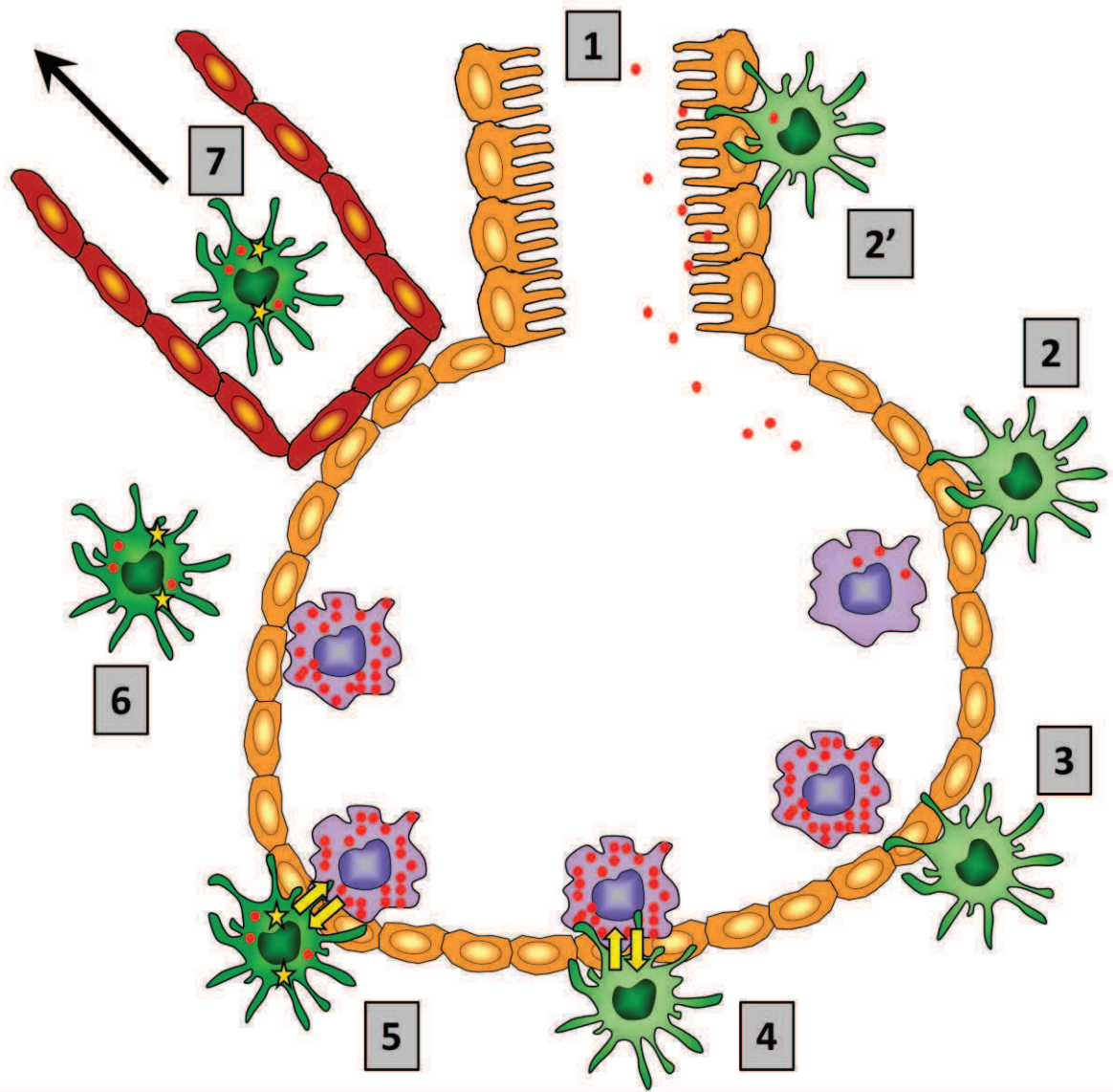
Des interactions entre une CPA (généralement une DC) ou un phagocyte, et un lymphocyte T^{250,251,474-477} ou B⁴⁷⁸ ou une cellule NK⁴⁷⁹ ont été observées pour la première fois à la fin des années 1990 et ont été nommées « synapses immunologiques ». La structure des synapses immunologiques est composée d'anneaux concentriques ordonnés contenant des complexes protéiniques dont le rôle est la régulation de l'activation de lymphocytes et la sécrétion de cytokines^{252,480} ou encore le transfert de matériel antigénique^{481,482}.

L'élément commun à la formation des différents types de synapses immunologiques semble être l'exclusion de phosphatase (notamment CD45) à la surface de la cellule sur le site de l'interaction. La diminution de la concentration en phosphatases qui sont les inhibiteurs principaux des kinases provoque une augmentation de leur activité, nécessaire à l'établissement de la synapse par laquelle peuvent alors transiter des informations. La durée typique des synapses est de quelques heures dans le cas des synapses lymphocyte T-APC⁴⁸³, celles-ci étant les plus étudiées à l'heure actuelle.

Jusqu'à présent, aucune observation *in vivo* ou *in situ* de synapses immunologiques n'a été décrite entre macrophages et DCs, et de nombreuses questions demeurent quant aux mécanismes impliqués dans de tels processus^{484,485}. Cependant, les observations réalisées dans le cadre de cette thèse s'insèrent parfaitement dans un modèle affiné de pénétration des spores au niveau alvéolaire, en impliquant une coopération entre ces deux populations cellulaires primordiales dans la réponse immunitaire, mais dont les interactions n'étaient jusqu'alors pas connues. Le modèle

affiné de pénétration des spores au niveau alvéolaire est schématisé à la Figure 74 et se présente en 7 étapes :

- (1) arrivée des spores dans l'alvéole ;
- (2) capture rapide des spores par les macrophages alvéolaires ;
- (2') capture directe de spores par des cDCs accolées à l'épithélium bronchique ;
- (3) rapprochement d'un macrophage infecté et d'une cDC CD11b ;
- (4) établissement d'une synapse immunologique entre les deux cellules ;
- (5) échange d'informations, de particules ou directement de spores ;
- (6-7) migration de la cDC CD11b vers un vaisseau lymphatique pour rejoindre le ganglion drainant.












- | | | | |
|---|---|--|-----------------------|
|  | Cellule épithéliale (alvéole) |  | Macrophage alvéolaire |
|  | Cellule épithéliale (bronche ou bronchiole) |  | cDC CD11b |
|  | Cellule endothéliale lymphatique |  | cDC CD11b « activée » |
|  | Spores de <i>B. anthracis</i> |  | Synapse immunologique |
|  | ? | | |

Figure 74. Modèle affiné de pénétration des spores au niveau alvéolaire.

8.2 Conclusion

Le développement d'une méthode d'imagerie biphotonique *in vivo* du poumon de souris sans contrainte mécanique appliquée à l'organe, couplée à des techniques d'imagerie *in situ*, ont permis pour la première fois la visualisation non seulement de la capture directe de pathogènes par des cDCs CD11b pulmonaires, mais aussi de l'établissement de synapses immunologiques entre macrophages et cDCs CD11b pulmonaires après inhalation. La formation de ces synapses, stimulée par l'infection, pourrait servir au transfert de spores ou d'informations non déterminées à ce jour, entre les macrophages, premières sentinelles du système immunitaire pulmonaire qui capturent très rapidement les agents pathogènes inhalés mais ne migrent pas vers les ganglions, et les cDCs CD11b situées dans l'interstitium alvéolaire dont la capacité de migration vers les ganglions est connue.

Les résultats que nous présentons s'inscrivent parfaitement dans un modèle affiné de pénétration des spores sur un schéma de « Cheval de Troie » réconciliant le rôle des macrophages, qui capturent la très grande majorité des spores, avec celui des DCs qui échantillonnent les pathogènes (et antigènes qui en dérivent) capturés par les macrophages, puis migrent vers les ganglions lymphatiques drainants. En effet, la présence en grande quantité de DCs CD11b ayant capturé des spores a été reportée dans les ganglions par des travaux préalables effectués dans l'équipe, montrant que les DCs participent malgré elles à la pénétration du pathogène à travers les lignes de défense immunitaire de l'hôte^{285,299}. Or, nous avons observé que les événements de capture directe par les DCs, bien qu'existants, sont relativement rares en raison du grand nombre de spores capturées rapidement par les macrophages alvéolaires. Ces différents résultats présentent la formation de synapses immunologiques entre macrophages et DCs comme un chaînon manquant à l'explication de la pénétration des spores à travers les défenses immunitaires de l'hôte au niveau pulmonaire selon un modèle affiné de Cheval de Troie.

Enfin, la caractérisation précise de la nature des informations échangées lors des contacts prolongés entre macrophages et DCs est une perspective majeure ouverte par ces travaux de thèse. Elle permettra alors de confirmer le rôle crucial de l'établissement de synapses entre macrophages et DCs dans la physiopathologie

des infections pulmonaires, qui demeurent à l'heure actuelle la première cause de mortalité dans les pays en voie de développement.

8.3 Perspectives

Le protocole d'imagerie pulmonaire *in vivo* développé au cours de ces travaux de thèse est perfectible. En particulier, il pourra être intéressant de corrélérer le coefficient de corrélation croisée entre images d'une même série temporelle aux paramètres physiologiques provoquant les mouvements thoraciques. Ainsi, il sera possible d'accéder à des informations sur la dérive axiale se produisant sous l'effet des mouvements, et donc de reconstruire des images en trois dimensions spatiales au cours du temps, alors que la reconstruction effectuée dans les travaux présentés ici n'intègre pas d'information en profondeur.

L'observation de synapses immunologiques entre macrophages et DCs décrite dans cette thèse ouvre la voie à l'étude plus poussée des processus qui sous-tendent leur formation et leur fonctionnement. En tant qu'événement rare, mais pourtant crucial dans le déroulement de la physiopathologie de la maladie du charbon (*cf.* modèle du goulot d'étranglement présenté au Chapitre 3), la caractérisation de la capture des spores de *B. anthracis* par les DCs *via* le truchement des macrophages nécessite la réalisation d'un grand nombre d'expériences. De cette manière pourra être observé un nombre suffisant d'événements, permettant d'effectuer une analyse phénoménologique statistiquement significative incluant par exemple la durée moyenne de contact, ce qui pourrait être d'une importance capitale dans la compréhension du phénomène. A titre d'exemple, il conviendra de définir si l'augmentation du ratio de contact après infection, défini au Chapitre 7, provient d'une augmentation du nombre de contacts ou d'une augmentation de la durée moyenne de contact. Dans ce dernier cas, l'augmentation de la probabilité d'observer un contact signifierait que les synapses s'établissent aléatoirement mais que l'état (infecté ou non) du macrophage conditionnerait la stabilité de l'interaction. Dans le cas inverse, cela signifierait que les DCs « sentent » que les macrophages sont infectés et donc qu'un signal cytokinique ou chimiokinique a été sécrété. L'analyse d'un nombre suffisant d'événements permettra également de définir une possible corrélation entre capture de spore(s) par un macrophage et établissement de la synapse par ce même macrophage et une DC. De plus, des analyses *in vitro* devraient permettre de caractériser le type d'information échangée dans les synapses immunologiques entre macrophages et DCs, comme d'éventuelles

cytokines pro-inflammatoires. Enfin, la réalisation des mêmes expérimentations sur des animaux déplétés en macrophages alvéolaires permettra de confirmer leur rôle précis, notamment sur l'effet des synapses macrophages-DCs dans le comportement dynamique des DCs après infection.

Bibliographie

Sauf mention contraire, les sites web ont été consultés pour la dernière fois le 13/03/2013.

1. Eitel, J. [Sacer ignis, quam pustulam vocant pastores: anthrax--cultural historical traces of a zoonosis]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **145**, 7–16 (2003).
2. Turnbull, P. C. B. *Chapter 15: Bacillus. Medical Microbiology* (The University of Texas: Galveston, TX, 1996).
3. Dirckx, J. H. Virgil on anthrax. *Am J Dermatopath* **3**, 191–5 (1981).
4. Virgile *Les Géorgiques, livre III*.
5. Klemm, D. M. & Klemm, W. R. A history of anthrax. *J Am Vet Med Assoc* **135**, 458–62 (1959).
6. Schwartz, M. Dr. Jekyll and Mr. Hyde: a short history of anthrax. *Mol Aspects Med* **30**, 347–55 (2009).
7. Sternbach, G. The history of anthrax. *J Emerg Med* **24**, 463–7 (2003).
8. Wistreich, G. A. & Lehman, M. D. *Microbiology and Human Disease*. 493–497 (Glencoe Press: New York, 1973).
9. Davaine, C. J. Recherche sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de sang de rate. *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **67**, 220–223 (1863).
10. Koch, R. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. 277–310 (Breslau, 1876).
11. Chamberland, C. *Le charbon et la vaccination charbonneuse*. (Paris, 1883).
12. Pasteur, L. & Roux *Compte-rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près de Melun, sur la vaccination Charbonneuse. Comptes-rendus de l'Académie des Sciences* **92**, (1881).
13. Sterne, M. *Anthrax. Infectious Disease of Animals*. (London, 1959).
14. Metchnikoff, E. Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. *Annales de l'Institut Pasteur* **7**, 321–336 (1890).
15. Bail, O. Veränderung der Bakterien in Tierkörper. Ueber die Korrelation zwischen Kapselbildung Sporenbildung und Infektiosität des Milzbrandbazillus. *Zentralbl. Bakt. Paras. Infectk. Krank. I orig.* **75**, 159–173 (1915).
16. Preisz, H. Experimentelle Studien über Virulenz, Empfänglichkeit und Immunität beim Milzbrand. *Zeitschr. Immunitätsf.* **5**, 341–452 (1909).
17. Sterne, M. Variation in Bacillus anthracis. *Onderstepoort J Vet Sci Animal Ind.* **8**, 271–349 (1937).
18. Sterne, M. Avirulent anthrax vaccine. *Onderstepoort J Vet Sci Animal Ind.* **21**, 41–43 (1937).
19. Smith, H. The use of bacteria grown in vivo for studies on the basis of their pathogenicity. *Annu Rev Microbiol* **12**, 77–102 (1958).

20. STANLEY, J. L. & SMITH, H. The three factors of anthrax toxin: their immunogenicity and lack of demonstrable enzymic activity. *J Gen Microbiol* **31**, 329–37 (1963).
21. AUERBACH, S. & WRIGHT, G. G. Studies on immunity in anthrax. VI. Immunizing activity of protective antigen against various strains of *Bacillus anthracis*. *J Immunol* **75**, 129–33 (1955).
22. BELTON, F. C. & STRANGE, R. E. Studies on a protective antigen produced in vitro from *Bacillus anthracis*: medium and methods of production. *Br J Exp Pathol* **35**, 144–52 (1954).
23. HENDERSON, D. W., PEACOCK, S. & BELTON, F. C. Observations on the prophylaxis of experimental pulmonary anthrax in the monkey. *J Hyg (Lond)* **54**, 28–36 (1956).
24. PUZISS, M. & WRIGHT, G. G. Studies on immunity in anthrax. IV. Factors influencing elaboration of the protective antigen of *Bacillus anthracis* in chemically defined media. *J Bacteriol* **68**, 474–82 (1954).
25. WRIGHT, G. G., HEDBERG, M. A. & FEINBERG, R. J. Studies on immunity in anthrax. II. In vitro elaboration of protective antigen by non-proteolytic mutants of *Bacillus anthracis*. *J Exp Med* **93**, 523–7 (1951).
26. Baillie, L. The development of new vaccines against *Bacillus anthracis*. *J Appl Microbiol* **91**, 609–13 (2001).
27. Brey, R. N. Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 1266–92 (2005).
28. Grabenstein, J. D. Vaccines: countering anthrax: vaccines and immunoglobulins. *Clin Infect Dis* **46**, 129–36 (2008).
29. Sever, J. L. *et al.* Safety of anthrax vaccine: an expanded review and evaluation of adverse events reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS). *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **13**, 825–40 (2004).
30. Turnbull, P. C. B. Current status of immunization against anthrax: old vaccines may be here to stay for a while. *Curr Opin Infect Dis* **13**, 113–120 (2000).
31. Bioterrorism Agents/Diseases. *Centers for Control Disease and Prevention* at <<http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>>
32. Alibek, K. & Handelman, S. *Biohazard: The Chilling True Story of the Largest Covert Biological Weapons Program in the World - Told from Inside by the Man Who Ran it.* (1999).
33. Franz, D. R. Preparedness for an anthrax attack. *Mol Aspects Med* **30**, 503–10 (2009).
34. Claus, D. & Berkeley, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1105–1139 (1986).
35. Van Ert, M. N. *et al.* Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One* **2**, e461 (2007).

36. Smith, N. R., Gordon, R. E. & Clark, F. E. *Aerobic mesophilic spore forming bacteria*. (Université de Virginie: Washington, DC, 1946).
37. Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W. J., Holmes, E. C. & Maiden, M. C. J. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **186**, 7959–70 (2004).
38. Koehler, T. M. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol Aspects Med* **30**, 386–96 (2009).
39. Kolstø, A.-B., Tourasse, N. J. & Økstad, O. A. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu Rev Microbiol* **63**, 451–76 (2009).
40. Mock, M. & Fouet, A. Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55**, 647–71 (2001).
41. Inglesby, T. V *et al.* Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **287**, 2236–52 (2002).
42. Fouet, A. The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med* **30**, 374–85 (2009).
43. Mesnage, S. & Fouet, A. Plasmid-encoded autolysin in *Bacillus anthracis*: modular structure and catalytic properties. *J Bacteriol* **184**, 331–4 (2002).
44. Wilson, A. C., Hoch, J. A. & Perego, M. Two small c-type cytochromes affect virulence gene expression in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **72**, 109–23 (2009).
45. Piris-Gimenez, A. *et al.* Encapsulated *Bacillus anthracis* interacts closely with liver endothelium. *J Infect Dis* **200**, 1381–9 (2009).
46. Mesnage, S., Tosi-Couture, E., Gounon, P., Mock, M. & Fouet, A. The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **180**, 52–8 (1998).
47. RYTER, A. [MORPHOLOGIC STUDY OF THE SPORULATION OF *BACILLUS SUBTILIS*]. *Annales de l'Institut Pasteur* **108**, 40–60 (1965).
48. Stragier, P. & Losick, R. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **30**, 297–41 (1996).
49. Setlow, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol* **15**, 172–80 (2007).
50. Setlow, P. Spore germination. *Curr Opin Microbiol* **6**, 550–6 (2003).
51. Igarashi, T. & Setlow, P. Transcription of the *Bacillus subtilis* gerK operon, which encodes a spore germinant receptor, and comparison with that of operons encoding other germinant receptors. *J Bacteriol* **188**, 4131–6 (2006).
52. Aronson, A. I. & Fitz-James, P. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriol Rev* **40**, 360–402 (1976).
53. Beaman, T. C., Pankratz, H. S. & Gerhardt, P. Paracrystalline sheets reaggregated from solubilized exosporium of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **107**, 320–4 (1971).

54. Tournier, J.-N., Rossi Paccani, S., Quesnel-Hellmann, A. & Baldari, C. T. Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Mol Aspects Med* **30**, 456–66 (2009).
55. Mehta, A. S. *et al.* Synthesis and antigenic analysis of the BclA glycoprotein oligosaccharide from the Bacillus anthracis exosporium. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **12**, 9136–49 (2006).
56. Steichen, C., Chen, P., Kearney, J. F. & Turnbough, C. L. Identification of the immunodominant protein and other proteins of the Bacillus anthracis exosporium. *J Bacteriol* **185**, 1903–10 (2003).
57. Oliva, C. R. *et al.* The integrin Mac-1 (CR3) mediates internalization and directs Bacillus anthracis spores into professional phagocytes. *P Natl Acad Sci USA* **105**, 1261–6 (2008).
58. Bozue, J. *et al.* Bacillus anthracis spores of the bclA mutant exhibit increased adherence to epithelial cells, fibroblasts, and endothelial cells but not to macrophages. *Infect Immun* **75**, 4498–505 (2007).
59. Nicholson, W. L. Using thermal inactivation kinetics to calculate the probability of extreme spore longevity: implications for paleomicrobiology and lithopanspermia. *Orig Life Evol Biosph* **33**, 621–31 (2003).
60. Lindeque, P. M. & Turnbull, P. C. Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. *Onderstepoort J Vet Res* **61**, 71–83 (1994).
61. Fasanella, A. *et al.* Evaluation of the house fly *Musca domestica* as a mechanical vector for an anthrax. *PLoS One* **5**, e12219 (2010).
62. Stiles, G. W. Isolation of the Bacillus anthracis from spinose ear ticks *Ornithodoros megnin*. *Am J Vet Res* **5**, 318–319 (1944).
63. Turell, M. J. & Knudson, G. B. Mechanical transmission of Bacillus anthracis by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infect Immun* **55**, 1859–61 (1987).
64. Williams, G., Linley, E., Nicholas, R. & Baillie, L. The role of the exosporium in the environmental distribution of anthrax. *J Appl Microbiol* **114**, 396–403 (2013).
65. *Anthrax in humans and animals*. (World Health Organization: 2008).
66. MINETT, F. C. Sporulation and viability of B. anthracis in relation to environmental temperature and humidity. *J Comp Pathol* **60**, 161–76 (1950).
67. World Anthrax Data Site. *School of Veterinary Medicine, Louisiana State University* at <http://www.vetmed.lsu.edu/whocc/mp_world.htm>
68. Sylvestre, P. Analyse structurale et fonctionnelle de l'exosporium de Bacillus anthracis. (Thèse). (2003).

69. Cinquetti, G. *et al.* Three related cases of cutaneous anthrax in France: clinical and laboratory aspects. *Medicine* **88**, 371–5 (2009).
70. Pébret, F. *Maladies infectieuses*. (Paris, 2003).
71. Patra, G., Vaissaire, J., Weber-Levy, M., Le Doujet, C. & Mock, M. Molecular characterization of *Bacillus* strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J Clin Microbiol* **36**, 3412–4 (1998).
72. Balali-Mood, M., Moshiri, M. & Etemad, L. Medical aspects of bio-terrorism. *Toxicon* (2013).doi:10.1016/j.toxicon.2013.01.005
73. Bruckner, V., Kovacs, J. & Denes, G. Structure of poly-D-glutamic acid isolated from capsulated strains of *B. anthracis*. *Nature* **172**, 508 (1953).
74. Candela, T., Mock, M. & Fouet, A. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *J Bacteriol* **187**, 7765–72 (2005).
75. Makino, S.-I., Watarai, M., Cheun, H.-I., Shirahata, T. & Uchida, I. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. *J Infect Dis* **186**, 227–33 (2002).
76. MAURER, P. H. Antigenicity of polypeptides (poly alpha amino acids). 13. Immunological studies with synthetic polymers containing only D- or D- and L-alpha-amino acids. *J Exp Med* **121**, 339–49 (1965).
77. Goodman, J. W. & Nitecki, D. E. Studies on the relation of a prior immune response to immunogenicity. *Immunology* **13**, 577–83 (1967).
78. Candela, T. & Fouet, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol Microbiol* **60**, 1091–8 (2006).
79. ZWARTOUW, H. T. & SMITH, H. Polyglutamic acid from *Bacillus anthracis* grown in vivo; structure and aggressin activity. *Biochem J* **63**, 437–42 (1956).
80. Boyer, A. E. *et al.* Kinetics of lethal factor and poly-D-glutamic acid antigenemia during inhalation anthrax in rhesus macaques. *Infect Immun* **77**, 3432–41 (2009).
81. Kintzer, A. F., Tang, I. I., Schawel, A. K., Brown, M. J. & Krantz, B. A. Anthrax toxin protective antigen integrates poly-γ-D-glutamate and pH signals to sense the optimal environment for channel formation. *P Natl Acad Sci USA* **109**, 18378–83 (2012).
82. BEALL, F. A., TAYLOR, M. J. & THORNE, C. B. Rapid lethal effect in rats of a third component found upon fractionating the toxin of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **83**, 1274–80 (1962).
83. Pezard, C., Berche, P. & Mock, M. Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **59**, 3472–7 (1991).
84. Moayeri, M., Haines, D., Young, H. A. & Leppla, S. H. *Bacillus anthracis* lethal toxin induces TNF-alpha-independent hypoxia-mediated toxicity in mice. *J Clin Invest* **112**, 670–82 (2003).

85. Cui, X. *et al.* Lethality during continuous anthrax lethal toxin infusion is associated with circulatory shock but not inflammatory cytokine or nitric oxide release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R699–709 (2004).
86. STANLEY, J. L. & SMITH, H. Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. *J Gen Microbiol* **26**, 49–63 (1961).
87. Firoved, A. M. *et al.* Bacillus anthracis edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *Am J Pathol* **167**, 1309–20 (2005).
88. Kintzer, A. F., Sterling, H. J., Tang, I. I., Williams, E. R. & Krantz, B. A. Anthrax toxin receptor drives protective antigen oligomerization and stabilizes the heptameric and octameric oligomer by a similar mechanism. *PLoS One* **5**, e13888 (2010).
89. Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J. & Young, J. A. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* **414**, 225–9 (2001).
90. Scobie, H. M., Rainey, G. J. A., Bradley, K. A. & Young, J. A. T. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *P Natl Acad Sci USA* **100**, 5170–4 (2003).
91. Deuquet, J., Lausch, E., Superti-Furga, A. & Van der Goot, F. G. The dark sides of capillary morphogenesis gene 2. *EMBO J* **31**, 3–13 (2012).
92. Cryan, L. M. & Rogers, M. S. Targeting the anthrax receptors, TEM-8 and CMG-2, for anti-angiogenic therapy. *Front Biosci* **16**, 1574–88 (2011).
93. Liu, S., Zhang, Y., Hoover, B. & Leppla, S. H. The receptors that mediate the direct lethality of anthrax toxin. *Toxins* **5**, 1–8 (2013).
94. Panchal, R. G. *et al.* Purified Bacillus anthracis lethal toxin complex formed in vitro and during infection exhibits functional and biological activity. *J Biol Chem* **280**, 10834–9 (2005).
95. Feld, G. K. *et al.* Structural basis for the unfolding of anthrax lethal factor by protective antigen oligomers. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1383–90 (2010).
96. Kintzer, A. F. *et al.* The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes. *J Mol Biol* **392**, 614–29 (2009).
97. Kintzer, A. F. *et al.* Role of the protective antigen octamer in the molecular mechanism of anthrax lethal toxin stabilization in plasma. *J Mol Biol* **399**, 741–58 (2010).
98. Ezzell, J. W. *et al.* Association of Bacillus anthracis capsule with lethal toxin during experimental infection. *Infect Immun* **77**, 749–55 (2009).
99. Candela, T. & Fouet, A. Bacillus anthracis CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol Microbiol* **57**, 717–26 (2005).
100. Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H. & Van der Goot, F. G. Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol* **160**, 321–8 (2003).

101. Thoren, K. L., Worden, E. J., Yassif, J. M. & Krantz, B. A. Lethal factor unfolding is the most force-dependent step of anthrax toxin translocation. *P Natl Acad Sci USA* **106**, 21555–60 (2009).
102. Mogridge, J., Cunningham, K. & Collier, R. J. Stoichiometry of anthrax toxin complexes. *Biochemistry* **41**, 1079–82 (2002).
103. Abrami, L., Lindsay, M., Parton, R. G., Leppla, S. H. & Van der Goot, F. G. Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J Cell Biol* **166**, 645–51 (2004).
104. Dal Molin, F. *et al.* Cell entry and cAMP imaging of anthrax edema toxin. *EMBO J* **25**, 5405–13 (2006).
105. Katayama, H. *et al.* GroEL as a molecular scaffold for structural analysis of the anthrax toxin pore. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 754–60 (2008).
106. Blaustein, R. O., Koehler, T. M., Collier, R. J. & Finkelstein, A. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. *P Natl Acad Sci USA* **86**, 2209–13 (1989).
107. Miller, C. J., Elliott, J. L. & Collier, R. J. Anthrax protective antigen: prepore-to-pore conversion. *Biochemistry* **38**, 10432–41 (1999).
108. Collier, R. Mechanism of membrane translocation by anthrax toxin: insertion and pore formation by protective antigen. *J Appl Microbiol* **87**, 283 (1999).
109. Falguières, T., Luyet, P.-P. & Gruenberg, J. Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp Cell Res* **315**, 1567–73 (2009).
110. Garraud, K. Etude de la réponse immunitaire mucoale pulmonaire dans l'infection par *Bacillus anthracis* : rôle de l'interleukine-17. (Thèse). (2012).
111. Klimpel, K. R., Arora, N. & Leppla, S. H. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol Microbiol* **13**, 1093–100 (1994).
112. Liang, X., Young, J. J., Boone, S. A., Waugh, D. S. & Duesbery, N. S. Involvement of domain II in toxicity of anthrax lethal factor. *J Biol Chem* **279**, 52473–8 (2004).
113. Vitale, G., Bernardi, L., Napolitani, G., Mock, M. & Montecucco, C. Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem J* **352 Pt 3**, 739–45 (2000).
114. Vitale, G. *et al.* Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 706–11 (1998).
115. Chopra, A. P., Boone, S. A., Liang, X. & Duesbery, N. S. Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *J Biol Chem* **278**, 9402–6 (2003).

116. Bardwell, A. J., Abdollahi, M. & Bardwell, L. Anthrax lethal factor-cleavage products of MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinases exhibit reduced binding to their cognate MAPKs. *Biochem J* **378**, 569–77 (2004).
117. Bardwell, A. J., Flatau, L. J., Matsukuma, K., Thorner, J. & Bardwell, L. A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem* **276**, 10374–86 (2001).
118. Bardwell, L. & Thorner, J. A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends Biochem Sci* **21**, 373–4 (1996).
119. Tournier, J.-N., Rossi Paccani, S., Quesnel-Hellmann, A. & Baldari, C. T. Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Mol Aspects Med* **30**, 456–66 (2009).
120. Cleret-Buhot, A., Mathieu, J., Tournier, J.-N. & Quesnel-Hellmann, A. Both lethal and edema toxins of *Bacillus anthracis* disrupt the human dendritic cell chemokine network. *PLoS One* **7**, e43266 (2012).
121. Hellmich, K. A. *et al.* Anthrax lethal factor cleaves mouse nlrp1b in both toxin-sensitive and toxin-resistant macrophages. *PLoS One* **7**, e49741 (2012).
122. Frew, B. C., Joag, V. R. & Mogridge, J. Proteolytic processing of Nlrp1b is required for inflammasome activity. *PLoS Pathog* **8**, e1002659 (2012).
123. Levinsohn, J. L. *et al.* Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. *PLoS Pathog* **8**, e1002638 (2012).
124. Roberts, J. E., Watters, J. W., Ballard, J. D. & Dietrich, W. F. Ltx1, a mouse locus that influences the susceptibility of macrophages to cytolysis caused by intoxication with *Bacillus anthracis* lethal factor, maps to chromosome 11. *Mol Microbiol* **29**, 581–91 (1998).
125. Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M. & Montecucco, C. Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN γ -induced release of NO and TNF α . *FEBS Lett* **462**, 199–204 (1999).
126. Park, J. M., Greten, F. R., Li, Z.-W. & Karin, M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* **297**, 2048–51 (2002).
127. Muehlbauer, S. M. *et al.* Anthrax lethal toxin kills macrophages in a strain-specific manner by apoptosis or caspase-1-mediated necrosis. *Cell Cycle* **6**, 758–66 (2007).
128. Pellizzari, R., Guidi-Rontani, C., Vitale, G., Mock, M. & Montecucco, C. Lethal factor of *Bacillus anthracis* cleaves the N-terminus of MAPKKs: analysis of the intracellular consequences in macrophages. *Int J Med Microbiol* **290**, 421–7 (2000).
129. Popov, S. G. *et al.* Effect of *Bacillus anthracis* lethal toxin on human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett* **527**, 211–5 (2002).
130. Tournier, J.-N. *et al.* Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J Immunol* **174**, 4934–41 (2005).

131. Gupta, P. K., Moayeri, M., Crown, D., Fattah, R. J. & Leppla, S. H. Role of N-terminal amino acids in the potency of anthrax lethal factor. *PLoS One* **3**, e3130 (2008).
132. Verma, A. *et al.* Role of the N-terminal amino acid of Bacillus anthracis lethal factor in lethal toxin cytotoxicity and its effect on the lethal toxin neutralization assay. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 1737–41 (2008).
133. Boyden, E. D. & Dietrich, W. F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* **38**, 240–4 (2006).
134. Moayeri, M., Sastalla, I. & Leppla, S. H. Anthrax and the inflammasome. *Microbes Infect* **14**, 392–400 (2012).
135. Martinon, F. & Tschopp, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* **14**, 10–22 (2007).
136. Reig, N. *et al.* Maturation modulates caspase-1-independent responses of dendritic cells to Anthrax lethal toxin. *Cell Microbiol* **10**, 1190–207 (2008).
137. Cordoba-Rodriguez, R., Fang, H., Lankford, C. S. R. & Frucht, D. M. Anthrax lethal toxin rapidly activates caspase-1/ICE and induces extracellular release of interleukin (IL)-1 β and IL-18. *J Biol Chem* **279**, 20563–6 (2004).
138. Terra, J. K. *et al.* Allelic variation on murine chromosome 11 modifies host inflammatory responses and resistance to Bacillus anthracis. *PLoS Pathog* **7**, e1002469 (2011).
139. Alileche, A., Serfass, E. R., Muehlbauer, S. M., Porcelli, S. A. & Brojatsch, J. Anthrax lethal toxin-mediated killing of human and murine dendritic cells impairs the adaptive immune response. *PLoS Pathog* **1**, e19 (2005).
140. Cleret, A., Quesnel-Hellmann, A., Mathieu, J., Vidal, D. & Tournier, J.-N. Resident CD11c+ lung cells are impaired by anthrax toxins after spore infection. *J Infect Dis* **194**, 86–94 (2006).
141. Tournier, J.-N. *et al.* Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J Immunol* **174**, 4934–41 (2005).
142. Agrawal, A. *et al.* Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* **424**, 329–34 (2003).
143. Xu, L., Fang, H. & Frucht, D. M. Anthrax lethal toxin increases superoxide production in murine neutrophils via differential effects on MAPK signaling pathways. *J Immunol* **180**, 4139–47 (2008).
144. Fang, H., Cordoba-Rodriguez, R., Lankford, C. S. R. & Frucht, D. M. Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4+ T cells. *J Immunol* **174**, 4966–71 (2005).
145. Comer, J. E., Chopra, A. K., Peterson, J. W. & König, R. Direct inhibition of T-lymphocyte activation by anthrax toxins in vivo. *Infect Immun* **73**, 8275–81 (2005).

146. Lehmann, M., Noack, D., Wood, M., Perego, M. & Knaus, U. G. Lung epithelial injury by B. anthracis lethal toxin is caused by MKK-dependent loss of cytoskeletal integrity. *PLoS One* **4**, e4755 (2009).
147. Paddle, B. M., Wong, V. K. & Muller, B. D. The cytotoxic effect of anthrax lethal toxin on human lung cells in vitro and the protective action of bovine antibodies to PA and LF. *J Appl Toxicol* **26**, 162–8
148. Pandey, J. & Warburton, D. Knock-on effect of anthrax lethal toxin on macrophages potentiates cytotoxicity to endothelial cells. *Microbes Infect* **6**, 835–43 (2004).
149. Langer, M. *et al.* Bacillus anthracis lethal toxin reduces human alveolar epithelial barrier function. *Infect Immun* **80**, 4374–87 (2012).
150. Leppla, S. H. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *P Natl Acad Sci USA* **79**, 3162–6 (1982).
151. Leppla, S. H. Bacillus anthracis calmodulin-dependent adenylate cyclase: chemical and enzymatic properties and interactions with eucaryotic cells. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **17**, 189–98 (1984).
152. Ulmer, T. S. *et al.* Calcium dependence of the interaction between calmodulin and anthrax edema factor. *J Biol Chem* **278**, 29261–6 (2003).
153. Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T. & Mei, F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**, 651–62 (2008).
154. O'Brien, J., Friedlander, A., Dreier, T., Ezzell, J. & Leppla, S. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun* **47**, 306–10 (1985).
155. Wright, G. G. & Mandell, G. L. Anthrax toxin blocks priming of neutrophils by lipopolysaccharide and by muramyl dipeptide. *J Exp Med* **164**, 1700–9 (1986).
156. Crawford, M. A., Aylott, C. V., Bourdeau, R. W. & Bokoch, G. M. Bacillus anthracis toxins inhibit human neutrophil NADPH oxidase activity. *J Immunol* **176**, 7557–65 (2006).
157. Hoover, D. L. *et al.* Anthrax edema toxin differentially regulates lipopolysaccharide-induced monocyte production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by increasing intracellular cyclic AMP. *Infect Immun* **62**, 4432–9 (1994).
158. Paccani, S. R. *et al.* Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. *J Exp Med* **201**, 325–31 (2005).
159. Maldonado-Arocho, F. J., Fulcher, J. A., Lee, B. & Bradley, K. A. Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. *Mol Microbiol* **61**, 324–37 (2006).
160. Park, J. M. *et al.* Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* **23**, 319–29 (2005).

161. Kim, C. *et al.* Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus. *P Natl Acad Sci USA* **105**, 6150–5 (2008).
162. Hong, J. *et al.* Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1. *J Biol Chem* **282**, 19781–7 (2007).
163. Rossi Paccani, S. *et al.* Anthrax toxins inhibit immune cell chemotaxis by perturbing chemokine receptor signalling. *Cell Microbiol* **9**, 924–9 (2007).
164. Szarowicz, S. E. *et al.* Bacillus anthracis edema toxin impairs neutrophil actin-based motility. *Infect Immun* **77**, 2455–64 (2009).
165. Dumetz, F. *et al.* Noninvasive imaging technologies reveal edema toxin as a key virulence factor in anthrax. *Am J Pathol* **178**, 2523–35 (2011).
166. Dixon, T. C., Meselson, M., Guillemin, J. & Hanna, P. C. Anthrax. *N Engl J Med* **341**, 815–26 (1999).
167. Kaufmann, A. F. & Dannenberg, A. L. Age as a risk factor for cutaneous human anthrax: evidence from Haiti, 1973-1974. *Emerg Infect Dis* **8**, 874–5 (2002).
168. Maguiña, C. *et al.* Cutaneous anthrax in Lima, Peru: retrospective analysis of 71 cases, including four with a meningoencephalic complication. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **47**, 25–30
169. Shieh, W.-J. *et al.* The critical role of pathology in the investigation of bioterrorism-related cutaneous anthrax. *Am J Pathol* **163**, 1901–10 (2003).
170. Irmak, H. *et al.* Cutaneous manifestations of anthrax in Eastern Anatolia: a review of 39 cases. *Acta Med Okayama* **57**, 235–40 (2003).
171. Karahocagil, M. K. *et al.* Cutaneous anthrax in Eastern Turkey: a review of 85 cases. *Clin Exp Dermatol* **33**, 406–11 (2008).
172. Kaya, A., Tasyaran, M. A., Erol, S., Ozkurt, Z. & Ozkan, B. Anthrax in adults and children: a review of 132 cases in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**, 258–61 (2002).
173. Ozkurt, Z. *et al.* Anthrax in eastern Turkey, 1992-2004. *Emerg Infect Dis* **11**, 1939–41 (2005).
174. Faghihi, G. & Siadat, A. H. Cutaneous anthrax associated with facial palsy. *Clin Exp Dermatol* **28**, 92–3 (2003).
175. Freedman, A. *et al.* Cutaneous anthrax associated with microangiopathic hemolytic anemia and coagulopathy in a 7-month-old infant. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **287**, 869–74 (2002).
176. Petrela, R., Ciu, L. & Coku, L. Complicated Cutaneous Anthrax. *Pediatrics Consultant* **360** (2010).at <<http://www.pediatricsconsultant360.com/content/complicated-cutaneous-anthrax>>

177. Kanafani, Z. A., Ghossain, A., Sharara, A. I., Hatem, J. M. & Kanj, S. S. Endemic gastrointestinal anthrax in 1960s Lebanon: clinical manifestations and surgical findings. *Emerg Infect Dis* **9**, 520–5 (2003).
178. Babamahmoodi, F., Aghabarari, F., Arjmand, A. & Ashrafi, G. H. Three rare cases of anthrax arising from the same source. *J Infect* **53**, e175–9 (2006).
179. Sujatha, S. *et al.* Anthrax peritonitis. *Trop Doct* **32**, 247–8 (2002).
180. Ghossain, A. Images in clinical medicine. Anthrax of the cecum. *N Engl J Med* **355**, 940 (2006).
181. Sun, C. *et al.* Anthrax lethal toxin disrupts intestinal barrier function and causes systemic infections with enteric bacteria. *PLoS One* **7**, e33583 (2012).
182. Sirisanthana, T. & Brown, A. E. Anthrax of the gastrointestinal tract. *Emerg Infect Dis* **8**, 649–51 (2002).
183. Navacharoen, N., Sirisanthana, T., Navacharoen, W. & Ruckphaopunt, K. Oropharyngeal anthrax. *J Laryngol Otol* **99**, 1293–5 (1985).
184. Borio, L. *et al.* Death due to bioterrorism-related inhalational anthrax: report of 2 patients. *JAMA* **286**, 2554–9 (2001).
185. Holty, J.-E. C. *et al.* Systematic review: a century of inhalational anthrax cases from 1900 to 2005. *Ann Intern Med* **144**, 270–80 (2006).
186. Meselson, M. *et al.* The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* **266**, 1202–8 (1994).
187. Holty, J.-E. C. & Bravata, D. M. Inhalational Anthrax: Recognizing the symptoms for rapid diagnosis. *J Respir Dis* **29**, 215–221 (2008).
188. Glomski, I. J., Piris-Gimenez, A., Huerre, M., Mock, M. & Goossens, P. L. Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax. *PLoS Pathog* **3**, e76 (2007).
189. Gerbelot, G. Infecté par l'anthrax, il a été soigné à Chambéry. *Le Dauphiné Libéré* (2012).at <<http://www.ledauphine.com/savoie/2012/09/17/infecte-par-l-anthrax-il-a-ete-soigne-a-chambery>>
190. Hicks, C. W., Sweeney, D. a, Cui, X., Li, Y. & Eichacker, P. Q. An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive Care Med* **38**, 1092–104 (2012).
191. Grunow, R. *et al.* Injection anthrax--a new outbreak in heroin users. *Deutsches Ärzteblatt international* **109**, 843–8 (2012).
192. Booth, M., Hart, A. & Donaldson, L. Injectional anthrax: the inflammatory response. *Critical Care* **16**, P503 (2012).
193. Sweeney, D. A., Hicks, C. W., Cui, X., Li, Y. & Eichacker, P. Q. Anthrax infection. *Am J Respir Crit Care Med* **184**, 1333–41 (2011).

194. Powell, A. G. M. T., Crozier, J. E. M., Hodgson, H. & Galloway, D. J. A case of septicaemic anthrax in an intravenous drug user. *BMC Infect Dis* **11**, 21 (2011).
195. AFSSAPS Charbon, thérapeutique. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. (2005).at <<http://agmed.sante.gouv.fr>>
196. Friedlander, A. M., Welkos, S. L. & Ivins, B. E. Anthrax vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* **271**, 33–60 (2002).
197. Hambleton, P. & Turnbull, P. C. Anthrax vaccine development: a continuing story. *Adv Biotechnol Processes* **13**, 105–22 (1990).
198. Cohen, S. *et al.* Attenuated nontoxinogenic and nonencapsulated recombinant *Bacillus anthracis* spore vaccines protect against anthrax. *Infect Immun* **68**, 4549–58 (2000).
199. Aloni-Grinstein, R. *et al.* Oral spore vaccine based on live attenuated nontoxinogenic *Bacillus anthracis* expressing recombinant mutant protective antigen. *Infect Immun* **73**, 4043–53 (2005).
200. Welkos, S. L. & Friedlander, A. M. Comparative safety and efficacy against *Bacillus anthracis* of protective antigen and live vaccines in mice. *Microb Pathog* **5**, 127–39 (1988).
201. Shlyakhov, E. N. & Rubinstein, E. Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine* **12**, 727–30 (1994).
202. Enstone, J. E., Wale, M. C. J., Nguyen-Van-Tam, J. S. & Pearson, J. C. G. Adverse medical events in British service personnel following anthrax vaccination. *Vaccine* **21**, 1348–54 (2003).
203. Ivins, B. E. *et al.* Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques. *Vaccine* **16**, 1141–8 (1998).
204. Fellows, P. F. *et al.* Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine* **19**, 3241–7 (2001).
205. Pittman, P. R. *et al.* Antibody response to a delayed booster dose of anthrax vaccine and botulinum toxoid. *Vaccine* **20**, 2107–15 (2002).
206. Baillie, L. Can one size fit all? Towards a universal anthrax vaccine. *Future Microbiol* **8**, 295–7 (2013).
207. Flick-Smith, H. C. *et al.* A recombinant carboxy-terminal domain of the protective antigen of *Bacillus anthracis* protects mice against anthrax infection. *Infect Immun* **70**, 1653–6 (2002).
208. Wolfe, D. N., Florence, W. & Bryant, P. Current biodefense vaccine programs and challenges. *Hum Vaccin Immunother* **9**, (2013).
209. Brossier, F. & Mock, M. Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon* **39**, 1747–55 (2001).
210. Brossier, F., Levy, M. & Mock, M. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infect Immun* **70**, 661–4 (2002).

211. Gauthier, Y. P. *et al.* Efficacy of a vaccine based on protective antigen and killed spores against experimental inhalational anthrax. *Infect Immun* **77**, 1197–207 (2009).
212. Cybulski, R. J., Sanz, P. & O'Brien, A. D. Anthrax vaccination strategies. *Mol Aspects Med* **30**, 490–502 (2009).
213. Rhie, G.-E. *et al.* A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins. *P Natl Acad Sci USA* **100**, 10925–30 (2003).
214. Chabot, D. J. *et al.* Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. *Vaccine* **23**, 43–7 (2004).
215. Joyce, J. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of *Bacillus anthracis* poly-gamma-D-glutamic acid capsule covalently coupled to a protein carrier using a novel triazine-based conjugation strategy. *J Biol Chem* **281**, 4831–43 (2006).
216. Tournier, J.-N., Ulrich, R. G., Quesnel-Hellmann, A., Mohamadzadeh, M. & Stiles, B. G. Anthrax, toxins and vaccines: a 125-year journey targeting *Bacillus anthracis*. *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**, 219–36 (2009).
217. Metzger, R. J., Klein, O. D., Martin, G. R. & Krasnow, M. a The branching programme of mouse lung development. *Nature* **453**, 745–50 (2008).
218. Mauroy, B., Filoche, M., Weibel, E. R. & Sapoval, B. An optimal bronchial tree may be dangerous. *Nature* **427**, 633–6 (2004).
219. WEIBEL, E. R. & GOMEZ, D. M. A principle for counting tissue structures on random sections. *J Appl Physiol* **17**, 343–8 (1962).
220. Weibel, E. R. How to make an alveolus. *Eur Respir J* **31**, 483–5 (2008).
221. Wiechmann, A. F. Interactive Histology Atlas. *Oklahoma Health Sciences Center Interactive Histology Atlas* at <<http://www.ouhsc.edu/histology>>
222. Ochs, M. *et al.* The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med* **169**, 120–4 (2004).
223. Prefaut, C. *L'essentiel en physiologie respiratoire*. (Sauramps: 1999).
224. Pulmonary Pathology. *University of Utah Spencer S. Eccles Health Sciences Library* at <<http://library.med.utah.edu/WebPath/LUNGHTML/LUNG002.html>>
225. Coraux, C., Hajj, R., Lesimple, P. & Puchelle, E. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. *Médecine sciences : M/S* **21**, 1063–9 (2005).
226. Namati, E., Thiesse, J., De Ryk, J. & McLennan, G. Alveolar dynamics during respiration: are the pores of Kohn a pathway to recruitment? *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**, 572–8 (2008).
227. Guntheroth, W. G., Luchtel, D. L. & Kawabori, I. Pulmonary microcirculation: tubules rather than sheet and post. *J Appl Physiol* **53**, 510–5 (1982).

228. Weibel, E. R. How does lung structure affect gas exchange? *Chest* **83**, 657–65 (1983).
229. Sahn, S. A. The pathophysiology of pleural effusions. *Annu. Rev. Med.* **41**, 7–13 (1990).
230. Agostoni, E. & Zocchi, L. Pleural liquid and its exchanges. *Respir Physiol Neurobiol* **159**, 311–23 (2007).
231. Baluk, P. *et al.* Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med* **204**, 2349–62 (2007).
232. Baluk, P. *et al.* Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* **115**, 247–57 (2005).
233. Hämmerling, B., Grund, C., Boda-Heggemann, J., Moll, R. & Franke, W. W. The complexus adhaerens of mammalian lymphatic endothelia revisited: a junction even more complex than hitherto thought. *Cell Tissue Res* **324**, 55–67 (2006).
234. Goossens, P. L. Animal models of human anthrax: the Quest for the Holy Grail. *Mol Aspects Med* **30**, 467–80 (2009).
235. Hoppeler, H. & Weibel, E. R. Scaling functions to body size: theories and facts. *J Exp Biol* **208**, 1573–4 (2005).
236. Gomes, R. F., Shen, X., Ramchandani, R., Tepper, R. S. & Bates, J. H. Comparative respiratory system mechanics in rodents. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **89**, 908–16 (2000).
237. Ogasawara, N. *et al.* Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human adenoids. *Acta Otolaryngol* **131**, 116–23 (2011).
238. Debertain, A. S. *et al.* Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children. *Clin Exp Immunol* **134**, 503–7 (2003).
239. Brandtzaeg, P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *J Oral Microbiol* **5**, (2013).
240. Bals, R., Weiner, D. J. & Wilson, J. M. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* **103**, 303–7 (1999).
241. Marzesco, A.-M. *et al.* The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **13**, 1819–31 (2002).
242. Shepherd, V. L. Pulmonary surfactant protein D: a novel link between innate and adaptive immunity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L516–7 (2002).
243. Takahashi, H., Sano, H., Chiba, H. & Kuroki, Y. Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases. *Curr Pharm Des* **12**, 589–598 (2006).
244. Brinker, K. G. *et al.* Surfactant protein D enhances bacterial antigen presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L1453–63 (2001).

245. Mukherjee, S. *et al.* Surfactant protein A integrates activation signal strength to differentially modulate T cell proliferation. *J Immunol* **188**, 957–67 (2012).
246. Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* **8**, 193–204 (2008).
247. Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy* **66**, 579–87 (2011).
248. Lymphatic System. *Encyclopedia Lubopitko* at <http://encyclopedia.lubopitko-bg.com/Lymphatic_System.html>
249. Chen, K. & Kolls, J. K. T cell-mediated host immune defenses in the lung. *Annu Rev Immunol* **31**, 605–33 (2013).
250. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–7 (1999).
251. Lee, K.-H. *et al.* T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* **295**, 1539–42 (2002).
252. Davis, D. M. & Dustin, M. L. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol* **25**, 323–7 (2004).
253. Lira, S. A. A passport into the lymph node. *Nat Immunol* **6**, 866–8 (2005).
254. Kiyono, H. & Fukuyama, S. NALT- versus Peyer’s-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* **4**, 699–710 (2004).
255. Kuper, C. F. *et al.* The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* **13**, 219–24 (1992).
256. Chiavolini, D. *et al.* Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and survival in a vaccine mouse model of tularemia. *PLoS One* **5**, e11156 (2010).
257. Tschernig, T. & Pabst, R. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology* **68**, 1–8 (2000).
258. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953–64 (2005).
259. Gjomarkaj, M. *et al.* Phenotypic and functional characterization of normal rat pleural macrophages in comparison with autologous peritoneal and alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 135–42 (1999).
260. Holt, P. G. Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on T-lymphocyte blastogenic response. *Am Rev Respir Dis* **118**, 791–3 (1978).
261. Bingisser, R. M. & Holt, P. G. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. *Swiss Med Wkly* **131**, 171–9 (2001).

262. Paolucci, C., Rovere, P., De Nadai, C., Manfredi, A. A. & Clementi, E. Nitric oxide inhibits the tumor necrosis factor alpha -regulated endocytosis of human dendritic cells in a cyclic GMP-dependent way. *J Biol Chem* **275**, 19638–44 (2000).
263. Rosenberger, C. M. & Finlay, B. B. Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 385–96 (2003).
264. Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259–62 (2001).
265. Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271–96 (1991).
266. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* **30**, 243–70 (2012).
267. GeurtsvanKessel, C. H. *et al.* Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **205**, 1621–34 (2008).
268. Desch, A. N. *et al.* CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *J Exp Med* **208**, 1789–97 (2011).
269. Satpathy, A. T., Wu, X., Albring, J. C. & Murphy, K. M. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* **13**, 1145–54 (2012).
270. Jakubzick, C. *et al.* Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. *J Immunol* **180**, 3019–27 (2008).
271. Beaty, S. R., Rose, C. E. & Sung, S.-S. J. Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* **178**, 1882–95 (2007).
272. Julia, V. *et al.* A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* **16**, 271–83 (2002).
273. Suzuki, Y. *et al.* Mouse CD11bhigh lung dendritic cells have more potent capability to induce IgA than CD103+ lung dendritic cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **46**, 773–80 (2012).
274. Furuhashi, K. *et al.* Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* **46**, 165–72 (2012).
275. Plantinga, M., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Origin and functional specializations of DC subsets in the lung. *Eur J Immunol* **40**, 2112–8 (2010).
276. Masten, B. J. Initiation of lung immunity: the afferent limb and the role of dendritic cells. *Semin Respir Crit Care Med* **25**, 11–20 (2004).
277. Sertl, K. *et al.* Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med* **163**, 436–51 (1986).

278. Fiore, D. *et al.* Multimodal 4D imaging of cell-pathogen interactions in the lungs provides new insights into pulmonary infections pulmonary infections. *Proc SPIE* **8086**, 808618–808618–8 (2011).
279. Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 669–92 (2009).
280. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762–74 (2011).
281. Mizgerd, J. P. Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. *Semin Immunol* **14**, 123–32 (2002).
282. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–5 (2004).
283. Ross, J. M. The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *J Pathol Bacteriol* **73**, 485–494 (1957).
284. Guidi-Rontani, C. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol* **10**, 405–9 (2002).
285. Cleret, A. *et al.* Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route. *J Immunol* **178**, 7994–8001 (2007).
286. Weiner, Z. P. & Glomski, I. J. Updating perspectives on the initiation of *Bacillus anthracis* growth and dissemination through its host. *Infect Immun* **80**, 1626–33 (2012).
287. Loving, C. L., Kennett, M., Lee, G. M., Grippe, V. K. & Merkel, T. J. Murine aerosol challenge model of anthrax. *Infect Immun* **75**, 2689–98 (2007).
288. Loving, C. L. *et al.* Role of anthrax toxins in dissemination, disease progression, and induction of protective adaptive immunity in the mouse aerosol challenge model. *Infect Immun* **77**, 255–65 (2009).
289. Plaut, R. D., Kelly, V. K., Lee, G. M., Stibitz, S. & Merkel, T. J. Dissemination bottleneck in a murine model of inhalational anthrax. *Infect Immun* **80**, 3189–93 (2012).
290. Glomski, I. J. *et al.* Inhaled non-capsulated *Bacillus anthracis* in A/J mice: nasopharynx and alveolar space as dual portals of entry, delayed dissemination, and specific organ targeting. *Microbes Infect* **10**, 1398–404 (2008).
291. Glomski, I. J., Corre, J.-P., Mock, M. & Goossens, P. L. Noncapsulated toxinogenic *Bacillus anthracis* presents a specific growth and dissemination pattern in naive and protective antigen-immune mice. *Infect Immun* **75**, 4754–61 (2007).
292. Bals, R. & Hiemstra, P. S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* **23**, 327–33 (2004).
293. Chakrabarty, K. *et al.* Human lung innate immune response to *Bacillus anthracis* spore infection. *Infect Immun* **75**, 3729–38 (2007).

294. Russell, B. H., Vasan, R., Keene, D. R., Koehler, T. M. & Xu, Y. Potential dissemination of *Bacillus anthracis* utilizing human lung epithelial cells. *Cell Microbiol* **10**, 945–57 (2008).
295. Russell, B. H. *et al.* In vivo demonstration and quantification of intracellular *Bacillus anthracis* in lung epithelial cells. *Infect Immun* **76**, 3975–83 (2008).
296. Tournier, J.-N., Cleret, A. & Quesnel-Hellmann, A. What is the relevance of lung epithelial cells during the dissemination of spores in inhalational anthrax? *Infect Immun* **77**, 565; author reply 565–6 (2009).
297. Guidi-Rontani, C. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol* **10**, 405–9 (2002).
298. Guidi-Rontani, C. & Mock, M. Macrophage interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* **271**, 115–41 (2002).
299. Cleret, A. Etude des interactions entre les cellules dendritiques pulmonaires murines et *Bacillus anthracis*. (Thèse). (2007).
300. Cote, C. K., Van Rooijen, N. & Welkos, S. L. Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *Bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. *Infect Immun* **74**, 469–80 (2006).
301. Holt, P. G., Strickland, D. H., Wikström, M. E. & Jahnsen, F. L. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* **8**, 142–52 (2008).
302. Kohlmeier, J. E. & Woodland, D. L. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol* **27**, 61–82 (2009).
303. Bosio, C. M., Gardner, D. & Elkins, K. L. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol* **164**, 6417–25 (2000).
304. Neves, P. *et al.* Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* **33**, 777–90 (2010).
305. Rayamajhi, M., Delgado, C., Condon, T. V., Riches, D. W. & Lenz, L. L. Lung B cells promote early pathogen dissemination and hasten death from inhalation anthrax. *Mucosal Immunol* **5**, 444–54 (2012).
306. Klezovich-Bénard, M. *et al.* Mechanisms of NK cell-macrophage *Bacillus anthracis* crosstalk: a balance between stimulation by spores and differential disruption by toxins. *PLoS Pathog* **8**, e1002481 (2012).
307. Klezovich-Bénard, M. Dialogue entre les cellules Natural Killer et *Bacillus anthracis* in vitro et in vivo : rôle dans la réponse immunitaire innée et le contrôle initial de l'infection. (Thèse). 186 (2012).
308. Brittingham, K. C. *et al.* Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis. *J Immunol* **174**, 5545–52 (2005).

309. Raymond, B. *et al.* Anthrax lethal toxin impairs IL-8 expression in epithelial cells through inhibition of histone H3 modification. *PLoS Pathog* **5**, e1000359 (2009).
310. During, R. L. *et al.* Anthrax lethal toxin paralyzes neutrophil actin-based motility. *J Infect Dis* **192**, 837–45 (2005).
311. Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* **10**, 479–89 (2010).
312. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. & Harrington, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* **25**, 821–52 (2007).
313. Garraud, K. *et al.* Differential role of the interleukin-17 axis and neutrophils in resolution of inhalational anthrax. *Infect Immun* **80**, 131–42 (2012).
314. Agrawal, A. *et al.* Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* **424**, 329–34 (2003).
315. Tournier, J.-N., Quesnel-Hellmann, A., Cleret, A. & Vidal, D. R. Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cell Microbiol* **9**, 555–65 (2007).
316. Valeur, B. *Invitation à la fluorescence moléculaire*. (DeBoeck: 2004).
317. Zotikov, A. A. & Polyakov, Y. S. The use of the phosphorescence microscope for the study of the phosphorescence of various cells. *Microsc Acta* **79**, 415–8 (1977).
318. Howard, S. S., Straub, A., Horton, N., Kobat, D. & Xu, C. Frequency Multiplexed In Vivo Multiphoton Phosphorescence Lifetime Microscopy. *Nat Photonics* **7**, 33–37 (2013).
319. Lakowicz, J. R. Principle of Fluorescence. *Introduction to Fluorescence* 3–15 (1983).
320. Brocas, A. *Microscopies non linéaires : Analyses et Instrumentations*. (Thèse). (2005).
321. Abramowitz, M., Flynn, B. O., Parry-Hill, M. J. & Davidson, M. W. Jablonski Energy Diagram. *National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University*. (2006).at <<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/lightandcolor/index.html>>
322. Einstein, A. Strahlungs-Emission und Absorption nach der Quantentheorie. *Deutsche Physikalische Gesellschaft* **18**, 318–323 (1916).
323. Valeur, B. Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters. *Molecular Luminescence Spectroscopy Part 3, Chemical Analysis Series Vol. 77, chap 2*. 25–84 (1993).
324. Rost, F. W. D. Fluorescence: physics and chemistry. *Fluorescence microscopy Vol. 1* 11–35 (1992).
325. Becker, W. Fluorescence lifetime imaging—techniques and applications. *J Microsc* **247**, 119–36 (2012).

326. Kostović, K. *et al.* Photodynamic therapy in dermatology: current treatments and implications. *Coll Antropol* **36**, 1477–81 (2012).
327. Minsky, M. Microscopy apparatus. (1957).
328. Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**, 128–138 (1988).
329. Davidovits, P. & Egger, M. D. Scanning laser microscope. *Nature* **223**, 831 (1969).
330. Amos, W. B. & White, J. G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol Cell* **95**, 335–42 (2003).
331. Pawley, J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. **122**, (Humana Press: 2006).
332. Fischer, R. S., Wu, Y., Kanchanawong, P., Shroff, H. & Waterman, C. M. Microscopy in 3D: a biologist's toolbox. *Trends Cell Biol* **21**, 682–91 (2011).
333. Göppert, M. Über die Wahrscheinlichkeit des Zusammenwirkens zweier Lichtquanten in einem Elementarakt. *Die Naturwissenschaften* **17**, 932–932 (1929).
334. Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik* **401**, 273–294 (1931).
335. Maiman, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature* **187**, 493–494 (1960).
336. Franken, P., Hill, A., Peters, C. & Weinreich, G. Generation of Optical Harmonics. *Phys Rev Lett* **7**, 118–119 (1961).
337. Kaiser, W. & Garrett, C. Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu(2+). *Phys Rev Lett* **7**, 229–231 (1961).
338. So, P. T., Dong, C. Y., Masters, B. R. & Berland, K. M. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu Rev Biomed Eng* **2**, 399–429 (2000).
339. Singh, S. & Bradley, L. Three-Photon Absorption in Napthalene Crystals by Laser Excitation. *Phys Rev Lett* **12**, 612–614 (1964).
340. Carriles, R. *et al.* Invited review article: Imaging techniques for harmonic and multiphoton absorption fluorescence microscopy. *Rev Sci Instrum* **80**, 081101 (2009).
341. Yi, Y., Zhu, L. & Shuai, Z. Theoretical Designs of Molecular Photonics Materials. *Macromolecular Theory and Simulations* **17**, 12–22 (2008).
342. Chu, S.-W. *et al.* Simultaneous four-photon luminescence, third-harmonic generation, and second-harmonic generation microscopy of GaN. *Opt Lett* **30**, 2463–5 (2005).
343. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73–6 (1990).

344. Herz, J., Zinselmeyer, B. H. & McGavern, D. B. Two-photon imaging of microbial immunity in living tissues. *Microsc Microanal* **18**, 730–41 (2012).
345. Bousso, P. & Moreau, H. D. Functional immunoimaging: the revolution continues. *Nat Rev Immunol* **12**, 858–64 (2012).
346. Perry, S. W., Burke, R. M. & Brown, E. B. Two-photon and second harmonic microscopy in clinical and translational cancer research. *Ann Biomed Eng* **40**, 277–91 (2012).
347. Svoboda, K. & Yasuda, R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* **50**, 823–39 (2006).
348. Olivier, N. *et al.* Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science* **329**, 967–71 (2010).
349. Baym, G. *Lectures on quantum mechanics*. 594 (Benjamin, W. A.: 1974).
350. Callis, P. R. The Theory of Two-Photon Induced Fluorescence Anisotropy. *Non-linear and Two-Photon Induced Fluorescence* 1–42 (1997).
351. Zipfel, W. R., Williams, R. M. & Webb, W. W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Net Biotechnol* **21**, 1369–77 (2003).
352. Guo, Y. *et al.* Second-harmonic tomography of tissues. *Opt Lett* **22**, 1323–5 (1997).
353. Campagnola, P. J., Wei, M. D., Lewis, A. & Loew, L. M. High-resolution nonlinear optical imaging of live cells by second harmonic generation. *Biophys J* **77**, 3341–9 (1999).
354. Moreaux, L., Sandre, O., Charpak, S., Blanchard-Desce, M. & Mertz, J. Coherent scattering in multi-harmonic light microscopy. *Biophys J* **80**, 1568–74 (2001).
355. Revillod, G. Diffusion Hyper-Rayleigh des Assemblages Moléculaires. (Thèse). (2006).
356. Bloembergen, N. *Nonlinear optics*. (World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: 1996).
357. Freund, I., Deutsch, M. & Sprecher, A. Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophys J* **50**, 693–712 (1986).
358. Campagnola, P. J. *et al.* Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophys J* **82**, 493–508 (2002).
359. Stoller, P., Reiser, K. M., Celliers, P. M. & Rubenchik, A. M. Polarization-modulated second harmonic generation in collagen. *Biophys J* **82**, 3330–42 (2002).
360. Wang, W. *et al.* Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res* **62**, 6278–88 (2002).
361. Williams, R. M., Zipfel, W. R. & Webb, W. W. Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. *Biophys J* **88**, 1377–86 (2005).

362. Zoumi, A., Lu, X., Kassab, G. S. & Tromberg, B. J. Imaging coronary artery microstructure using second-harmonic and two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J* **87**, 2778–86 (2004).
363. Boulesteix, T., Beaurepaire, E., Sauviat, M.-P. & Schanne-Klein, M.-C. Second-harmonic microscopy of unstained living cardiac myocytes: measurements of sarcomere length with 20-nm accuracy. *Opt Lett* **29**, 2031–3 (2004).
364. Both, M. *et al.* Second harmonic imaging of intrinsic signals in muscle fibers in situ. *J Biomed Opt* **9**, 882–92
365. Plotnikov, S. V., Millard, A. C., Campagnola, P. J. & Mohler, W. A. Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres. *Biophys J* **90**, 693–703 (2006).
366. Dombeck, D. A. *et al.* Uniform polarity microtubule assemblies imaged in native brain tissue by second-harmonic generation microscopy. *P Natl Acad Sci USA* **100**, 7081–6 (2003).
367. Lim, H. & Danias, J. Effect of axonal micro-tubules on the morphology of retinal nerve fibers studied by second-harmonic generation. *J Biomed Opt* **17**, 110502 (2012).
368. Fritzky, L. & Lagunoff, D. Advanced methods in fluorescence microscopy. *Anal Cell Pathol* (2012).doi:10.3233/ACP-120071
369. Débarre, D. *et al.* [Second- and third-harmonic generation microscopies for the structural imaging of intact tissues]. *Médecine sciences : M/S* **22**, 845–50 (2006).
370. Strupler, M. Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique. Application aux fibroses rénales. (Thèse). (2008).
371. Pena, A.-M., Boulesteix, T., Dartigalongue, T. & Schanne-Klein, M.-C. Chiroptical effects in the second harmonic signal of collagens I and IV. *J Am Chem Soc* **127**, 10314–22 (2005).
372. Deniset-Besseau, A. *et al.* Measurement of the second-order hyperpolarizability of the collagen triple helix and determination of its physical origin. *J Phys Chem B* **113**, 13437–45 (2009).
373. Altendorf, H. *et al.* Imaging and 3D morphological analysis of collagen fibrils. *J Microsc* **247**, 161–75 (2012).
374. Pena, A. *et al.* Three-dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc Res Tech* **70**, 162–70 (2007).
375. Abraham, T., Hirota, J. A., Wadsworth, S. & Knight, D. A. Minimally invasive multiphoton and harmonic generation imaging of extracellular matrix structures in lung airway and related diseases. *Pulm Pharmacol Ther* **24**, 487–96 (2011).
376. Strupler, M. *et al.* Second harmonic microscopy to quantify renal interstitial fibrosis and arterial remodeling. *J Biomed Opt* **13**, 054041

377. Chen, W.-L. *et al.* Quantitative analysis of multiphoton excitation autofluorescence and second harmonic generation imaging for medical diagnosis. *Comput Med Imaging Graph* **36**, 519–26 (2012).
378. Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth* **2**, 932–40 (2005).
379. Tomer, R., Khairy, K. & Keller, P. J. Light sheet microscopy in cell biology. *Methods Mol Biol* **931**, 123–37 (2013).
380. Carriles, R. *et al.* Invited review article: Imaging techniques for harmonic and multiphoton absorption fluorescence microscopy. *Rev Sci Instrum* **80**, 081101 (2009).
381. Bahlmann, K. *et al.* Multifocal multiphoton microscopy (MMM) at a frame rate beyond 600 Hz. *Opt Express* **15**, 10991–8 (2007).
382. Schmidt, R., Engelhardt, J. & Lang, M. 4Pi Microscopy. *Methods Mol Biol* **950**, 27–41 (2013).
383. Weber, M. & Huisken, J. Light sheet microscopy for real-time developmental biology. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 566–72 (2011).
384. Lavagnino, Z., Zancchi, F. C., Ronzitti, E. & Diaspro, A. Two-photon excitation selective plane illumination microscopy (2PE-SPIM) of highly scattering samples: characterization and application. *Opt Express* **21**, 5998–6008 (2013).
385. Dixit, R. & Ross, J. L. Studying plus-end tracking at single molecule resolution using TIRF microscopy. *Methods Cell Biol* **95**, 543–54 (2010).
386. Leung, B. O. & Chou, K. C. Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology. *Appl Spectrosc* **65**, 967–80 (2011).
387. Mahou, P. Microscopie non linéaire de tissus biologiques : excitation multicouleur, faisceaux de Bessel, et illumination en nappe de lumière. (Thèse). (2012).
388. Mahou, P. *et al.* Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nat Meth* **9**, 815–8 (2012).
389. Olivier, N., Aptel, F., Plamann, K., Schanne-Klein, M.-C. & Beaurepaire, E. Harmonic microscopy of isotropic and anisotropic microstructure of the human cornea. *Opt Express* **18**, 5028–40 (2010).
390. Aptel, F. *et al.* Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 2459–65 (2010).
391. Malpighi, M. *De pulmonibus epistolae*. (1661).
392. Wearn, J. T. *et al.* The normal behavior of the pulmonary blood vessels with observations on the intermittence of the flow of blood in the arterioles and capillaries. *Am J Physiol* **109**, 236–256 (1934).
393. Terry, R. J. A thoracic window for observation of the lung in a living animal. *Science* **90**, 43–4 (1939).

394. Dray, C., Rougon, G. & Debarbieux, F. Quantitative analysis by in vivo imaging of the dynamics of vascular and axonal networks in injured mouse spinal cord. *P Natl Acad Sci USA* **106**, 9459–64 (2009).
395. Fenrich, K. K. *et al.* Long-term in vivo imaging of normal and pathological mouse spinal cord with subcellular resolution using implanted glass windows. *J Physiol* **590**, 3665–75 (2012).
396. Holtmaat, A. *et al.* Imaging neocortical neurons through a chronic cranial window. *Cold Spring Harb Protoc* **2012**, 694–701 (2012).
397. Holtmaat, A. *et al.* Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc* **4**, 1128–44 (2009).
398. Mostany, R. & Portera-Cailliau, C. A method for 2-photon imaging of blood flow in the neocortex through a cranial window. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2008).doi:10.3791/678
399. Mostany, R. & Portera-Cailliau, C. A craniotomy surgery procedure for chronic brain imaging. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2008).doi:10.3791/680
400. Momiyama, M. *et al.* Dynamic subcellular imaging of cancer cell mitosis in the brain of live mice. *Anticancer Res* **33**, 1367–71 (2013).
401. Gupta, S. *et al.* Intravital microscopy on a closed cranial window in mice: a model to study trigeminovascular mechanisms involved in migraine. *Cephalalgia* **26**, 1294–303 (2006).
402. Menger, M. D., Laschke, M. W. & Vollmar, B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes* **34**, 83–91
403. Ritsma, L. *et al.* Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc* **8**, 583–94 (2013).
404. On a new kind of rays. By W.C. Rontgen. Translated by Arthur Stanton from the Sitzungsberichte der Würzburger Physic-med. Gesellschaft, 1895. *Nature*, January 23, 1896. *Radiography* **36**, 185–8 (1970).
405. Purcell, E., Torrey, H. & Pound, R. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review* **69**, 37–38 (1946).
406. Salerno, M., Altes, T. A., Brookeman, J. R., De Lange, E. E. & Mugler, J. P. Dynamic spiral MRI of pulmonary gas flow using hyperpolarized (3)He: preliminary studies in healthy and diseased lungs. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* **46**, 667–77 (2001).
407. De Dreuille, O., Maszelin, P., Foehrenbach, H., Bonardel, G. & Gaillard, J.-F. Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (2002).

408. Hutchens, M. & Luker, G. D. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cell Microbiol* **9**, 2315–22 (2007).
409. Virostko, J. *et al.* Factors influencing quantification of in vivo bioluminescence imaging: application to assessment of pancreatic islet transplants. *Mol Imaging* **3**, 333–42 (2004).
410. Ambrosini, V. *et al.* Assessment of a chemically induced model of lung squamous cell carcinoma in mice by 18F-FDG small-animal PET. *Nucl Med Commun* **28**, 647–52 (2007).
411. Garbow, J. R., Zhang, Z. & You, M. Detection of primary lung tumors in rodents by magnetic resonance imaging. *Cancer Res* **64**, 2740–2 (2004).
412. Thornton, E. E., Krummel, M. F. & Looney, M. R. Live imaging of the lung. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 12**, Unit12.28 (2012).
413. Henjakovic, M. *et al.* Ex vivo testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicol Appl Pharm* **231**, 68–76 (2008).
414. Liu, X., Jin, L., Upham, J. W. & Roberts, M. S. The development of models for the evaluation of pulmonary drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* (2013).doi:10.1517/17425255.2013.754009
415. Brueckl, C. *et al.* Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 453–63 (2006).
416. Lamm, W. J. E., Bernard, S. L., Wagner, W. W. & Glenn, R. W. Intravital microscopic observations of 15-microm microspheres lodging in the pulmonary microcirculation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **98**, 2242–8 (2005).
417. Nava, R. G. *et al.* Two-photon microscopy in pulmonary research. *Seminars in immunopathology* **32**, 297–304 (2010).
418. Okada, T. Two-photon microscopy analysis of leukocyte trafficking and motility. *Seminars in immunopathology* **32**, 215–25 (2010).
419. Veres, T. Z. *et al.* Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy. *Am J Pathol* **179**, 603–9 (2011).
420. Presson, R. G. *et al.* Two-photon imaging within the murine thorax without respiratory and cardiac motion artifact. *Am J Pathol* **179**, 75–82 (2011).
421. Kuebler, W. M., Parthasarathi, K., Lindert, J. & Bhattacharya, J. Real-time lung microscopy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **102**, 1255–64 (2007).
422. Hall, H. L. A Study of the Pulmonary Circulation by the Trans-Illumination Method. *Am J Physiol* **72**, 446–457 (1925).
423. Hasegawa, A. *et al.* Color-coded real-time cellular imaging of lung T-lymphocyte accumulation and focus formation in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* **125**, 461–468.e6 (2010).

424. Hedenstierna, G. Airway closure, atelectasis and gas exchange during anaesthesia. *Minerva Anesthesiol* **68**, 332–6 (2002).
425. Kreisel, D. *et al.* In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *P Natl Acad Sci USA* **107**, 18073–8 (2010).
426. Looney, M. R. *et al.* Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung. *Nat Meth* **8**, 91–6 (2011).
427. Tabuchi, A., Mertens, M., Kuppe, H., Pries, A. R. & Kuebler, W. M. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **104**, 338–46 (2008).
428. McCormack, D. G. *et al.* Pulmonary microvascular changes during sepsis: evaluation using intravital videomicroscopy. *Microvasc Res* **60**, 131–40 (2000).
429. Thornton, E. E. *et al.* Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *J Exp Med* **209**, 1183–99 (2012).
430. Razavi, H. M. *et al.* Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 227–33 (2004).
431. Newton, R. C. *et al.* Imaging parenchymal lung diseases with confocal endomicroscopy. *Respir Med* **106**, 127–37 (2012).
432. Newton, R. C. *et al.* Progress toward optical biopsy: bringing the microscope to the patient. *Lung* **189**, 111–9 (2011).
433. Morisse, H. *et al.* In vivo and in situ imaging of experimental invasive pulmonary aspergillosis using fibered confocal fluorescence microscopy. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* **50**, 386–95 (2012).
434. Rivera, D. R., Brown, C. M., Ouzounov, D. G., Webb, W. W. & Xu, C. Multifocal multiphoton endoscope. *Opt Lett* **37**, 1349–51 (2012).
435. Tankersley, C. G., Fitzgerald, R. S. & Kleeberger, S. R. Differential control of ventilation among inbred strains of mice. *The American journal of physiology* **267**, R1371–7 (1994).
436. Kuhnle, G. E., Leipfinger, F. H. & Goetz, A. E. Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **74**, 1462–71 (1993).
437. Browse, N. L., Lord, R. S. & Taylor, A. Pressure waves and gradients in the canine thoracic duct. *J Physiol* **213**, 507–24 (1971).
438. Browse, N. L., Rutt, D. R., Sizeland, D. & Taylor, A. The velocity of lymph flow in the canine thoracic duct. *J Physiol* **237**, 401–13 (1974).
439. Lattuada, M. & Hedenstierna, G. Abdominal lymph flow in an endotoxin sepsis model: influence of spontaneous breathing and mechanical ventilation. *Crit Care Med* **34**, 2792–8 (2006).

440. Piller, N., Craig, G., Leduc, A. & Ryan, T. Does Breathing Have an Influence on Lymphatic Drainage? *J Lymphoedema* **1**, (2006).
441. Wen, L., Eberl, S., Fulham, M. & Feng, D. D. Recent software developments and applications in functional imaging. *Curr Pharm Biotechnol* **13**, 2166–81 (2012).
442. Oechsner, M. *et al.* Lung imaging under free-breathing conditions. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* **61**, 723–7 (2009).
443. Guckenberger, M., Richter, A., Boda-Heggemann, J. & Lohr, F. Motion compensation in radiotherapy. *Crit Rev Biomed Eng* **40**, 187–97 (2012).
444. Lucignani, G. Respiratory and cardiac motion correction with 4D PET imaging: shooting at moving targets. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **36**, 315–9 (2009).
445. Ouyang, J., Li, Q. & El Fakhri, G. Magnetic resonance-based motion correction for positron emission tomography imaging. *Semin Nucl Med* **43**, 60–7 (2013).
446. Wang, X. & Koch, S. Positron emission tomography/computed tomography potential pitfalls and artifacts. *Curr Probl Diagn Radiol.* **38**, 156–69
447. Nehmeh, S. A. & Erdi, Y. E. Respiratory motion in positron emission tomography/computed tomography: a review. *Semin Nucl Med* **38**, 167–76 (2008).
448. Sarrut, D., Boldea, V., Miguet, S. & Ginestet, C. Simulation of four-dimensional CT images from deformable registration between inhale and exhale breath-hold CT scans. *Med Phys* **33**, 605–17 (2006).
449. Rit, S., Sarrut, D. & Ginestet, C. Respiratory signal extraction for 4D CT imaging of the thorax from cone-beam CT projections. *Med Image Comput Comput Assist Interv* **8**, 556–63 (2005).
450. Xu, S., Taylor, R. H., Fichtinger, G. & Cleary, K. Lung deformation estimation and four-dimensional CT lung reconstruction. *Acad Radiol* **13**, 1082–92 (2006).
451. Holden, M. A review of geometric transformations for nonrigid body registration. *IEEE transactions on medical imaging* **27**, 111–28 (2008).
452. Ouksili, Z. Compensation du mouvement respiratoire dans les images TEP/TDM thoraciques. (Thèse). (2010).
453. Lorenz, K. S., Salama, P., Dunn, K. W. & Delp, E. J. Non-rigid registration of multiphoton microscopy images using B-splines. *Proc SPIE* 796221–796221–8 (2011).doi:10.1117/12.878304
454. Mlodzianoski, M. J. *et al.* Sample drift correction in 3D fluorescence photoactivation localization microscopy. *Opt Express* **19**, 15009–19 (2011).
455. Cui, G. *et al.* An automated method for comparing motion artifacts in cine four-dimensional computed tomography images. *J Appl Clin Med Phys* **13**, 3838 (2012).

456. Bhattacharya, J. Seeing is believing. *Nat Meth* **8**, 57–8 (2011).
457. Clark, A. K., Staniland, A. A. & Malcangio, M. Fractalkine/CX3CR1 signalling in chronic pain and inflammation. *Curr Pharm Biotechnol* **12**, 1707–14 (2011).
458. Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* **20**, 4106–14 (2000).
459. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–61 (2010).
460. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666–70 (2007).
461. Varol, C. *et al.* Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 171–80 (2007).
462. Landsman, L., Varol, C. & Jung, S. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* **178**, 2000–7 (2007).
463. Blair, D. & Dufresne, E. The Matlab Particle Tracking Code Repository.
464. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142–62 (1973).
465. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* **139**, 380–97 (1974).
466. Steinman, R. M., Lustig, D. S. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* **139**, 1431–45 (1974).
467. Steinman, R. M., Adams, J. C. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* **141**, 804–20 (1975).
468. Ressmeyer, A. R. *et al.* Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. *ERJ* **28**, 603–11 (2006).
469. Hammad, H. *et al.* House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* **15**, 410–6 (2009).
470. Lindquist, R. L. *et al.* Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* **5**, 1243–50 (2004).
471. Fiole, D., Deman, P., Trescos, Y., Douady, J. & Tournier, J.-N. An optimized two-photon method for in vivo lung imaging reveals intimate cell collaborations during infection. *Proc SPIE* **85891H**, (2013).

472. Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y. C. & Germain, R. N. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* **203**, 2841–52 (2006).
473. Fiore, D., Touvrey, C., Quesnel-Hellmann, A., Douady, J. & Tournier, J.-N. Shape-based tracking allows functional discrimination of two immune cell subsets expressing the same fluorescent tag in mouse lung explant. *PLoS One* **7**, e39831 (2012).
474. Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. & Kupfer, A. Selective modulation of protein kinase C- θ during T-cell activation. *Nature* **385**, 83–6 (1997).
475. Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82–6 (1998).
476. Freiberg, B. A. *et al.* Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* **3**, 911–7 (2002).
477. Trautmann, A. & Valitutti, S. The diversity of immunological synapses. *Current Opinion in Immunology* **15**, 249–254 (2003).
478. Batista, F. D., Iber, D. & Neuberger, M. S. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* **411**, 489–94 (2001).
479. Davis, D. M. *et al.* The human natural killer cell immune synapse. *P Natl Acad Sci USA* **96**, 15062–7 (1999).
480. Dustin, M. L. Signaling at neuro/immune synapses. *J Clin Invest* **122**, 1149–55 (2012).
481. Goodridge, H. S. *et al.* Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a “phagocytic synapse”. *Nature* **472**, 471–5 (2011).
482. Blank, F. *et al.* Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology* **216**, 86–95 (2011).
483. Davis, D. M. Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **9**, 543–55 (2009).
484. Rodríguez-Fernández, J. L., Riol-Blanco, L., Delgado-Martín, C. & Escribano-Díaz, C. The dendritic cell side of the immunological synapse: exploring terra incognita. *Discov Med* **8**, 108–12 (2009).
485. Rodríguez-Fernández, J. L., Riol-Blanco, L. & Delgado-Martín, C. What is the function of the dendritic cell side of the immunological synapse? *Sci Signal* **3**, re2 (2010).

Annexe 1

Article de conférence *Proc SPIE 2011*

Article de conférence publié dans les *proceedings SPIE* après présentation d'un poster au congrès SPIE *European Conferences on Biomedical Optics* à Munich (Allemagne) en avril 2011, récompensé par le prix TOPTICA du meilleur poster.

Multimodal 4D imaging of cell-pathogen interactions in the lungs provides new insights into pulmonary infections

Daniel Fiolo^{*a,b}, Julien Douady^b, Aurélie Cleret^a, Kévin Garraud^a, Jacques Mathieu^a, Anne Quesnel-Hellmann^a, Jean-Nicolas Tournier^{*a,c}

^a Unité Interactions Hôte-Agents pathogènes, Département de Microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France;

^b Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, UMR 5588 CNRS / Université Joseph Fourier, St-Martin-d'Hères, France ;

^c Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France.

ABSTRACT

Lung efficiency as gas exchanger organ is based on the delicate balance of its associated mucosal immune system between inflammation and sterility. In this study, we developed a dynamic imaging protocol using confocal and two-photon excitation fluorescence (2PEF) on freshly harvested infected lungs. This modus operandi allowed the collection of important information about CX3CR1⁺ pulmonary cells. This major immune cell subset turned out to be distributed in an anisotropic way in the lungs: subpleural, parenchymal and bronchial CX3CR1⁺ cells have then been described. The way parenchymal CX3CR1⁺ cells react against LPS activation has been considered using Matlab software, demonstrating a dramatic increase of average cell speed. Then, interactions between *Bacillus anthracis* spores and CX3CR1⁺ dendritic cells have been investigated, providing not only evidences of CX3CR1⁺ cells involvement in pathogen uptake but also details about the capture mechanisms.

Keywords: two-photon imaging, 2PEF, confocal, host-pathogen interactions, lung, infectious disease, ex vivo imaging, *Bacillus anthracis*

1. INTRODUCTION

The lung is a delicate vital organ constantly exposed to pollutants and pathogens through air sampling¹. Exploration of lung immune system dynamic under infection has not been performed in detail so far, mainly because ventilation mechanic and chest movement don't allow the micrometric resolution needed to track roughly one micrometer bacteria. In this paper, we investigate this issue using an *ex vivo* imaging protocol on freshly harvested lungs, allowing conservation of cell dynamic many hours after animal euthanasia.

Two-photon excitation fluorescence (2PEF) has proved itself as a high performance technique in thick life tissues imaging². The use of infrared laser allows the generation of second harmonic signal (SHG), a non-centrosymmetric material specific signal offering the opportunity of imaging of alveoli collagen fibers in the lungs without binding to an exogenous fluorochrome. This work deals with 2PEF as well as confocal microscopy, allowing theoretically a better resolution than 2PEF to the detriment of penetrability in thick samples, photodamage and increased photobleaching.

The experiments herein described aimed to lead to a better understanding of the immune interactions between a major immune cell population characterized by their expression of the CX3CR1, the receptor of fractalkin (mostly expressed in dendritic cells (DCs) and monocytes in the lungs) and inhaled contaminants at the lower airways level. These experiments have been facilitated by the use of a transgenic CX3CR1^{+/gfp} mice strain³ expressing the green fluorescent protein (GFP) on monocytes (macrophages and DCs precursors) and DCs, the sentinels of the immune system, sampling the environment on the mucosa and efficient antigen-presenting cells after migration into the lymph nodes⁴.

*daniel.fiolo@ujf-grenoble.fr or jntournier@gmail.com, phone: 33 4 76 63 68 48.

So far, little is known about the anatomy of spatial DC distribution and the dynamic of DCs population at the homeostasis and after activation or under an infection. We took advantage of the development of dynamic imaging, to analyse the kinetic of lung immune system under infectious stimulation.

For the model of pulmonary infection we used two different approaches: in some experiments lipopolysaccharide, one of the major constituent of Gram-negative bacteria was instilled in the upper airways, while in some others spores of *Bacillus anthracis*, the Gram-positive causative agent of anthrax was administered intranasally.

Some previous works^{5,6} suggest a major role of CX3CR1⁺ cells in *B. anthracis* spore uptake in the lungs, though the uptake mechanism as well as the precise anatomical location of cells involved and the dynamic of such interactions remain unclear. In such a context, 2PEF and confocal microscopy provide complementary data to those previously acquired using flow cytometry⁷.

In this study, we identified three main locations of CX3CR1⁺ cells in the lungs and their possible role in controlling bacteria infection, as well as CX3CR1⁺ cell dynamic under inflammatory conditions. Then, the precise mechanisms of pathogen uptake by CX3CR1⁺ cells have been investigated. We shown that CX3CR1⁺ lung cells are capable of emitting 'balloon-body' shaped extension aimed to uptake pathogens, and that the uptake process can occur in a short time (typically less than 3 minutes).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

C57BL/6 mice (Centre d'Élevage R. Janvier, France) (further referred as wild type) were housed in clean standard conditions in our animal care facility (Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France), and CX3CR1^{+/gfp} mice on a C57BL/6 genetic background were maintained under specific pathogen-free conditions at the Plate-forme de Haute Technologie Animale (Institut Jean Roget, La Tronche, France). The local ethics committee approved all our animal experiments according to international guidelines.

2.2 Models of lung infection

In order to mimic the effects of Gram-negative bacteria infection, we administered by intratracheal route (i.t.) 150 µg of Lipopolysaccharide from *Echerischia coli* (LPS) in 30 µl of Phosphate Buffered Saline (PBS) after tracheotomy. Control mice were administered with an equivalent volume of PBS.

Avirulent *B. anthracis* Sterne 7702 strain was originally provided by M. Mock (Institut Pasteur, Paris, France). The spores are chemically labelled with Alexa Fluor 647 (Invitrogen Life Technologies) as follows: 3×10^9 CFU of the spores were stained with the reactive dye in 10 ml of H₂O/0.1 M sodium bicarbonate for 1 h protected from light. Spores were washed five times in H₂O/0.1 M sodium bicarbonate. The spores were maintained in H₂O at 4°C to avoid germination. Mice were anesthetized and 50 ml of spores were administered i.t. by 10^8 CFU/mouse. Control mice were administered with the same volume of PBS.

2.3 Sample preparation

Lung explants were kept on their whole or cut in two parts with a vibratome. These sample are glued on a Petri dish filled up either with 4°C PBS for static studies or with 37°C RPMI medium for dynamic studies. In this case medium was refresh every hour. Explants were kept 45 minutes at 37°C before and during the imaging phase.

For some experiments, 5-6(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine (CMTMR, Invitrogen Life Technologies) was diluted in warm agar gelose at 50 µg/ml and injected i.t. after mouse euthanasia. Lungs were harvested 5 minutes after staining, washed 3 times with cold PBS and kept in 4°C PBS.

2.4 Confocal and 2PEF microscopy

Confocal and 2PEF imaging was performed on a Zeiss LSM 710 NLO microscope equipped with a W Plan-Apochromat 20×/1.0 DIC M27 75mm water immersion objective. In confocal mode, GFP is excited with a Argon 488 nm laser, while Alexa Fluor 647 with a Helium-Neon 633 nm laser. In 2PEF mode, excitation is usually made at 854 nm by a tunable pulsed laser (Chameleon Coherent). GFP signal is epicollected by a 500-550 nm dedicated non-descanned detector (NDD) and CMTMR by a 640-710 nm dedicated NDD. The second harmonic generation (SHG) allows detection of non-

centrosymmetric structures, such as alveolar collagen in the lungs. This signal is epicollected by a dedicated NDD coupled with a 427 nm \pm 20 nm band pass filter.

2.5 Kinetic analysis

In order to achieve kinetic analysis of the cell dynamic, 2PEF GFP-SHG imaging was performed at the rate of one 283 \times 283 \times 200 μ m image every two minutes for one hour. The median filtered maximum intensity z-projection of each image was calculated using ZEN 2008 Zeiss software. A custom made program developed under Matlab (Mathworks) was intended to correct the x-y time shift owing to a realignment of each frame based on its SHG signal. At least 20 cell positions were calculated using the track.pro code written by John C. Cooper transmuted to Matlab by Blair & Dufresne⁸. Starting with these positions, a custom made Matlab code was aimed at calculating average cell speed and meandering index.

3. RESULTS

3.1 Lung structure analysis using confocal and 2PEF imaging

Our first goal was to examine the lung structure comparing confocal, 2PEF and SHG, to decipher the topography of collagen matrix and cell architecture. One manner of imaging a sample such a whole lung explant consists in the epicollection of autofluorescence. Such a technique has been successfully used in human endomicroscopy to detect elastin fibers⁹. This radiation was generated by a high power argon 488 nm laser and collected using the confocal mode of the microscope (Fig. 1-A) showing a dense autofluorescent structure between the parenchyma edge and the pleura, forming the subpleural area. The collection of second harmonic signal was simultaneously achieved (Fig.1-B) at 857 nm excitation, showing a subpleural collagen lattice. When both images were merged into one (Fig. 1-C), we did not observe any correlation between SHG and autofluorescence signals.

The same result was obtained when comparing CMTMR staining (Fig. 1-D) and SHG (Fig. 1-E) signals (Fig. 1-F). However, CMTMR staining provided more information on structure than autofluorescence on whole lung explants as shown in Fig. 1-D. The same comparisons were achieved deeper in the parenchyma on lung lobes cut in half using a vibratome. In contrast to what was observed in the subpleural area, autofluorescence could be used to provide information on alveoli structures as well as SHG (Fig. 1 G-I). Both signals were highly stackable (Fig. 1-I). Finally, CMTMR staining did not add useful information to SHG signal (Fig. 1 J-L). As CMTMR could be toxic to cells and require agarose injection in the trachea, that could modify lung physiology, we limited its application to static analysis.

Fig. 1

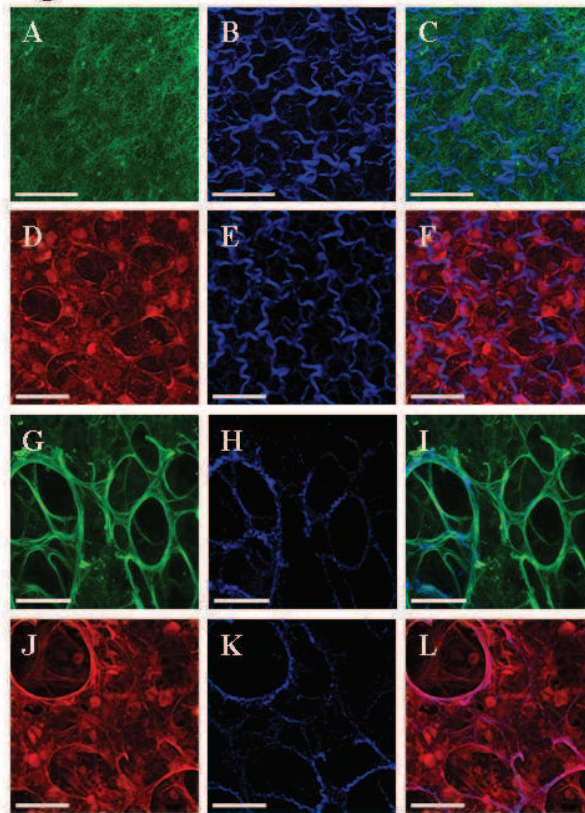


Figure 1: Autofluorescence, CMTMR staining and SHG provide different informations about lung anatomy. Comparison between autofluorescence (green) and CMTMR staining (red) versus SHG (blue) on whole lung explant (A-F) and on half lung lobe (G-L). CMTMR and SHG images where acquired using a 857 nm excitation wavelength, and autofluorescence images with 488 nm. Scale bar = 40 μm .

3.2 Anatomical description of three different CX3CR1⁺ cell networks in the lungs

We next tried to analyse the localisation of DCs using CX3CR1^{+/eGFP} knock in mice expressing physiologically eGFP in several myeloid subset of lung cells. Previous studies showed that monocytes and a DC subset express GFP in the lungs^{3,10}. GFP-positive cells can be imaged either in confocal or 2PEF modes. DCs were observed as large cells with typical hair-like thin dendritic shape (Fig. 2-A) allowing their discrimination from round shaped monocytes (Fig. 2-B, white arrows). We first analysed how the DC population was organized within the lung tissue. We could differentiate at least three different organizing sites for CX3CR1⁺ cells in the lungs:

- Subpleural CX3CR1⁺ cells

We analyzed up to 60 μm deep a lung explant after CMTMR staining, with one projection in each space direction (z on the centre, x-y on the edges), providing a 3-D view of GFP⁺ cell topography (Fig. 2-C). A tight mesh of CX3CR1⁺ cells was observed right upon the lung surface visible in red staining, at the subpleural area level. These subpleural CX3CR1⁺ cells seemed tangled right in the subpleural collagen lattice, as shown on Fig. 2-D.

- Parenchymal CX3CR1⁺ cells

On half a lung lobe, another tidy CX3CR1⁺ cellular network located within the inter-alveolar parenchyma area of the lungs was observed (Fig. 2-E). These cells appeared to be intertwined in the alveoli tissue, as shown on Fig. 2-F.

- Bronchial CX3CR1⁺ cells

CMTMR and SHG both allow bronchi imaging on lung slices (Figs. 2-G,H). We observed a strong density of CX3CR1⁺ cells right along the bronchial epithelium surface, in longitudinal projection (Fig. 2-G) and in transverse projection (Fig. 2-H).

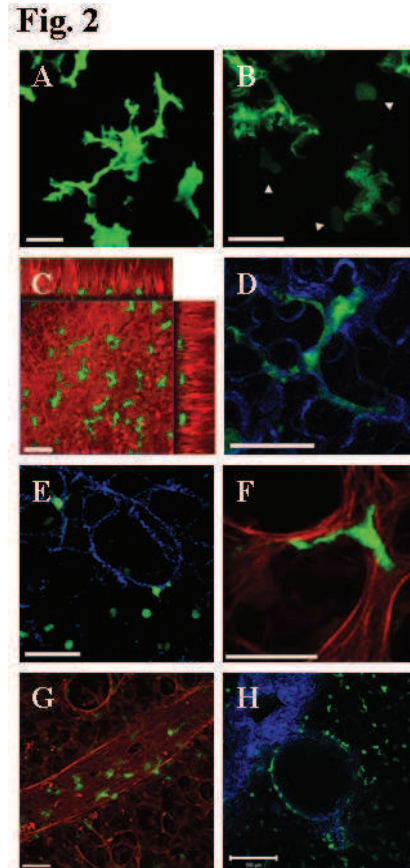


Figure 2: CX3CR1⁺ cells can be sorted according to their location in the lungs. Anatomical location of CX3CR1⁺ cells (green) in the lungs: (A) Dendritic cell (scale bar = 10 μm), (B) monocytes (white arrows, scale bar = 20 μm). (C-D) Subpleural CX3CR1⁺ cells merged with CMTMR staining (C, scale bar = 40 μm) and with SHG (D, scale bar = 20 μm). (E-F) Parenchymal CX3CR1⁺ cells merged with SHG (E, scale bar = 40 μm) and with CMTMR staining (F, scale bar = 20 μm). (G-H) Bronchial CX3CR1⁺ cells merged with CMTMR staining (G, scale bar = 40 μm) and with SHG (H, scale bar = 100 μm).

3.3 CX3CR1⁺ cell velocity is increased upon LPS activation

Kinetic analysis of immune cells is crucial for the study of immunological processes and defence against an aggression. Thus, we developed an ex vivo imaging protocol allowing an analysis of cell physical parameters. First, the dynamic analysis of the subpleural CX3CR1⁺ subset showed rare mobility events, both under non-inflammatory (Fig. 3-A) or inflammatory conditions (data not shown).

Then, we performed the same analysis on the parenchymal CX3CR1⁺ cells after i.t. injection of PBS (control group) or LPS, which is a potent pro-inflammatory molecule mimicking a Gram-negative bacterium dissemination. CX3CR1⁺ cells had a statistically significant increase in cell velocity after LPS stimulation (Fig. 3-B). This increase of velocity was randomly directed as the meandering index stayed inferior to 0.5, even though increased after LPS stimulation.

Fig. 3

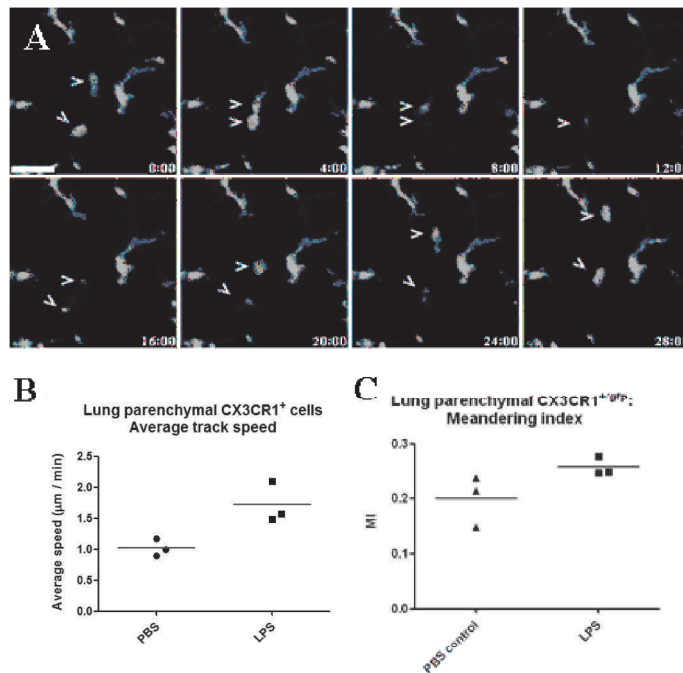


Figure 3: Inflammatory condition increases CX3CR1+ cells motility. (A) Time-lapse imaging of CX3CR1+ subpleural cells. Two motile cells are highlighted with open arrows. Images were acquired using a 860 nm excitation wavelength. Scale bar = 20 μm , 4 min between each frame. (B-C) Analysis of the parenchymal CX3CR1+ cell dynamic 1h30 after i.t. injection of LPS (closed square) or of PBS as a control (closed triangle) (1h after sacrifice) over 1h: average track speed (B) and average meandering index (C) calculated on three mice in each group (each point represents the average value calculated on 20 up to 40 cells).

3.4 CX3CR1+ cells capture in *B. anthracis* spores upon activation

We finally characterized DC-pathogen interactions with *B. anthracis* spores coupled with Alexa Fluor 647 (Invitrogen Life Technologies) in confocal mode such as shown in Fig. 4-A.

Static imaging performed on whole lung explants (Fig. 4-B,C) shows the uptake of one spore by a subpleural CX3CR1+ DC. The cell captured a spore through 'balloon-body'-like shape extension as previously described in the gut¹¹.

Dynamic confocal imaging was then performed on a lung slice from a CX3CR1^{+gfp} mouse, from 3 hours up to 5 hours post infection. Fig. 4-E shows time-series. This time series is cropped from a larger image visible in Fig. 4-D. This series clearly showed a CX3CR1+ DC moving toward an isolated *B. anthracis* spore and taking it up. This uptake process is achieved in less than 3 minutes between minute 15 and minute 18 in Fig. 4-D.

Fig. 4

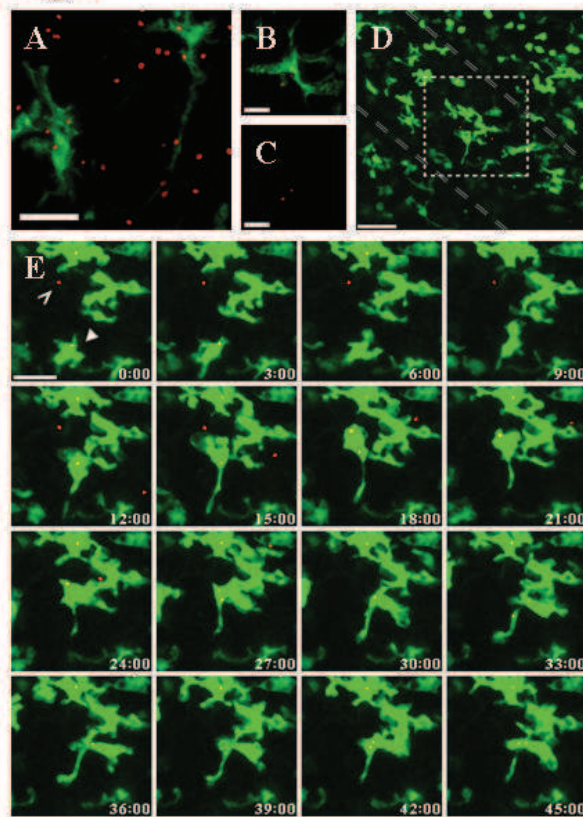


Figure 4: CX3CR1⁺ cells are involved in *B. anthracis* spore uptake. Interactions between CX3CR1⁺ cells and *B. anthracis* spores stained with Alexa Fluor 647 (in red) in the lungs: (A) Without colocalized signal, scale bar = 20 μ m. (B-C) Spore uptake by a CX3CR1⁺ cell on a whole lung explant, scale bar = 10 μ m. (D) Lung slice after i.t. injection of *B. anthracis* spores. Grey dashed double lines may represent a bronchial epithelium. White dashed square is the ROI showed in (E), scale bar = 40 μ m. (E) Time-lapse imaging of a spore uptake (open white arrow) by a dendritic CX3CR1⁺ cell (full white arrow) on a lung slice 3h30 after i.t. infection. Scale bar = 20 μ m, 3 min between each frames.

4. DISCUSSION

Our results demonstrate the complementary interests of confocal and 2PEF imaging in lung immune system analysis. We analyse here for the first time some functional aspects of the CX3CR1-DC such as their topographic distribution in the lung, their capacity to be activated after an inflammatory signal, and finally to sample efficiently the environment. The lung represents a very inhospitable environment for microscopic analysis, as it is very fragile, filled with air that diffuses light. We circumvented some issues by using tissue slices that could be maintained under physiological conditions for a dynamic analysis. Our work illustrates the fact that imaging of immune pulmonary cells can be performed *ex vivo* either in a whole lung explant or in a lung slice, deciphering different aspects of CX3CR1-DC physiology. Alveoli imaging can be performed using alternatively CMTMR staining or autofluorescence or SHG detection. CMTMR is not devoid of any toxic activity damageable for dynamic analysis and the autofluorescence signal generation needs high intensity excitation laser radiation, which may reveal damageable for the tissues. In our experiments, SHG then appears to be the best alveoli imaging method, providing the best compromise between specific details of cell-tissue architecture analysis and functional damages.

Our protocol on lung slices allows dynamic imaging for up to 5 hours after lung harvest. LPS intratracheal injection, as a model of inflammatory conditions, leads to a dramatic increase of CX3CR1⁺ cell velocity (Fig. 3-B), providing evidence

that this population is involved in fighting immune aggressions in the lungs. As shown in another study on tracheal DCs, it remains to be shown how the activation signal is delivered to the DCs, by direct interaction, or after indirect epithelial cell activation¹². After inhalation, non-motile micrometric particles such as *B. anthracis* spores are distributed along the whole respiratory tract from upper airway into lower airways and alveoli through bronchi, bronchioles. Spores stay trapped in the alveolus environment where they stay confined, not being able to intrude through the alveolar epithelium by themselves. Parenchymal CX3CR1-DCs are involved in the uptake of pathogens confined in alveoli, while bronchial CX3CR1-DCs deal with pathogens present right beneath the bronchial surface, as suggested by Fig. 4-D where the anisotropy in the distribution of CX3CR1⁺ cells (dendritic shaped CX3CR1⁺ cells between the grey double dashed line and round shaped CX3CR1⁺ outside) gives a hint according to which the capture visible in Fig. 4-E would occur on a bronchiole surface. The subpleural CX3CR1-DCs are probably involved in both parenchymal (as shown in Fig. 4-B,C) and pleural sampling and defence against infection.

This work illustrates the feasibility of our ex vivo lung imaging protocol herein described as a powerful way to study the kinetic of an immune cell subset and as an alternative technique to high-quality in vivo lung imaging, which does not provide until now a sufficient resolution to characterize cell-pathogen interaction.

Acknowledgement: This work was supported by the grant co09-301-1 from the Direction Générale de l'Armement (DGA). Daniel Fiolo was supported by a fellowship from the DGA.

REFERENCES

- [1] Holt, P. G., Strickland, D. H., Wikstrom, M. E. & Jahnsen, F. L. "Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract." *Nat Rev Immunol* **8**, 142-152 (2008).
- [2] Helmchen, F. & Denk, W. "Deep tissue two-photon microscopy." *Nat Methods* **2**, 932-940 (2005).
- [3] 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).
- [4] Banchereau, J. & Steinman, R. M. "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**, 245-252 (1998).
- [5] Tournier, J. N. & Mohamadzadeh, M. Key roles of dendritic cells in lung infection and improving anthrax vaccines." *Trends Mol Med* **16**, 303-312 (2010).
- [6] Tournier, J. N., Rossi Paccani, S., Quesnel-Hellmann, A. & Baldari, C. T. "Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses." *Mol Aspects Med* **30**, 456-466 (2009).
- [7] Cleret, A. *et al.* "Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route." *J Immunol* **178**, 7994-8001 (2007).
- [8] <http://physics.georgetown.edu/matlab>
- [9] Thiberville, L. *et al.* "Confocal fluorescence endomicroscopy of the human airways." *Proc Am Thorac Soc* **6**, 444-449 (2009).
- [10] Landsman, L., Varol, C. & Jung, S. "Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung." *J Immunol* **178**, 2000-2007 (2007).
- [11] Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y. & Germain, R. N. "Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement." *J Exp Med* **203**, 2841-2852 (2006).
- [12] Hammad, H. *et al.* "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." *Nat Med* **15**, 410-416 (2009).

Annexe 2

Publication *PLoS Pathogens* 2012

Article publié dans la revue *PLoS Pathogens* en 2012 suite à une collaboration avec l'équipe de Pierre Goossens (Institut Pasteur, Paris).

Mechanisms of NK Cell-Macrophage *Bacillus anthracis* Crosstalk: A Balance between Stimulation by Spores and Differential Disruption by Toxins

Maria Klezovich-Bénard^{1,2}, Jean-Philippe Corre^{1,2}, Hélène Jusforgues-Saklani³, Daniel Fiole^{4,5}, Nick Burjek^{1,2}, Jean-Nicolas Tournier^{4,6}, Pierre L. Goossens^{1,2*}

1 Laboratoire Pathogénie et Toxi-Infections Bactériennes, Institut Pasteur, Paris, France, **2** CNRS URA 2172, Paris, France, **3** Unité d'Immunobiologie des Cellules Dendritiques, Institut Pasteur, Paris, France, **4** Unité Interactions Hôte-Agents Pathogènes, Département de Microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France, **5** Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, UMR 5588 CNRS/Université Joseph Fourier, St-Martin-d'Hères, France, **6** École du Val-de-Grâce, Paris, France

Abstract

NK cells are important immune effectors for preventing microbial invasion and dissemination, through natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Bacillus anthracis* spores can efficiently drive IFN- γ production by NK cells. The present study provides insights into the mechanisms of cytokine and cellular signaling that underlie the process of NK-cell activation by *B. anthracis* and the bacterial strategies to subvert and evade this response. Infection with non-toxigenic encapsulated *B. anthracis* induced recruitment of NK cells and macrophages into the mouse draining lymph node. Production of edema (ET) or lethal (LT) toxin during infection impaired this cellular recruitment. NK cell depletion led to accelerated systemic bacterial dissemination. IFN- γ production by NK cells in response to *B. anthracis* spores was: i) contact-dependent through RAE-1-NKG2D interaction with macrophages; ii) IL-12, IL-18, and IL-15-dependent, where IL-12 played a key role and regulated both NK cell and macrophage activation; and iii) required IL-18 for only an initial short time window. *B. anthracis* toxins subverted both NK cell essential functions. ET and LT disrupted IFN- γ production through different mechanisms. LT acted both on macrophages and NK cells, whereas ET mainly affected macrophages and did not alter NK cell capacity of IFN- γ secretion. In contrast, ET and LT inhibited the natural cytotoxicity function of NK cells, both *in vitro* and *in vivo*. The subverting action of ET thus led to dissociation in NK cell function and blocked natural cytotoxicity without affecting IFN- γ secretion. The high efficiency of this process stresses the impact that this toxin may exert in anthrax pathogenesis, and highlights a potential usefulness for controlling excessive cytotoxic responses in immunopathological diseases. Our findings therefore exemplify the delicate balance between bacterial stimulation and evasion strategies. This highlights the potential implication of the crosstalk between host innate defences and *B. anthracis* in initial anthrax control mechanisms.

Citation: Klezovich-Bénard M, Corre J-P, Jusforgues-Saklani H, Fiole D, Burjek N, et al. (2012) Mechanisms of NK Cell-Macrophage *Bacillus anthracis* Crosstalk: A Balance between Stimulation by Spores and Differential Disruption by Toxins. PLoS Pathog 8(1): e1002481. doi:10.1371/journal.ppat.1002481

Editor: Kenneth A. Bradley, University of California Los Angeles, United States of America

Received: June 17, 2011; **Accepted:** November 28, 2011; **Published:** January 12, 2012

Copyright: © 2012 Klezovich-Bénard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: MKB was funded through a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Technologies and DF by a fellowship from DGA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pierre.goossens@pasteur.fr

Introduction

NK cells are immune cells that do not need prior exposure to antigen to exert their functions. Their receptors are germline encoded and do not require somatic gene rearrangements. These receptors recognise an array of self-molecules through highly specific mechanisms. The functions of NK cells are regulated through a delicate balance between activating and inhibitory receptors. Although NK cells are traditionally considered as belonging to the innate immune system, a number of recent reports have shown that NK cell education can occur, leading to an expansion of pathogen-specific cells and generation of 'memory' cells [1]. NK cells perform a surveillance task and react to transformed, stressed, and virally infected cells. They represent a first-line of defence against cancer and pathogen invasion.

NK cells are important immune effectors for preventing microbial invasion and dissemination [1]. They are found in

blood as well as in peripheral nonlymphoid tissues and secondary lymphoid organs [1]. In early host responses, NK cells exert two principal functions: secretion of a range of cytokines and natural cytotoxicity. Among secreted cytokines, IFN- γ plays a key role in enhancing immune responses, in particular by modulating macrophage activation [2]. NK-cell activation is readily induced during viral and bacterial infections and requires cytokine and receptor signals that are delivered by myeloid cells [3–5], such as IFN- α/β [6], IL-12 [7], IL-15 [6] and IL-18 [8]. Apart from a potential role in polymicrobial sepsis [9], NK-cell implication during bacterial infections has been studied in few models, mainly of intracellular bacteria (*Mycobacterium sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*) [5]. Among the extracellular bacteria, *Staphylococcus aureus* and the anaerobe *Lactobacillus johnsonii* have been reported to stimulate NK cells [5].

Spores of the extracellular bacterial pathogen *Bacillus anthracis* can efficiently drive IFN- γ production in large amounts by NK

Author Summary

NK cells are important immune effectors that perform a surveillance task and react to transformed, stressed, and virally infected cells. They represent a first-line defence against cancer and pathogen invasion. Different pathogens trigger distinct NK-cell activation pathways. The *Bacillus anthracis* spore is the highly resistant form that enters the host and provokes anthrax. This microbe kills through a combination of acute bacterial infection and devastating toxemia. In the present study, we characterise the crosstalk between NK cells and spores, as well as the strategies used by *B. anthracis* to evade initial control mechanisms and impact anthrax pathogenesis. Our findings exemplify the spores' property to efficiently drive a high production of IFN- γ by NK cells, as well as the complex pathways used for activation which require both cytokine and cellular signaling. *B. anthracis* subverts this response through its toxins by paralyzing essential NK cell functions. Furthermore, edema toxin from *B. anthracis* blocks natural cytotoxicity without affecting IFN- γ secretion. The CyaA toxin of *Bordetella pertussis* possesses the same enzymatic activity and has a similar effect. The high efficiency of these toxins in blocking cytotoxicity *in vivo* implies possible exploitation of their subverting activity to modulate excessive cytotoxic responses in immunopathological diseases.

cells [10]. The spore is the infectious bacterial form that first interacts with the host, thereby eliciting the earliest host defences against infection. The innate immune response was originally considered as a non-specific response characterized by engulfment and digestion of microorganisms and foreign substances by phagocytic cells. However, innate immunity does show considerable specificity through the activation of different signaling pathways associated with different Toll-like receptors (TLRs) that recognise different pathogen-associated molecular patterns. Activation of TLRs thus results in different biological responses depending on the pathogen. NK cell activation induced by the *B. anthracis* spore is independent of TLR2, TLR4, and TLR7 [10] and is probably dependent on multiple receptor engagement due to the complex nature of the spore. The downstream signaling pathways nevertheless implicate the adaptor molecule MyD88 [10]. Among the primary effector cells of innate immunity to intervene at the portal of *B. anthracis* entry, macrophages have been implicated in two contrasting processes: (i) the initiation of infection by playing a role in spore germination [11] and spore dissemination [12], and (ii) the control of infection through spore phagocytosis and destruction [11,13,14]. Neutrophils are recruited in the first hours of infection and are involved in the early control of infection [14,15]. Lung dendritic cells (DCs) play a pivotal role in spore uptake and promote dissemination of spores from the alveolar space into the draining lymph nodes [14].

Many of the symptoms of systemic anthrax can be attributed to the subversive effects of a poly- γ -D-glutamic capsule and toxins. Anthrax toxins suppress the immune defences of the host by targeting cells of innate and adaptive immunity. *B. anthracis* thus completely evades almost all of the key players responsible for efficient host protection. *B. anthracis* toxins are made up of three secreted proteins, protective antigen (PA), edema factor (EF; a calmodulin-dependent adenylate cyclase that increases intracellular concentrations of cAMP in host cells [16]) and lethal factor (LF; a zinc-dependent metalloprotease which cleaves the N-terminal region of mitogen-activated protein kinase kinases [MAPKKs] [17]). Functionally, the combination of PA with EF or LF forms

edema toxin (ET) or lethal toxin (LT) respectively [18,19]. LT kills or inactivates monocytes, macrophages, and neutrophils [14] whereas ET disrupts cytokine networks in monocytes [14], and reduces macrophage migration [14]. Both LT and ET impair neutrophil actin-based motility, resulting in paralysis of PMN chemotaxis [14,20]. Anthrax toxins impair activation and maturation of DCs, thus blocking the initiation of adaptive immunity [21,22]. LT disrupts TCR signaling in CD1d-restricted NKT cells, leading to functional unresponsiveness [23]. LT also severely reduces B-cell proliferation, impairs immunoglobulin production [24], and blocks MAPKK-dependent cytokine production in CD4+ T cells [25,26]. Furthermore, ET reduces T-cell migration [14] and disrupts T-cell function [14]. Anthrax toxins are therefore involved in mediating immune evasion of the bacterium by interfering with the innate and adaptive immune responses.

NK cells are pivotal in the first-line of innate defence, serving as a functional bridge between innate and acquired immunity. To our knowledge, their role during *B. anthracis* infection has yet to be addressed. The present study aimed to characterise the mechanisms of NK-cell activation by *B. anthracis* spores, the strategies employed by the bacteria to subvert and evade this response through toxin secretion. We also aimed to identify the relevance of these processes for controlling *B. anthracis* infection. Relatively few studies have linked specific cytokines with protection against *B. anthracis*. However, IFN- γ increases the ability of macrophages to resist destruction by *B. anthracis* and to kill the bacteria [27] and we have shown that sensitivity to *B. anthracis* infection was partially dependent on IFN- γ [28]. As NK cells are the main innate immune cells to produce IFN- γ , we focused our study on these novel cellular targets of anthrax toxins in the context of the complex heterocellular interactions induced by *B. anthracis* spores.

Results

B. anthracis spores activate NK cells through accessory-cell- and contact-dependent interactions

B. anthracis spores induce naive spleen cells to secrete large amounts of IFN- γ . This phenomenon depends upon the interactions between CD49b⁺ cells and accessory cells from the CD49b-negative fraction (Figure 1A). Depletion of CD49b⁺ cells led to a significant 6.5-fold decrease of IFN- γ production (Figure 1A). Direct stimulation of purified CD49b⁺ cells with spores did not induce IFN- γ secretion. However, co-culture of positively selected CD49b cells with CD49b-negative splenocytes restored IFN- γ production upon spore stimulation (Figure 1A).

As our study was focused on spore components as the initial stimuli of the innate immune system, spores needed to be inactivated and prevented from germinating and developing into vegetative bacilli. Different means of inactivation (i.e. heat-inactivation, germination-deficient spores, and live spores in the presence of antibiotics) did not modify the extent of IFN- γ induction when compared with formaldehyde inactivation (Figure 1B). Spores of the phylogenetically distant *B. subtilis* gave rise only to a modest IFN- γ production, demonstrating that *B. anthracis* spore components are more efficient in inducing IFN- γ production than those of *B. subtilis*. Latex beads of comparable size as *B. anthracis* spores were ineffective in stimulating IFN- γ secretion by splenocytes, indicating that phagocytosis of inert particles alone was not sufficient and that *B. anthracis* spores were central for this response.

Similarly, stimulation with spores of positively selected CD49b cells with bone-marrow derived macrophages (BMDMs) resulted in a strong induction of IFN- γ secretion (Figure 1C) and activation

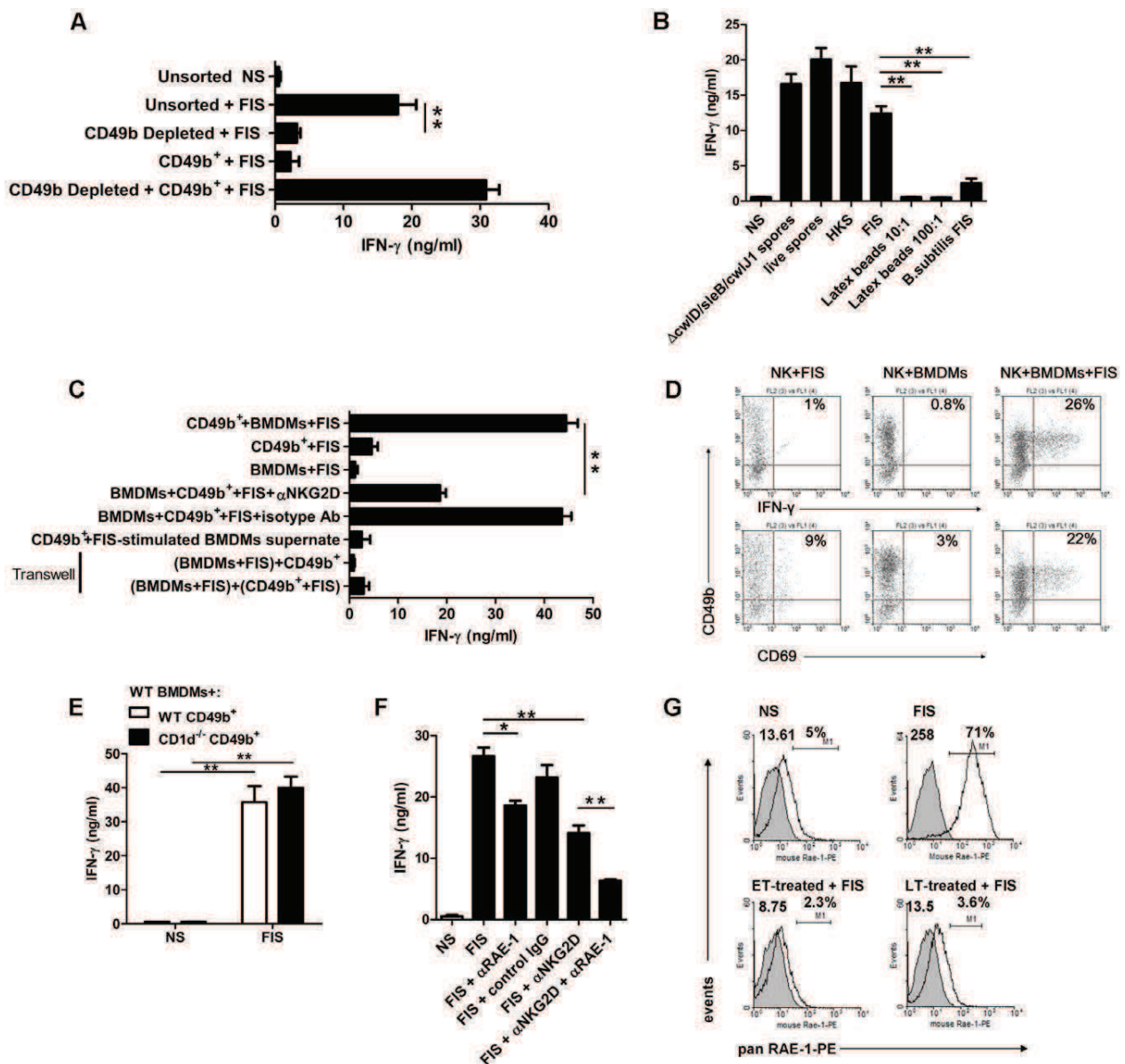


Figure 1. Contact dependence of NK cell activation by *B. anthracis* spores. C57BL/6 splenocytes, either unsorted (**A** and **B**), fractionated with anti-CD49b magnetic beads (**A**), or purified CD49b⁺ spleen cells cocultured with BMDMs (**C**) were stimulated with formaldehyde-inactivated spores (FIS), or (**B**) with heat-inactivated spores (HKS), live spores in the presence of antibiotics, a germination-deficient strain, formaldehyde-inactivated *B. subtilis* spores or latex beads; (**C**) the NKG2D receptor was neutralized, or the CD49b⁺ cells and BMDMs were separated in a Transwell system. IFN- γ concentrations were determined in the supernatants by ELISA as described in Materials and Methods. Results shown are the mean \pm SD for triplicate cultures representative of at least three experiments. (**D**) FACS analysis of surface CD69 and intracellular IFN- γ expression in spore-stimulated CD49b⁺ cells in the presence of BMDMs (see Figure S1A for gating strategy and controls); percentage for each positive cell population shown in the upper right quadrant of each dot plot; data representative of three independent experiments; the mean fold increase was 8.4 ± 0.7 and 12.4 ± 5 for CD69 and IFN- γ expression respectively; (**E**) CD49b⁺ cells from NKT-deficient CD1d^{-/-} mice stimulated with FIS in the presence of BMDMs from WT C57BL/6 mice produce similar amounts of IFN- γ than WT C57BL/6 mice; (**F**) same experimental conditions as in (**C**) with neutralization of NKG2D and/or RAE-1. (**G**) FACS analysis of RAE-1 surface expression on FIS-stimulated BMDMs and effect of incubation with ET and LT; mean fluorescence intensity of the positive peak (upper left corner) and percentage of the positive cell population are shown in each dot plot. Isotype-matched controls Abs were used for each staining combination (filled histogram). Data are representative of at least three independent experiments giving similar results. Significant differences between experimental conditions are indicated with asterisks (t test; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). doi:10.1371/journal.ppat.1002481.g001

of CD49b⁺ cells (Figure 1D); *i.e.* a 7.3-fold upregulation of the leukocyte early activation marker CD69 and a 32-fold increase of intracellular IFN- γ positive cells (Figure 1D and S1A). Stimulation of isolated CD49b⁺ cells or BMDMs by spores did not result in

IFN- γ secretion (Figure 1C), nor did it change basal expression of CD69 or intracellular IFN- γ (Figure 1D). IFN- γ secretion by CD49b⁺ cells from NKT-deficient CD1d^{-/-} mice [29,30] was similar to that by CD49b⁺ wild-type cells when co-cultured with

spore-stimulated wild-type BMDMs (Figure 1E). This strongly suggests that NK cells were the main source of IFN- γ production in this bacterial system.

NK-cell activity is regulated by both contact-dependent and soluble signals. Direct contact between BMDMs and NK cells was necessary for NK cell activation as: (i) conditioned medium from spore-stimulated BMDMs did not elicit IFN- γ secretion (Figure 1C); and (ii) physical separation of purified NK cells and BMDMs in compartments of transwell plates did not lead to IFN- γ secretion, even if stimulation with the spores was effected in both compartments (Figure 1C). The activating receptor, NKG2D, elicits cytokine production by NK cells [31,32]. The present study also implicated the NKG2D receptor in the interaction between NK cells and spore-stimulated BMDMs as addition of neutralizing antibody for the NKG2D receptor decreased IFN- γ production (Figure 1C and 1F). Similarly, neutralizing antibody for RAE-1 — one of the NKG2D ligands — partially inhibited IFN- γ production and co-neutralization of NKG2D and RAE-1 led to a greater reduction (Figure 1F). Finally, stimulation of BMDMs with *B. anthracis* spores resulted in an approximately 19-fold upregulation of RAE-1 expression compared with non-stimulated BMDMs (Figure 1G). The activating receptor Nkp46 was not involved as its neutralization did not modify IFN- γ secretion induced by spores (Figure S1B).

Taken together, these results indicate that NK cell activation and IFN- γ production in response to *B. anthracis* spores are dependent on an accessory cell, are contact-dependent, and occur through RAE-1-NKG2D interaction.

Functional relationship between IL-12 and IL-18 during stimulation by *B. anthracis* spores

Stimulation of BMDMs with *B. anthracis* spores induced secretion of IL-12 (Figure 2A). Neutralization of IL-18 or blocking the IL-15R α receptor did not alter IL-12 secretion. Macrophage-secreted IL-12 appeared to play a key role in NK-cell activation by *B. anthracis* spores as: (i) IL-12 neutralizing antibodies abolished IFN- γ secretion both in splenocytes and co-cultured BMDMs/purified NK cells (Figure 2B), and (ii) stimulation of splenocytes from IL-12^{-/-} and IL-12 R^{-/-} mice did not elicit IFN- γ production (Figure 2C). Furthermore, absence of IL-12 secretion by spore-stimulated BMDMs from IL-12^{-/-} mice did not induce IFN- γ secretion by wild-type NK cells (Figure 2D).

However, NK cells from IL-12R^{-/-} mice were weakly activated by spore-stimulated wild-type BMDMs (Figure 2E), indicating that other signals besides IL-12 were able to activate NK cells. This low amount of IFN- γ production was completely abolished by the addition of neutralizing antibody for IL-18 (Figure 2E). Thus, in the absence of IL-12 signaling, IL-18 becomes essential for the induction of IFN- γ . This was experimentally confirmed by the addition of IL-18 neutralizing antibodies, which significantly decreased spore-induced IFN- γ production by wild-type splenocytes or co-cultured BMDMs and purified NK cells (Figure 2B). Expression of the IL-12 receptor by BMDMs was also important for full NK cell activation in response to spores; IFN- γ production by wild-type NK was significantly lower with spore-stimulated BMDMs from IL-12R^{-/-} mice compared with their wild-type counterparts (Figure 2D). This finding implies a positive feedback of IL-12 and its important role in influencing the stimulatory capacities of macrophages.

Blocking the IL-15R α receptor led to a partial but significant inhibition of IFN- γ production in both spore-stimulated splenocytes and purified NK cells co-cultured with BMDMs (Figure 2B). Finally, simultaneous neutralization of IL-18 and IL-15 strongly decreased IFN- γ production (Figure 2B). This indicates that IL-12-

induced IFN- γ production depends upon IL-18 and IL-15 and suggests a synergistic mechanism of action of IL-12 with IL-18 and/or IL-15. As mentioned above, inhibition of IFN- γ production by IL-18 or/and IL-15 neutralizing antibodies was not associated with a decrease in IL-12 secretion (Figure 2A). The hypothesis that IL-18 or IL-15 are necessary for optimal IL-12 secretion by spore-stimulated BMDMs can therefore be excluded. Of the other cytokines tested, TNF- α , IFN- α , IFN- β , and IL-10 were not involved in the stimulation of IFN- γ secretion, as their neutralization did not interfere with IFN- γ secretion (Figure S1B).

IL-18 is stored in internal cellular compartments as a precursor and can rapidly be secreted through caspase-1 activation whereas IL-12 needs to be synthesized before secretion. To explore whether IL-18 is secreted earlier than IL-12 in spore-induced macrophage activation and NK cell IFN- γ production, we determined whether short-term priming with IL-18 or IL-12 was sufficient to achieve full activation of NK cells during stimulation with *B. anthracis* spores. A 4-h priming of splenocytes with IL-18 before spore stimulation followed by neutralization of IL-18 for the remaining incubation period with spores was sufficient to reach similar concentrations of IFN- γ to those obtained in the absence of IL-18 neutralization. In contrast, IL-18 neutralization for the entire length of spore-incubation significantly decreased IFN- γ production (Figure 2F). However, similar short-term priming with IL-12, followed by neutralization of IL-12 for the remaining incubation period with spores, only partially restored the IFN- γ response compared with spore-incubation without IL-12 neutralization (Figure 2F). Thus *B. anthracis* spores induce IL-18 signaling as a primary event that probably synergizes with IL-12 signaling which needs to be effective for a longer period to activate IFN- γ secretion by NK cells. Both IL-12 and IL-18 are therefore essential for IFN- γ production by NK cells in response to *B. anthracis* spores.

Spore recognition by macrophages triggers downstream signaling pathways that are dependent on MyD88, an adapter protein essential not only for the induction of inflammatory cytokines triggered by TLRs, but also for signaling downstream to IL-18 and IL-1 receptors. Splenocytes from MyD88-deficient mice cannot produce IFN- γ in response to *B. anthracis* spores [10]. To identify the cells on which the MyD88 adapter protein is required, we performed mixed experiments co-culturing macrophages and NK cells from WT or MyD88-deficient mice. NK cells deficient in MyD88 did not produce IFN- γ ; this is most likely due to the defect in IL-18 downstream signaling as IL-18 is central in this system of NK cell activation (Figure 2G). Macrophages from MyD88-deficient mice were also impaired in their capacity to help NK cells to produce IFN- γ following spore stimulation. IL-12 production was strongly decreased (Figure 2H, left panel), thus inhibiting IFN- γ production (Figure 2H, right panel). These results demonstrate that MyD88 is implicated both in the macrophage — through recognition of *B. anthracis* spores by yet to be characterised pathogen pattern-based receptors — and in the NK cells — through activation of the IL-18 signaling pathway.

Dissociation of NK cell functions by ET versus global inhibition by LT

As *B. anthracis* toxins secreted by the nascent bacilli upon spore germination could subvert the innate immune response to spores at the initial step of infection, the effects of toxins on spore-induced IFN- γ production were evaluated.

The toxins interfered with contact-dependent signaling, as the spore-induced increase in RAE-1 expression on BMDMs was efficiently downregulated by ET or LT-treatment (Figure 1G).

The toxins also impaired cytokine-dependent signaling. LT disrupted the ability of splenocytes stimulated with *B. anthracis*

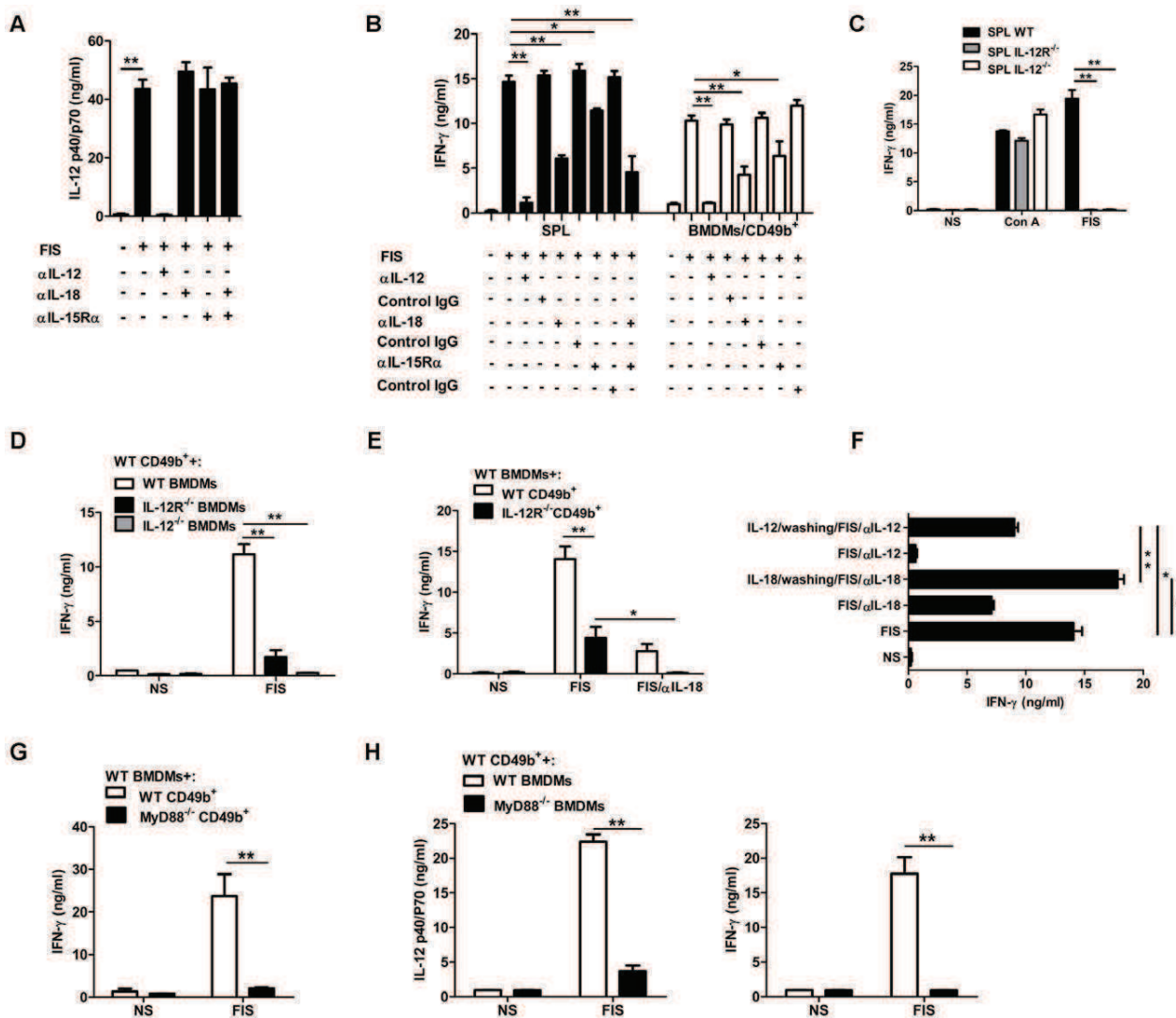


Figure 2. Network of cytokine dependence of NK cell activation by *B. anthracis* spores. Effect of neutralization of IL-12, IL-18 or IL-15R α on (A) IL-12p40/p70 concentration in culture supernatants of FIS-stimulated BMDMs or (B) IFN- γ production by splenocytes (SPL; left panel), or purified CD49b⁺ cells co-cultured with BMDMs (right panel). (C) Splenocytes (SPL) from wild-type (WT), IL-12R^{-/-} or IL-12^{-/-} C57BL/6 mice were stimulated with FIS, or ConA as a positive control. (D) CD49b⁺ cells from WT C57BL/6 mice were co-cultured with BMDMs from IL-12R^{-/-} or IL-12^{-/-} C57BL/6 mice in the presence of FIS. (E) CD49b⁺ cells from WT or IL-12R^{-/-} C57BL/6 mice were co-cultured with BMDMs from WT C57BL/6 mice in the presence of FIS with or without IL-18 neutralizing antibody. (F) Effect of short-term priming with IL-12 or IL-18 on spore-stimulation of splenocytes; corresponding cytokine neutralization was maintained for the remainder of the assay. (G) Purified CD49b⁺ cells from WT or MyD88^{-/-} C57BL/6 mice were co-cultured with BMDMs from WT C57BL/6 mice in the presence of FIS; IL-12 (left panel), or IFN- γ (right panel) production. For all experiments with purified CD49b⁺ cells, no IFN- γ was detected after direct stimulation with spores (D, E, G, H; data not shown). For all experiments, values are mean \pm SD for at least three measurements and are representative of at least three independent experiments. Significant differences between experimental conditions are indicated with asterisks (t test; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). doi:10.1371/journal.ppat.1002481.g002

spores to produce both IL-12 and IFN- γ , in a dose-dependent manner (Figure 3A and 3B); doses as low as 1 ng/ml and 0.1 ng/ml, respectively, significantly inhibited IL-12 and IFN- γ secretion. The addition of IL-12 or IL-18 did not restore LT-inhibited IFN- γ secretion (Figure 3C). Cell viability was unaffected (Figure 3I). These results suggest that LT blocks the NK cell response to IFN- γ inducing stimuli by interfering with IL-12 and IL-18 signaling.

To explore the direct effects of LT on NK cells and the mechanisms of inhibition of IFN- γ production by LT, purified NK cells were co-stimulated with IL-12 and IL-18 in the absence of accessory cells. As expected [33], this resulted in abundant IFN- γ

production (Figure 4A and 4B; PA only) and rapid phosphorylation of p38, ERK1/2, and JNK MAPK (Figure 4C). IFN- γ secretion by IL-12/IL-18-stimulated purified NK cells was totally inhibited with LT in a dose-dependent manner (Figure 4A); statistically significant inhibition was observed from doses as low as 1 ng/ml in these conditions of strong stimulation. LT inhibited p38, ERK1/2, and JNK MAPK phosphorylation (Figure 4C). The viability of NK cells was unaffected by LT treatment, even at the highest dose of 100 ng/ml over the 18 h culture period (Figure 4D). Assessment of metabolic activity using the MTS assay (which measures the activity of mitochondrial deshydro-

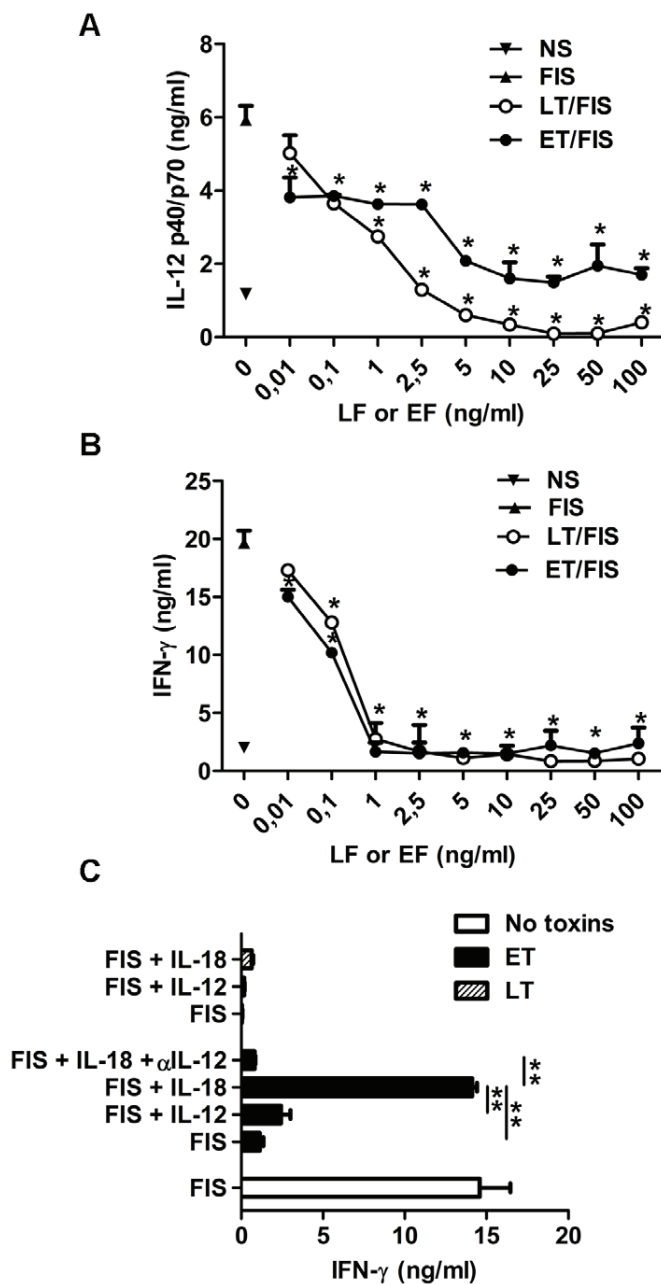


Figure 3. Differential inhibition by ET and LT of the spore-induced IL-12 and IFN- γ production by splenocytes. IL-12p40/p70 (A) and IFN- γ (B) production by splenocytes pre-incubated for 1 h with PA and increasing concentrations of LF or EF; spore stimulation was then performed as in Figure 1A in the presence of toxins. (C) Similar incubation conditions as in (A,B) with either addition of rIL-18 or rIL-12p70, or IL-12 neutralization. The data represent mean cytokine concentrations of triplicates in culture supernatants (\pm SD) representative of three independent experiments. T test; *, $P < 0.05$ compared with the group incubated with FIS without toxins. doi:10.1371/journal.ppat.1002481.g003

genes) showed a reduction at 1 ng/ml and reached a plateau from 10 ng/ml with a *circa* 50% decrease (Figure 4D). Metabolic activity was thus low in LT-treated NK cells, whereas viability was maintained.

NK cells possess a dual function, cytokine secretion and natural cytotoxicity towards specific targets [1]. We determined whether LT could also alter the cytotoxic activity of NK cells. LT significantly reduced the ability of NK cells to kill the mouse YAC-

1 lymphoma target cell *in vitro* (Figure 5A). Thus, our results show that NK cells are highly sensitive to LT subverting both functions, leading to a strong inhibition of cytokine secretion and natural cytotoxicity.

Similarly, ET disrupted the ability of splenocytes stimulated with *B. anthracis* spores to produce both IL-12 and IFN- γ in a dose-dependent manner (Figure 3A and 3B). A dose of 10 pg/ml significantly inhibited both IL-12 and IFN- γ secretion, whereas the

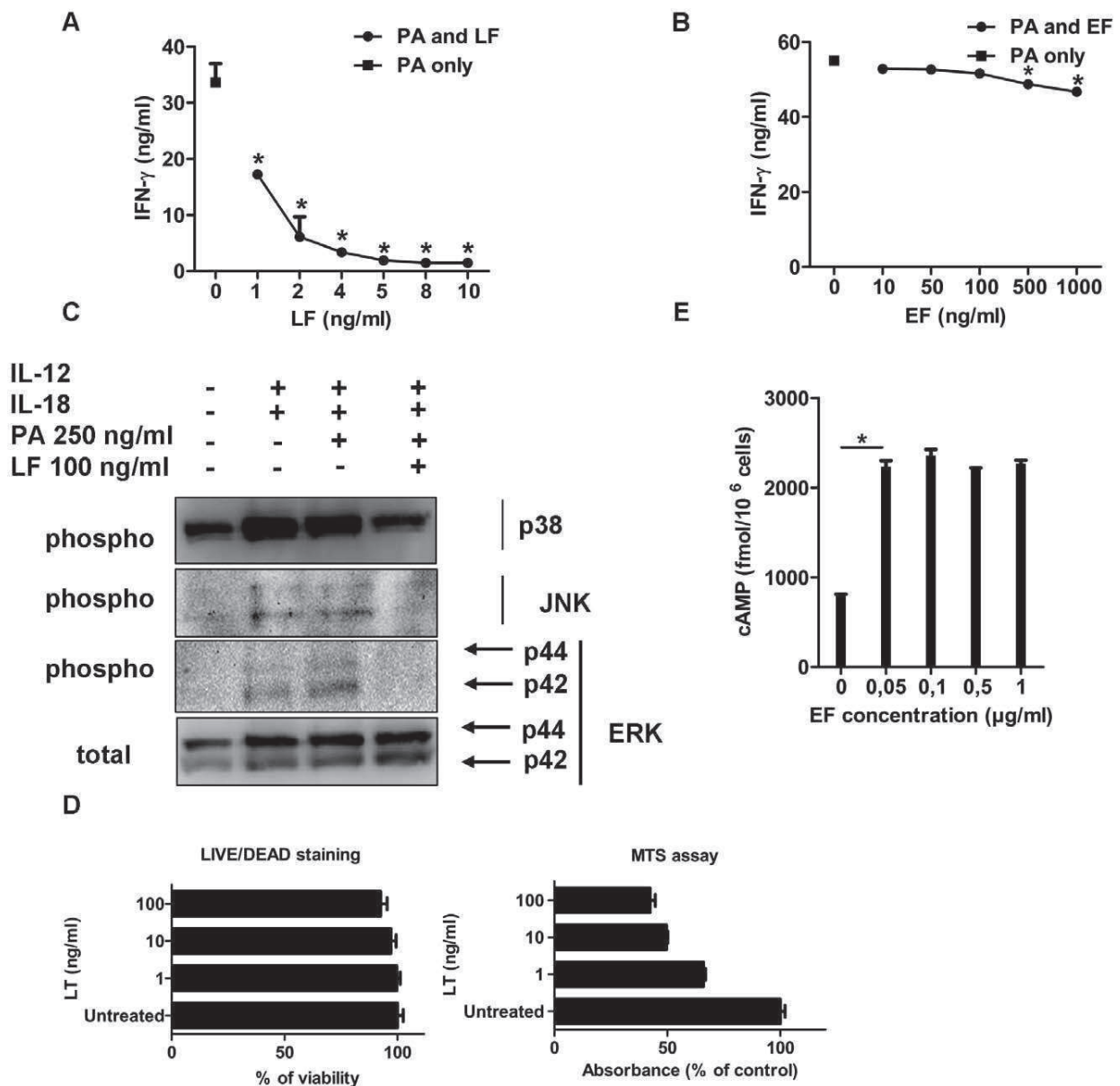


Figure 4. Impairment of IFN- γ production by LT in purified NK cells, contrasting with absence of effect by ET. (A,B) IFN- γ production by purified CD49b⁺ cells pre-treated for 1 h with PA and increasing concentrations of LF or EF and then stimulated for the whole incubation time with rIL-12 and rIL-18 in the presence of toxins. Data are mean \pm SD of triplicates and are representative of one experiment of three performed; SD values are hidden by symbol size. T test; *, $P < 0.05$ compared with the group incubated with PA only. **(C)** Inhibition of p38, JNK and ERK phosphorylation by LT in purified CD49b⁺ cells activated by rIL-12 and rIL-18 for 10 min; total ERK1/2 was used as loading control. Data represent one of at least two independent experiments. **(D)** NK cell viability (left panel; Live/Dead Cell Staining) and metabolic activity (right panel; MTS assay) after 18 h incubation with LT. *, $P < 0.05$ compared to the untreated group. **(E)** Intracellular cAMP production by purified CD49b⁺ cells treated with ET for 1 h. Data are mean \pm SD of triplicates per condition and are representative of one experiment out of three. T test; *, $P < 0.05$ compared with the untreated group.

doi:10.1371/journal.ppat.1002481.g004

basal secretion IL-12 was not inhibited (Figure 3A). The addition of IL-12 during spore stimulation did not restore the IFN- γ secretion (Figure 3C). In contrast, the ET-mediated inhibition was reversed by addition of IL-18 (Figure 3C). This was related to the persistence of a basal IL-12 secretion, as addition of neutralizing antibodies for IL-12 abolished restoration of IFN- γ production by recombinant IL-18 (Figure 3C). These results strongly suggest that ET blocked IFN- γ production by acting mainly on macrophages, as NK cells were still functional and able to secrete IFN- γ .

To explore in detail the direct effects of ET on IFN- γ secretion inhibition in NK cells, IL12/18-stimulated purified NK cells were exposed to graded doses of ET in the absence of accessory cells. ET did not inhibit IFN- γ production at doses up to 100 ng/ml, and only slightly at the high dose of 1 μ g/ml (Figure 4B), despite expression of adenylate cyclase activity, detected by a marked increase in intracellular cAMP (2.8-fold higher than in untreated IL-12/IL-18-stimulated purified NK cells) (Figure 4E). In contrast, ET significantly reduced the ability of NK cells to kill the YAC-1

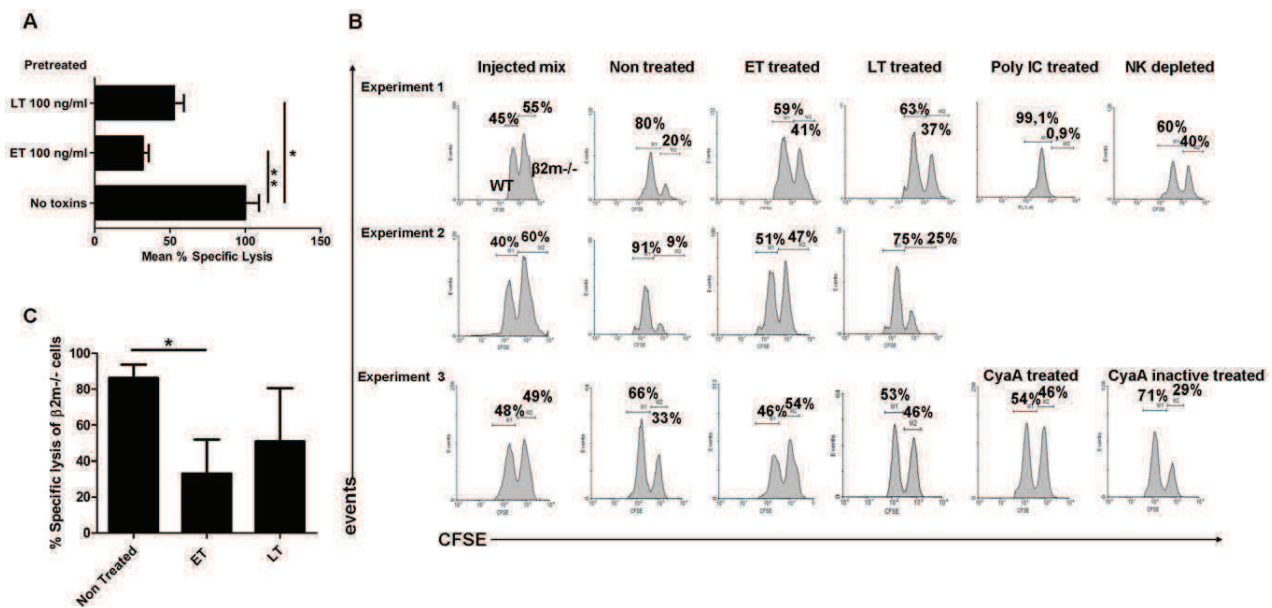


Figure 5. ET efficiently inhibits NK cell cytotoxic activity *in vitro* and *in vivo*. (A) Pre-incubation of purified CD49b⁺ cells with ET and LT inhibits lysis of YAC-1 target cells. Data represent mean \pm SD (n=3) of one of at least three independent experiments. T test; *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with the no-toxin group. (B) *In vivo* effect of ET and LT on the natural cytotoxic activity of NK cells: C57BL/6 wild-type and syngeneic MHC class I-deficient $\beta 2m^{-/-}$ splenocytes were differentially labeled with CFSE and adoptively transferred intravenously in equal number ("injected mix") into C57BL/6 syngeneic wild-type recipients; elimination of the MHC class I-deficient cells (CFSE high) was quantified 16–20 h later in the spleen and confirmed to be mediated by the NK cell population of the recipients, either after *in vivo* NK cell activation by poly:(IC) injection, or after *in vivo* NK cell depletion through injection of anti-NK1.1 antibodies (experiment 1). The effect on elimination of the MHC class I-deficient cells of ET, LT (experiments 1 to 3) or the toxin CyaA of *Bordetella pertussis* (or its inactive mutant CyaE5) (experiment 3) was then quantified: all toxins were injected intravenously 8 h prior CFSE-labeled mixed cell inoculation. Controls were injected with PA, EF, or LF only; MHC class I-deficient cells were eliminated as in the non-treated recipients (Figure S1D). Data represent histogram plots from three independent experiments showing relative percentages of the high (MHC class I-deficient) and low (normal) CFSE cell populations. (C) Mean percent specific lysis of MHC class I-deficient cells of 3 independent assays performed. The percent specific lysis was calculated as described in Materials and Methods. T test; *, $P < 0.05$ compared to the untreated group. doi:10.1371/journal.ppat.1002481.g005

target cells *in vitro*, exhibiting an even stronger inhibition capacity when compared with the effects of a similar dose of LT (Figure 5A).

The above results show that: (i) ET and LT similarly disrupt IFN- γ production by spore-stimulated splenocytes, but the mechanism of inhibition is different for each toxin; LT acts both on macrophages and NK cells, whereas ET acts on macrophages, and (ii) both ET and LT directly alter the innate ability of NK cells to exert their natural cytotoxicity function.

During anthrax infection, *B. anthracis* toxins are present in the infected tissues and circulate in the host vascular system. To evaluate the functional consequences on the natural cytotoxic activity of NK cells *in vivo*, we exploited an *in vivo* model of NK cell cytotoxic activity relying on the capacity of NK cells to recognise and eliminate MHC class I-deficient cells. Equal ratios of MHC class I-deficient splenocytes (from C57BL/6 $\beta 2m^{-/-}$, high CFSE labeling) and wild-type C57BL/6 MHC class I-expressing splenocytes (low CFSE labeling) (Figure 5B; "injected mix") were injected intravenously into syngeneic wild-type C57BL/6 mice. The elimination of the MHC class I-deficient $\beta 2m^{-/-}$ cells was quantified in the spleen relative to the MHC class I-expressing cells [34]. In this *in vivo* model, MHC class I-deficient $\beta 2m^{-/-}$ cells are rapidly eliminated 16–24 h following adoptive transfer, through the natural cytotoxicity function of NK cells (Figure 5B and 5C; non-treated; cytotoxicity of 94%). As controls, *in vivo* activation of NK cells by injection of the classical NK cell cytotoxic activator poly:(IC) [35] led to elimination of the MHC class I-deficient cells (CFSE high) (Figure 5B). In contrast, *in vivo* depletion

of NK cells led to persistence of MHC class I-deficient cells (Figure 5B).

Pretreatment of mice with ET (EF+PA) by intravenous inoculation drastically inhibited clearance of the MHC class I-deficient cells (CFSE high) (Figure 5B and 5C; remaining cytotoxicity of 27%). This effect was related to the adenylate cyclase activity of EF, as the *Bordetella pertussis* toxin CyaA, which has a similar enzymatic activity, also inhibited the elimination of the MHC class I-deficient cells (Figure 5B). EF, LF or PA alone, and a mutated enzymatically inactive CyaA did not modify the capacity of NK cells to specifically eliminate the MHC class I-deficient cells (Figure 5B and S1D). LT (LF+PA) also decreased MHC class I-deficient cell clearance, albeit to a lesser extent (Figure 5B; remaining cytotoxicity of 51%). These results demonstrate the high efficiency of *B. anthracis* toxins, especially ET, in impairing the natural cytotoxicity of NK cells *in vivo*.

CD49b⁺ and F4/80⁺ cells are rapidly recruited to the draining lymph nodes upon infection with *B. anthracis*

NK cells patrol the host tissues to detect and react to any danger signal. No data are available on their involvement during *B. anthracis* infection. We therefore visualised *in vivo* NK cell recruitment into the initial infectious foci and the draining lymph node. Biphotonic imaging was performed on the infected ear of mice after inoculation with spores of an encapsulated toxin-deficient *B. anthracis* strain (due to confinement restrictions, these experiments could not be performed with encapsulated toxin-

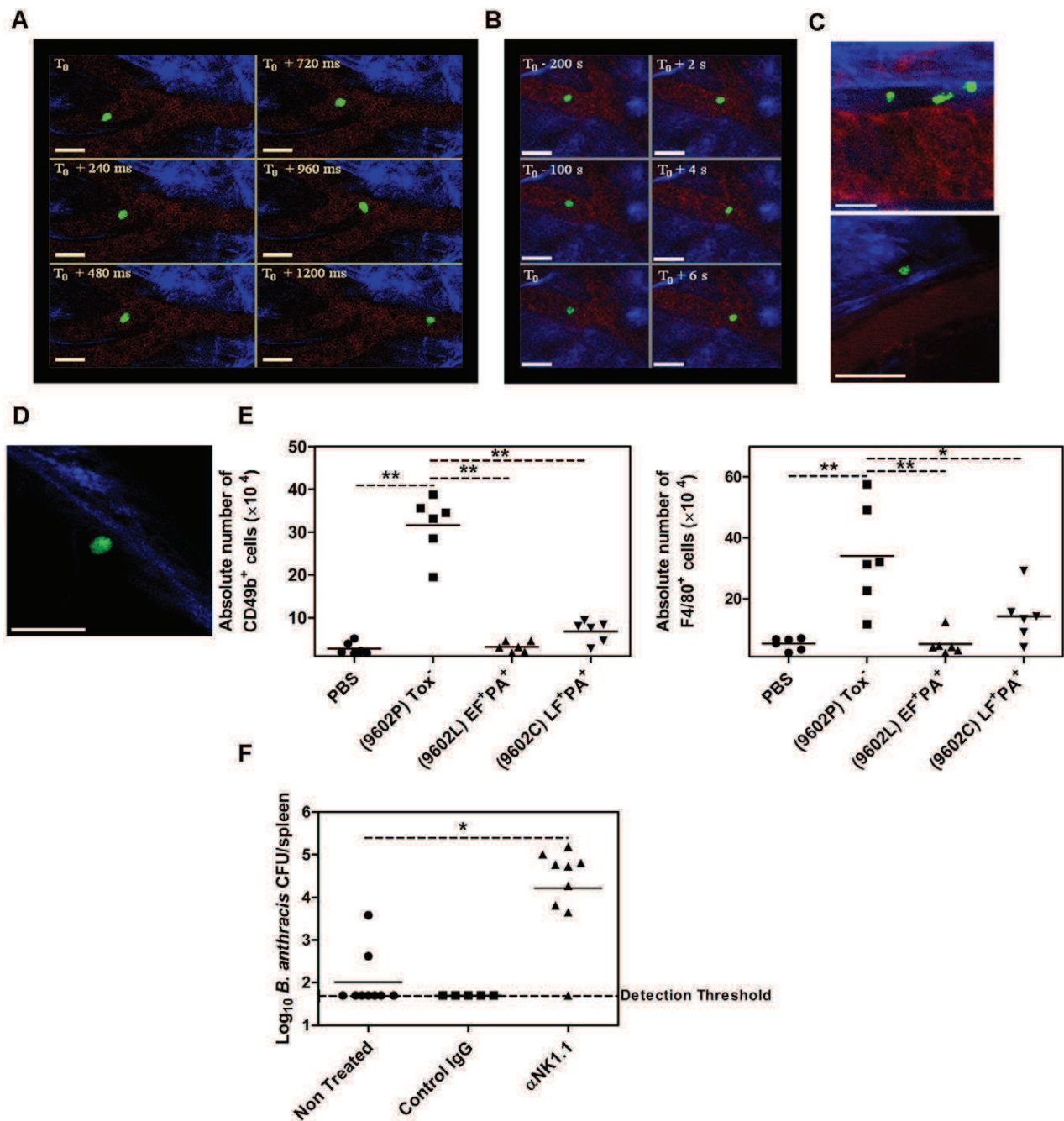


Figure 6. Recruitment and role of NK cells during *B. anthracis* infection and impact of *in vivo* toxin production. (A) Circulating NK cells 5 h post-inoculation, viewed by biphoton imaging; dermal collagen in blue (SHG), vascular flow in red (rhodamine B) and NK cells in green (CFSE); scale bar = 20 μm; time-scale in milliseconds indicated on each image. (B) Adherent, then rolling NK cell 5 h post-inoculation; scale bar = 20 μm; time-scale in seconds indicated on each image. (C) Extravasated NK cells at 18 h post-inoculation; scale bar = 10 μm (top), 40 μm (bottom). (D) Subcapsular NK cell in the cervical lymph node draining the infected ear 18 h post-inoculation; NK cells in green (CFSE) and capsular collagen in blue (SHG); scale bar = 20 μm. Data representative of 3 mice. (E) Absolute numbers of CD49b⁺ (left panel) and F4/80⁺ cells (right panel) in the cervical lymph node draining the site of cutaneous infection with spores of the 9602P(PA-EF+LF+), 9602L(PA-EF+LF-), 9602C(PA-EF-LF+) strains 24 h post-inoculation ($2.91 \pm 0.03 \log_{10}$ CFU per mouse). Controls were injected with PBS. Each symbol represents the value for an individual mouse; horizontal lines indicate the mean value for each group. Data are pooled from two independent experiments. T test; ** $P < 0.01$ as compared with the 9602P-injected group. (F) *In vivo* effect of NK cell depletion on systemic bacterial dissemination in the spleen. Bacterial load was determined 18 h after infection into the ear with spores of the 9602P strain ($3.05 \pm 0.29 \log_{10}$ CFU per mouse). Controls were injected with PBS. Each symbol represents the value for an individual mouse; horizontal lines indicate the mean value for each group. Data are pooled from two independent experiments. T test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ as compared with the non-treated group. doi:10.1371/journal.ppat.1002481.g006

secreting strains); visualisation of the NK cells was carried out through intravenous adoptive transfer of CFSE-labeled purified NK cells in mice whose blood vascular system was labeled through injection of dextran-rhodamine (Figure 6A–D). During the first 5 h of infection, NK cells were observed circulating in the ear capillaries (#20 μm diameter) in both infected and control ears (Figure 6A). Occasionally, long-term (more than 6 sec) interaction of NK cells with the capillary endothelium could be observed in the infected ear (Figure 6B). At 24 h of infection, NK cells were observed in the infected ear tissue, outside the vascular bed in the collagen-rich tissue (as visualised in blue by the second harmonic), either close to the vascular lining (Figure 6C, top), or at a distance (Figure 6C, bottom). At this time of infection, NK cells began to be observed in the capsular sinus of the draining lymph nodes (Figure 6D). Thus, infection with spores of *B. anthracis* triggers recruitment of NK cells into the local site of infection and further migration into the subcapsular sinus of the draining lymph node, where these cells could exert their functions.

We then determine the early *in vivo* impact of toxin secretion by nascent bacilli on the local NK cell response. To this end, we characterised the recruitment of NK cells and macrophages into the draining lymph node at 24 h of infection with the encapsulated toxin-deficient *B. anthracis* strain, and its encapsulated derivatives expressing either ET or LT (Figure 6E). The total number of lymphoid cells and the percentage of F4/80⁺ cells and CD49b⁺ cells was increased in the draining lymph node of the encapsulated toxin-less infected mice, compared with the lymph node from PBS-injected mice (data not shown). Compared with an uninfected lymph node, the absolute number of CD49b⁺ cells (Figure 6E, left panel) and F4/80⁺ cells (Figure 6E, right panel) in the infected draining lymph nodes significantly increased by nine-fold and six-fold respectively; $p < 0.01$). Production of either ET or LT during infection with the encapsulated strains 9602L(EF+PA+) or 9602C(LF+PA+) led to a significant decrease in the number of CD49b⁺ and F4/80⁺ cells in the infected lymph node, as compared with lymph nodes from mice infected with the encapsulated toxin-deficient strain (Figure 6E; $p < 0.01$). These results clearly indicate that infection with *B. anthracis* spores is recognized by the innate immune system, leading to early recruitment of NK cells into the cutaneous tissue, and recruitment of NK cells and macrophages into the draining lymph node. Through the action of its toxins, *B. anthracis* blocked recruitment of both NK cells and macrophages.

To define the role of NK cells in *B. anthracis* infection, the effect of *in vivo* NK cell depletion was characterised. Accelerated systemic dissemination of the bacteria from the site of infection was observed, with early bacterial seeding of the spleen in NK-depleted mice *versus* control infected mice (Figure 6F). This result demonstrates the *in vivo* role of NK cells in controlling early *B. anthracis* dissemination.

Discussion

In the present study, we have provided insight into the mechanisms of cytokine and cellular signaling that enable *B. anthracis* spores to efficiently drive IFN- γ production by NK cells. We also showed how *B. anthracis* toxins may allow the bacteria to avoid immune clearance by altering cytokine production and natural cytotoxicity.

The communication between NK cells and spore-activated macrophages was both cytokine- and contact-dependent and involved engagement of the NKG2D receptor. Our data indicate that macrophage-derived cytokines alone, or direct stimulation of NK cells by *B. anthracis* spores alone, are not sufficient to drive

activation of NK cells, as assessed by CD69 and IFN- γ expression. Although IL-12 was secreted by spore-stimulated macrophages, NK cell activation did not occur when cellular interactions between NK cells and macrophages were prevented. Thus, cell-cell contact was a critical factor in macrophage/NK-cell interactions. Contact dependency involved at least engagement of the activating NKG2D receptor with one of its main ligands on the macrophage, RAE-1 [36], whose expression was upregulated upon spore stimulation. Stimulation with various TLR agonists leads to surface expression of RAE-1 on macrophages [37]. RAE-1-NKG2D interactions contribute to IFN- γ production and provide a molecular mechanism by which NK cells and infected macrophages communicate directly during an innate immune response to infection [38]. The requirement for direct contact between NK cells and macrophages for full NK cell activation might in part also be a manifestation of the dependency of NK cells on cytokine-mediated signals delivered when contact is established. For example, delivery to NK cells of IL-15 and IL-18 produced by macrophages and dendritic cells occurs in a synaptic manner, so that as soon as the cytokines are secreted, they are captured by the secreting or target cell [39,40]. Secreted IL-15, for example, is immediately bound by the IL-15 receptor- α expressed on the surface of the accessory cells and is presented to NK cells in a cell-contact dependent manner [41]. Similarly, IL-18 is delivered to NK cells through cell contact with dendritic cells [39]. The IL-12 receptor may also localise at the contact zone between NK cells and macrophages [4], indicating that direct contact might be pivotal for efficient delivery of IL-12 to NK cells [42]. Our data are thus consistent with the strict contact-dependency of NK-cell activation, as these three cytokines are induced under spore stimulation and are strictly required for NK cell activation.

We demonstrated a predominant implication of IL-12 and IL-18 in NK-cell activation by *B. anthracis* spores, and to a lesser degree of IL-15; these cytokines were secreted by the spore-stimulated macrophages. However, individually, IL-12, IL-15, and IL-18 failed to induce effector responses in purified NK cells. IFN- γ production was almost abolished when both signals from IL-15 and IL-18 were simultaneously absent. These observations strongly suggest a synergistic mechanism of action of IL-12 with IL-15 and/or IL-18. Endogenous IL-15 produced by LPS-activated monocytes works in concert with IL-12 for optimal IFN- γ production by NK cells [43]. Several studies have shown that IL-18 responsiveness is dependent upon IL-12 and *vice versa* for T cells [44,45]. IL-12 and IL-18 are considered important mediators of IFN- γ production by NK cells and T lymphocytes [46]. The molecular mechanism underlying the synergy between IL-18 and IL-12 may be explained in part by reciprocal modulation of cytokine receptor expression. Specifically, IL-18 upregulates IL-12R expression [47], whereas IL-12 upregulates expression of the IL-18R [48].

In our model, liberation of IL-18 was probably a primary event in response to *B. anthracis* spores. Short-term pretreatment with IL-18 prior to stimulation with spores fully restored IFN- γ production, even when IL-18 paracrine activity was later neutralized. In contrast, IL-12 was required for a longer time period to obtain full restoration of IFN- γ secretion. This may reflect differences in storage and delivery for these two cytokines. IL-18 is stored as a biologically inactive precursor in secretory organelles of the endolysosomal compartment and, upon stimulation, can be rapidly released into the extracellular milieu after cleavage by caspase-1 [49,50], whereas IL-12 needs to be synthesised and secreted along the classical secretory pathway [51].

Finally, our data emphasise the key role of IL-12 which is produced by spore-activated macrophages, and demonstrate that it acts both on NK cells and macrophages. Absence of the IL-12 receptor on NK cells reveals the secondary key role of IL-18. For macrophages, the absence of the IL-12 receptor greatly decreased their capacity to provide the necessary accessory signals to NK cells. Indeed, a general and critical role of IL-12 in potentiating the accessory function of myeloid antigen presenting cells has been suggested by Grohmann *et al* [52]. IL-12 is thus not only a connective element between accessory cells and lymphocytes, but also a key molecule for programming macrophage and dendritic-cell functions [53,54].

We demonstrated that the inflammatory response induced by *B. anthracis* spores requires MyD88-mediated signaling both on macrophages and NK cells. MyD88 is an adaptor protein which is essential for signaling downstream of many TLRs, and also of IL-18 and IL-1 receptors [55]. MyD88-implication in the NK cell response was thus expected, as IL-18 is crucial for NK cell activation by *B. anthracis* spores. On the other hand, MyD88-dependence of spore recognition by macrophages, leading to deficient IL-12 secretion and, by way of consequence, absence of NK cell activation, shows that it is pathogen-pattern based. However, the interactions between the components of the highly complex spore particle and TLRs or related receptors still need to be characterised in detail. Spore recognition most probably involve several receptors; knocking-out one or more TLRs has indeed been reported not to modify the biological response observed, either *in vitro* [10] or *in vivo* (Tod Merkel, personal communication).

IL-18 is a proinflammatory cytokine that belongs to the IL-1 cytokine family. IL-18 and IL-1 are related in terms of structure, processing, receptor and signaling pathways [56]. Secretion of the active form of both cytokines is dependent on caspase-1 activation that is required for the processing of the IL-1 and IL-18 precursors. Release of mature IL-18 depends on concomitant activation of caspase-1 and TLR engagement by pathogen-derived agonists [56]. This suggests that spore recognition is able to deliver both activation signals. IL-18 amplifies the innate immune response by inducing the expression of cytokines and chemokines such as IL-1 β , TNF α and IL-8. The macrophage cytokine response could thus be triggered both directly and indirectly by the spores.

B. anthracis toxins were highly efficient in subverting the innate immune response, triggered by *B. anthracis* spores through activation of macrophages and induction of IFN- γ secretion by NK cells. Even at very low doses, the toxins disrupted IFN- γ production by spore-stimulated splenocytes. They altered both contact-dependent and cytokine-dependent signaling. Both toxins reduced expression of RAE-1 on the surface of spore-stimulated macrophages, thus decreasing signaling through the activating receptor, NKG2D. Indeed, defects in the expression of RAE-1 molecules have been hypothesized to contribute to reduced NK cell function [57]. The mechanisms of inhibitory action for each toxin on cytokine secretion were different. LT targeted both macrophages and NK cells, whereas ET blocked the macrophage activating functions but did not affect the IFN- γ secretion capacity of NK cells. Impairment of IFN- γ production by ET depended mainly on inhibition of IL-18 production by macrophages, a primary event in NK cell stimulation. Basal IL-12 secretion by macrophages was not affected and was sufficient to drive normal amounts of IFN- γ secretion by NK cells when the external IL-18 concentration was restored.

A number of studies have addressed the effects of LT and ET on cytokine secretion and their consequences on immunity [18,58,59]. While LT inactivation of MKK signaling pathways

leads to almost invariable inhibition of the innate immune response, ET-induced cAMP increase results in a complex immunomodulatory effect. LT inhibits, whereas ET differentially regulates the release of pro-inflammatory cytokines in macrophages and DCs [22,60,61].

Our results on ET-induced IL-12 inhibition are consistent with previous reports of an inhibitory effect of ET on macrophages and DCs [22]. Of note is our observation that ET has a dominant effect on IL-18 secretion. Secretion of IL-18 by activated macrophages depends on the protease caspase-1 that converts the IL-18 precursor to the mature and biologically active cytokine [62,63]. Caspase-1 activation is induced by *B. anthracis* spores and has been suggested to play a critical role in host defences against *B. anthracis* infection *in vivo* [64]. LT has also been reported to induce caspase-1 activation which results in IL-1 β and IL-18 intracellular processing [64]. However, the release of these cytokines occurs as a passive event, resulting from cell death and lysis [65].

NKT cells are a specialized subset of T lymphocytes sharing both T cell and NK cell markers with the capacity to recognise microbial glycolipid antigens [66]. However, their modes of recognition are distinct from NK cells and their functions are quite different [67]. The effect of LT on NKT cells has recently been explored after stimulation with their classical cognate ligand, α -galactosylceramide [23]. LT was reported to induce an anergy-like unresponsiveness in NKT cells following stimulation *via* their T cell receptor [23].

One of the best characterised functions of NK cells is their natural cytotoxic activity against virus-infected cells or cells undergoing tumor transformation [35]. The present study showed that both ET and LT directly altered the innate ability of NK cells to exert their natural cytotoxic function, both *in vitro* and, most importantly, *in vivo*. Furthermore, ET exerted a much stronger inhibitory effect than LT. EF -the enzymatic moiety of ET- is an adenylate cyclase leading to elevated concentrations of intracellular cAMP [16]. We demonstrated that similar *in vivo* inhibition of the NK cell cytotoxic activity was also induced by the CyaA toxin of *Bordetella pertussis*. Thus, as a bacterial adenylate cyclase, CyaA toxin produces the same end-effect *i.e.* increase of intracellular cAMP [68]. These data thus strongly suggest that inhibition of NK-cell cytotoxic activity by ET is mediated *via* the activation of cAMP downstream pathways. We thus provide the first demonstration that the ET subverting action leads to dissociation in NK-cell function, which strongly blocks natural cytotoxicity without affecting IFN- γ secreting capacity. Its high efficiency stresses the impact this toxin may exert on anthrax pathogenesis. NK cell-associated receptors have been implicated in certain autoimmune diseases [69,70] and NK cells have been suggested to play a role in modifying T cell-mediated autoimmunity. As the cytotoxic activity of cytotoxic CD8 T cells shares at least in part, common mechanisms with NK cells [71], we believe these AMPc-elevating compounds could be of use to inhibit the deregulated or increased cytotoxic activities that underlie NK or CTL-dependent autoimmune pathology [72].

Our *in vivo* data show that NK cells are rapidly recruited into the cutaneous tissue infected by *B. anthracis*. Both NK cells and macrophages were detected early in the draining lymph node in the absence of toxin secretion. In contrast, production of either ET or LT during infection drastically inhibited this local immune response. The reduced inflammatory response could be related to the immunosuppressive activities of LT and ET [59]. By increasing the intracellular concentration of cAMP and cleaving MKKs, *B. anthracis* toxins have the potential to interfere with chemotactic signaling for neutrophils, T-cells and macrophages [14,20,73]. Considering that -in the context of anthrax infection- macrophages appear to afford protection to the host [14,74], it is not surprising

that *B. anthracis* has developed means of suppressing certain macrophage functions such as their migration to lymph nodes.

We furthermore demonstrated that NK cells controlled the infectious process, as *in vivo* NK cell depletion resulted in an increased bacterial dissemination to the spleen. Conceptually, NK cell depletion could mimic the consequences of NK cell inactivation by the toxins. Clearly, further experiments are needed to address how NK cells control *in vivo* spreading of bacteria during anthrax infection. In a previous study, we showed the central impact of ET on bacterial control of dissemination in the draining lymph node, both after cutaneous and inhalational infections [75]. The draining lymph node thus appears to be the key organ for delaying bacterial systemic dissemination. We postulate that this control most probably occurs through direct interactions between NK cells and accessory cells, resulting in IFN- γ production and macrophage activation of their bactericidal activity. NK cells respond to pathogens through both cytokine secretion and natural cytotoxicity. The relative impact of each NK function on the development of an infectious process depends on the type of infection [5]. Natural cytotoxicity has mainly been characterised against tumoral or virally-infected target cells [76]. Direct natural cytotoxicity to infected cells in bacterial infections has rarely been reported, primarily with intracellular pathogens (*Mycobacterium sp.*, *Listeria monocytogenes*; [5]). As *B. anthracis* is an extracellular pathogen, we hypothesise that NK cell cytotoxic activity may potentially occur either at the initial infection step, when a proportion of the infecting spores are phagocytosed by accessory resident cells such as macrophages or dendritic cells - which could provide the necessary contact- and cytokine-dependent signaling to the NK cells, or, at a later stage of infection, through recognition by NK cells of cellular stress induced by the toxins. The potential role of NK cell cytotoxicity during *B. anthracis* infection remains to be explored in depth.

The present study is the first to investigate the direct modulation of NK cell functions, IFN- γ producing capacity and natural cytotoxicity, by *B. anthracis*, and their subversion by ET and LT. Our findings exemplify the delicate balance between stimulation of the initial host control mechanisms by *B. anthracis* spores and the bacterial evasion strategies to overcome these innate host defences. NK cells are important immune effectors for preventing microbial invasion and dissemination [77], performing their surveillance function and establishing intercellular communications at an early stage of infection. The model we propose hypothesises that interactions of macrophages and dendritic cells with the infecting spores and spore components would lead to NK cell activation and IFN- γ production, through a combination of signals derived from intercellular contacts with macrophages and from cytokines secreted by these cells. The accumulation of NK cells and macrophages in the appropriate cytokine environment of the infected lymph nodes will thereby amplify the inflammatory response. Such a positive feedback loop is likely to be important in the control and pathogenesis of anthrax. Furthermore, by secreting toxins, nascent *B. anthracis* bacilli will alter spore-induced contact-dependent signaling and cytokine production. This will prevent efficient immune-cell contacts and initiation of inflammation and inflammatory-cell recruitment into the infected draining lymph node, resulting in successful bacterial colonization and spreading of infection.

Materials and Methods

Ethics statement

All the animal experiments described in the present study were conducted at the Institut Pasteur according to the European

Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm) and were approved by the animal care and use committee at the Institut Pasteur. All efforts were made to minimize suffering.

Bacterial strains and mice

RPLC2 is a Sterne derivative that produces inactive lethal and edema factors mutated in their enzymatic site [78]. The 9602P (Δ -*pagA*), 9602C (Δ -*cya*) and 9602L (Δ -*lef*) strains [75] are derivatives of the highly virulent natural human isolate 9602 [79]. RPLC2 spores were produced, purified on Radioselectan (Renografin 76%, Schering) and formaldehyde-inactivated as previously described [80,81]. Formaldehyde-inactivated spores (FIS) were quantified using a Malassez counting chamber and inactivation was confirmed by plating on BHI agar. Heat inactivation was carried out as previously described [10]. *B. subtilis* strain SMY was a kind gift from Abraham L. Sonenshein (Department of Molecular Biology and Microbiology, Tufts University School of Medicine, Boston, USA) and spore inactivation was performed as for *B. anthracis*. The germination-deficient mutant on the 7702 background was constructed by inactivation of the *awlD*, *slxB* and *awlJ1* genes through double crossing-over insertion of antibiotic cassettes (spectinomycin, erythromycin and kanamycin respectively) using techniques as previously described [82] (Manuel Lopez-Vernara, Fabien Brosier and Michèle Mock, unpublished results). Germination was decreased by at least 6 log₁₀ on BHI agar. The inoculum used in the *in vitro* cell infection assays (2×10^6 spores per well, as assessed by counting in a Malassez chamber) did not give rise to any CFU upon numeration.

Six- to 10-week-old C57BL/6 and FVB female mice were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). CD1d-deficient C57BL/6 mice lacking both CD1d1 and CD1d2 [83] were a kind gift from Dr Claire-Lise Forestier (G5 Parasite Virulence, Institut Pasteur, Paris, France). β 2m-deficient C57BL/6 mice, B6.129P2-B2m^{tm1Unc}/J (Jackson Laboratory), were a kind gift from Dr Matthew Albert (Dendritic Cell Immunobiology, Institut Pasteur, Paris, France). The IL-12R β 2-deficient and IL-12p35/p40-deficient C57BL/6 mice (both from Jackson Laboratory) were kindly provided by Dr Selina Keppler (University Hospital Freiburg, Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Freiburg). The MyD88-deficient mice obtained from the laboratory of Shizuo Akira were backcrossed eight times to the C57BL/6 background [55] and bred in the central animal facility of the Pasteur Institute. The animals were housed in the animal facilities of the Institut Pasteur licensed by the French Ministry of Agriculture and complying with the European regulations. The protocols were approved by the safety committee at the Institut Pasteur according to the standard procedures recommended by the animal care and use committee at the Institut Pasteur.

Cell activation assay and immunodetection of cytokines

Single spleen cell suspensions were prepared by mechanical disruption on a cell strainer (70 μ m pore diameter, BD Biosciences, Bedford, USA) in Dulbecco's D-PBS (Invitrogen). Red blood cells were lysed using Hemolytic Gey's Solution as previously described [10]. NK cells were purified using the EasySep Mouse panNK (CD49b) Positive Selection Kit (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada) according to the manufacturer's protocol. Flow cytometry analysis showed the purity of NK cells to be more than 90%. Further purification (>98%) was performed using a MoFlo cell sorter (Beckman-Coulter). Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were obtained from the femur of mice after differentiation for 8 to 10

days in RPMI complete medium supplemented with 20 ng/ml M-CSF (PeproTech, Levallois-Perret, France) on bacterial petri dishes. BMDMs were mature as assessed by expression of the F4/80 surface marker (consistently over 90% F4/80 positive). Cell enumeration and viability (>90%) was routinely assessed by acridine orange/propidium iodide staining.

All cell cultures were carried out in RPMI 1640 medium+Glu-taMAXTM I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; BioWest, Nuaille, France), 100 µg/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen), and 50 µM 2-mercaptoethanol (Invitrogen). All reactivation conditions were performed in triplicate.

Cell activation was performed by incubating either 2×10^5 splenocytes, or 2×10^5 purified NK cells with 2×10^5 BMDM, with 2×10^6 spores (or polystyrene latex beads – 1.1 µm mean particle size-, Sigma, Aldrich) in a final volume of 200 µl in 96-well tissue culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) for 1 to 3 days. Direct stimulation of purified NK cells was performed by adding to the culture medium endotoxin-free mouse rIL-12 (10 ng/ml, BD Pharmingen) and endotoxin-free mouse rIL-18 (20 ng/ml, MBL International) for 18 h. In some experiments, NK cell activation was performed in 96-well Transwell plates (0.4 µm pore diameter; Corning Costar, NY); BMDMs (3.1×10^5 cells in 235 µl) mixed with FIS (3.1×10^6) were seeded into the outer chamber; CD49b⁺ NK cells (3.1×10^5 cells in 75 µl) were added either directly to the outer chamber, or placed into the inner chamber along with or without 3.1×10^6 FIS. Cytokine and receptor function were blocked by addition of the following azide-free, low-endotoxin anti-mouse cytokine or receptor-specific mAbs: rat anti-mouse IL-12p40/p70 (5 µg/ml, clone C17.8, BD Pharmingen) and its isotype control (clone R35-95, BD Pharmingen), rat anti-mouse IL-18 (10 µg/ml, clone 93-10C, MBL International Corporation) and its isotype control (clone eBRG1, eBioscience), goat anti-mouse IL-15R α polyclonal (10 µg/ml, R&D Systems), armenian hamster anti-mouse NKG2D (10 µg/ml, clone C7, eBioscience) and its isotype control (clone eBio299Arm, eBioscience), rat anti-mouse RAE-1 (5 µg/ml, clone 199205, R&D Systems) and its isotype control (clone R35-95, BD Pharmingen), rat anti-mouse IFN- α (5 µg/ml, clone RMMA-1, PBL Biomedical Laboratories), rat anti-mouse IFN- β (5 µg/ml, clone RMMB-1, PBL Biomedical Laboratories), goat anti-mouse Nkp46 polyclonal (10 µg/ml, R&D Systems), rat anti-mouse IL-10 (10 µg/ml, clone JES5-2A5, BD Pharmingen), armenian hamster anti-mouse TNF- α (10 µg/ml, clone TN3-19.12, Sigma).

For analysis of the effects of the toxins, splenocytes were pre-treated before stimulation, for 1 h with rPA (250 ng/ml) and/or either rLF (0.01–100 ng/ml), -both a kind gift from Dr Bassam Hallis, HPA, Porton Down, UK-, or rEF (0.01–100 ng/ml) -a kind gift from Pr Wei-Jen Tang, University of Chicago, Chicago, USA. Purified CD49b⁺ NK cells were pre-treated before stimulation for 1 h with PA (250 ng/ml) and/or either LF (0.5–100 ng/ml) or EF (10–100 ng/ml), or PA (2500 ng/ml) and EF (500–1000 ng/ml). NK cell viability after toxin treatment was analyzed by using Live/Dead Cell Staining Kit (Invitrogen) and their metabolic activity was assessed by the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega).

In all cases, cell-free supernatants were removed at specific time points and frozen at –20°C before subsequent ELISA analysis for IFN- γ or IL-12. When mentioned, conditioned supernatants from FIS-activated BMDM were collected after a 24-h stimulation, transferred on purified CD49b⁺ NK cells and incubated for a further 48 h. ELISA was performed as previously described [10] using the following antibody pairs and protein standards (all from BD Pharmingen, Le-Pont-de-Claix, France): for IL-12p40/p70,

capture with mAb clone C15.6, detection with mAb clone C17.8, standard recombinant mouse IL-12 (p70); for IFN- γ , capture with mAb clone R4-6A2, detection with mAb clone XMG1.2, standard recombinant mouse IFN- γ .

Flow cytometry

Cell staining was performed with the following mAbs: anti-mouse CD69-fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone H1.2F3) (BioLegend, San Diego, USA) and its FITC-conjugated isotype control (Caltag laboratories), CD49b- phycoerythrin (PE) (clone DX5) (BD Bioscience, San Diego, CA), IFN- γ -FITC (clone XMG1.2) (BD Bioscience, San Diego, CA) and its FITC-conjugated isotype control (BioLegend), F4/80-allophycocyanine (APC) (clone BM8) (BioLegend), pan-RAE-1-PE (clone 186107) (R&D Systems) and its PE-conjugated isotype control (Caltag Laboratories). To obtain a single-cell suspension, collected cells were pre-treated in 5 mM EDTA/PBS to dissociate cell aggregates. Cells were subsequently washed and blocked for 10 min with anti-CD16/CD32 mAb (BioLegend) in FACS buffer (Dulbecco's PBS, 2% heat-inactivated FBS, 10 mM sodium azide) and then labeled with the appropriate antibodies. Dead cells were excluded during acquisition through staining with LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit according to the manufacturer's procedure (Invitrogen). For intracellular cytokine staining [84], cells were incubated with brefeldin A (5 µg/ml, Sigma, Aldrich) for the last 4 h of activation with the spores. After labeling with DX5-PE mAb, fixation in 2% paraformaldehyde and permeabilisation in 0.5% saponine, the cells were stained with anti-IFN- γ -FITC mAb for 30 min. Cell acquisition was performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience). NK cells were gated by their light scattering properties -forward (FSC) and side (SSC) scatter- that distinguished them from the macrophages (Figure S1A). Isotype controls Abs were used for each staining combination. A minimum of 10,000 events was acquired for analysis. Data were acquired and analyzed using CELLQUEST software (BD Bioscience). Figures were derived by free WinMDI Software (Version 2.8, Bio-Soft Net; WinMDI software [http://en.bio-soft.net/other/WinMDI.html]).

CFSE-based *in vitro* cytotoxicity assay

Natural cytotoxicity assay was performed as previously described [85]. Briefly, the mouse lymphoma YAC-1 target cells were labeled with 2.5 µM CFSE (Sigma, Aldrich) at 2×10^6 cells/ml for 8 min at room temperature. After dilution by 1:5 in complete medium and 2 washing steps, the CFSE-labeled target cells were resuspended in complete medium (4×10^4 cells/ml, 100 µl/tube) and mixed with positively selected CD49b⁺ cells at an effector/target cell ratio (E/T ratio) of 50:1 (final volume: 200 µl) in 5 ml Falcon round-bottom tubes (BD Bioscience). When necessary, CD49b⁺ cells were treated for 4 h with PA (250 ng/ml) and/or either LF (100 ng/ml) or EF (100 ng/ml), and then washed prior to mixing. The cells were then incubated in the presence of 10 ng murine rIL-2 (BioLegend) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C for 18 h. Cytotoxicity was then assessed by flow cytometry analysis after propidium iodide labeling. Negative controls were CFSE-labeled target cells without NK cells.

For data analysis, the CFSE-stained target cells were gated (R1) on SSC/FL1(CFSE) parameters and analyzed on FL1(CFSE)/FL3(Propidium iodide). For each sample 4000 events of R1 were collected. The percentage of specific target cell death was calculated as follows: [(dead CFSE-positive targets in the sample (%)-spontaneously dead CFSE-positive targets (%))/(100-spontaneously dead CFSE-positive targets)] \times 100.

In vivo cytotoxicity assay

Spleen cells from C57BL/6 and $\beta 2m^{-/-}$ C57BL/6 mice were labeled with 2 μM (C57BL/6) or 5 μM ($\beta 2m^{-/-}$ C57BL/6) CFSE, and equal cell numbers (10^6 ; “injected mix”) were co-injected intravenously into C57BL/6 mice recipients, either untreated or injected intravenously 8 h prior to cell inoculation with (i) LF (7.5 μg) or EF (7.5 μg) and PA (20 μg) or (ii) CyaA or the inactive mutant CyaE5 (15 μg) of *Bordetella pertussis* (a kind gift from Dr Daniel Ladant, Biochimie des Interactions Macromoléculaires, Institut Pasteur, Paris, France). Control mice received either EF or PA alone. *In vivo* NK cell depletion was performed by intravenous injection of 200 μg anti-NK1.1 mAb (clone PK136, Serotec, Oxford, United Kingdom). *In vivo* NK cell activation was performed by intravenous injection of 100 μg poly:(IC) (Invivo-gen). Single spleen cell suspensions were prepared 16 h later and the CFSE positive cell population was acquired by FACS as described above. The ratio of CFSE high *versus* CFSE low cells was determined and specific lysis was calculated as described [86]: $100 \times [1 - (\text{ratio of injected mix/recovery ratio})]$, where ratio = % CFSE low / % CFSE high.

MAPK phosphorylation and cAMP assays

Purified NK cells (10^6 cells) were incubated with PA (250 ng/ml), and/or LF (100 ng/ml) for 2 h at 37°C. Recombinant IL-12 (50 ng/ml) and IL-18 (100 ng/ml) were then added for 10 min, cells were washed twice with cold PBS and lysed on ice for 30 min with a total protein extraction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM sodium EDTA, 1 mM EGTA, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin) containing Complete protease and phosphatase inhibitor tablets as specified by the manufacturer (Roche Diagnostics). Total protein (50 μg as determined by the Bradford assay, Bio-Rad Laboratories) was resolved on 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in TBS containing 5% non-fat dried milk and 0.1% Tween 20. Protein detection was performed with polyclonal Abs directed against phospho-p38 MAPK, phospho-p42/44 (ERK 1/2) MAPK, phospho-JNK or total p42/44 (ERK 1/2) MAPK (all from Cell Signaling Technology). Total p42/44 (ERK 1/2) MAPK was used as loading control as previously described [87]. Bands were visualized with appropriate secondary HRP-conjugated Abs and SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce). When reprobed, membranes were first stripped by incubating in a stripping buffer (Gene Bio-Application Ltd.).

To determine the cAMP response generated by edema toxin, purified CD49b⁺ NK cells (10^6 cells) were incubated with PA (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and EF (0.05–0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), or PA (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and EF (0.5–1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 37°C for 1 h and then stimulated with rIL-12 (10 ng/ml) and rIL-18 (20 ng/ml). After 2 h of incubation, the culture medium was discarded and the cells were lysed with 0.1 M HCl. After centrifugation, the supernatants were collected and immediately stored at -80°C before analysis. Intracellular cAMP concentration was determined using a commercial cAMP EIA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer’s instructions.

Isolation of lymph node cells and flow cytometry

FVB mice were infected into the ear dermis with spores of the non-toxinogenic encapsulated 9602P (EF+LF+) strain, or the 9602L (EF+PA+) or 9602C (LF+PA+) strains. Cutaneous infections were performed under light anesthesia by injecting $2.91 \pm 0.03 \log_{10}$ spores per mouse in 10 μl of PBS into the dermis of the left ear as previously described [88]. 24 h later the cervical

lymph nodes draining the infected site were excised, placed into ice-cold saline solution and mechanically dissociated to obtain single-cell suspensions. Control lymph nodes were obtained from PBS-inoculated ears. Cell labeling was performed with APC-conjugated anti-F4/80 (BioLegend), anti-CD4-FITC (BD Pharmingen), anti-CD8-PE (BD Pharmingen), and PE-conjugated DX5 (eBioscience). Flow cytometry acquisition was performed as described above.

Effect of NK cell depletion upon *B. anthracis* infection

NK-cell depletion was performed in C57BL/6 mice by intraperitoneal injection of 200 μg of anti-NK1.1 antibody (clone PK136, Serotec, Oxford, United Kingdom) at 2 days and 1 day before infection. Depletion of NK cells (>95%) was verified in the spleen by flow cytometry. Control mice received an injection of 200 μg isotype-matched antibody (Sigma). Cutaneous infection in the ear was performed by injection of $3.05 \pm 0.29 \log_{10}$ spores of the 9602P strain. Spleens were removed aseptically 18 h post-inoculation and homogenized in 5 ml of PBS. The bacterial load in the resulting suspensions was determined by plating 100 μl of 10-fold dilutions onto BHI agar plates and is expressed as \log_{10} CFU per spleen.

Two-photon excitation fluorescence *in vivo* imaging

C57BL/6 mice were subcutaneously infected with 2×10^3 spores of the non-toxinogenic encapsulated *B. anthracis* strain in 10 μl of PBS into the external face of the right ear, while the same volume of PBS was injected in the left ear. Prior to imaging, 100 μg of rhodamine B 10 kD-dextran (Sigma) were administered by intravenous injection. Negatively selected NK cells (Negative selection mouse NK cell enrichment kit, StemCell Technologies) were labeled with 5 μM of CFSE and were injected intravenously (10^6 per mice) 4 h after infection. Ketamine-xylazine anesthetized mice were placed under the microscope with their ears maintained between cover glasses. The cervical lymph nodes draining the infected and the PBS-injected control ears were harvested from the recipient mice 24 h after infection, fixed with tissue glue to the plastic chamber containing PBS, and sequentially imaged. Two-photon excitation fluorescence (TPEF) imaging was performed using a LSM 710 Zeiss microscope. The excitation wavelength is 854 nm, allowing epicollection of second-harmonic generated signal (SHG) at 427 nm quasi specific of collagen. Other epicollected signals were intravenous rhodamine B and CFSE-stained NK cells fluorescence. Image acquisition and analysis were performed by using ZEN 2008 software (Zeiss).

Statistical analysis and software

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism software. Unless otherwise noted, results are expressed as mean values \pm standard deviation. The student’s t-test was used to determine significance ($P < 0.05$).

Supporting Information

Figure S1 Controls for NK cell activation, cytokine secretion and natural cytotoxicity. (A) FACS analysis of surface CD69 and intracellular IFN- γ expression in CD49b⁺ cells in the presence of spore-stimulated BMDMs. NK cells were gated by their light scattering properties -forward (FSC) and side (SSC) scatter- that distinguished them from the macrophages (left panels), then dead cells were excluded along the FL4 channel through staining with LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). Isotype-matched controls Abs were used for each staining combination (see Materials and Methods). (B) Effect of

neutralization of IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-10 and NKp46 on IFN- γ production by splenocytes. **(C)** Cell viability of splenocytes 18 h after incubation with PA+LF, or PA alone, LF alone compared with untreated splenocytes, as assessed by Live/Dead staining. **(D)** Absence of effect on the elimination of MHC class I-deficient $\beta 2m^{-/-}$ splenocytes for the control groups receiving PA alone, EF alone or LF alone (see Figure 5B). (TIF)

Acknowledgments

We wish to warmly thank Selina Keppler for kindly providing the IL12 and IL-12R-deficient mice, Claire-Lise Forestier for providing the CD1-deficient mice, Matthew Albert for providing the $\beta 2m$ -deficient mice,

References

- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 503–510.
- Schoenborn JR, Wilson CB (2007) Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96: 41–101.
- Chiesa S, Mingueneau M, Fuseri N, Malissen B, Raulet DH, et al. (2006) Multiplicity and plasticity of natural killer cell signaling pathways. *Blood* 107: 2364–2372.
- Lapaque N, Walzer T, Meresse S, Vivier E, Trowsdale J (2009) Interactions between human NK cells and macrophages in response to Salmonella infection. *J Immunol* 182: 4339–4348.
- Newman KC, Riley EM (2007) Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 7: 279–291.
- Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A (2007) Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26: 503–517.
- Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O’Shea JJ (2003) The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 361–368.
- Sporri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A (2008) A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol* 181: 7121–7130.
- Chiche L, Forel JM, Thomas G, Farnarier C, Vely F, et al. (2011) The role of natural killer cells in sepsis. *J Biomed Biotechnol* 2011: 986491.
- Glomski JJ, Fritz JH, Keppler SJ, Balloy V, Chignard M, et al. (2007) Murine splenocytes produce inflammatory cytokines in a MyD88-dependent response to *Bacillus anthracis* spores. *Cell Microbiol* 9: 502–513.
- Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Labruyere E, Mock M (1999) Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol Microbiol* 31: 9–17.
- Guidi-Rontani C (2002) The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol* 10: 405–409.
- Kang TJ, Fenton MJ, Weiner MA, Hibbs S, Basu S, et al. (2005) Murine macrophages kill the vegetative form of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 73: 7495–7501.
- Tournier JN, Rossi Paccani S, Quesnel-Hellmann A, Baldari CT (2009) Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Mol Aspects Med* 30: 456–466.
- Cromartie WJ, Bloom WL, Watson DW (1947) Studies on infection with *Bacillus anthracis*; a histopathological study of skin lesions produced by *B. anthracis* in susceptible and resistant animal species. *J Infect Dis* 80: 1–13.
- Leppa SH (1982) Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 3162–3166.
- Vitale G, Bernardi L, Napolitani G, Mock M, Montecucco C (2000) Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem J* 352 Pt 3: 739–745.
- Moayeri M, Leppa SH (2004) The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 7: 19–24.
- Mourez M (2004) Anthrax toxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152: 135–164.
- Szarowicz SE, During RL, Li W, Quinn CP, Tang WJ, et al. (2009) *Bacillus anthracis* edema toxin impairs neutrophil actin-based motility. *Infect Immun* 77: 2455–2464.
- Agrawal A, Lingappa J, Leppa SH, Agrawal S, Jabbar A, et al. (2003) Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* 424: 329–334.
- Tournier JN, Quesnel-Hellmann A, Mathieu J, Montecucco C, Tang WJ, et al. (2005) Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J Immunol* 174: 4934–4941.
- Joshi SK, Lang GA, Larabee JL, Devera TS, Aye LM, et al. (2009) *Bacillus anthracis* lethal toxin disrupts TCR signaling in CD1d-restricted NKT cells leading to functional anergy. *PLoS Pathog* 5: e1000588.
- Fang H, Xu L, Chen TY, Cyr JM, Frucht DM (2006) Anthrax lethal toxin has direct and potent inhibitory effects on B cell proliferation and immunoglobulin production. *J Immunol* 176: 6155–6161.
- Daniel Ladant for providing the purified *Bordetella pertussis* Cya toxins and sharing his expertise, Anne Louise for her expert assistance with cell sorting and Lhousseine Touqui for providing several anti-MAPK pathways antibodies. PLG wish to specially thank Michèle Mock for her frequent scientific (and non scientific) exchanges during all these years, and for her constant support for developing original and stimulating research approaches on an ‘ancient’ pathogen with a long ‘pasteurian’ history.
- Paccani SR, Tonello F, Ghittoni R, Natale M, Muraro L, et al. (2005) Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. *J Exp Med* 201: 325–331.
- Fang H, Cordoba-Rodriguez R, Lankford CS, Frucht DM (2005) Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4+ T cells. *J Immunol* 174: 4966–4971.
- Gold JA, Hoshino Y, Hoshino S, Jones MB, Nolan A, et al. (2004) Exogenous gamma and alpha/beta interferon rescues human macrophages from cell death induced by *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 72: 1291–1297.
- Glomski JJ, Corre JP, Mock M, Goossens PL (2007) Cutting Edge: IFN-gamma-producing CD4 T lymphocytes mediate spore-induced immunity to capsulated *Bacillus anthracis*. *J Immunol* 178: 2646–2650.
- Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang CR (1997) Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 6: 459–467.
- Mendiratta SK, Martin WD, Hong S, Boesteanu A, Joyce S, et al. (1997) CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 6: 469–477.
- Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH (2000) Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1: 119–126.
- Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, et al. (2002) The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17: 19–29.
- Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuseri N, Ryffel B, et al. (2008) Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol* 181: 1627–1631.
- Ljunggren HG, Karre K (1990) In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11: 237–244.
- Trinchieri G (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47: 187–376.
- Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, et al. (2000) Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12: 721–727.
- Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL (2004) Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* 172: 2001–2005.
- Backstrom E, Kristensson K, Ljunggren HG (2004) Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed. *Scand J Immunol* 60: 14–22.
- Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A (2005) NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106: 609–616.
- Walzer T, Dalod M, Vivier E, Zitvogel L (2005) Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1: S49–59.
- Schluns KS, Stoklasek T, Lefrancois L (2005) The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both? *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1567–1571.
- Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, et al. (2004) NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104: 3267–3275.
- Carson W, Caligiuri MA (1998) Interleukin-15 as a potential regulator of the innate immune response. *Braz J Med Biol Res* 31: 1–9.
- Haerberlein S, Sebald H, Bogdan C, Schleicher U (2010) IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. *Eur J Immunol* 40: 1708–1717.
- Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S (2000) IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* 165: 1933–1938.
- Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, et al. (1995) Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378: 88–91.
- Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, et al. (1998) Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 188: 1485–1492.

48. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, et al. (1998) IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161: 3400–3407.
49. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, et al. (1997) Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275: 206–209.
50. Nickel W (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 270: 2109–2119.
51. Stanley AC, Lacy P (2010) Pathways for cytokine secretion. *Physiology* (Bethesda) 25: 218–229.
52. Grohmann U, Belladonna ML, Vacca C, Bianchi R, Fallarino F, et al. (2001) Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma. *J Immunol* 167: 221–227.
53. Bastos KR, de Deus Vieira de Moraes L, Zago CA, Marinho CR, Russo M, et al. (2005) Analysis of the activation profile of dendritic cells derived from the bone marrow of interleukin-12/interleukin-23-deficient mice. *Immunology* 114: 499–506.
54. Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, et al. (2004) What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect* 6: 630–636.
55. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, et al. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9: 143–150.
56. Arend WP, Palmer G, Gabay C (2008) IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 223: 20–38.
57. Maier LM, Howlett SK, Rainbow KM, Clark J, Howson JM, et al. (2008) NKG2D-RAE-1 receptor-ligand variation does not account for the NK cell defect in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 181: 7073–7080.
58. Fukao T (2004) Immune system paralysis by anthrax lethal toxin: the roles of innate and adaptive immunity. *Lancet Infect Dis* 4: 166–170.
59. Moayeri M, Leppa SH (2009) Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol Aspects Med* 30: 439–455.
60. Hoover DL, Friedlander AM, Rogers LC, Yoon IK, Warren RL, et al. (1994) Anthrax edema toxin differentially regulates lipopolysaccharide-induced monocyte production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by increasing intracellular cyclic AMP. *Infect Immun* 62: 4432–4439.
61. Pellizzari R, Guidi-Rontani C, Vitale G, Mock M, Montecucco C (1999) Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibits the LPS/IFN-gamma-induced release of NO and TNFalpha. *FEBS Lett* 462: 199–204.
62. Mariathasan S, Monack DM (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7: 31–40.
63. Martinon F, Gaide O, Petrilli V, Mayor A, Tschopp J (2007) NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol* 29: 213–229.
64. Kang TJ, Basu S, Zhang L, Thomas KE, Vogel SN, et al. (2008) Bacillus anthracis spores and lethal toxin induce IL-1beta via functionally distinct signaling pathways. *Eur J Immunol* 38: 1574–1584.
65. Wickliffe KE, Leppa SH, Moayeri M (2008) Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome. *Cell Microbiol* 10: 332–343.
66. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M (2007) The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5: 405–417.
67. Tupin E, Kronenberg M (2006) Activation of natural killer T cells by glycolipids. *Methods Enzymol* 417: 185–201.
68. Ahuja N, Kumar P, Bhatnagar R (2004) The adenylate cyclase toxins. *Crit Rev Microbiol* 30: 187–196.
69. Gur C, Porgador A, Elboim M, Gazit R, Mizrahi S, et al. (2010) The activating receptor NKP46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 11: 121–128.
70. Martin MP, Nelson G, Lee JH, Pellett F, Gao X, et al. (2002) Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles. *J Immunol* 169: 2818–2822.
71. de Saint Basile G, Menasche G, Fischer A (2010) Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol* 10: 568–579.
72. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, et al. (1993) Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by Coxsackie virus B3. *J Pathol* 170: 53–58.
73. van Sorge NM, Ebrahimi CM, McGillivray SM, Quach D, Sabet M, et al. (2008) Anthrax toxins inhibit neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contribute to the pathogenesis of meningitis. *PLoS One* 3: e2964.
74. Cote CK, Rea KM, Norris SL, van Rooijen N, Welkos SL (2004) The use of a model of in vivo macrophage depletion to study the role of macrophages during infection with *Bacillus anthracis* spores. *Microb Pathog* 37: 169–175.
75. Dumetz FJG, Khun H, Glomski IJ, Corre J-P, Rougeaux C, et al. (2011) Noninvasive imaging technologies reveal Edema toxin as a key virulence factor in anthrax. *Am J Pathol* 178: 2523–2535.
76. Trapani JA, Smyth MJ (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2: 735–747.
77. Bancroft GJ (1993) The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr Opin Immunol* 5: 503–510.
78. Brossier F, Mock M (2001) Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicol* 39: 1747–1755.
79. Berthier M, Fauchere JL, Perrin J, Grignon B, Oriot D (1996) Fulminant meningitis due to *Bacillus anthracis* in 11-year-old girl during Ramadan. *Lancet* 347: 828.
80. Brossier F, Levy M, Mock M (2002) Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infect Immun* 70: 661–664.
81. Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M (2005) Contribution of ExsFA and ExsFB proteins to the localization of BclA on the spore surface and to the stability of the bacillus anthracis exosporium. *J Bacteriol* 187: 5122–5128.
82. Pezard C, Dufloot E, Mock M (1993) Construction of *Bacillus anthracis* mutant strains producing a single toxin component. *J Gen Microbiol* 139: 2459–2463.
83. Park SH, Guy-Grand D, Lemonnier FA, Wang CR, Bendelac A, et al. (1999) Selection and expansion of CD8alpha/alpha(1) T cell receptor alpha/beta(1) intestinal intraepithelial lymphocytes in the absence of both classical major histocompatibility complex class I and nonclassical CID1 molecules. *J Exp Med* 190: 885–890.
84. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C (1993) Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159: 197–207.
85. Marcusson-Stahl M, Cederbrant K (2003) A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. *Toxicology* 193: 269–279.
86. Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, et al. (2005) Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* 6: 928–937.
87. Wang X, Zhang F, Chen F, Liu D, Zheng Y, et al. (2011) MEKK3 regulates IFN-gamma production in T cells through the Rac1/2-dependent MAPK cascades. *J Immunol* 186: 5791–5800.
88. Glomski IJ, Piris-Gimenez A, Huerre M, Mock M, Goossens PL (2007) Primary involvement of pharynx and Peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax. *PLoS Pathog* 3: e76.

Annexe 3

Publication *Infection and Immunity*

2012

Article publié dans la revue *Infection and Immunity* en 2012 présentant les travaux réalisés au sein de l'équipe Interactions Hôte-Agents Pathogènes par Garraud *et al.*

Differential Role of the Interleukin-17 Axis and Neutrophils in Resolution of Inhalational Anthrax

Kévin Garraud,^a Aurélie Cleret,^{a*} Jacques Mathieu,^a Daniel Fiole,^a Yves Gauthier,^a Anne Quesnel-Hellmann,^a and Jean-Nicolas Tournier^{a,b}

Unité Interactions Hôte-Agents Pathogènes, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, La Tronche, France,^a and Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France^b

The roles of interleukin-17 (IL-17) and neutrophils in the lung have been described as those of two intricate but independent players. Here we identify neutrophils as the primary IL-17-secreting subset of cells in a model of inhalation anthrax using A/J and C57BL/6 mice. With IL-17 receptor A knockout (IL-17RA^{-/-}) mice, we confirmed that IL-17A/F signaling is instrumental in the self-recruitment of this population. We also show that the IL-17A/F axis is critical for surviving pulmonary infection, as IL-17RA^{-/-} mice become susceptible to intranasal infection by *Bacillus anthracis* Sterne spores. Strikingly, infection with a fully virulent strain did not affect IL-17RA^{-/-} mouse survival. Eventually, by depleting neutrophils in wild-type and IL-17RA^{-/-} mice, we demonstrated the crucial role of IL-17-secreting neutrophils in mouse survival of infection by fully virulent *B. anthracis*. This work demonstrates the important roles of both IL-17 signaling and neutrophils in clearing this pathogen and surviving pulmonary *B. anthracis* infection.

The lung is a delicate and vital organ which is constantly exposed to pollutants and pathogens through air sampling (22). To achieve gaseous exchange through the thin membranes separating air in the alveoli from the capillaries, the lung has developed a highly efficient and balanced immune system which maintains balance between inflammation and tolerance. Studies on the role of the innate immune system in protecting against inhalational anthrax have focused mainly on alveolar phagocytes such as macrophages and dendritic cells. Anthrax is a disease caused by *Bacillus anthracis*, a Gram-positive, rod-shaped, spore-forming bacterium whose spores are considered a serious bioterrorism agent (25). *B. anthracis* spores cause three main clinical forms of the disease, depending on the route of infection: cutaneous, inhalational, and gastrointestinal anthrax (16). Intriguingly, prognoses of *B. anthracis* mucosal infections (pulmonary and intestinal) are dreadful, whereas cutaneous infection is known to be diagnosed easily and is readily cured. This suggests that the mucosal and skin-associated immune systems differ greatly in their handling of the pathogen.

The pulmonary route of infection is of paramount interest in terms of bioterrorism. The pathophysiology of inhalational anthrax is still a matter of discussion (7, 16, 47). It has been studied in multiple models, including mainly mouse, guinea pig, rabbit, and nonhuman primate (NHP) models, among which rodents are by far the most studied species (16, 50). In mice, recent studies have proven that entry of *B. anthracis* is not restricted to the lower respiratory tract, as initially thought, but may occur dually at the upper airways through the nasal mucosa-associated lymphoid tissue (NALT) (14, 15). In the lower respiratory tract, we and others have already shown that *B. anthracis* spores are managed during early infection in a coordinated manner by lung phagocytes (46, 49). Spores are immediately phagocytosed by alveolar macrophages lodged along the alveolar pneumocytes. Lung epithelial cells have also been described to phagocytose spores after inhalation (43). After a slight delay, lung dendritic cells (DCs) capture spores and rapidly transport them to the draining thoracic lymph nodes, playing the role of a Trojan horse (5). There, the spores

start to transform into metabolically active, toxin-producing, replicating bacilli. *B. anthracis* toxins are formed by the association of enzymatically active moieties, lethal factor (LF) and edema factor (EF), with protective antigen (PA) as a cell surface binding component, generating lethal toxin (LT) and edema toxin (ET), respectively (36). Both toxins play a major role in bacterial evasion of the host innate and adaptive immune systems (47, 48).

So far, little is known about the lung innate immune responses that are triggered after spore phagocytosis and processing. The specific role of neutrophils in lung immunity has not been explored thoroughly, although one report suggests it to be minor (6). Indirect arguments based on subcutaneous and intravenous models of infection were recently reported. Using myeloid-specific *B. anthracis* toxin receptor capillary morphogenesis protein 2 (CMG2) knockout mice, it was shown that toxin impairment of myeloid cells, including neutrophils, is critical for establishing disease (31).

Interleukin-17 (IL-17) is the prototype of a large family of six cytokines that play a potent role in regulating neutrophil responses (10, 51). IL-17 (also referred as IL-17A) in association with IL-17F—both of which are capable of signaling through IL-17 receptor A (IL-17RA)—acts as a master coordinator of the response. Neutrophil recruitment is induced indirectly by IL-17 through triggering of epithelial cells to secrete CXC chemokines

Received 26 September 2011 Returned for modification 6 October 2011

Accepted 14 October 2011

Published ahead of print 24 October 2011

Editor: S. R. Blanke

Address correspondence to Jean-Nicolas Tournier, jntournier@gmail.com.

* Present address: Université de Montréal, Département de Microbiologie et Immunologie, Hôpital Saint Luc, Montréal, Québec, Canada.

K. Garraud and A. Cleret contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.05988-11

(27). The protective role of IL-17 in host defense against pathogens in the lung has been demonstrated for numerous pathogens, including bacteria, fungi, and viruses (reviewed in reference 26). IL-17 can be either protective or detrimental, as recently exemplified in cases of influenza virus infection, as IL-17RA knockout mice survived significantly longer than wild-type (WT) mice (9). This highlights the delicate balance between inflammation and clearance of infection in the lung, as well as the role played by neutrophils and IL-17.

Several studies have pointed out the variety of IL-17 sources at mucosal sites, emphasizing that IL-17 bridges innate and adaptive immunity (10). In the lung, besides the classical Th17 lineage, innate cells such as $\gamma\delta$ T and NKT cells produce IL-17 during infection, sparking a quick start to the immune response. Recent reports suggest that neutrophils may also be a novel player in the game, as shown in noninfectious inflammation models such as acute ischemia-reperfusion in the kidney (30), lung lipopolysaccharide (LPS)-induced neutrophilia (13), and acute vasculitis (23). More recently, neutrophils have been shown to produce IL-17A in the lung after fungal infection by *Cryptococcus neoformans* (55) and *Aspergillus fumigatus* (54). Taken together, the extended diversity of IL-17 sources in response to stress or pathogens emphasizes its roles from early to late stages of infection. Given the critical roles of IL-17A and -F in lung immunity and elimination of extracellular pathogens (26), we hypothesized that these cytokines would be induced by *B. anthracis* infection in the lung mucosal immune system.

In the present study, we identified neutrophils as the main cell population secreting IL-17 in a pulmonary model of *B. anthracis* infection. Using IL-17RA^{-/-} mice, we showed that the IL-17A/F axis is instrumental for recruiting neutrophils to the lung. We also showed that the IL-17A/F axis is critical for survival of pulmonary *B. anthracis* infection, as IL-17RA^{-/-} mice became susceptible to intranasal (i.n.) infection with Sterne spores. Eventually, by depleting neutrophils in wild-type and IL-17RA^{-/-} mice, we demonstrated the crucial role of IL-17-secreting neutrophils in mouse survival after infection with a fully virulent capsulated strain. This work demonstrates the very important roles of both IL-17 and neutrophils in the clearance of this lung pathogen and in surviving pulmonary anthrax.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Six- to 10-week-old A/J mice (Harlan), C57BL/6 WT mice (CERJ), IL-17RA^{-/-} mice (obtained from Bernhard Ryffel, CNRS UMR6218, Orléans, France), and CX₃CR1^{+/-sgfp} mice (Jackson Laboratories) were housed under clean standard conditions. IL-17RA^{-/-} and CX₃CR1^{+/-sgfp} mice (all on a C57BL/6 background) were bred at the Plateforme de Haute Technologie Animale (La Tronche, France). All experimental protocols were approved by the local animal use committee according to international guidelines.

Bacillus anthracis strains. *B. anthracis* Sterne 7702 (pXO1⁺ pXO2⁻) and the fully virulent strain 17JB (pXO1⁺ pXO2⁺) were provided by Michèle Mock (Institut Pasteur, Paris, France).

Preparation of spores. Stocks of *B. anthracis* strains were prepared as follows. Bacteria were streaked on nutrient broth-yeast extract (NBY) agar slants and incubated for 7 days at 30°C. Five milliliters of sterile distilled water was added to each slant, and the samples were suspended. The spore suspension was incubated in a sterile screw-cap tube at 65°C in a water bath for 30 min to kill any remaining bacilli. The spores were collected by centrifugation and resuspended in water (1/20 [vol/vol] of the original culture) to give samples containing at least 90% spores and 10⁸ CFU/ml. Spores were purified by differential centrifugation for 30 min at 6,000 × g

at +4°C through layers of 45 to 55% Radioselectan (Renografin 76%; Schering) prepared in distilled water. Free spores contained in the pellet were washed three times with water to remove residual Renografin and then stored in deionized water. All spore stocks were stored at -80°C until use. Prior to each infection of mice, aliquots were diluted and viable spore counts estimated.

Immunization and infection of mice. Mice were immunized by subcutaneous (s.c.) injection with 10 μ g of recombinant PA (List Biological Laboratories Inc.) and 0.3% aluminum hydroxide gel (Sigma-Aldrich) in 100 μ l of vaccine 20 days before infection, with a booster given 10 days before infection.

For i.n. challenge, mice were lightly anesthetized with O₂-isoflurane (2.5%), and 25 μ l of a spore solution diluted in phosphate-buffered saline (PBS) at various concentrations was instilled in each nostril. Animal infections were performed in biosafety level 2 (BSL2) and BSL3 facilities, depending on the strain type.

Bacterial counting. For bacterial enumeration, mice were infected intranasally with 2 × 10⁸ spores of Sterne strain 7702 and killed at 3 days postinfection. Suspensions of lung cells were obtained by mechanical disruption in 1 ml of ice-cold distilled water. Homogenates were then serially diluted (for bacillus counting) or heated at 65°C for 30 min prior to dilutions for spore counting. Thereafter, we added 18 ml of Trypticase soy agar medium (Becton Dickinson) (cooled to ~45°C). Sample dilutions and agar medium were thoroughly mixed by alternating rotation and back-and-forth motion of plates. We let the agar solidify and incubated it promptly for 24 h at 37°C prior to CFU counting.

Neutrophil depletion. Use of a Ly6G-specific monoclonal antibody is an established technique for depleting neutrophils in mice *in vivo* (11, 38). In our study, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 100 μ l of 1A8 monoclonal antibody (BioXCell) at a concentration of 0.25 mg/ml in PBS. Five hours following neutrophil depletion, mice were infected by the intranasal route with 2 × 10⁸ spores of Sterne strain 7702, and survival was monitored each day until day 15. Injection was repeated on days 1 and 2 and then every 2 days until day 15, the last time point of the survival experiments.

Complement depletion. C57BL/6 mice were injected i.p. with two 5-U doses of cobra venom factor (CVF) 4 h apart to deplete the animals of C5 (19, 44). The mice were injected with 5 U of CVF every fifth day until day 15.

Forty-eight hours following CVF injection, mice were infected by the intranasal route with 2 × 10⁸ spores of Sterne strain 7702, and survival was monitored each day until day 15.

BAL and lung cell analysis. For bronchoalveolar lavage (BAL), 1 ml of ice-cold PBS-2 mM EDTA (Sigma-Aldrich) was injected into the trachea, collected, and kept on ice prior to treatment. Single-cell suspensions of lung cells were obtained after physical dissociation using a GentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec) followed by enzymatic digestion (30 min in a humidified incubator at 37°C with 5% ambient CO₂) of lung tissue in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) containing collagenase type I (1 mg/ml; Worthington Biochemical) and DNase I (50 U/ml; Sigma-Aldrich). Red blood cells were lysed in NH₄Cl (1×) solution. Cells were resuspended in PBS-1% bovine serum albumin (BSA)-0.1% azide before staining.

For microscopy analysis, lung preparations were cytocentrifuged and mounted with Vectashield DAPI medium (4',6-diamidino-2-phenylindole; Dako) or stained with Giemsa stain (RAL 555 kit). Cells were examined on a Zeiss Axioplan 2 microscope to image Giemsa staining and on an Olympus IX-81 microscope for fluorescence microscopy.

Flow cytometry analysis. Lung cell suspensions were incubated with Fc receptor blocking antibody (anti-mouse CD16/CD32 Ab, clone 2.4G2; BD Biosciences) for 30 min at 4°C. We used the following monoclonal antibodies (MAbs) (all from BD Biosciences, except where stated otherwise): anti-mouse CD3 ϵ (145-2C11), CD4 (L3T4), CD8 α (53-6.7), CD11b (M1/70), CD11c (H3L), CD25 (3C7), CD45 (30-F11), CD335 (NKp46, 29A1.4), Gr-1 (RB6-8C5), T-cell receptor $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$) (GL3), Ly6G (1A8), TCR β (H57-597; eBiosciences), and CD1d tetramer (a kind gift of Murielle Pichavant, Institut Pasteur de Lille), as well as correspond-

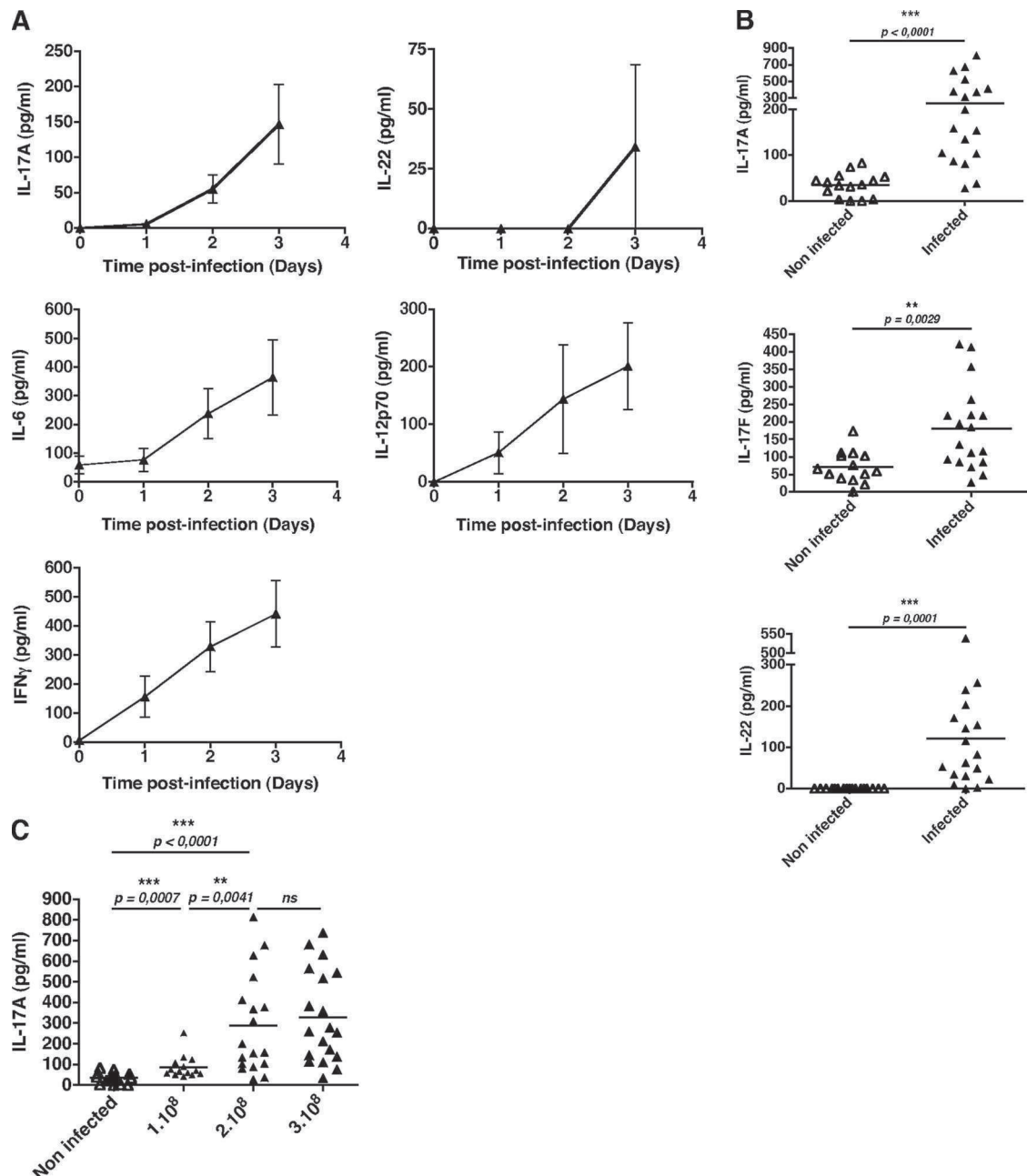


FIG 1 Kinetics of cytokine secretion in BALFs after *Bacillus anthracis* intranasal infection. (A and B) A/J mice were infected by the i.n. route with 2×10^8 spores of Sterne strain 7702 of *B. anthracis*. (A) IL-17A, IL-22, IL-6, IL-12p70, and IFN- γ secretion kinetics in BALFs of mice. Each time point represents the mean for three to five mice \pm the standard error of the mean (SEM). (B) IL-17A, IL-17F, and IL-22 concentrations in the BALFs of noninfected mice (open symbols) or at day 3 postinfection (closed symbols). Each symbol represents one mouse. (C) A/J mice were infected intranasally with different doses of spores of Sterne strain 7702 of *B. anthracis* (1×10^8 [small closed triangles], 2×10^8 [medium closed triangles], and 3×10^8 [large closed triangles]) or were left noninfected (open triangles). Each triangle represents one mouse. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant.

ing isotypes. Cells were stained for 30 min at 4°C. For intracellular staining, cells were permeabilized with saponin and stained for 1 h at 4°C with IL-17A MAb (eBio17B7; eBiosciences). Cell acquisition was conducted on a model FC500 (Beckman Coulter) flow cytometer, and data were analyzed with FlowJo software.

Cytokine measurement. Cytokine concentrations in BAL fluid (BALF) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a DuoSet assay for IL-17A and IL-17F and a Quantikine immunoassay (R&D Systems) for IL-22, IL-6, IL-12p70, and gamma interferon (IFN- γ), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 4.0c; GraphPad Software, Inc.). Statistical differences between the groups were determined by a nonparametric test, the Mann-Whitney test, and by the log rank test for survival analysis.

RESULTS

IL-17A and IL-17F are present in BALF after inhalational anthrax. We first aimed to determine whether IL-17 is produced after i.n. infection with *B. anthracis*. We therefore investigated the

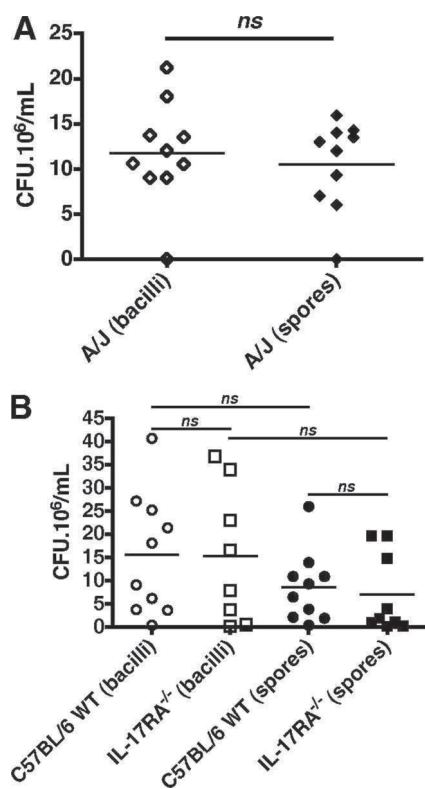


FIG 2 CFU in pulmonary homogenates 3 days after intranasal infection with *B. anthracis* Sterne strain spores. A/J (A) and C57BL/6 WT and IL-17RA^{-/-} (B) mice were infected intranasally with 2×10^8 spores of Sterne strain 7702 of *B. anthracis*. (A) CFU of bacilli (open diamonds) and spores (closed diamonds) in lungs of A/J mice at 3 days postinfection. Each diamond represents one mouse. (B) CFU of bacilli (open symbols) and spores (closed symbols) in lungs of C57BL/6 WT (circles) and IL-17RA^{-/-} (squares) mice at 3 days postinfection. Each symbol represents one mouse. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant.

cytokines present in the BALFs of A/J mice (C5 deficient), a largely used model of mouse infection with strain Sterne (Fig. 1A). Mice were infected with *B. anthracis* Sterne strain 7702 via the i.n. route and were sacrificed serially from day 0 (noninfected) to day 4 to determine the cytokine concentrations in the BALF samples.

We observed a robust production of IL-17A, IL-22, IL-6, IL-12p70, and IFN- γ in the BALF samples starting as soon as 24 h postinfection and reaching a peak at day 3 (Fig. 1A). Beyond this time point, mice started to die, and all mice were dead by day 4. Since IL-17A, IL-17F, and IL-22 were produced in significant amounts on day 3, we focused the rest of our investigations on this time point (Fig. 1B). Using different doses of *B. anthracis* spores, we observed that IL-17A was produced significantly only with an infective quantum above 2×10^8 spores per mouse (Fig. 1C). Furthermore, for A/J mice as well as C57BL/6 and IL-17RA^{-/-} mice (used later in this study), CFU analysis did not show any germination in the lungs following infection (Fig. 2A and B).

These initial results showed that infection with *B. anthracis* spores leads to local IL-17A, IL-17F, and IL-22 production.

IL-17A is produced by neutrophils recruited to the lungs of A/J mice. Next, we investigated the cell population secreting IL-17A in A/J mouse lungs. In accordance with our aforementioned data, an IL-17A⁺ cell population was recruited to mouse lungs

after infection and represented up to 11.4% of the total cells (Fig. 3A). This population was around 1% in noninfected mice. Moreover, the mean fluorescence intensity (MFI) of IL-17⁺ cells was significantly higher for the infected than the noninfected group (Fig. 3B). We extensively analyzed the IL-17A⁺ cell population phenotype (Fig. 3C). In agreement with our initial results, no more than about 6% of the IL-17A⁺ population was mature T cells (CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺), demonstrating that most of the recruited cell population did not belong to the classical Th17 lineage. We also excluded CD8⁺, Treg (CD3⁺ CD25⁺), and CD4⁺ cell populations. We then focused on $\gamma\delta$ T cells, NKT (TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD1d tetramer⁺) cells, and NK (NKp46⁺ CD3⁺) cells, which play a role in innate IL-17 production in the mucosa (10). None of these innate cell populations produced IL-17. Finally, we found that most IL-17A⁺ cells (~90%) in the lungs of infected A/J mice were neutrophils (CD11b⁺ Gr-1^{high} Ly6G⁺). Furthermore, we observed that IL-17⁺ cell MFIs were significantly higher for neutrophils than for Th17 populations (Fig. 3D), confirming that neutrophils are the main producer of IL-17.

IL-17A is produced mainly by CD11b⁺ Gr-1^{high} CX₃CR1⁻ neutrophils recruited to the lungs of C57BL/6 mice. In parallel, we performed the same analysis on C57BL/6 mouse lungs (Fig. 4A), because A/J mice are deficient in C5 and this factor is critical for IL-17 production by T cells (20). Using knock-in heterozygous CX₃CR1^{+ /*sgfp*} mice, we could differentiate monocytes (CX₃CR1⁺) and neutrophils (CX₃CR1⁻) that both express Gr-1 (29). We confirmed that the IL-17⁺ population corresponded to CD11b⁺ Gr-1^{high} CX₃CR1⁻ cells (Fig. 4B). Accordingly, IL-17A-positive cells exhibited multilobulated ring-shaped nuclei characteristic of neutrophils (Fig. 4C).

The neutrophil population was recruited to the lung upon infection in A/J and C57BL/6 mice (Fig. 5A). Interestingly, IL-17⁺ cells represented a significant subset of about 40% in A/J mice and 30% in C57BL/6 mice among the total neutrophils (Fig. 5B).

To determine a putative role of Th17 cells in resolving infection in A/J mice, we performed experiments on PA-immunized mice allowing mature T cell differentiation. In contrast to the case for naive animals, IL-17A and IL-17F levels in BALFs of vaccinated mice were not different from those for noninfected animals at day 3 postinfection (Fig. 6A). Even 15 days following infection, we did not observe any IL-17 production in immunized mice (data not shown). Since C57BL/6 mice survive Sterne strain infection, we analyzed IL-17-producing cells in lungs for up to 6 days after infection to rule out the role of Th17 cells. At day 6, we found no significant increase of the Th17⁺ cell phenotype compared to that in uninfected animals (Fig. 6B). Taken together, these results show that mature T cells did not participate in IL-17 production in the A/J and C57BL/6 models of inhalational anthrax by a Sterne strain.

Impaired recruitment of neutrophils in IL-17RA^{-/-} mice leads to susceptibility to intranasal Sterne strain infection but not to infection with a fully virulent strain. We next examined the role of IL-17A/F axis signaling during recruitment of the neutrophil population by using IL-17RA^{-/-} mice. Although we did not observe a decrease of the IL-17A⁺ cell percentage in the lungs of IL-17RA^{-/-} mice compared with WT animals when we gated on total cells, it was significantly diminished when the gating strategy was restricted to the neutrophils (Fig. 7A). One can infer that in the absence of an IL-17A/F retrofit, some other cell populations compensate for the lower recruitment of IL-17-secreting neuro-

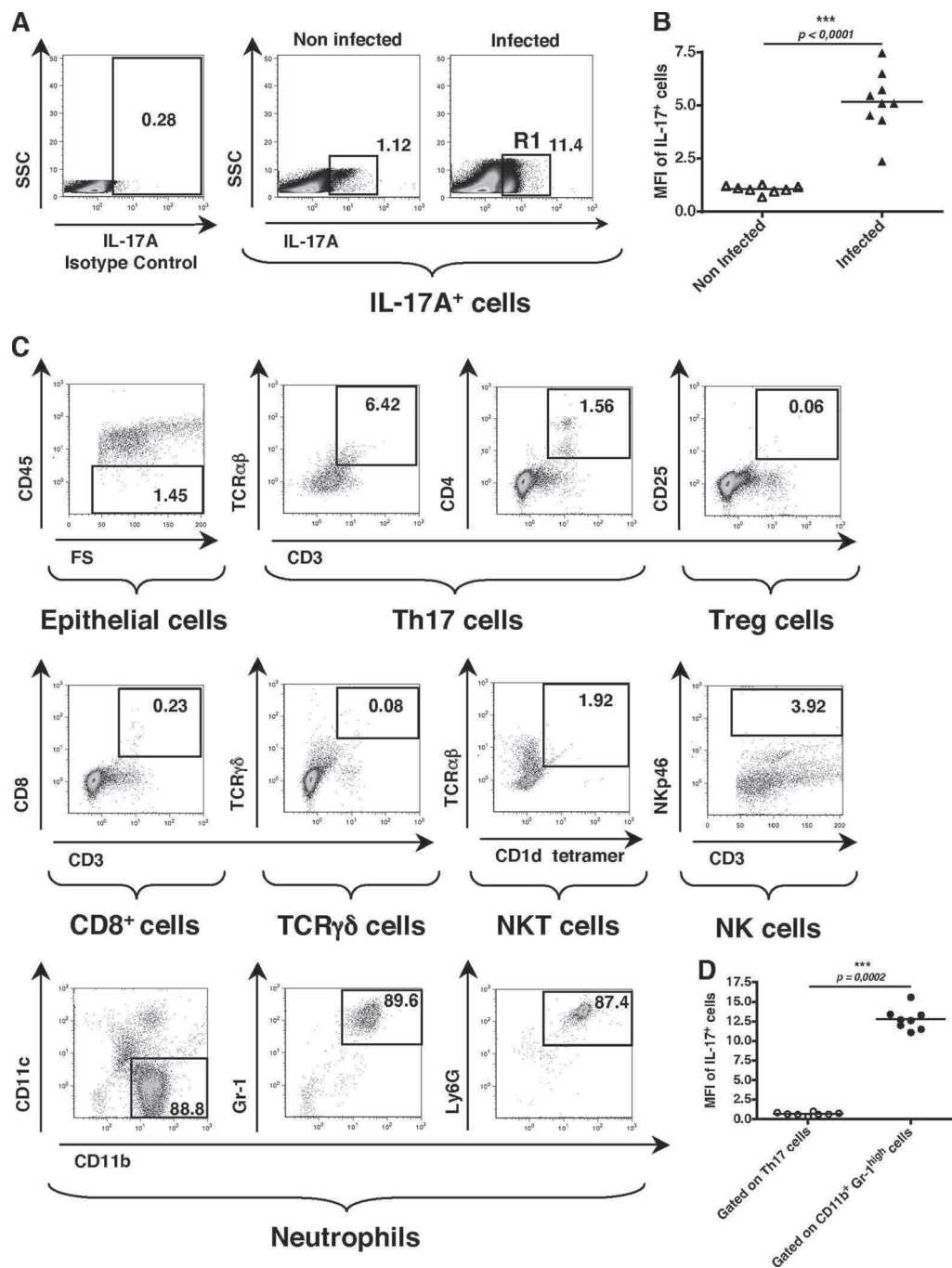


FIG 3 IL-17-positive cells are CD11b⁺ Gr-1^{high} Ly6G⁺ neutrophils. (A to D) A/J mice were infected intranasally with 2×10^8 spores of Sterne strain 7702 of *B. anthracis*. (A) Percentage of IL-17⁺ cells gated among total pulmonary cells of A/J mice at 3 days postinfection. These plots are representative of three independent experiments with 10 mice in each experiment. (B) Mean fluorescence intensities of IL-17⁺ cells from noninfected (open triangles) and infected (closed triangles) A/J mice. Each triangle represents one mouse. (C) Phenotypic analysis of the R1 population from panel A. These plots are representative of three independent experiments with 10 mice in each experiment. (D) Mean fluorescence intensities of IL-17⁺ cells among Th17 cells (i.e., TCRαβ⁺ CD3⁺ cells; open circles) and neutrophils (i.e., CD11b⁺ Gr-1^{high} cells; closed circles). Each circle represents one mouse. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant.

phils. We observed an increased percentage of CD11b⁺ Gr-1^{int} cells, which may be monocytes (Fig. 7A).

In contrast, neutrophil recruitment was significantly impaired in IL-17RA^{-/-} mice compared with that in WT animals (Fig. 7B). We also observed a lower level of neutrophils in IL-17RA^{-/-} naïve mice compared to WT noninfected mice, in

accordance with a previous study (57) and other literature suggesting a role of IL-17 during granulopoiesis and migration of neutrophils in tissues (3, 33).

Next, we investigated the effects of IL-17A/F signaling knock-out on mouse survival by using the acapsulated Sterne and fully virulent 17JB strains. IL-17RA^{-/-} mouse survival was impaired

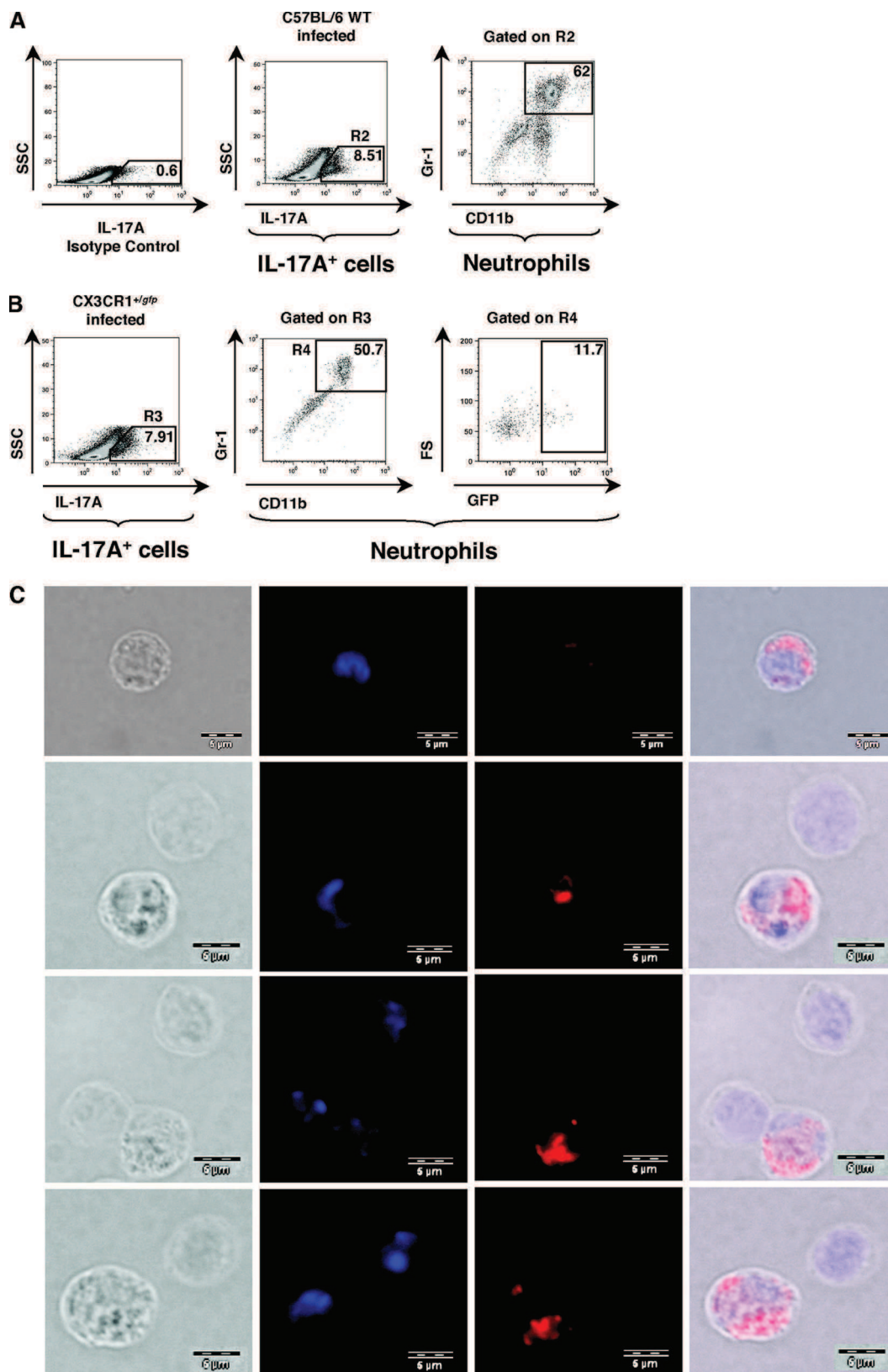


FIG 4 IL-17-positive cells are mostly CD11b⁺ Gr-1^{high} CX₃CR1⁻ multilobed neutrophils. (A to C) Each group of C57BL/6 and CX₃CR1^{+/gfp} mice was infected intranasally with 2×10^8 spores of Sterne strain 7702 of *B. anthracis*. (A) Lung cell analysis of C57BL/6 mice. These plots are representative of two independent experiments with 10 mice in each experiment. (B) Lung cell analysis of CX₃CR1^{+/gfp} mice. These plots are representative of two independent experiments with five mice in each experiment. (C) Cytospin analysis of C57BL/6 lung cells double stained with DAPI (blue) and with Alexa Fluor 647 for intracellular IL-17A (red) (magnification, $\times 60$).

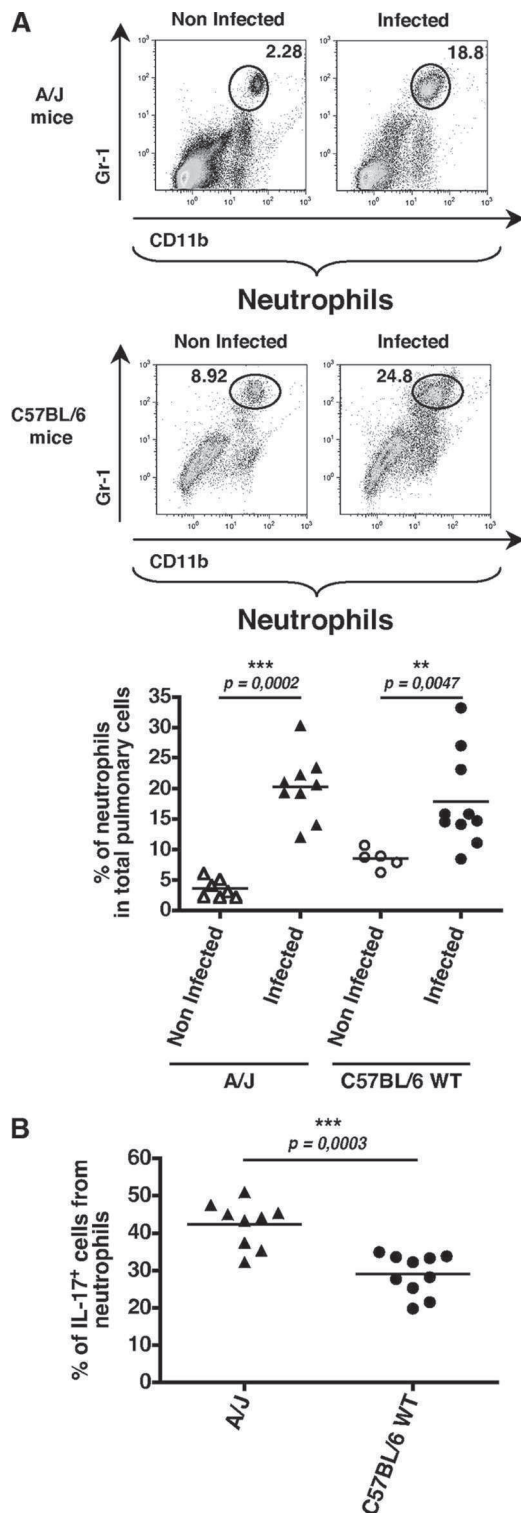


FIG 5 Recruitment of CD11b⁺ Gr-1^{high} neutrophils is dramatically increased in A/J and C57BL/6 mice infected with the Sterne strain. (A and B) A/J and C57BL/6 WT mice were infected intranasally with 2×10^8 spores of the Sterne strain of *B. anthracis*. (A) Dot plots of neutrophils (CD11b⁺ Gr-1^{high} cells) in noninfected mice (left) and infected mice (right) of the A/J (upper panels) and C57BL/6 (lower panels) strains. These plots are representative of three independent experiments with five mice per group. The lower graph represent the recruitment of neutrophils (CD11b⁺ Gr-1^{high} cells) in A/J noninfected (open triangles) or infected (closed triangles) mice and C57BL/6 noninfected (open

circles) or infected (closed circles) mice. Each symbol represents one mouse. (B) Percentages of IL-17⁺ cells among neutrophils (CD11b⁺ Gr-1^{high} cells) in infected A/J mice (closed triangles) and infected C57BL/6 mice (closed circles). Each symbol represents one mouse. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant.

significantly compared with that of WT mice, which are resistant to i.n. *B. anthracis* Sterne infection (52). This result highlights the critical role played by the IL-17 axis against *B. anthracis* at the lung mucosa in an acapsulated strain infection model (Fig. 7C). In sharp contrast, we did not observe any differences when we used a capsulated fully virulent strain, suggesting that protection against a capsulated strain does not depend on the IL-17 axis (Fig. 7D). **Neutrophils are critical for resolution of infection by a fully virulent capsulated strain of *B. anthracis*.** Finally, we sought to assess the role of neutrophils recruited to the lung in protection against Sterne strain and fully virulent models of infection. In the C5-deficient A/J mouse model depleted of neutrophils (Fig. 8A and B) and infected with the Sterne strain, we observed only a slight significant decrease in time to death among depleted mice (Fig. 8C). We then determined the effects of neutrophil depletion in complement-sufficient WT and IL-17RA^{-/-} mice (Fig. 8D). After infection by the Sterne strain, we observed only a slight, nonsignificant difference between the depleted and nondepleted groups (Fig. 8E). These results suggested that protection against an acapsulated strain depends strongly on the IL-17 axis but only partially upon neutrophil recruitment. Since we observed an increase of time to death only for A/J C5-deficient mice compared to the survival among C5-sufficient C57BL/6 mice, we tried to address the role of C5 in survival. To that end, we assessed the survival of C57BL/6 mice after depletion of C5 by CVF. We did not observe any differences between WT and C5-depleted mice (data not shown), suggesting that C5 deficiency did not account for the differences between the A/J and C57BL/6 backgrounds. We eventually infected depleted and nondepleted WT mice with the fully virulent capsulated 17JB strain and observed a significant decrease in survival time, thereby demonstrating that neutrophils play a critical role in protection against lung *B. anthracis* infection (Fig. 8F).

DISCUSSION

Our study identified IL-17 as one of the first innate immune alarms after *B. anthracis* infection of the lungs and determined that neutrophils are the primary source of IL-17. We also demonstrated that IL-17⁺ neutrophils are recruited upon infection and that the IL-17 axis is necessary for amplifying its own recruitment. To our knowledge, this is one of the first reports that IL-17-secreting neutrophils are a central producer of IL-17 in an infected mucosa, playing a critical role in survival.

Neutrophils are a vital component of the acute cellular inflammatory system and defense against intruding microorganisms (3, 37). At homeostasis, neutrophils are recruited through their CXCR4 chemokine receptor for rapid clearance of bacteria. However, they can cause lung injury when their recruitment is dysregulated (28). IL-17 is instrumental in lung neutrophil recruitment via its effect on epithelial cells, which in turn produce granulopoietic factors such as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and CCL20 (10). The role of IL-17 in neutrophil recruitment has been demonstrated largely with large panels of extracellular

Downloaded from <http://iai.asm.org/> on December 23, 2011 by guest

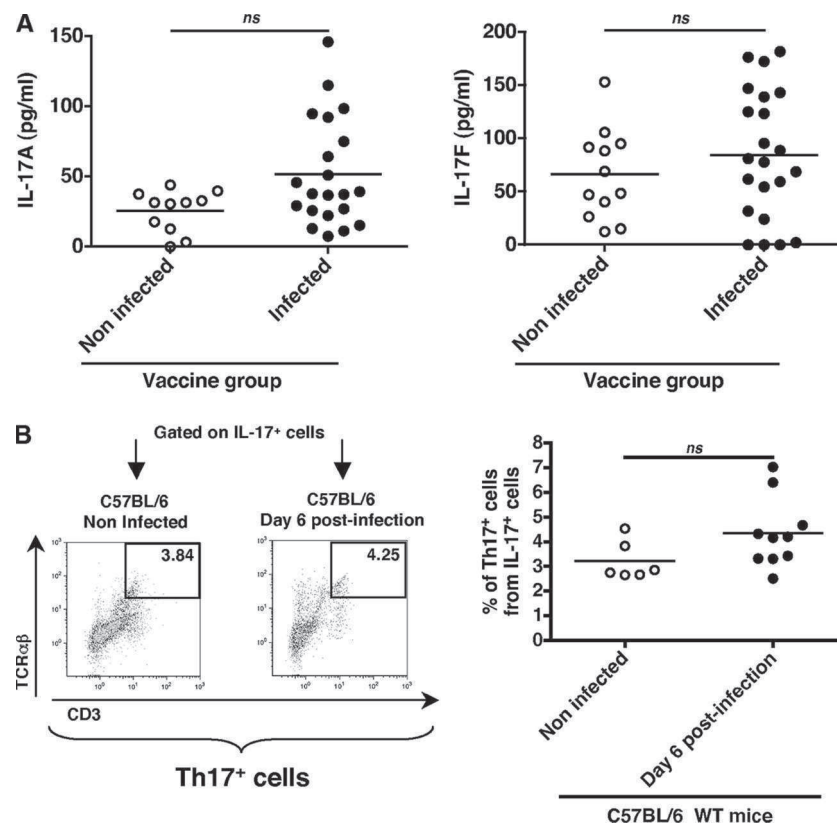


FIG 6 Mature T cells do not play a critical role in IL-17 production during inhalational anthrax. Each group of A/J (A) and C57BL/6 (B) mice was infected with 2×10^8 spores of Sterne strain 7702 of *B. anthracis*. (A) IL-17A and IL-17F concentrations in the BALFs of noninfected mice (open symbols) or at day 3 postinfection (closed symbols) for the vaccine group. Each symbol represent one mouse. (B) Lung cell analysis of C57BL/6 mice. These plots are representative of one experiment with 6 mice (noninfected) or 10 mice (day 6 postinfection). In the graph, open circles represent noninfected mice and closed circles represent mice at 6 days postinfection. Each circle represents one mouse. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney test. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant.

pathogens, mainly as an early requirement, within 4 to 8 h after exposure (10). In our model, IL-17 was detected from day 2 onwards, and its level increased until death. Interestingly, the mean time to death was 8 to 9 days for IL-17RA^{-/-} mice, which is much later than that for acute infection with a susceptible strain. This suggests that neutrophil-related IL-17 sustains the recruitment of new neutrophils to the infected site at the later stages of infection. Although neutrophil-related IL-17 is classified as an innate response, its role is delayed until the late phase of lung scavenging. IL-17 is known to induce CXC chemokines (57), some of which possess antimicrobial properties against *B. anthracis* spores and bacilli (8). This could be another IL-17 effector mechanism of action, independent of neutrophils. Here we demonstrated that lung neutrophils produce IL-17. A previous study with a model of lung neutrophilia induced by LPS instillation reported the detection of IL-17 mRNA in neutrophils (13). Subsequently, it was shown that IL-17 can be produced by non-T cells during “sterile” inflammation of the kidneys (30) and in a model of acute vasculitis (23). Intriguingly, in a model of *Helicobacter hepaticus*-induced colitis, Gr-1⁺ CD11b⁺ cells produced a significant amount of IL-17 in the gut lamina propria (24). More recent data favor a role of neutrophils in IL-17A production in the lung after fungal infection by *C. neoformans* (55) or *A. fumigatus* (54). Our study provides a new, nonfungal pathogen on the list of neutrophil IL-17 inducers. According to our data, IL-17 is produced by a subset of

neutrophils which represent about 30 to 40% of the total CD11b⁺ Gr-1^{high} cell population in the infected lungs. This subpopulation is crucial for sustained recruitment of neutrophils during infection with an acapsulated strain, as illustrated with IL-17RA knock-out mice. Neutrophil-related IL-17 induces a stimulating loop of recruitment for inflammatory effectors such as neutrophils and monocytes. It should be noted that production of IL-17 in A/J mice infected with an acapsulated strain depends on the level of infection. This could mean that below a certain quantum, neutrophils are not activated to produce IL-17. Interestingly, the role of the IL-17 axis might differ during infections by acapsulated versus capsulated *B. anthracis*, as shown by mouse survival. This is not surprising given that mice are sensitive to capsulated *B. anthracis* devoid of toxins (21, 53), demonstrating the unique role of capsule in virulence (12). This may suggest that IL-17 axis-dependent effectors are ineffective against capsulated strains. Conversely, major capsule effects upon infection dissemination may mask subtle differences observed with the Sterne strain in mice. Interestingly, the capsulated virulent strain 17JB did not trigger a detectable level of IL-17 in BALF (data not shown). Since the capsule allows dissemination to distal organs (12), it could mean that the pathogen spreads before a certain level of activation is reached in the lung. In our study, we focused on the lung, although IL-17 could participate in controlling infection at alternate sites, such as the NALT or the lymph nodes. Alternatively, the infective dose

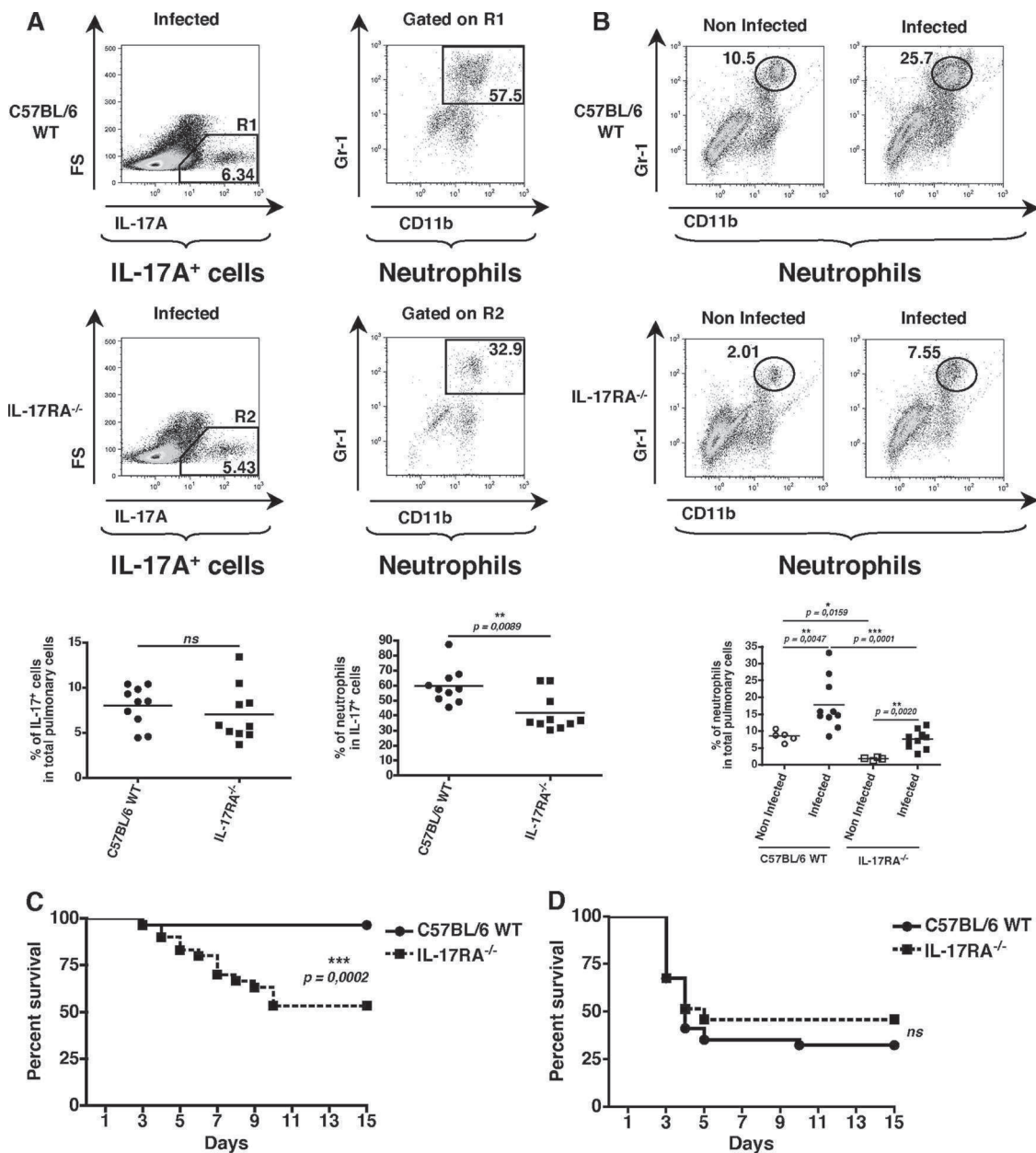


FIG 7 Recruitment of CD11b⁺ Gr-1^{high} neutrophils is impaired in IL-17RA^{-/-} mice, leading to susceptibility to Sterne strain infection. (A to C) C57BL/6 WT and IL-17RA^{-/-} mice were infected intranasally with 2×10^8 spores of the Sterne strain of *B. anthracis*. (A) Percentages of IL-17⁺ cells (left dot plots) and neutrophils (right dot plots) in infected C57BL/6 WT (upper dot plots) and infected IL-17RA^{-/-} (lower dot plots) mice. These data are representative of two independent experiments with 10 mice in each group. The lower left graph represents the percentages of IL-17⁺ cells from infected C57BL/6 WT (closed circles) and infected IL-17RA^{-/-} (closed squares) mice. The lower right graph represents the percentages of neutrophils gated on IL-17⁺ cells from infected C57BL/6 WT (closed circles) and infected IL-17RA^{-/-} (closed squares) mice. Each symbol represents one mouse. (B) Recruitment of total neutrophils in C57BL/6 WT (upper panels) and IL-17RA^{-/-} (lower panels) mice, either noninfected (left) or infected (right). These data are representative of two independent experiments with 10 mice in each group. The lower graph represents the recruitment of neutrophils in noninfected (open symbols) and infected (closed symbols) C57BL/6 WT (circles) and IL-17RA^{-/-} (squares) mice. Each symbol represents one mouse. (C) Survival curves for wild-type (circles, full line) and IL-17RA^{-/-} (squares, dashed line) mice. These data are means for three independent experiments with 10 mice in each group. (D) Survival curves for wild-type (circles, full line) and IL-17RA^{-/-} (squares, dashed line) mice infected with 7.5×10^5 spores of the capsulated virulent strain 17JB. These data are representative of three independent experiments with 10 mice in each group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant.

used was much lower for infection with the 17JB capsulated strain, far below the threshold for activating IL-17 production. Finally, the roles of IL-17 and neutrophils in resisting infection are not always strictly correlated. It has been exemplified in a systemic model of infection by *Acinetobacter baumannii* that neutrophils

may have a prominent role in infections with virulent strains, independent of IL-17 signaling (4).

The role of neutrophils in anthrax disease was first recognized by the seminal work of Elie Metchnikoff on phagocytosis in the late 19th century (34). Over time, the role of neutrophils in pul-

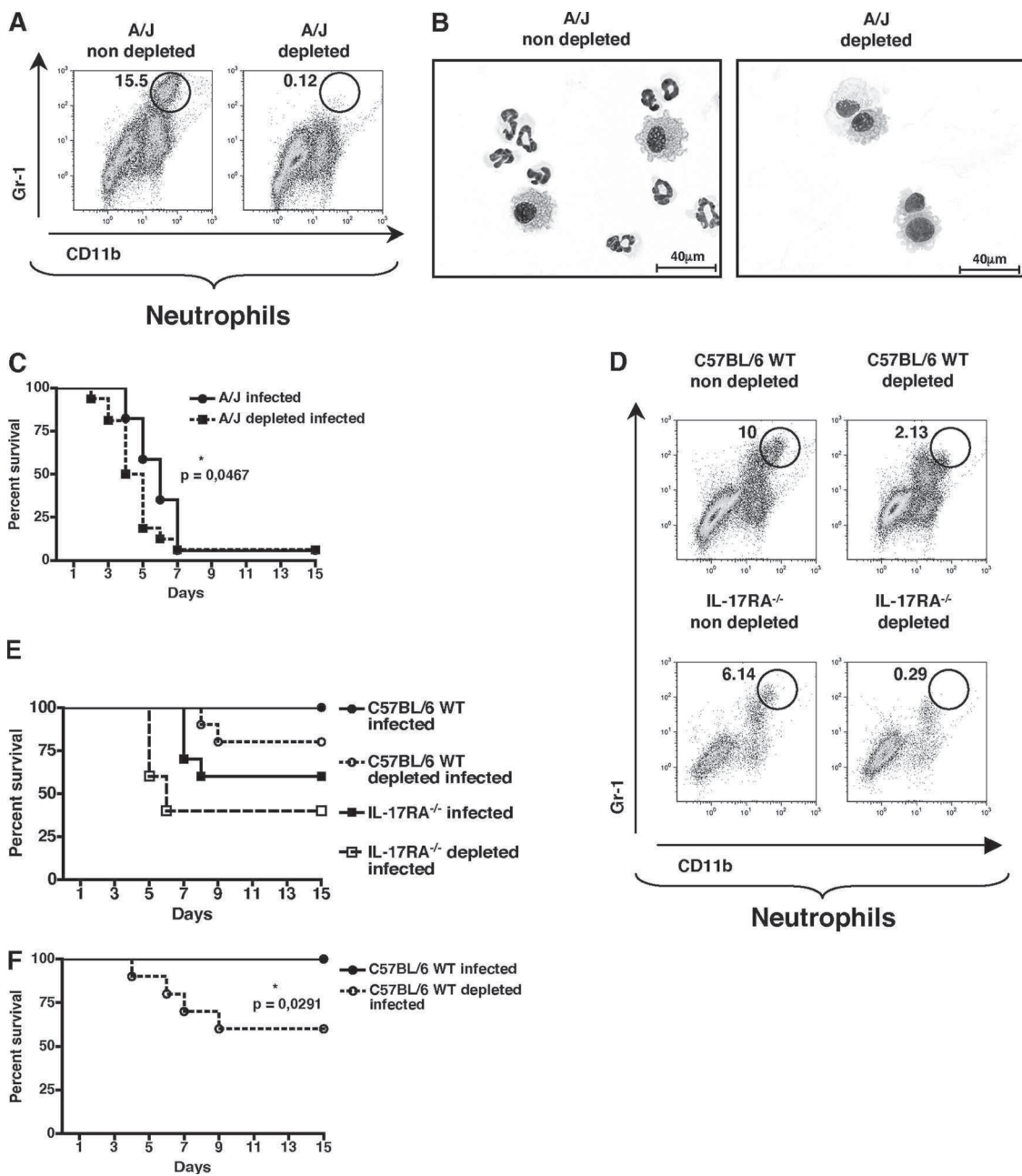


FIG 8 Depletion of neutrophil population induces a decrease in survival of mice infected with a virulent strain. (A to E) A/J, C57BL/6, and IL-17RA^{-/-} mice were infected intranasally with 2×10^8 spores of the Sterne strain of *B. anthracis*. (A) Neutrophil depletion in A/J mice by i.p. injection of 1A8 MAb at 3 days postinfection. These plots are representative of one experiment with five mice in each group. (B) Cytospin analysis of lung cells of A/J mice stained with Giemsa stain (magnification, $\times 100$). These pictures are representative of one experiment with five mice in each group. (C) Survival curves for nondepleted-infected (closed circles, full line) and depleted-infected (closed squares, dashed line) A/J mice. These data are representative of three independent experiments with 10 mice in each group. (D) Neutrophil depletion in C57BL/6 WT and IL-17RA^{-/-} mice by i.p. injection of monoclonal antibody 1A8 at 3 days postinfection. These plots are representative of one experiment with five mice in each group. (E) Survival curve comparison between nondepleted-infected (closed circles) and depleted-infected (open circles) C57BL/6 WT mice and nondepleted-infected (closed squares) and depleted-infected (open squares) IL-17RA^{-/-} mice. These data are representative of two independent experiments with 10 mice in each group. (F) Mice were infected intranasally with 7.5×10^5 spores of the 17J strain of *B. anthracis*. The graph shows a survival curve comparison between nondepleted-infected (closed circles, full line) and depleted-infected (open circles, dashed line) C57BL/6 WT mice. Experiments were performed with 10 mice in each group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not significant.

monary anthrax has been masked progressively by studies focusing on the first cell responder that is directly on-site: the alveolar macrophages (6). Human neutrophils can kill spores and fully virulent capsulated bacilli (32), suggesting that they scavenge in-

fectured tissues. It has been known for a long time that *B. anthracis* toxins dampen the recruitment (39) and priming (56) of neutrophils. LT impairs production of IL-8, which is a critical chemokine for neutrophil recruitment, acting on epithelial (40) and endothe-

lial (2) cells through at least two molecular mechanisms. The role of neutrophils in anthrax was recently brought back into the limelight in a study using myeloid lineage CMG2-deficient mice (31). According to this study, toxin receptor inactivation renders mice resistant to s.c. or intravenous (i.v.) models of *B. anthracis* infection. The toxin effects were mediated mainly by neutrophil impairment. In another study, mice bearing Nlrp1b-sensitive alleles for macrophage lysis were resistant to infection, through caspase 1 activation, IL-1 β signaling, and neutrophil recruitment following s.c. challenge (35).

Beyond our mouse models, one interesting question is the relevance of such findings to neutrophils in other animal models and, ultimately, humans. The main documents on humans are from necropsy analyses of the Sverdlosk incident in 1979 and the U.S. outbreak in 2001. In the Sverdlosk accident cohort, a neutrophilic infiltration was noticed for 37% of microscopic lung analyses (17). In contrast, during the 2001 outbreak, various degrees of monocytic infiltration were noticed on lung necropsy of deceased patients (18). Both studies report major inflammatory lesions with alveolar edema and hyaline membrane formation. Since these reports are based on terminal state examination, they may be biased toward patients whose immune systems did not handle the pathogen properly and thus may miss neutrophil involvement. Research of the most relevant animal model of inhalational anthrax has been compared to a quest for the Holy Grail (16). NHPs have been used widely over the past 60 years (50). Interestingly, neutrophilic infiltration has been reported in most studies using more distant species (1, 45). Neutrophils were found to various degrees on lung tissue necropsy of rabbits (50), as well as in historical studies of guinea pigs (41, 42, 50). Taken together, these data indicate that neutrophils are recruited into the lung in most animal models of *B. anthracis* infection. The role of neutrophils has largely been undetermined so far, mainly because their recruitment is faint compared to that in other major lung histological disorders.

Our data confirm the critical role of the IL-17 axis in survival with an acapsulated-toxigenic Sterne strain and of neutrophils in survival with a fully virulent strain in a mouse model of pulmonary anthrax. These data draw a more complicated picture of the host innate immune response to *B. anthracis* infection, including the roles of IL-17 and neutrophils in clearing of the lungs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Desor for spore production and E. Gentilhomme for microscopy. We thank Bradley Stiles for reading and editing the manuscript.

There are no conflicts of interest to report.

This work was supported by grant 09co301-1 from the Direction Générale de l'Armement.

REFERENCES

- Albrink WS. 1961. Pathogenesis of inhalation anthrax. *Bacteriol. Rev.* 25:268–273.
- Batty S, Chow EM, Kassam A, Der SD, Mogridge J. 2006. Inhibition of mitogen-activated protein kinase signalling by *Bacillus anthracis* lethal toxin causes destabilization of interleukin-8 mRNA. *Cell. Microbiol.* 8:130–138.
- Borregaard N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33:657–670.
- Breslow JM, et al. 2011. Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. *Infect. Immunol.* 79:3317–3327.
- Cleret A, et al. 2007. Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route. *J. Immunol.* 178:7994–8001.
- Cote CK, Van Rooijen N, Welkos SL. 2006. Roles of macrophages and neutrophils in the early host response to *Bacillus anthracis* spores in a mouse model of infection. *Infect. Immunol.* 74:469–480.
- Cote CK, Welkos SL, Bozue J. Key aspects of the molecular and cellular basis of inhalational anthrax. *Microbes Infect.*, in press.
- Crawford MA, et al. 2010. Interferon-inducible CXC chemokines directly contribute to host defense against inhalational anthrax in a murine model of infection. *PLoS Pathog.* 6:e1001199.
- Crowe CR, et al. 2009. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J. Immunol.* 183:5301–5310.
- Cua DJ, Tato CM. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10:479–489.
- Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* 83:64–70.
- Drysdale M, et al. 2005. Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *EMBO J.* 24:221–227.
- Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifileff A. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol.* 170:2106–2112.
- Glomski IJ, et al. 2008. Inhaled non-capsulated *Bacillus anthracis* in A/J mice: nasopharynx and alveolar space as dual portals of entry, delayed dissemination, and specific organ targeting. *Microbes Infect.* 10:1398–1404.
- Glomski IJ, Piris-Gimenez A, Huerre M, Mock M, Goossens PL. 2007. Primary involvement of pharynx and Peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax. *PLoS Pathog.* 3:e76.
- Goossens PL. 2009. Animal models of human anthrax: the quest for the Holy Grail. *Mol. Aspects Med.* 30:467–480.
- Grinberg LM, Abramova FA, Yampolskaya OV, Walker DH, Smith JH. 2001. Quantitative pathology of inhalational anthrax. I. Quantitative microscopic findings. *Mod. Pathol.* 14:482–495.
- Guarner J, et al. 2003. Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. *Am. J. Pathol.* 163:701–709.
- Harvill ET, Lee G, Grippe VK, Merkel TJ. 2005. Complement depletion renders C57BL/6 mice sensitive to the *Bacillus anthracis* Sterne strain. *Infect. Immunol.* 73:4420–4422.
- Hashimoto M, et al. 2010. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. *J. Exp. Med.* 207:1135–1143.
- Heninger S, et al. 2006. Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax. *Infect. Immunol.* 74:6067–6074.
- Holt PG, Strickland DH, Wikstrom ME, Jahnsen FL. 2008. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat. Rev. Immunol.* 8:142–152.
- Hoshino A, et al. 2008. MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. *J. Autoimmun.* 31:79–89.
- Hue S, et al. 2006. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 203:2473–2483.
- Inglesby TV, et al. 2002. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA* 287:2236–2252.
- Khader SA, Gaffen SL, Kolls JK. 2009. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* 2:403–411.
- Kolls JK, Linden A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467–476.
- Koltsova EK, Ley K. 2010. The mysterious ways of the chemokine CXCL5. *Immunity* 33:7–9.
- Landsman L, Varol C, Jung S. 2007. Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J. Immunol.* 178:2000–2007.
- Li L, et al. 2010. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 120:331–342.
- Liu S, et al. 2010. Anthrax toxin targeting of myeloid cells through the CMG2 receptor is essential for establishment of *Bacillus anthracis* infections in mice. *Cell Host Microbe* 8:455–462.
- Mayer-Scholl A, et al. 2005. Human neutrophils kill *Bacillus anthracis*. *PLoS Pathog.* 1:e23.
- McAleer JP, Kolls JK. 2011. Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. *J. Leukoc. Biol.* 90:263–270.

34. Metchnikoff E. 1890. Etudes sur l'immunité. 3^e mémoire: le charbon des rats blancs. *Ann. Inst. Pasteur* IV:193–212.
35. Moayeri M, et al. 2010. Inflammasome sensor Nlrp1b-dependent resistance to anthrax is mediated by caspase-1, IL-1 signaling and neutrophil recruitment. *PLoS Pathog.* 6:e1001222.
36. Moayeri M, Leppla SH. 2009. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol. Aspects Med.* 30:439–455.
37. Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6:173–182.
38. Norman KE, et al. 2003. Combined anticoagulant and antiselectin treatments prevent lethal intravascular coagulation. *Blood* 101:921–928.
39. O'Brien J, Friedlander A, Dreier T, Ezzell J, Leppla S. 1985. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect. Immun.* 47:306–310.
40. Raymond B, et al. 2009. Anthrax lethal toxin impairs IL-8 expression in epithelial cells through inhibition of histone H3 modification. *PLoS Pathog.* 5:e1000359.
41. Ross JM. 1955. On the histopathology of experimental anthrax in the guinea-pig. *Br. J. Exp. Pathol.* 36:336–339.
42. Ross JM. 1957. The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *J. Pathol. Bacteriol.* 73:485–494.
43. Russell BH, et al. 2008. In vivo demonstration and quantification of intracellular *Bacillus anthracis* in lung epithelial cells. *Infect. Immun.* 76:3975–3983.
44. Shapiro S, et al. 2002. Immunoglobulin G monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* protect mice deficient in complement component C3. *Infect. Immun.* 70:2598–2604.
45. Stearns-Kurosawa DJ, Lupu F, Taylor FB Jr, Kinasewitz G, Kurosawa S. 2006. Sepsis and pathophysiology of anthrax in a nonhuman primate model. *Am. J. Pathol.* 169:433–444.
46. Tournier JN, Mohamadzadeh M. 2010. Key roles of dendritic cells in lung infection and improving anthrax vaccines. *Trends Mol. Med.* 16:303–312.
47. Tournier JN, Quesnel-Hellmann A, Cleret A, Vidal DR. 2007. Contribution of toxins to the pathogenesis of inhalational anthrax. *Cell. Microbiol.* 9:555–565.
48. Tournier JN, Rossi Paccani S, Quesnel-Hellmann A, Baldari CT. 2009. Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Mol. Aspects Med.* 30:456–466.
49. Tournier JN, Ulrich RG, Quesnel-Hellmann A, Mohamadzadeh M, Stiles BG. 2009. Anthrax, toxins and vaccines: a 125-year journey targeting *Bacillus anthracis*. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 7:219–236.
50. Twenhafel NA. 2010. Pathology of inhalational anthrax animal models. *Vet. Pathol.* 47:819–830.
51. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25:821–852.
52. Welkos SL, Friedlander AM. 1988. Pathogenesis and genetic control of resistance to the Sterne strain of *Bacillus anthracis*. *Microb. Pathog.* 4:53–69.
53. Welkos SL, Vietri NJ, Gibbs PH. 1993. Non-toxigenic derivatives of the Ames strain of *Bacillus anthracis* are fully virulent for mice: role of plasmid pX02 and chromosome in strain-dependent virulence. *Microb. Pathog.* 14:381–388.
54. Werner JL, et al. 2011. Neutrophils produce interleukin-17A (IL-17A) in a dectin-1- and IL-23-dependent manner during invasive fungal infection. *Infect. Immun.* 79:3966–3977.
55. Wozniak KL, Hardison SE, Kolls JK, Wormley FL. 2011. Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection. *PLoS One* 6:e17204.
56. Wright GG, Mandell GL. 1986. Anthrax toxin blocks priming of neutrophils by lipopolysaccharide and by muramyl dipeptide. *J. Exp. Med.* 164:1700–1709.
57. Ye P, et al. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194:519–527.

Annexe 4

Article de conférence *Proc SPIE 2013*

Article de conférence publié dans les *proceedings SPIE* après présentation d'un poster au congrès SPIE Photonics West à San Francisco (Etats-Unis) en février 2013.

An optimized two-photon method for in vivo lung imaging reveals intimate cell collaborations during infection

Daniel Fiole*^{a,b}, Pierre Deman^a, Yannick Trescos^a, Julien Douady^b, Jean-Nicolas Tournier*^{a,c}

^a Unité Interactions Hôte-Agents pathogènes, Département de Microbiologie, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, La Tronche, France;

^b Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, UMR 5588 Université Grenoble 1/CNRS, Grenoble, France ;

^c Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France.

ABSTRACT

Lung tissue motion arising from breathing and heart beating has been described as the largest annoyance of in vivo imaging. Consequently, infected lung tissue has never been imaged in vivo thus far, and little is known concerning the kinetics of the mucosal immune system at the cellular level. We have developed an optimized post-processing strategy to overcome tissue motion, based upon two-photon and second harmonic generation (SHG) microscopy.

In contrast to previously published data, we have freed the lung parenchyma from any strain and depression in order to maintain the lungs under optimal physiological parameters. Excitation beams swept the sample throughout normal breathing and heart movements, allowing the collection of many images. Given that tissue motion is unpredictably, it was essential to sort images of interest. This step was enhanced by using SHG signal from collagen as a reference for sampling and realignment phases. A normalized cross-correlation criterion was used between a manually chosen reference image and rigid transformations of all others. Using CX3CR1^{+/gfp} mice this process allowed the collection of high resolution images of pulmonary dendritic cells (DCs) interacting with *Bacillus anthracis* spores, a Gram-positive bacteria responsible for anthrax disease. We imaged lung tissue for up to one hour, without interrupting normal lung physiology. Interestingly, our data revealed unexpected interactions between DCs and macrophages, two specialized phagocytes. These contacts may participate in a better coordinate immune response. Our results not only demonstrate the phagocytizing task of lung DCs but also infer a cooperative role of alveolar macrophages and DCs.

Keywords: two-photon microscopy, in vivo lung imaging, host-pathogen interactions, infectious disease, *Bacillus anthracis*

1. INTRODUCTION

The lung is a delicate organ greatly exposed to pathogens and pollutants that is maintained sterile due to the presence of a scattered efficient mucosal immune system. Physiologically the lung is devoted to gas exchange through the respiration process and its structure is integrally adapted to its function. As a result the capillary bed is only 0.2 μm from the outer space. The lung is then structurally one of the most exposed parts of our body to microbial threat. However, lung infection are scarce although one of the most prevalent cause of morbidity and mortality. This shows us that the lung is associated to one of the most organized and efficient immune systems to combat and protect against infection and inflammation damages. Intriguingly, little is known about the lung immune system dynamics, as lung function is not dissociable from motion, and motion is not compatible with microscopy. It is then not surprising that lung has been one of the last organs to be observed by two-photon excitation microscopy¹⁻³ (2PEF), although 2PEF has been made available to biologists and immunologists since the early 2000's⁴⁻⁶.

*daniel.fiole@ujf-grenoble.fr or jntournier@gmail.com, phone: 334 766 368 48.

In the lower respiratory tract the immune system is mainly formed by alveolar macrophages that reside outside the body lodged in the alveoli of the airway spaces. Dendritic cells (DCs) represent the other main sentinel of the lung immune system placed in the epithelium or underneath the mucosae⁷. In previous studies we have shown that DCs play a pivotal role in the early events of infection, by picking up spores and transporting them swiftly^{8,9}. Two main subsets of conventional DCs have been described so far in the lung: CD103-DCs and CD11b-DCs¹⁰. The latter CD11b-DCs express also CX3CR1, the receptor of fraktalkin, a chemokine involved in cell migration¹¹. An efficient immune system is based on coordinated cell cooperation. In the lung the coordination of cell responses between the different subsets has not been investigated so far. Nonetheless, the role of alveolar macrophages is more complex than simply scavenging throughout the lung and inhibiting inappropriate inflammatory responses. To illustrate this point, evidences have shown that mouse macrophages control both DC-recruitment into the alveoli and subsequent migration of these latter cells carrying antigens to the draining thoracic lymph nodes¹².

To better characterize the lung immune system by using two-photon microscopy, we have developed a novel strategy to overcome lung motion and analyze DC and macrophage dynamic at the homeostasis and under lung infection by *Bacillus anthracis* spores, a Gram-positive bacterium responsible for anthrax disease. Our data reveal unexpected interactions between DCs and macrophages. These contacts may participate in a better coordinate immune response. Our results not only demonstrate the phagocytizing task of lung DCs but also infer a cooperative role of alveolar macrophages and DCs.

2. METHODOLOGY

The ‘methodology’ section is summarized in Fig. 1.

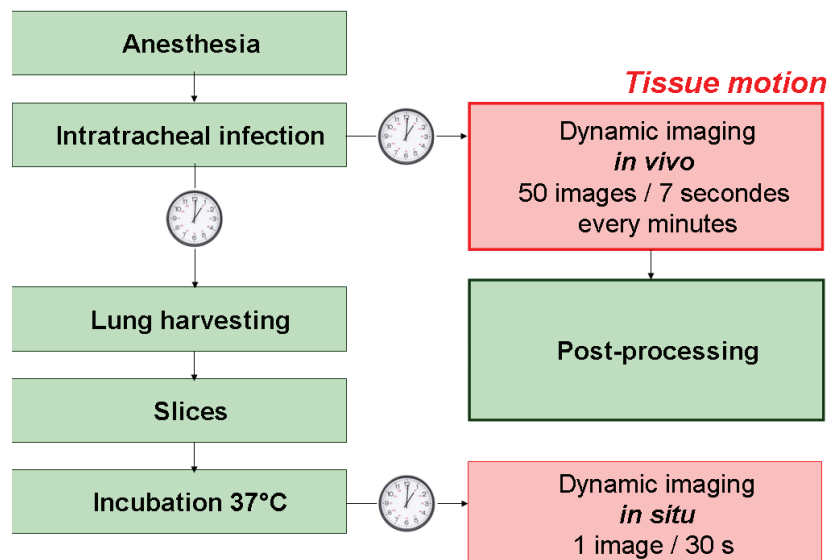


Figure 1. Imaging protocol for both *in situ* and *in vivo* experiments with incubation time. Green boxes: sample or animal preparation and post-processing. Red boxes: acquisition phases.

2.1 Animals

CX3CR1^{+GFP} mice on a C57BL/6 genetic background were maintained under specific pathogen-free conditions at the Plate-forme de Haute Technologie Animale (Institut Jean Roget, La Tronche, France). At the lung level, these mice express GFP mainly on monocytes and a subset of DCs.

The local ethics committee approved all our animal experiments according to international guidelines.

2.2 Infection

Avirulent *B. anthracis* Sterne 7702 strain was originally provided by M. Mock (Institut Pasteur, Paris, France). The spores are chemically labelled with Alexa Fluor 633 (Invitrogen Life Technologies) as follows: 3×10^8 CFU of the spores were stained with the reactive dye in 10 ml of H₂O/0.1 M sodium bicarbonate for 1 h protected from light. Spores were washed five times in H₂O/0.1 M sodium bicarbonate. The spores were maintained in H₂O at 4°C to avoid germination. Mice were anesthetized and 50 μ L of spores were administered intratracheally by 10^8 CFU/mouse. Control mice were administered with the same volume of PBS.

2.3 In vivo staining of alveolar macrophages

Alveolar macrophages were stained by intranasal injection of 30 μ L of rhodamine B-Dextran 10 kDa diluted in PBS 6 hours prior to imaging.

2.4 Imaging setup

2PEF imaging was performed on a Zeiss LSM 710 NLO microscope equipped with a W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC M27 75mm water immersion objective. Excitation is produced at 854 nm by a tuneable pulsed laser (Chameleon Coherent). SHG is epicollected by a dedicated non-descanned detector (NDD) coupled with a 427 ± 20 nm band-pass filter, GFP by a 500-550 nm NDD, Rhodamine by a 565-610 nm NDD and Alexa 633 by a 660-730 nm NDD.

2.5 Sample preparation for *in situ* experiment

Lung explants were cut in two parts with a vibratome (Leica). These samples are glued on a Petri dish filled up with 37°C RPMI medium. Explants were kept 1 h before imaging.

2.6 Undrifting strategy

An important drift was due to air leaking from the lungs after harvesting. Our undrifting strategy used SHG signal as a reference to realign each frame (cf. Fig. 2)¹¹.

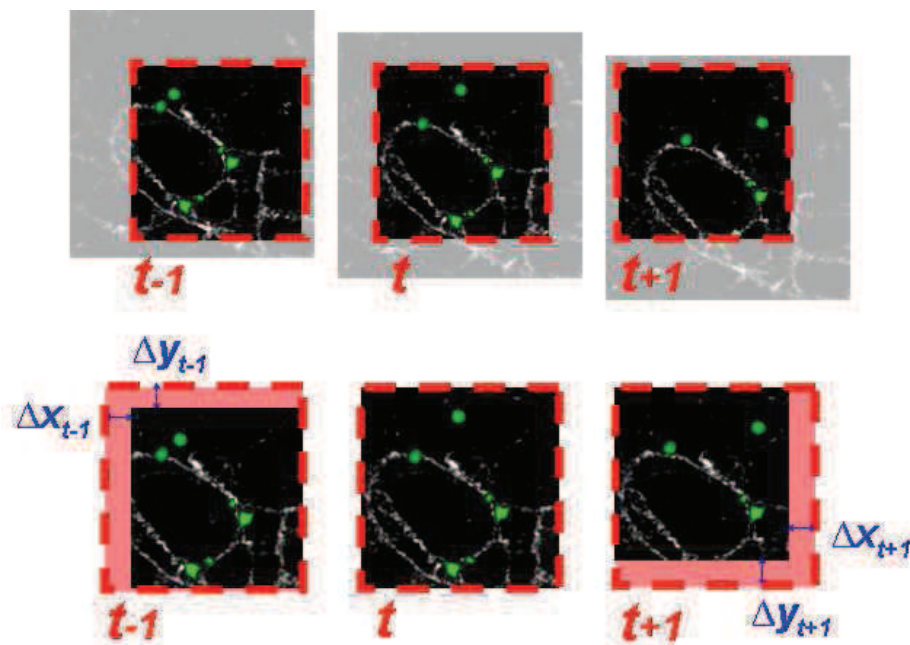


Figure 2 (adapted from reference¹¹.) Dashed red squares show the optic field imaged by the microscope (CX3CR1-GFP cells in green and SHG in grey). The realignment phase consisted in calculating the tissue drift using the maximization of SHG signal cross-correlation.

2.7 Mouse preparation and surgery for *in vivo* experiment

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine/Xylazine (80 mg of Ketamine / kilogram). Mice were surgically intubated and placed under mechanical ventilator. A tiny thoracotomy was then performed, allowing contact between the lung surface and the objective.

2.8 *In vivo* imaging sequence

A series of fifty 4 colours images were acquired for 5 to 7 seconds (acquisition frequency = 16 Hz) every minute (cf. Fig. 3).

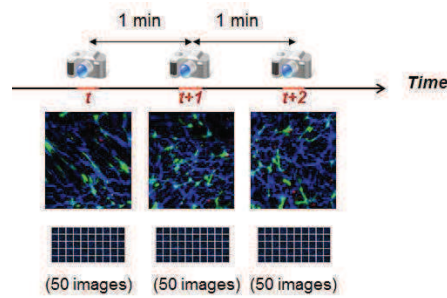


Figure 3. Acquisition timing diagram. 50 images were acquired during 5 to 7 seconds every minute.

2.9 Post-processing

The post-processing phase consisted in extracting the most valuable frame in each series, in order to overcome instability resulting from physiological tissue motion. To achieve this point, an image of interest was selected by the experimenter. This image, further called as 'reference image', was crosscorrelated to each image of each series by calculating the Pearson's coefficient on the SHG signal. The highest correlation score in each serie was then selected for reconstructing the movie. The most correlated image of each series is then selected.

3. RESULTS

3.1 *Bacillus anthracis* spore were captured by CX3CR1 cells: *in situ* imaging

We first performed static 2PEF imaging approximately 5 hours after infection of CX3CR1^{+gfp} mice by avirulent *B. anthracis* Sterne 7702 strain. As shown on Fig. 4A, some CX3CR1 DCs had already phagocytized at 5 hours confirming our previous observations^{8,9}.

We also observed that many spores were captured by other cell type, within the alveoli, suggesting a cooperative role of macrophages and also confirming our previous studies using flow cytometry (Fig. 4B).

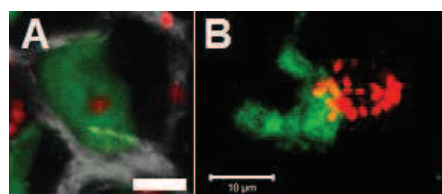


Figure 4. A: Infected CX3CR1 cell 5 hours after intranasal infection by *B. anthracis* spores. Green: CX3CR1 cell, red: *B. anthracis* spores, grey: SHG signal. B: spores-loaded phagosome in contact with a CX3CR1 cell. Two-photon *in situ* imaging, excitation wavelength = 854 nm. Scale bar = 5 μm.

This study was then extended to the dynamics of the capture process, using the protocol described in section 2. Methodology. We could then observe a long process resulting in spore engulfment. (Fig. 5). These results clearly confirmed previous data showing that most spores are captured rapidly by macrophages, while some spores are picked up by CX3CR1-DCs.

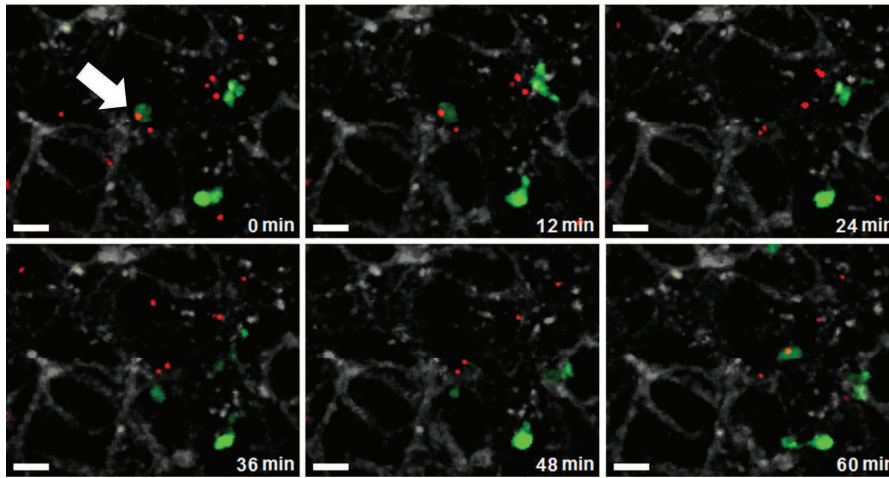


Figure 5. Time-lapse of a *B. anthracis* spore capture by a DC 5 hours after intranasal infection. The white arrow in the first frame highlights the phagocytosing cell. Green: CX3CR1 cell, red: *B. anthracis* spores, grey: SHG signal. Two-photon *in situ* imaging, excitation wavelength = 854 nm. Scale bar = 20 μ m.

3.2 *Bacillus anthracis* spore were captured by CX3CR1 cells: *in vivo* imaging

Next, we wanted to investigate how spore capture was performed *in vivo*. We have applied the imaging protocol described in section 2. Methodology. Although, we have extensively tried to image the capture of spore by CX3CR1-DCs *in vivo*, we could not observe it. In our settings, by using 2PEF imaging we could only reach the sub-pleural area, where spores were less frequently detected, which could explain why we could not see them. However, we constantly observed close contact of DCs with spores. The figure 6 shows a spore moving in a close contact to a DC. In many cases spores were packed close a DCs, suggesting that another phagocytic cell containing the spores, was in close contact to the DCs. As most phagocytic cells in the lung are macrophages, we hypothesised that phagocytic macrophages may take advantage to contact DCs.

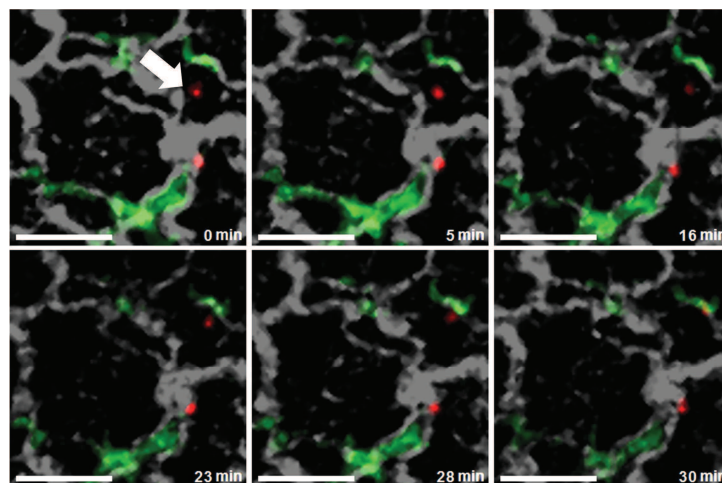


Figure 6. Time-lapse of a *B. anthracis* spore moving toward a DC 5 hours after intranasal infection. The white arrow in the first frame highlights the spore. Green: CX3CR1 cell, red: *B. anthracis* spores, grey: SHG signal. Two-photon *in vivo* imaging, excitation wavelength = 854 nm. Scale bar = 20 μ m.

3.3 Macrophages –DCs contacts: *in vivo* imaging

We then investigated our hypothesis by staining alveolar macrophages of CX3CR1^{+gfp} mice by Rhodamine Dextran as described in section 2. Methodology. Interestingly, we could observe *in vivo* contacts between macrophages and DCs in the lung (cf. Fig. 7).

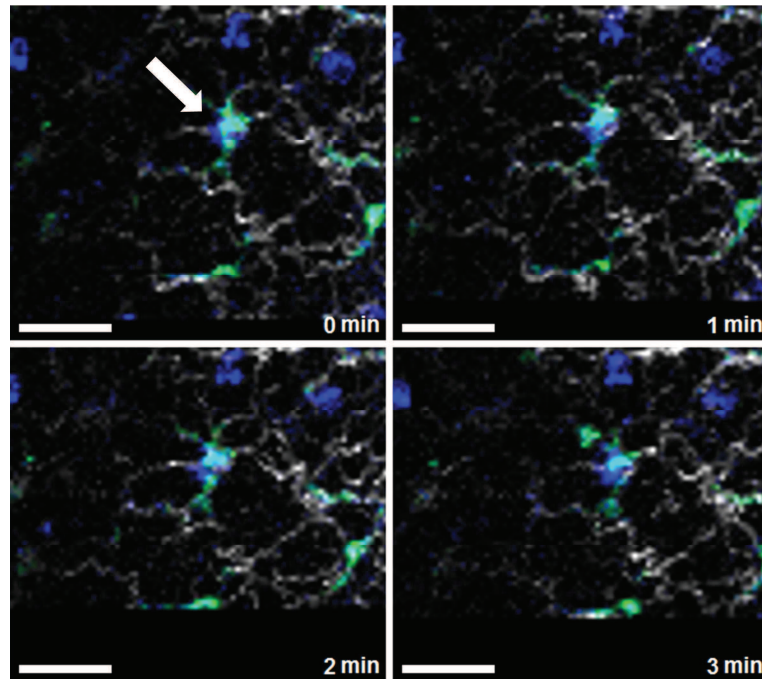


Figure 7. Time-lapse imaging of a macrophage moving along a DC 5 hours after intranasal infection by non-stained spores. The white arrow in the first frame highlights the contact. Green: CX3CR1 cell, blue: macrophage, grey: SHG signal. Two-photon *in vivo* imaging, excitation wavelength = 854 nm. Scale bar = 20 μ m.

4. DISCUSSION

The data presented in section 3. Results clearly demonstrate the major role of CX3CR1 cells in *Bacillus anthracis* spore capture. Even though we have already described direct spore capture by pulmonary DC⁹, such an event does not seem to be the main process given its scarcity.

In vivo data provided as Fig. 6 show a spore slowly moving toward a DC in the upper right corner of the frame. Because spores are non-motile by themselves, this time-lapse infers the existence of a non-fluorescent phagocytosing cell, possibly alveolar macrophages as shown in Fig. 7, acting as a ‘spore carrier’ from the alveoli up to DCs located in the interstitial space.

This first description of cooperation between macrophages and dendritic cells, two major immune cell populations in the lungs, may lead to a better understanding of pulmonary infections.

Acknowledgement: Daniel Fiole was supported by a fellowship from DGA.

REFERENCES

- [1] Looney, M.R., Thornton, E.E., Sen, D., Lamm, W.J., Glenny, R.W., and Krummel, M.F., “Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung.,” *Nature methods* 8(1), 91–6 (2011).
- [2] Kreisel, D., Nava, R.G., Li, W., Zinselmeyer, B.H., Wang, B., Lai, J., Pless, R., Gelman, A.E., Krupnick, A.S., et al., “In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(42), 18073–8 (2010).
- [3] Veres, T.Z., Zoltán Veres, T., Voedisch, S., Spies, E., Tschernig, T., and Braun, A., “Spatiotemporal and functional behavior of airway dendritic cells visualized by two-photon microscopy.,” *The American journal of pathology* 179(2), 603–9 (2011).
- [4] Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W., “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.,” *Science* 248(4951), 73–6 (1990).
- [5] Helmchen, F., and Denk, W., “Deep tissue two-photon microscopy.,” *Nature methods* 2(12), 932–40 (2005).
- [6] Zipfel, W.R., Williams, R.M., and Webb, W.W., “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences.,” *Nature biotechnology* 21(11), 1369–77 (2003).
- [7] Niess, J.H., and Reinecker, H.-C., “Dendritic cells: the commanders-in-chief of mucosal immune defenses.,” *Current opinion in gastroenterology* 22(4), 354–60 (2006).
- [8] Cleret, A., Quesnel-Hellmann, A., Vallon-Eberhard, A., Verrier, B., Jung, S., Vidal, D., Mathieu, J., and Tournier, J.-N., “Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route.,” *Journal of immunology* 178(12), 7994–8001 (2007).
- [9] Fiore, D., Douady, J., Vial, J.-C., Quesnel-Hellmann, A., and Tournier, J.-N., “Dynamics of rapid spore capture by dendritic cells in the lung alveolus.,” *American journal of respiratory and critical care medicine* 186(2), e2–3 (2012).
- [10] Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., et al., “Dendritic cell subsets in health and disease.,” *Immunological reviews* 219, 118–42 (2007).
- [11] Fiore, D., Touvrey, C., Quesnel-Hellmann, A., Douady, J., and Tournier, J.-N., “Shape-based tracking allows functional discrimination of two immune cell subsets expressing the same fluorescent tag in mouse lung explant.,” *PloS one* 7(6), e39831 (2012).
- [12] Jakubzick, C., Tacke, F., Llodra, J., Van Rooijen, N., and Randolph, G.J., “Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways.,” *Journal of immunology* 176(6), 3578–84 (2006).

RESUME

Bacillus anthracis, l'agent infectieux responsable de la maladie du charbon, est un agent pathogène majeur du risque biologique provoqué, notamment en raison de la sévérité de la forme respiratoire de la maladie. Celle-ci résulte de l'inhalation de spores dont les mécanismes de pénétration au niveau pulmonaire sont mal connus à l'heure actuelle.

Cette thèse présente les apports des microscopies confocale et biphotonique à l'étude de ces mécanismes de pénétration des spores inhalées. Le modèle murin CX3CR1^{+/gfp}, dont la sous-population CD11b⁺ de cellules dendritiques (DCs) exprime constitutivement la protéine de fluorescence verte (GFP), a été utilisé dans ces travaux. Une première partie présente le développement d'une méthode automatisée de discrimination des DCs parmi d'autres populations cellulaires exprimant le même fluorophore, en se basant sur le calcul d'un coefficient morphologique. Cette méthode a permis d'étudier dans un deuxième temps le comportement spécifique de la sous-population de DCs CD11b, après infection par des spores de *B. anthracis*. L'étude microscopique a été d'abord effectuée *in situ*, c'est-à-dire sur des explants pulmonaires maintenus dans des conditions favorables à la préservation de l'activité cellulaire, puis *in vivo*, sur des souris anesthésiées et ventilées. Le protocole d'imagerie tire profit d'une stratégie d'acquisition et de traitement *a posteriori* des données permettant de surmonter, sans contrainte mécanique appliquée à l'organe, les problèmes de focalisation liés aux mouvements thoraciques durant la ventilation de l'animal. Cette stratégie originale utilise un sur-échantillonnage de l'acquisition et profite du signal de seconde harmonique généré par le collagène comme référence spatiale ; elle a permis l'observation *in vivo* d'interactions entre DCs et macrophages au niveau pulmonaire. Ces interactions, de type synapse immunologique, sont favorisées par l'infection et présentent donc un rôle fonctionnel qui reste à définir.

La formation de synapses immunologiques entre macrophages et DCs pourrait non seulement représenter un chaînon manquant à l'explication de la pénétration des spores de *B. anthracis* au niveau pulmonaire, mais pourrait aussi constituer un enjeu crucial dans la compréhension de la réponse immunitaire associée aux infections pulmonaires.

ABSTRACT

Bacillus anthracis, the causative agent of anthrax, is a major bioterrorism pathogen mainly because it can lead to a severe respiratory form of the disease. This form results from inhalation of spores, whose ways of entry into the lungs are not fully understood.

This thesis reports the contribution of confocal and two-photon microscopy to the study of the penetration mechanisms of inhaled spores. The animal model utilized was CX3CR1^{+/gfp} mouse, which constitutively expresses the green fluorescent protein (GFP) on CD11b⁺ dendritic cells (DCs). First, we present an automated method allowing discrimination of DCs among other GFP expressing cells, based on a morphologic coefficient. This method was then applied to the study of the specific behavior of CD11b DCs, after infection by *B. anthracis* spores. The microscopic study was first performed *in situ*, i.e. on explanted organs kept in conditions favorable to cell dynamics, then *in vivo*, i.e. on anesthetized and ventilated mice. In this case the imaging protocol profits from both acquisition and post-processing strategies, and allowed overcoming the focalization pitfalls coming from chest movements during ventilation. This novel strategy is based on an over-sampling of frame acquisition and utilizes second harmonic generation signal from alveolar collagen as a spatial reference. It led to the first ever *in vivo* observation of interactions between DCs and macrophages at the lung level. These immunological synapse-like structures are promoted by infection and thus display a functional role unknown until now.

The formation of macrophages-DCs immunological synapses not only could represent a missing-link in figuring out the *B. anthracis* spore penetration mechanisms at the lung level, but more importantly could lead to a better understanding of the immune response associated with pulmonary infections.