

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Nyssen, Laura

Promoteur(s) : 24255

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/20518>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

RÔLE DES MACROPHAGES RÉGULATEURS PULMONAIRES DANS LA PATHOGÉNIE DE LA BPCO



Année académique

2023-2024

Promoteur

Laurence Fievez

Co-promoteur

Fabrice Bureau

NYSSEN Laura

Master 2 sciences biomédicales

Abstract

The respiratory system, which is constantly exposed to environmental stresses, has defence mechanisms that enable it to react to threats or, on the contrary, to tolerate such exposure. Under physiological conditions, the human body naturally develops an habituation to the particles it inhales on a daily basis, regulating its response to danger signals.

Among the key players in this process are the regulatory macrophages and their ability to secrete IL-10. In the context of asthma, studies have shown that exposure of mice to CpG motifs led to an increase in the number of these cells, as well as in their production of IL-10. These findings have stimulated research into their potential roles in other respiratory diseases such as obstructive pulmonary disease (COPD).

COPD, classified by the WHO as the third leading cause of death worldwide in 2019, affects millions of people without the benefit of a cure, underlining the urgency of research in this field.

Our study therefore focused on characterising regulatory macrophages in a mouse model of short-term exposure to cigarette smoke, mimicking the first years of smoking in humans. Our aim was to validate this model by assessing lung inflammation through analysis of immune cells in bronchoalveolar lavages and lung parenchyma. We then quantified pulmonary regulatory macrophages and measured their IL-10 production.

Our results indicate that regulatory macrophages from mice exposed to cigarette smoke secrete significantly more IL-10 than those from unexposed mice, supporting the hypothesis that these cells could play a preventive role in the development of COPD. These results therefore reinforce the interest in Mregs as potential targets for future therapeutic interventions in inflammatory lung diseases such as COPD. Further studies are obviously needed to fully validate these results and broaden our understanding of the immunoregulatory mechanisms involved.

Résumé

L'appareil respiratoire, constamment exposé aux agressions environnementales, possède des mécanismes de défense lui permettant de réagir aux menaces ou au contraire, de tolérer ces expositions. En effet, dans des conditions physiologiques le corps humain développe naturellement une accoutumance envers les particules quotidiennement inhalées, régulant ainsi sa réponse aux signaux de danger.

Parmi les acteurs clés de ce processus, se trouvent les macrophages régulateurs et leur capacité de sécrétion d'IL-10. Dans le contexte de l'asthme, des études ont montré que l'exposition de souris à des motifs CpG entraînait une augmentation du nombre de ces cellules, ainsi que de leur production d'IL-10. Ces découvertes ont stimulé la recherche sur leurs rôles potentiels dans d'autres maladies respiratoires comme la bronchopneumopathie obstructive (BPCO).

La BPCO, classée par l'OMS comme la troisième cause mondiale de décès en 2019, affecte des millions de personnes sans bénéficier d'un traitement curatif, soulignant ainsi l'urgence de la recherche dans ce domaine.

Notre étude s'est donc concentrée sur la caractérisation des macrophages régulateurs dans un modèle murin exposé à court terme à la fumée de cigarettes, mimant les premières années de tabagisme chez l'homme. Notre objectif était de valider ce modèle en évaluant l'inflammation pulmonaire à travers l'analyse des cellules immunitaires dans les lavages bronchoalvéolaires et le parenchyme pulmonaire. Nous avons ensuite quantifié les macrophages régulateurs pulmonaires et mesuré leur production d'IL-10.

Nos résultats indiquent que les macrophages régulateurs des souris exposées à la fumée de cigarettes sécrètent significativement plus d'IL-10 que ceux des souris non exposées, soutenant ainsi l'hypothèse selon laquelle ces cellules pourraient jouer un rôle préventif dans le développement de la BPCO. Ces résultats renforcent donc l'intérêt des Mregs comme cibles potentielles pour des interventions thérapeutiques futures dans les maladies pulmonaires inflammatoires comme la BPCO. Des études supplémentaires sont, évidemment, nécessaires afin de valider pleinement ces résultats et élargir la compréhension des mécanismes immunorégulateurs impliqués.

Remerciements

À l'issue de la réalisation de ce mémoire, je tiens à remercier les personnes qui y ont contribué de près ou de loin.

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Professeur Fabrice Bureau pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire.

Je tiens également à adresser un immense merci à Laurence Fievez, ma promotrice, dont la bienveillance et les conseils précieux ont été d'une importance capitale ! Laurence a été bien plus qu'une guide académique ; sa compréhension, sa gentillesse et son engagement ont véritablement enrichi cette expérience, tant sur le plan personnel que professionnel. Merci mille fois!

Un grand merci à tous les membres du laboratoire, Amandine, Cédric, Kiréna, Joseph, Catherine, Julien et Joey. Leur gentillesse et leur expertise ont créé un environnement propice à l'apprentissage et au partage. Grâce à eux, j'ai non seulement acquis de nouvelles connaissances, mais j'ai aussi eu le privilège de rencontrer des personnes formidables ! Je vous souhaite le meilleur à l'avenir, j'espère qu'il sera rempli de jolies choses et de chouettes découvertes ! Encore merci pour tout !

Un immense merci à mes amis exceptionnels, Emma, Amanda, Auriane, Renaud, Ayoub, merci d'être vous, merci pour votre rôle d'amis, mais également de famille, merci de m'avoir accompagné durant toutes ces années, merci d'avoir cru en moi et merci d'avoir toujours répondu présent quand j'en avais besoin.

Enfin, j'aimerais remercier mes grands-parents, qui ont toujours cru en mes capacités et qui m'ont encouragé tout au long de ces études, merci pour votre soutien.

Table des matières

Introduction	1
Partie 1 : Le système respiratoire	1
1. Homéostasie et défenses respiratoires.....	1
2. La réponse immunitaire.....	3
2.1. La réponse immunitaire innée.....	3
2.1.1. Les cellules dendritiques.....	3
2.1.2. Les neutrophiles.....	3
2.1.3. Les éosinophiles.....	3
2.1.4. Les monocytes.....	4
2.1.5. Les macrophages	5
2.1.5.1. Les macrophages alvéolaires.....	6
2.1.5.2. Les macrophages régulateurs.....	6
2.5.2. Caractérisation des MA et Mregs.....	7
3. La réponse immunitaire adaptative.....	9
4. Les mécanismes immunorégulateurs du poumon.....	10
Partie 2 : La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive	11
5. Réponse initiale à la fumée de cigarettes.....	12
6. Évaluation de la gravité de la BPCO.....	14
7. Les phases d'exacerbation dans la BPCO.....	15
8. Traitements	15
Partie 3 : Le potentiel thérapeutique des Mregs pulmonaires	17
9. Les Mregs et l'asthme.....	17
10. Les Mregs et la BPCO.....	18
Objectifs	20
Matériel et méthodes	21
1. Animaux expérimentaux	21

2. Réactifs et anticorps	21
3. Exposition à la fumée de cigarettes.....	22
4. Lavage bronchoalvéolaire	23
5. Histologie.....	23
6. Techniques relatives à la cytométrie en flux.....	23
6.1. Obtention des différents types cellulaires	23
6.2 Marquage FACS.....	24
6.3. Phénotype / Tri cellulaire.....	24
7. Évaluation de la production d'IL-10.....	25
8. Analyses statistiques	25
R é s u l t a t s	26
1. Stratégie de cytométrie en flux.....	26
2. Analyse de l'inflammation pulmonaire.....	28
2.1. Analyse des lavages bronchoalvéolaires.....	28
2.2. Analyse par la cytométrie en flux.....	30
2.3. Histologie.....	33
3. Production d'IL-10 par les macrophages régulateurs.....	36
D i s c u s s i o n & P e r s p e c t i v e s	37
1. Mise au point du modèle murin de BPCO.....	38
2. Production d'IL-10 par les macrophages régulateurs.....	40
R é f é r e n c e s	42

Abréviations

BPCO	broncho-pneumopathie chronique obstructive
BSA	bovine serum albumin
cAMs	macrophages alvéolaires classiques
CAT	COPD Assessment Test
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
CMoP	progéniteur commun aux monocytes
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
CV	capacité vitale
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8
CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11
DAMP	damage-associated molecular pattern
DC	cellule dendritique
DPBS.	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Acide éthylènediaminetétracétique
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assays
FBS	foetal bovine serum
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP	<i>progéniteur granulocytaire-monocytaire</i>
GOLD	Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HSC	cellule souche hématopoïétique
IFN- γ	interféron gamma
IL-10	interleukine-10
LB	lymphocyte B
LBA	lavages broncho-alvéolaires
LT	lymphocyte T

MA	macrophage alvéolaire
MDP	progéniteur commun aux monocytes et aux cellules dendritiques
MHC-II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
Mreg	macrophage régulateur
NETs	neutrophil extracellular traps
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered-saline
PRR	pattern recognition receptor
RBC Lysis	red blood cell lysis
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
Th1	lymphocyte T helper 1
Th2	lymphocyte T helper 2
Th17	lymphocyte T helper 17
TLR	Toll-like receptor
Treg	lymphocyte T régulateur
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEMS	volume expiratoire maximal par second
WT	wild-type

Introduction

Partie 1 : Le système respiratoire

1. Homéostasie et défenses respiratoires

L'appareil respiratoire débute au sein des cavités nasales/buccales et s'étend à travers les voies aériennes jusqu'aux poumons. À l'extrémité de ce système se trouvent des sacs alvéolaires entourés de capillaires sanguins, permettant les échanges gazeux avec l'environnement (Figure 1). Bien que cette interaction constante soit vitale pour la survie humaine, elle peut également compromettre l'intégrité de cet organe. Afin de le préserver, différents mécanismes de défense sont mis en place. Parmi ceux-ci, nous retrouvons l'arborisation bronchique, favorisant la sédimentation des particules inhalées, ou encore, l'épithélium pseudostratifié. Ce dernier, grâce à ses cellules ciliées et à la présence de mucus, assure l'élimination efficace des particules nocives.

Ce revêtement présente également des fonctions immunitaires capables de répondre aux stimuli rencontrés lors de ces interactions (Hartl et al., 2018 ; Ardain et al., 2020).

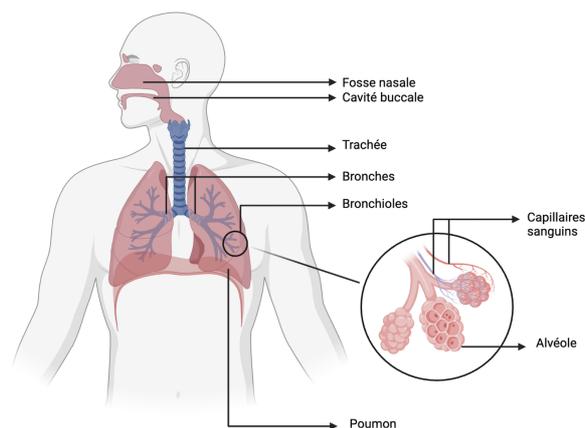


Figure 1 : Anatomie du système respiratoire.

Les voies aériennes, incluant la trachée et les bronches, permettent le passage de l'air vers les poumons. Les alvéoles, entourées de capillaires sanguins, sont les sites d'échanges gazeux entre l'air et le sang
Schéma créé sur BioRender.com le 22/11/2023

2. La réponse immunitaire

En 1959, le scientifique Frank Macfarlane Burnet posait les fondations de la théorie du soi et du non-soi, établissant ainsi la capacité du système immunitaire à distinguer, les éléments propres à l'organisme, des agents étrangers (Burnet, 1959). Cette théorie, fut étoffée en 1994, par Polly Matzinger, qui y ajouta la notion de « danger » (Matzinger, 1994). Selon cette nouvelle perspective, les signaux d'alarme, qu'ils soient d'origine virale, bactérienne (PAMPs - pathogen-associated molecular patterns), ou encore endogène (DAMPs - damage-associated molecular patterns), stimulent, spécifiquement, les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs - pattern recognition receptors) afin de déclencher une réaction immune appropriée (Figure 2).

Ce processus se caractérise principalement par deux types de réponses : l'immunité innée, définie par sa rapidité et sa non-spécificité, et l'immunité adaptative, qui bien que plus lente se révèle plus ciblée.

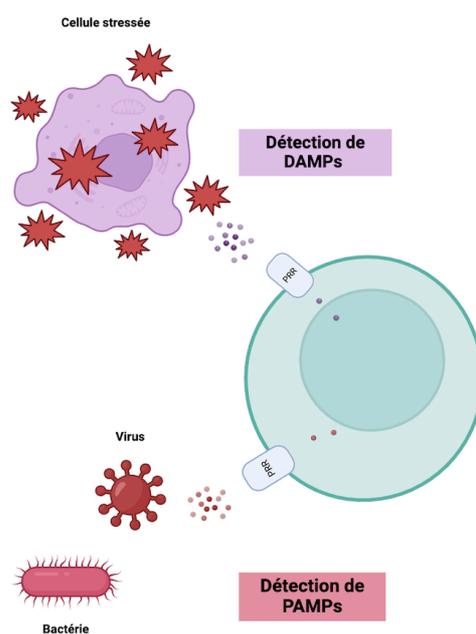


Figure 2 : PAMPs, DAMPs et récepteurs PRR dans la réponse immunitaire. Les PAMPs (motifs moléculaires associés aux agents pathogènes) et les DAMPs (motifs moléculaires associés aux dommages) activent les récepteurs PRR (de reconnaissance de motifs) afin de déclencher une réponse immunitaire. Schéma créé sur BioRender.com le 10/05/2024

2.1 La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée, mobilise une variété de types cellulaires. Parmi ceux-ci, seuls les cellules dendritiques, les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les macrophages seront abordés dans le cadre de ce travail.

Ces cellules présentent des récepteurs PRRs, capables de reconnaître les signaux d'alarme abordés précédemment. Cette interaction permet la libération de médiateurs inflammatoires et favorise, dans certains cas, la mise en place du processus de phagocytose (Abbal, 2013 ; Park et al., 2022).

2.1.1 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle crucial en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA), établissant un lien entre l'immunité innée et adaptative. Dotées de PRR, ces cellules migrent vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs, initiant ainsi une réponse immunitaire spécifique. Ce processus est fondamental pour la reconnaissance précoce des agents pathogènes et la mise en place d'une réponse immunitaire rapide et efficace (Upham et Xi, 2017).

2.1.2 Les neutrophiles

Présents en abondance dans la circulation sanguine, les neutrophiles sont donc distribués dans l'ensemble du poumon. Leur mobilisation rapide vers les sites d'inflammation leur permet de combattre les agressions par phagocytose, exocytose de leurs granules cytotoxiques ou encore par libération de pièges extracellulaires de neutrophiles (NETs) (Summers et al., 2010 ; Radermecker et al., 2020).

2.1.3 Les éosinophiles

Les éosinophiles sont une catégorie de leucocytes jouant un rôle important dans la réponse immunitaire et, en particulier, dans la défense contre les parasites et les réactions allergiques

(Rothenberg et Hogan, 2006). Ces cellules agissent, principalement, en procédant à la dégranulation, processus par lequel elles libèrent le contenu de leurs granules cytotoxiques, modulant ainsi l'inflammation.

2.1.4 Les monocytes

Les monocytes peuvent être répartis en trois catégories : classiques, intermédiaires et non-classiques. Chez la souris, deux populations sont distinguées : les classiques, équivalents à ceux retrouvés chez l'homme, et les patrouilleurs, représentant les « non-classiques » chez l'humain.

Les monocytes classiques, également appelés Ly-6C^{hi}, en raison de l'expression du marqueur Ly6c à leur surface, sont recrutés au niveau des sites inflammatoires (Shi & Pamer, 2011). Ces cellules, capables de phagocytose, peuvent reconstituer des populations cellulaires, notamment les macrophages tissulaires, les monocytes patrouilleurs ou encore les cellules dendritiques (Epelman et al., 2014b ; Molawi et al., 2014).

Concernant leur origine, elles seraient issues à la fois du progéniteur commun (MDP) et, du progéniteur exclusif des monocytes (cMoP) (Figure 3) (Hettinger et al., 2013; Ginhoux et Jung, 2014).

Cependant, cette théorie est de plus en plus contestée. Certains chercheurs suggèrent un engagement dans la lignée monocyttaire dès le stade de cellule souche hématopoïétique (HSCs) (Guilliams et al., 2018). D'autres études avancent même une contribution du progéniteur granulocytaire-monocytaire (GMP) lors de la différenciation des monocytes, indépendamment de l'intervention du MDP (Yáñez et al., 2017).

Les monocytes patrouilleurs, caractérisés par une faible expression de Ly-6C (Ly-6C^{lo}), peuvent, quant à eux, se différencier à partir de monocytes classiques (Mildner et al., 2017). Ils assurent la surveillance des vaisseaux sanguins (Ginhoux et Jung, 2014) et, en cas de lésion, ils peuvent ingérer les débris cellulaires, favorisant ainsi la réparation tissulaire (Carlin et al., 2013).

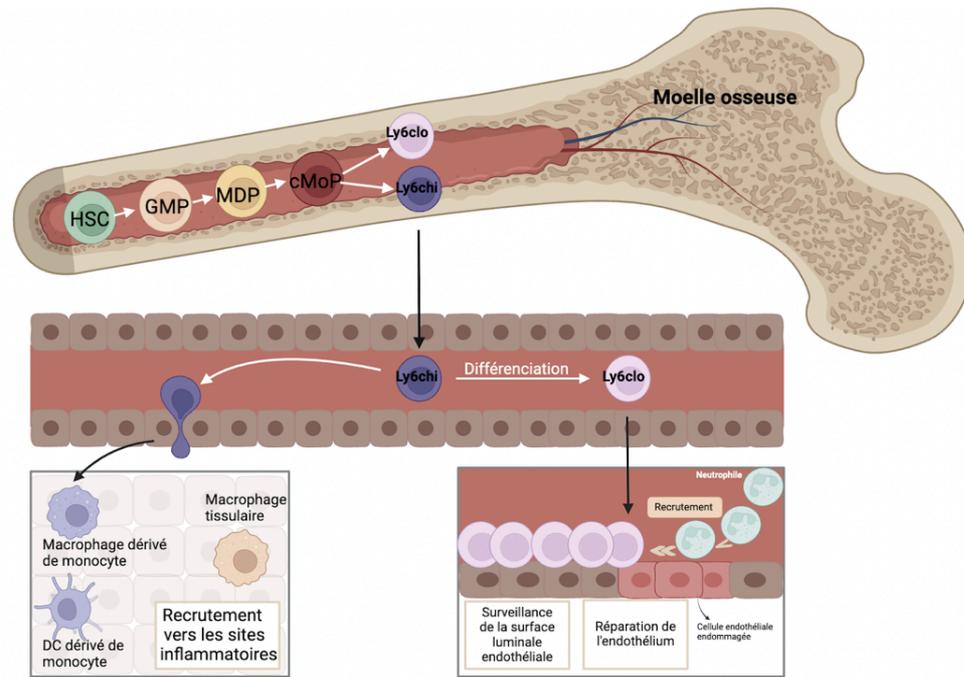


Figure 3 : Les monocytes classiques et patrouilleurs de la souris. Cette figure illustre la différenciation des monocytes classiques $Ly6C^{hi}$ et des monocytes patrouilleurs $Ly6C^{lo}$. $cMoP$, progéniteur commun aux monocytes ; DC, cellule dendritique ; GMP, progéniteur granulocytaire-monocytaire ; HSC, cellule souche hématopoïétique ; MDP, progéniteur commun aux monocytes et aux cellules dendritiques. Figure adaptée de (Ginhoux et Jung, 2014) créée sur BioRender.com le 02/03/2024

2.1.5 Les macrophages

Les macrophages, découverts à l'origine par Elie Metchnikoff, sont des cellules présentes dans tous les tissus, assurant un rôle de sentinelle immunitaire. Elles sont capables de phagocyter les débris cellulaires et bactéries, permettant ainsi de maintenir l'homéostasie (Metchnikoff, 1892; Murray et Wynn, 2011; Davies et al., 2013).

Au sein des voies respiratoires murines, il existe deux types de macrophages : les macrophages alvéolaires (MAs) et les macrophages régulateurs (Mregs) (Fathi et al., 2001 ; Bedoret et al, 2009 ; Hoppstädter et al., 2010 ; Liégeois et al., 2018). Les MAs, caractérisés par leur forme sphérique, sont dotés de microvillosités ainsi que d'un cytoplasme volumineux, renfermant une variété d'organelles. Les Mregs, quant à eux, ont une surface plus lisse et plus restreinte.

Ces cellules se distinguent également par leur localisation, leurs fonctions et leur ontogénie (Fathi et al., 2001 ; Hoppstädter et al., 2010 ; Liégeois et al., 2018).

2.1.5.1 Les macrophages alvéolaires

Les MAs jouent un rôle essentiel dans la préservation de l'intégrité du poumon. Leur emplacement stratégique dans la lumière alvéolaire les place en contact direct avec l'air inhalé, faisant de ces cellules, les défenseurs de première ligne. Les MAs sont activés, notamment, par l'interaction des PAMPs avec leurs récepteurs de type TLR (TLR – Toll-like receptor), ce qui entraîne une augmentation de leur activité phagocytaire et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Hoppstädter et al., 2010).

Leur origine a longtemps été attribuée au modèle linéaire « *mononuclear phagocyte system* » proposé par Van Furth et Cohn en 1968. Ce modèle suggère que les macrophages sont des cellules complètement différenciées, dérivant de monocytes sanguins circulants (Van Furth et Cohn, 1968). Cependant, l'émergence de nouvelles études démontrant la capacité de ces cellules à proliférer localement (Sawyer et al., 1982 ; Parwaresch et Wacker, 1984 ; Czernielewski et Demarchez, 1987) ou encore leur présence dans le sac vitellin avant l'hématopoïèse primaire (Naito et al., 1996), ont contredit cette théorie. En effet, ces travaux suggèrent que les macrophages alvéolaires proviennent d'une source embryonnaire initiale et sont activés par le Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), un facteur de croissance, afin de se différencier en cellules fonctionnelles. Ils se maintiennent ensuite et se multiplient dans les tissus pulmonaires indépendamment des monocytes circulants. Toutefois, en cas de perturbation induite par un stress génotoxique, les monocytes classiques peuvent se différencier en macrophages alvéolaires pour reconstituer la population (Epelman et al., 2014a; Lavin et al., 2015).

2.1.5.2 Les macrophages régulateurs

Les macrophages régulateurs sont situés au sein de l'interstitium pulmonaire, dans les zones péri-bronchiques, dans le parenchyme alvéolaire, et parfois même dans la lumière alvéolaire (Sabatel et al., 2017 ; Schyns et al., 2019b ; Tang et al., 2022).

Concernant leur ontogénie, les études rapportent des observations contradictoires. En 2013, des chercheurs suggéraient que ces cellules étaient capables de se renouveler indépendamment des monocytes sanguins (Jakubzick et al., 2013). En revanche, en 2016, des scientifiques avançaient l'idée que des vagues de progéniteurs embryonnaires peuplaient l'interstitium pulmonaire pendant l'embryogenèse et les premières semaines après la naissance, tandis qu'à l'âge adulte, les Mregs provenaient de progéniteurs circulants (Tan et Krasnow, 2016). Quelques années plus tard, l'origine monocyttaire de ces cellules a été confirmée par différents scientifiques (Gibbins et al., 2017 ; Chakarov et al., 2019; Schyns et al., 2019). Ainsi, dans certaines conditions inflammatoires, le nombre de Mregs augmente dans le poumon murin, et, dans la plupart des cas, ces nouvelles cellules se différencient à partir de monocytes (Misharin et al., 2013; Pugliese et al., 2017; Sabatel et al., 2017; Schyns et al., 2019).

Les Mregs expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC-II). Ils sont donc capables de phagocyter des corps étrangers (Bedoret et al., 2009 ; Gibbins et al., 2017 ; Sabatel et al., 2017 ; Chakarov et al., 2019 ; Schyns et al., 2019 ; Tang et al., 2022), confirmant ainsi leur implication dans la présentation antigénique (Legrand et al., 2024).

Ils se caractérisent, aussi, par leur capacité régulatrice, notamment par la production conséquente d'interleukine-10 (IL-10) (Bedoret et al., 2009 ; Saraiva et O'Garra, 2010; Sabatel et al., 2017). Cette molécule, sécrétée par diverses cellules du système immunitaire inné et adaptatif, est capable d'inhiber les fonctions pro-inflammatoires des cellules phagocytaires mononucléées, notamment la présentation d'antigènes (Bedoret et al., 2009).

2.5.2 Caractérisation des MA et Mregs

Après avoir exploré l'origine, l'apparence et la fonction de ces cellules, il est essentiel de reconnaître que leur analyse comporte quelques défis.

En effet, la forte auto-fluorescence des MAs peut parfois compliquer l'interprétation des résultats en cytométrie en flux. Les marqueurs couramment utilisés sont, parfois, associés à des fluorochromes capables d'émettre dans les mêmes canaux que cette auto-fluorescence

intrinsèque. Cela peut donc créer une certaine confusion dans l'interprétation des données (Joshi et al., 2018). Malgré ces obstacles, la caractérisation précise de ces cellules reste cruciale pour améliorer la compréhension de leur fonction au sein du microenvironnement pulmonaire. Pour éviter ces problèmes, un panel de marqueurs est choisi en privilégiant des fluorochromes moins sensibles à ce phénomène. Les MAs présentent le phénotype suivant: CD45⁺, F4/80⁺, CD64⁺, CD11b⁻, CD11c⁺ et le SiglecF⁺ (Tableau I) (Johansson et al., 1997 ; Bedoret et al., 2009 ; Gibbings et al., 2017 ; Sabatel et al., 2017).

Concernant les Mregs, la cytométrie en flux a révélé qu'ils étaient, approximativement, dix fois moins nombreux que les MA, se distinguant par leur faible auto-fluorescence et par l'expression spécifique des marqueurs : CD45⁺, F4/80⁺, CD64⁺, ly6C^{lo}, CD11b⁺, CD11c^{-/lo} (Tableau I) (Sabatel et al., 2017 ; Liegeois et al., 2018 ; Schyns et al., 2018).

Tableau I : Phénotype des macrophages

Type cellulaire	Phénotype
Macrophages alvéolaires	CD45 ⁺ , SiglecF ⁺ , CD64 ⁺ , F4/80 ⁺ , Ly6C ⁻ , CD11b ⁻ , CD11c ⁺
Macrophages régulateurs	CD45 ⁺ , SiglecF ⁻ , CD64 ⁺ , F4/80 ⁺ , Ly6C ^{lo} , CD11b ⁺ , CD11c ^{-/lo}

(D'après Johansson et al., 1997 ; Bedoret et al., 2009 ; Gibbings et al., 2017 ; Sabatel et al., 2017; Liégeois et al., 2018).

3. La réponse immunitaire adaptative

Contrairement à l'immunité innée, qui offre une réponse immédiate et non spécifique aux agents infectieux, l'immunité adaptative cible leurs antigènes afin de développer une réponse appropriée. Les principaux acteurs de ce type de réaction sont les lymphocytes B (LB) et T (LT) (Sallusto, 2016). Les LB, responsables de l'immunité humorale, se différencient en plasmocytes afin de produire des anticorps dirigés contre ces agressions, tandis que les LT, « coordonnent » l'ensemble de ce système.

La classification des LT s'articule autour de deux catégories : les lymphocytes T CD8⁺, qui initient le processus de mort cellulaire, et les lymphocytes T CD4⁺ qui modulent l'ensemble de la réponse immunitaire (Chen and Kolls, 2013). Parmi ceux-ci, les lymphocytes T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17), ou encore les T régulateurs (Treg), peuvent, notamment, être distingués. Ces sous-types de cellules sont capables de sécréter diverses molécules afin de moduler et coordonner la réponse immunitaire (Figure 4).

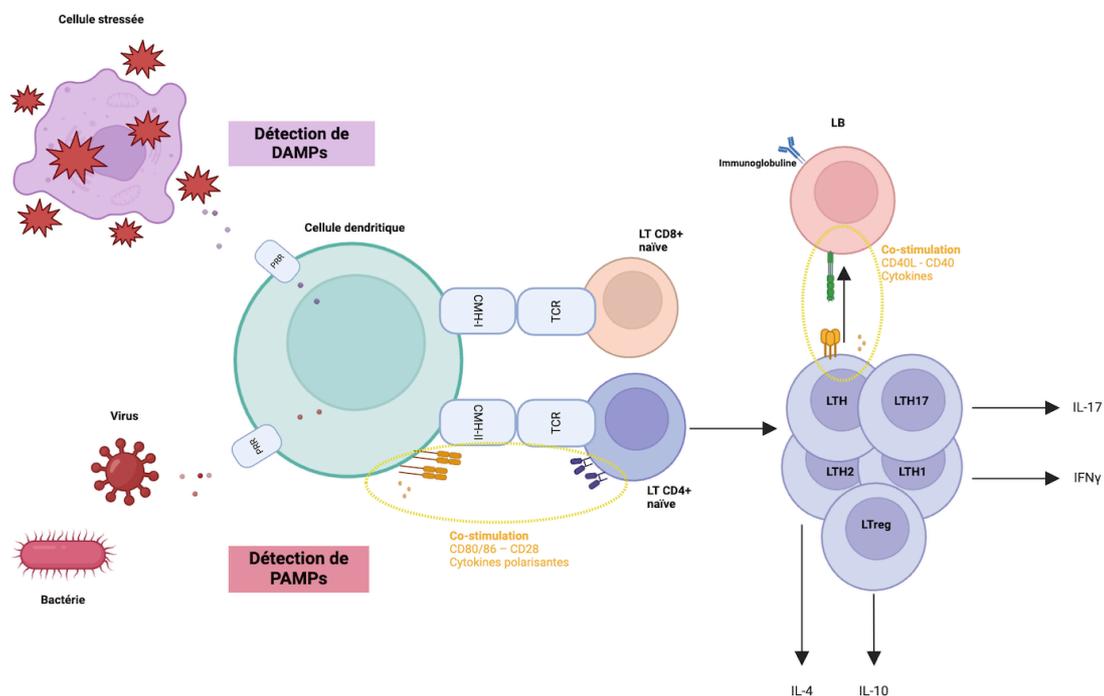


Figure 4 : La réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques, via leurs PRRs, détectent les PAMP/DAMPs et les présentent aux récepteurs TCR (T-cell receptor) des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ via les molécules CMH-II. En fonction des cytokines relarguées par les cellules dendritiques et les phénomènes de co-stimulation, le lymphocyte T CD4⁺ va pouvoir se différencier notamment en Th1, Th2, Th17 ou Tregs. Ces sous-types de cellules sont capables de sécréter diverses molécules afin de moduler et coordonner la réponse immunitaire comme IL-4,-10,-17 ou encore l'IFNγ. Ils sont également capables d'activer les lymphocytes B. Schéma créé sur BioRender.com le 10/05/2024

4. Les mécanismes immunorégulateurs du poumon

Bien que le système immunitaire pulmonaire soit doté de dispositifs de défense lui permettant de répondre aux menaces, il possède également des mécanismes de tolérance. Dans des conditions physiologiques, le corps humain développe naturellement une accoutumance envers les particules quotidiennement inhalées, régulant ainsi sa réponse aux signaux de danger. Compte tenu de l'interaction constante avec l'environnement extérieur, ce phénomène permet d'éviter les réponses immunitaires inappropriées.

Diverses cellules, telles que les lymphocytes T régulateurs, les cellules épithéliales pulmonaires, ou encore les lymphocytes B régulateurs participent à ce processus (Sakaguchi et al., 2008 ; Iwata et al., 2011 ; Zhao et al., 2017 ; Weitnauer et al., 2016). Cependant, dans le cadre de ce mémoire, nous nous concentrerons spécifiquement sur l'effet immunorégulateur des Mregs, abordé dans le point 2.1.5.2.

Partie 2 : La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) constitue un problème de santé majeur à l'échelle mondiale causant, selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS*), 3,23 millions de décès en 2019. L'apparition de cette maladie, regroupant un ensemble de troubles respiratoires chroniques progressifs, est favorisée dans 85% des cas par l'inhalation répétée de fumée de cigarettes (Degano et Soumagne, 2014). Cependant, il est important de noter que d'autres facteurs, tels que la pollution atmosphérique, les prédispositions génétiques, l'exposition professionnelle à des agents irritants, ou encore les infections respiratoires, peuvent contribuer à son développement.

Cette affection se caractérise, cliniquement, par une inflammation pulmonaire persistante, engendrant une surproduction de mucus, propice au développement de la bronchite chronique. Elle peut également se manifester par l'apparition d'emphysème, une altération des tissus pulmonaires diminuant la surface disponible pour les échanges gazeux (MacNee, 2005).

Les symptômes courants comprennent la dyspnée et la toux chronique, parfois accompagnées d'expectorations (Fuhrman et Delmas, 2010). Ceux-ci peuvent aussi entraîner une détérioration du bien-être psychique, susceptible de provoquer des troubles mentaux comme l'anxiété ou la dépression (Decramer, 2008).

Malgré l'impact significatif de cette maladie sur la santé publique, en raison de sa progression lente et insidieuse, elle demeure souvent sous-diagnostiquée. Bien que le tabagisme soit reconnu comme étant le facteur de risque principal, il est important de souligner qu'un tiers des patients atteints de cette maladie sont non-fumeurs, suggérant l'influence d'autres facteurs dans son développement (Agustí and Hogg, 2019). De plus, il est essentiel de noter que tous les fumeurs ne développent pas nécessairement la BPCO. Il est donc impératif d'approfondir les recherches à ce sujet afin de mieux comprendre

*[https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))

cette maladie et d'étudier les mécanismes immunorégulateurs qui pourraient y être associés.

5. Réponse initiale à la fumée de cigarettes

Lors de l'inhalation de la fumée de cigarettes, les composés irritants endommagent les cellules des voies respiratoires, notamment les cellules épithéliales pulmonaires et les macrophages. Les substances issues de ces lésions, et présentes dans la fumée de tabac, agissent comme des signaux pour les récepteurs PRR, enclenchant ainsi les voies de signalisation cellulaires responsables de l'inflammation (Pouwels et al., 2016).

En réponse à cela, les macrophages sécrètent une variété de facteurs chimiotactiques tels que le C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), le C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1) et le C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8), attirant davantage de cellules inflammatoires dans les poumons, notamment les monocytes et les neutrophiles. Comme mentionné précédemment, les monocytes sont capables de se différencier en macrophages alvéolaires ou régulateurs, cette infiltration cellulaire participe donc à l'augmentation du nombre de macrophages dans les tissus et sécrétions pulmonaires (O'Shaughnessy *et al.*, 1997 ; Pons *et al.*, 2005 ; Kaku *et al.*, 2014).

Les neutrophiles, recrutés également en grandes quantités, libèrent des protéases comme l'élastase neutrophilique, pouvant ainsi contribuer à la sécrétion excessive de mucus (Pilette et al., 2007 ; Barnes, 2016 ; Tregay et al., 2019 ; Jasper et al., 2019). Cette molécule joue aussi un rôle dans le développement de l'emphysème en dégradant les tissus pulmonaires, notamment les fibres d'élastine. Les patients présentant une déficience en α 1-antitrypsine, une protéine protégeant les poumons contre les dommages protéolytiques causés par des enzymes telles que l'élastase neutrophilique, sont donc prédisposés au développement de la BPCO (Brusselle et al., 2011 ; Stoller & Aboussouan, 2012b).

Les cellules épithéliales endommagées par ces aérosols, sécrètent du transforming growth factor beta (TGF- β), favorisant la fibrose bronchique. Ces cellules, produisent, au même titre

que les macrophages, des chimiokines telles que le C-X-C motif chemokine ligand 9,10 et 11 (CXCL9,10,11) permettant de recruter les lymphocytes T (Figure 5).

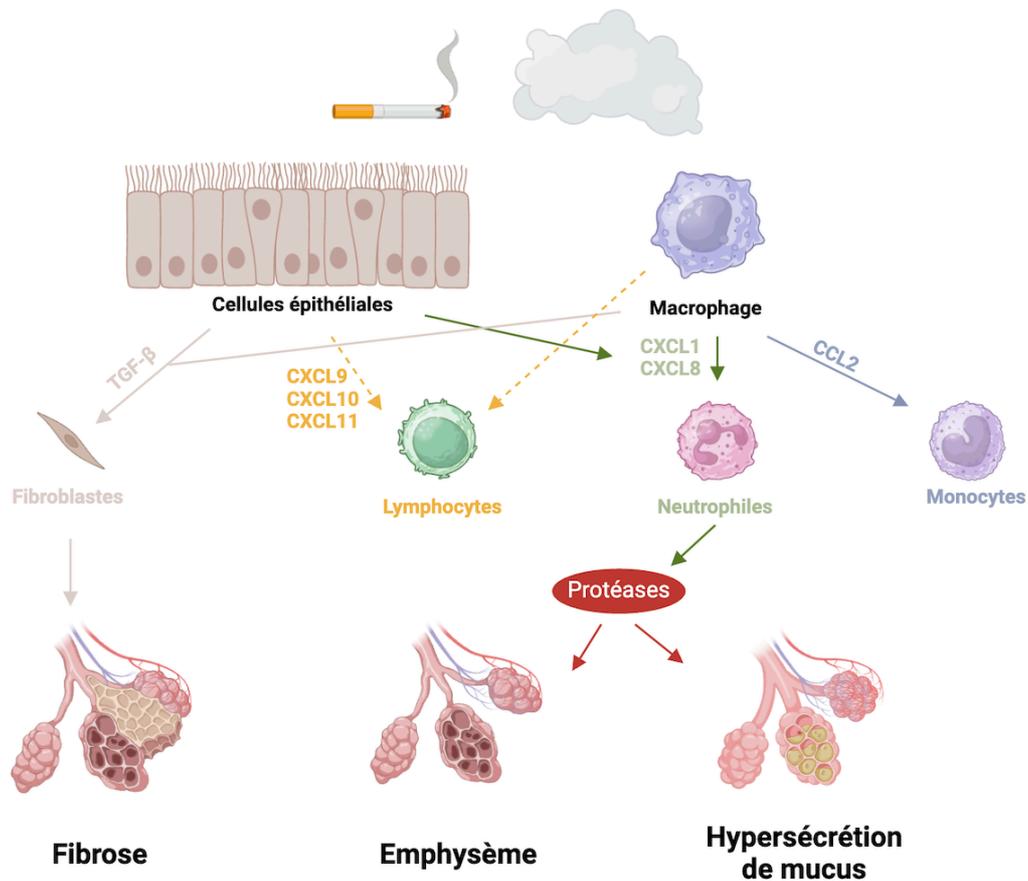


Figure 5 : Physiopathologie de la BPCO. La fumée de cigarettes endommage les cellules pulmonaires, déclenchant une inflammation. Les macrophages sécrètent des chimiokines qui attirent les monocytes, les lymphocytes et les neutrophiles. Ces derniers, en produisant des protéases, contribuent à l'hypersécrétion de mucus et à l'emphysème. Les cellules épithéliales endommagées produisent également des chimiokines, recrutant les lymphocytes. Le TGF- β produit par ces cellules participe à la fibrose. Adapté de (Barnes P.J., 2009). Créé le 25/03/24 sur BioRender.com

Ces lymphocytes, en particulier les sous-types Th1 et Th17, sont abondants dans les poumons des patients BPCO et contribuent à l'inflammation par la sécrétion d'IFN- γ (interféron gamma) et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Brusselle *et al.*, 2011).

La polarisation de ces lymphocytes est orientée par les DC, qui sont également présentes en grande quantité dans les poumons de ces patients (Vassallo *et al.*, 2010 ; Freeman and Curtis, 2017).

Outre leur implication dans l'inflammation, les cellules épithéliales pulmonaires subissent des altérations fonctionnelles telles qu'une diminution de la sécrétion de certains facteurs de croissance, comme le vascular endothelial growth factor (VEGF) contribuant au développement de l'emphysème (Kanazawa *et al.*, 2014). D'autres modifications ont également lieu comme l'hyperplasie des cellules productrices de mucus, favorisant le phénomène de bronchite chronique (Gao *et al.*, 2015).

6. Évaluation de la gravité de la BPCO

L'obstruction des voies respiratoires, augmente la résistance au flux d'air et diminue le volume expiratoire maximal par seconde (VEMS). Ce phénomène promeut les symptômes "standards" mentionnés précédemment.

Afin d'évaluer la gravité de cette maladie, le personnel hospitalier fait usage d'une classification, connue sous le nom de GOLD (Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Celle-ci divise les patients en quatre catégories allant de GOLD1 à GOLD4, suivant la sévérité de la maladie (Hogg *et al.*, 2004 ; Curtis *et al.*, 2007). Pour cela, ils évaluent la fonction pulmonaire du sujet à l'aide de la spirométrie (Hogg et Timens, 2009). Les praticiens se basent alors sur différents aspects comme : le VEMS et la capacité vitale (CV) (Figure 6). Le diagnostic est établi lorsque le rapport VEMS/CV, appelé indice de Tiffeneau, est inférieur à 70% post-bronchodilatation.

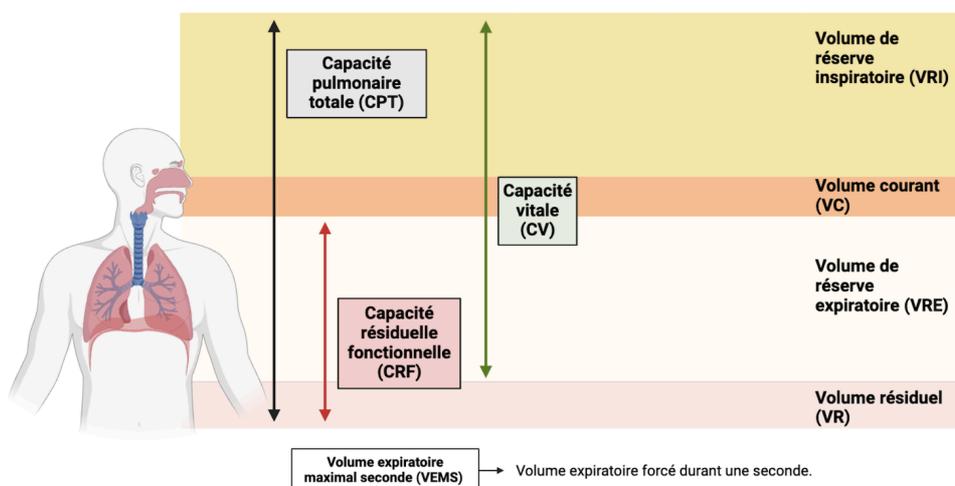


Figure 6 : Les volumes respiratoires
Figure créée sur BioRender le 11/03/2024

Depuis peu, une nouvelle classification permet de catégoriser les patients en tenant également compte de données cliniques. Pour cela, un questionnaire est mis à leur disposition afin d'obtenir des informations sur leur qualité de vie, permettant de déterminer l'indice CAT (COPD Assessment Test) (Figure 7), ou encore l'intensité de leur dyspnée (2024 GOLD report : Global Initiative for Chronique Obstructive Lung Disease, <http://golcopd.org/gold-reports/>).

		SCORE					
Je ne tousse jamais	0 1 2 3 4 5	Je tousse tout le temps					
Je n'ai pas du tout de glaire (mucus) dans les poumons	0 1 2 3 4 5	J'ai la poitrine très encombrée de glaire (mucus)					
Je n'ai pas du tout la poitrine oppressée	0 1 2 3 4 5	J'ai la poitrine très oppressée					
Quand je monte une côte ou une volée de marches, je ne suis pas essouffé(e)	0 1 2 3 4 5	Quand je monte une côte ou une volée de marches, je suis très essouffé(e)					
Je ne suis pas limité(e) dans mes activités chez moi	0 1 2 3 4 5	Je suis très limité(e) dans mes activités chez moi					
Je ne suis pas inquiet(e) quand je quitte la maison, en dépit de mes problèmes pulmonaires	0 1 2 3 4 5	Je suis très inquiet(e) quand je quitte la maison, en raison de mes problèmes pulmonaires					
Je dors bien	0 1 2 3 4 5	Je dors mal à cause de mes problèmes pulmonaires					
Je suis plein(e) d'énergie	0 1 2 3 4 5	Je n'ai pas d'énergie du tout					

Figure 7: Questionnaire de la qualité de vie des patients BPCO pour déterminer l'indice CAT. (<http://www.catestonline.org/>)

7. Les phases d'exacerbation dans la BPCO

Les exacerbations sont définies comme une aggravation des symptômes respiratoires, pouvant être causées, entre autres, par des infections virales et bactériennes. Ces épisodes aigus sont susceptibles de mettre en jeu le pronostic vital du patient, justifiant ainsi une modification thérapeutique.

8. Traitements

Il n'existe, actuellement, aucun traitement curatif pour la BPCO. Cependant, diverses options palliatives sont disponibles. Parmi celles-ci, nous retrouvons : le sevrage tabagique,

l'oxygénothérapie, les traitements pharmacologiques (bronchodilatateurs, corticoïdes), la vaccination ou encore la chirurgie (Barnes, 2013).

Il faut également garder à l'esprit que la BPCO présente une variabilité clinique, certains patients nécessitent une approche spécifique dans le diagnostic et la prise en charge (Barnes, 2016). Il est également important de noter que le stress oxydatif induit par la fumée de cigarettes peut influencer la sévérité des symptômes et la réponse au traitement (Chung and Adcock, 2008 ; Barnes, 2009).

Partie 3 : Le potentiel thérapeutique des Mregs pulmonaires

Comme évoqué précédemment, dans des conditions physiologiques, le corps humain est doté de mécanismes immunorégulateurs lui permettant de ne pas surréagir à chaque signal de danger (voir partie 1, point 5). Toutefois, les maladies chroniques pulmonaires mettent en évidence le dysfonctionnement de ce système. Les Mregs pourraient alors constituer une piste thérapeutique permettant de diminuer cet état inflammatoire. Plusieurs laboratoires, y compris celui dirigé par le Professeur Fabrice Bureau, se sont donc penchés sur ce sujet.

9. Les Mregs et l'asthme

En 2009, l'équipe de Bedoret et ses collaborateurs ont révélé l'existence et le rôle des Mregs. Leur étude a démontré qu'ils étaient capables d'inhiber la maturation et la migration des DCs, grâce à leur capacité de production d'IL-10. Ces deux caractéristiques combinées semblent jouer un rôle dans la réduction du développement des réponses allergiques pulmonaires (Bedoret et al, 2009).

Cette avancée a donc été corroborée et étendue par des travaux ultérieurs, tels que ceux du Professeur Fabrice Bureau en 2017. Ses recherches ont mis en évidence que l'exposition de souris à des séquences d'ADN bactérien contenant des motifs CpG non méthylés (CpG) augmentait le nombre de macrophages régulateurs dans les poumons. Cette augmentation était également associée à une élévation de la production d'IL-10 par ces cellules (Figure 8). Ces phénomènes combinés ont été associés à la réduction de l'inflammation dans des modèles murins d'asthme allergique (Sabatel et al., 2017). L'asthme est une maladie chronique inflammatoire caractérisée par une hyperréactivité bronchique.

Malgré les avancées médicales, il n'existe, actuellement, aucun traitement curatif pour cette atteinte ; ces nouvelles connaissances pourraient donc ouvrir la voie à de nouveaux traitements thérapeutiques applicables à l'asthme, mais aussi à d'autres maladies inflammatoires pulmonaires comme la BPCO ((2023 GINA Report : Global Strategy for Asthma Management and Prevention, <http://ginasthma.org/>).

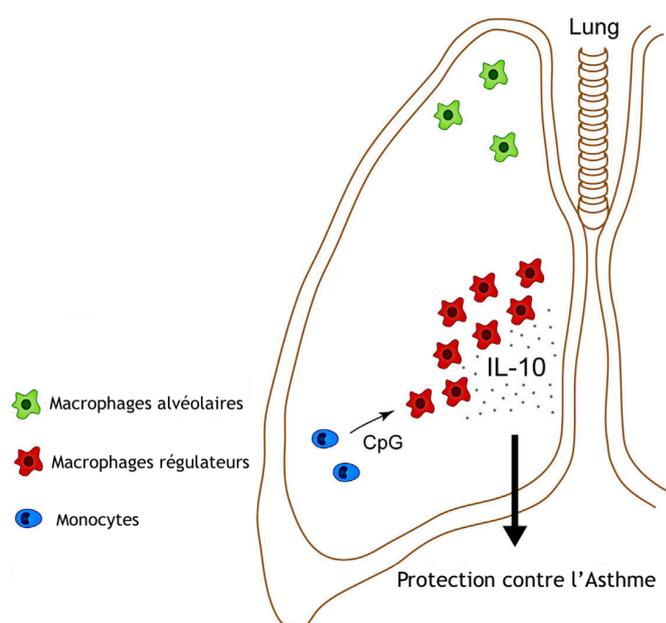


Figure 8 : L'exposition aux CpGs bactériens augmente le nombre de macrophages régulateurs. L'administration de CpG est associée à une augmentation du nombre de macrophages régulateurs dans les poumons, ainsi qu'à une augmentation de la production d'IL-10 induisant une protection contre le développement d'asthme allergique. (Figure adaptée de Sabatel et al., 2017)

10. Les Mregs et la BPCO

Les macrophages régulateurs, identifiés précédemment dans le poumon murin, ont faiblement été caractérisés chez les humains. Afin de mieux comprendre leur rôle potentiel dans la BPCO, le laboratoire d'immunologie cellulaire et moléculaire a développé un marquage spécifique permettant d'évaluer les différentes populations de macrophages au sein de lavages bronchoalvéolaires humains. En examinant une cohorte composée de patients fumeurs « sains », fumeurs atteints de BPCO et non-fumeurs, deux ensembles distincts de macrophages ont été décelés : d'une part, des macrophages alvéolaires classiques (cAMs) et d'autre part, des macrophages similaires aux Mregs, produisant eux-aussi de l'IL-10.

Ils ont également observé le fait que ces cellules apparaissaient de façon importante chez les patients fumeurs à l'inverse de la population de non-fumeurs. Cependant, bien que présentes en quantité identique chez les patients fumeurs « sains » et ceux atteints de BPCO, ces cellules semblaient produire moins d'IL-10 chez ces derniers, suggérant qu'une perte

fonctionnelle des Mreg pourrait être à l'origine du développement de la maladie (Liegeois et al., 2018). Les Mreg pourraient ainsi prévenir le développement de la BPCO pendant plusieurs dizaines d'années avant de perdre de leur fonctionnalité.

Objectifs

Malgré le rôle crucial des macrophages régulateurs dans la gestion de l'inflammation pulmonaire, notamment dans des conditions pathologiques comme l'asthme allergique, leur implication dans d'autres maladies respiratoires, demeure largement méconnue. L'objectif de ce mémoire vise donc à caractériser ces cellules dans un modèle murin court d'exposition à la fumée de cigarettes permettant de mimer les premières années de tabagisme d'un homme. Celui-ci nous permettra d'étudier le rôle des Mreg dans les mécanismes protégeant, dès le départ, les poumons de l'agression affligée par la fumée de tabac.

Dans un premier temps, nous chercherons à valider notre modèle en évaluant l'inflammation pulmonaire : nous étudierons les cellules immunitaires présentes dans les lavages bronchoalvéolaires (LBAs) et le parenchyme pulmonaire. Nous évaluerons ensuite le nombre de Mreg pulmonaires et mesurerons également la quantité d'IL-10 sécrétée par ces cellules.

Matériel et méthodes

1. Animaux expérimentaux

Les souris wild-type (WT) de sept semaines, utilisées pour cette étude, ont un fond génétique C57BL/6, et ont été obtenues chez Charles River (Wilmington, Massachusetts, États-Unis).

Ces animaux ont été logés dans un environnement dépourvu de pathogènes au sein de l'animalerie A2 de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège. Toutes les expériences réalisées dans le cadre de ce projet ont été approuvées par le Comité d'Éthique de l'Université de Liège (Dossier d'éthique 2401).

2. Réactifs et anticorps

Les anticorps utilisés pour la cytométrie en flux sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : Liste d'anticorps

Cible	Fluorochrome	Clone	Isotype	Référence	Firme
CD45.2	V500	104	Mouse IgG2a, k	562129	BD Biosciences
F4/80	PE	BM-8	Rat IgG2a, k	1215550	Sony
CD11c	BUV395	HL3	Hamster IgG1, λ2	564080	BD Biosciences
MHC-II	PerCP-Cy5.5	M5/114.15.2	Rat IgG2b, κ	107626	Biologend
Ly-6C	AF700	HK1.4	Rat IgG2c, κ	128024	Biologend
CD64	BV421	X54-5/7.1	Mouse IgG1, κ	139309	Biologend
CD11b	PE-Cy7	M1/70	Rat IgG2b, κ	561098	BD Biosciences
CD4	APC-Cy7	GK1.5	Rat IgG2b, κ	1102070	Sony
Ly-6G	APC	1A8	Rat IgG2a, κ	560599	BD Biosciences
Siglec-F	BV711	E50-2440	Rat IgG2a, κ	740764	BD Biosciences

3. Exposition à la fumée de cigarettes

Les souris ont été soumises à de la fumée de cigarettes de recherche 1R6F (University of Kentucky, Lexington, KY, USA) à l'aide de la machine InExpose (SCIREQ, Montreal, QC, Canada). Cet appareil se compose d'un robot capable d'allumer jusqu'à 24 cigarettes. Il est relié à une pompe chargée de générer la fumée. Le robot est responsable de l'allumage des cigarettes, tandis que le piston et les pompes assurent le transport de cette émanation jusqu'aux souris. La pompe est connectée à une unité de base, qui est à son tour liée à un logiciel permettant de contrôler le déroulement de l'expérience (Figure 9).

Les souris ont été placées dans des chambres d'exposition à corps entiers avec des séparations, où jusqu'à seize souris peuvent être logées simultanément. Elles ont reçu, alternativement, des bouffées de fumée de cigarettes et d'air à raison de 7 bouffées par cigarette et de 4 cigarettes par groupe (soit une bouffée toutes les 15 secondes). Ces expositions ont eu lieu deux fois par jour à raison de 24 cigarettes par exposition. Chaque exposition durait environ 45 minutes et les sacrifices de ces souris ont eu lieu à J3, J7, J10, J15, J18, J30 et J60.

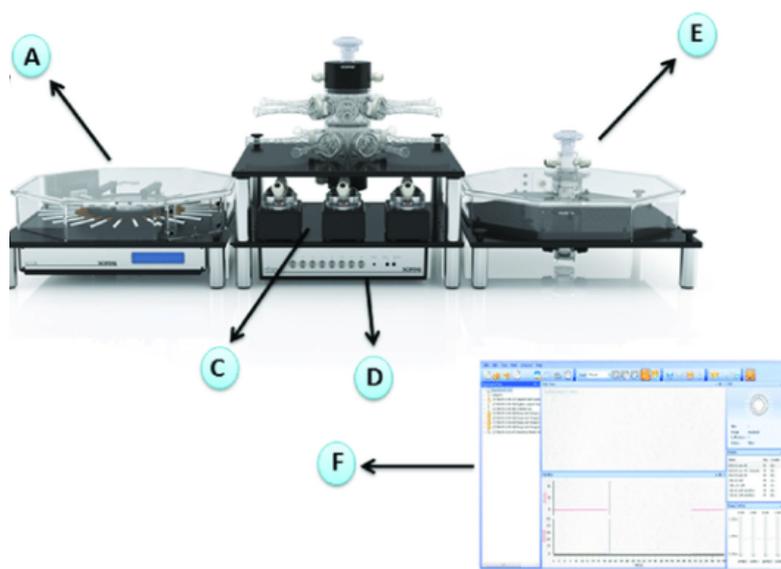


Figure 9 : Machine InExpose (SCIREQ, Montreal, QC, Canada). (A) Robot capable d'allumer les cigarettes. (C) Pompe chargée de générer la fumée de cigarettes (D) Unité de base. (E) Chambres d'exposition. (F) Logiciel.

4. Lavage bronchoalvéolaire

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et un LBA a ensuite été réalisé à l'aide d'un cathéter à ailettes 20G (BD Insite-W, Franklin Lakes, New Jersey, États-Unis) placé dans la trachée. Pour cela, 2 mL de DPBS (Solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco sans calcium et sans magnésium – L0615, Biowest, Nuaille, France) ont été injectés via ce cathéter en 3 fois (d'abord 1 ml et ensuite deux fois 0,5 ml) et récupérés sur glace. Le comptage des cellules présentes dans cet échantillon a été réalisé à l'aide d'une lame de Thoma.

Concernant le compte différentiel des cellules, 150 µL du prélèvement ont été étalés sur lame par centrifugation dans un Cytospin (Cellspin® I, THARMAC®, Paris, France). Ces lames ont ensuite été colorées à l'aide de la coloration Hemacolor® (N°réf 1.11955.2500, N°réf 1.11956.2500 N°réf 1.11957.2500, Sigma-Aldrich, Missouri, États-Unis) et 300 cellules ont été identifiées au microscope optique (Leica DMLS) selon leurs caractéristiques morphologiques.

5. Histologie

Après avoir réalisé le lavage bronchoalvéolaire, le lobe pulmonaire gauche a été prélevé et immergé dans une solution de formaldéhyde 4% (Formaldéhyde, extra pur, solution 37-41 %, SLR, Fisher Chemical™, Massachusetts, aux États-Unis). Les coupes histologiques ont été réalisées à la plateforme d'immunohistologie du GIGA où elles ont, également, été colorées à l'aide d'une coloration hématoxyline / éosine.

6. Techniques relatives à la cytométrie en flux

6.1 Obtention des différents types cellulaires

Afin d'isoler les cellules pulmonaires, les poumons ont été perfusés avec 5 mL de PBS, permettant ainsi, d'éliminer le sang des vaisseaux pulmonaires. Les lobes pulmonaires droits

ont été récupérés, hachés à l'aide d'une lame de rasoir et digérés pendant 30 minutes à 37°C dans du milieu de digestion Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco™ N°réf24020117 avec Ca et Mg, New York, États-Unis) contenant 5% de sérum fœtal bovin (FBS, Gibco™ N°réf A3160801, Grand Island, New York, États-Unis), 1 mg/mL de collagénase A (Sigma-Aldrich N° réf C2674-500MG, Missouri, États-Unis) et 0.05 mg/mL de DNase (Roche N° réf11 284 932 001, Bâle, Suisse).

Afin de stopper la digestion enzymatique, 12 mL de PBS-EDTA (10 mM, pH=7,4) ont été ajoutés et la solution a été filtrée (pores de 70 µM). Après cela, l'échantillon a été centrifugé, le surnageant a été éliminé et nos cellules ont été resuspendues dans 350 µl de tampon de lyse des globules rouges (RBC Lysis ; Eau distillée : 500 ml EDTA : 0.1mM NH₄Cl : 150mM KHCO₃ : 10mM) pendant 3 minutes. Cette lyse a été stoppée à l'aide de 10 mL de PBS-EDTA et les cellules ont été comptées à l'aide d'une cellule de Thoma.

6.2 Marquage FACS

Le marquage a été effectué en plaçant 1 million de cellules dans 50 µL de tampon de marquage (PBS + 0.1% d'azide de sodium (Sigma) + 0.5% d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma Missouri, États-Unis)) contenant 40% de surnageant de cellules sécrétant l'anticorps 24G2 (produit dans le laboratoire) afin de réduire la liaison aspécifique à la fraction Fc des anticorps. 50µL du mix d'anticorps a ensuite été déposé sur ces cellules et incubé durant 30 min. Le marquage a été suspendu grâce à l'ajout de 130 µL de tampon de marquage.

6.3 Phénotypage/ Tri cellulaire

Le phénotypage et le tri cellulaire ont été réalisés, respectivement, sur un cytomètre LSRFortessa™ et un cytomètre trieur FACS ARIA III (BD Biosciences, New Jersey, États-Unis). La viabilité des cellules a été vérifiée en utilisant de la Fixable Viability Stain 520 de chez BD Biosciences (réf 564407).

Les résultats ont été analysés avec le programme FlowJo™ (Oregon, aux États-Unis).

7. Évaluation de la production d'IL-10

Afin d'évaluer la production d'IL-10, les MA et MI ont été isolés par tri sur le FACS Aria et cultivées à une concentration de 10^6 cellules/ml dans du milieu RPMI contenant 10% de FBS (Gibco™, N°réf A3160801, New York, États-Unis), 0.1 mM d'acides aminés essentiels (Gibco™, N°réf 11140-050, New York, États-Unis), 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco™, N°réf 11360-070, New York, États-Unis), 50 µI/mL de pénicilline G, 50 µg/mL de streptomycine sulfate (Gibco™, N°réf 15070-063, New York, États-Unis), et 0.5 mM de β-mercapto-éthanol (Gibco™, N°réf 31350-010, New York, États-Unis) dans une plaque 96 puits durant 16h.

La concentration en IL-10 a, ensuite, été mesurée dans les surnageants de culture par ELISA (IL-10 mouse uncoated Elisa kit Invitrogen).

8. Analyses statistiques

Concernant les tests statistiques, une ANOVA a été réalisée. En cas de résultat significatif, un test t a été utilisé pour évaluer les différences significatives entre les groupes. Enfin, une correction de Bonferroni a été appliquée pour contrôler le risque d'erreur. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism™ (San Diego, Californie, États-Unis).

Résultats

1. Stratégie de cytométrie en flux

Afin d'évaluer la présence d'inflammation, nous avons mis au point un marquage de cytométrie en flux.

Dans un premier temps, nous avons exclu les doublets et sélectionné les cellules vivantes exprimant le CD45. Les macrophages alvéolaires ont, ensuite, été associés aux grandes cellules n'exprimant pas le CD11b mais bien le F4/80 et le CD11c. Les cellules de petites tailles CD11b⁺ F4/80⁺ ont été subdivisées en 3 populations suivant l'expression du Ly6c et du CD64. Ainsi, nous trouvons une population de cellules Ly6C^{hi}CD64^{lo} correspondant aux monocytes classiques, une population Ly6C^{lo}CD64^{lo} représentant les monocytes patrouilleurs et enfin, une population Ly6C^{lo}CD64^{hi} identifiée comme étant des Mregs (Figure 10).

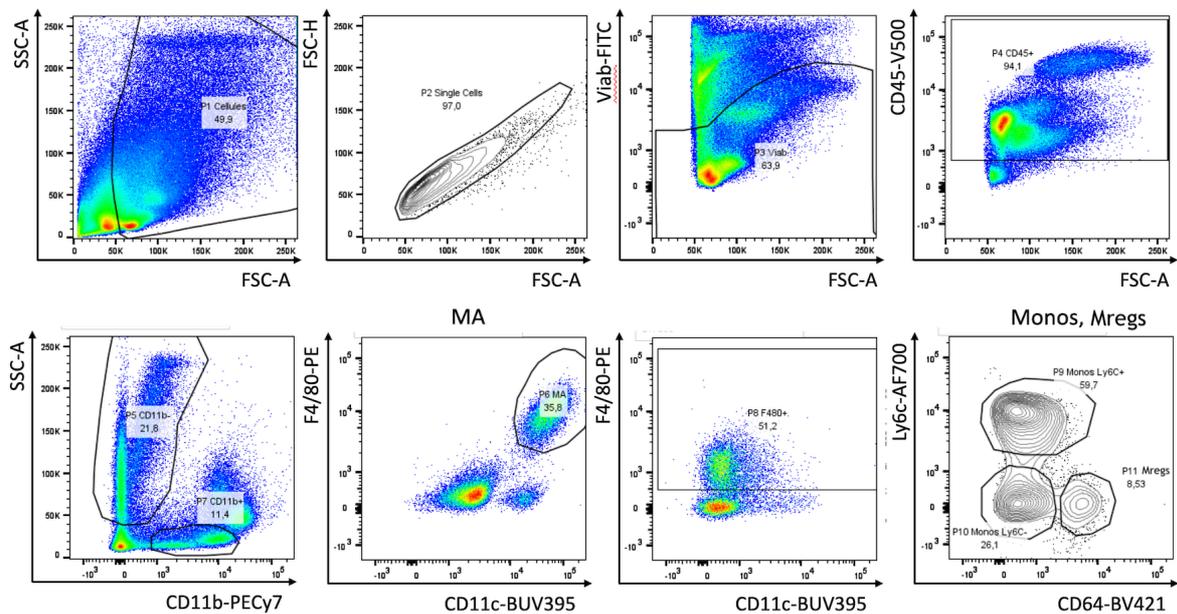


Figure 10 : Stratégie de gating pour l'identification des populations de monocytes et de macrophages du poumon.

Les cellules dendritiques possédant le phénotype CD45⁺, F4/80⁻, CD11c⁺ (Figure 11a), les éosinophiles (Figure 11b), caractérisés comme étant F4/80⁺, CD11c⁻, SSC-mid et CD11b⁺ et les neutrophiles (Figure 11c) identifiés comme étant CD45⁺, Ly6G⁺, CD11b⁻ et F4/80⁻ ont également été distingués.

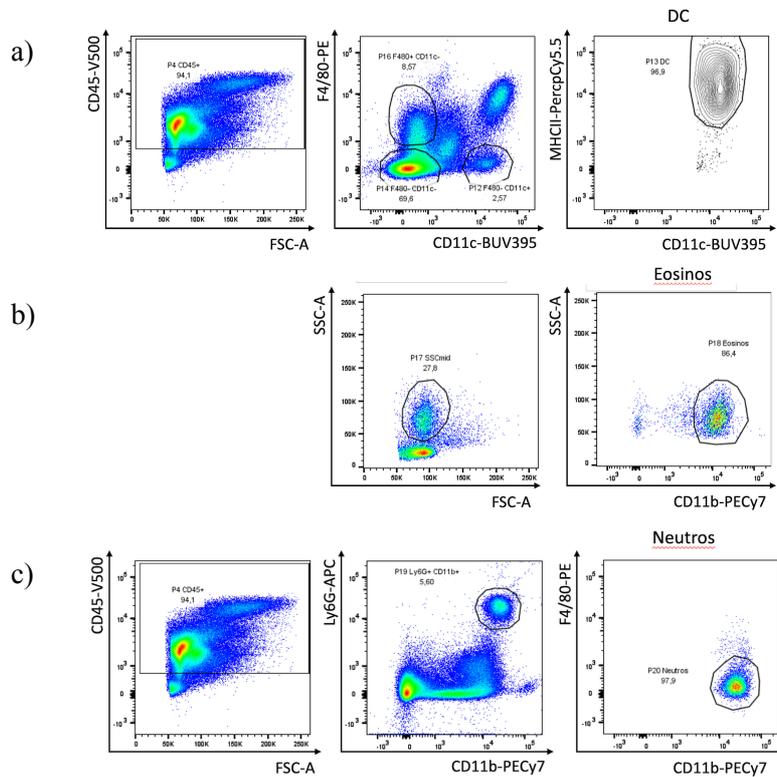


Figure 11 : Stratégie de gating pour l'identification des populations de cellules dendritiques (a), d'éosinophiles (b), et de neutrophiles (c) du poumon.

Grâce à cela, nous avons pu mettre en évidence différents types de cellules immunitaires présents dans le tissu pulmonaire en réponse à la fumée de cigarettes.

2. Analyse de l'inflammation pulmonaire

La lumière des voies respiratoires a été analysée grâce à la réalisation de LBA. Le parenchyme pulmonaire a ensuite été examiné par cytométrie en flux et les données ont été recueillies à partir de deux séries d'expériences, la série A et la série B.

Tableau III : Séries d'expériences

	<u>Série A</u>	<u>Série B</u>
Nombre de souris fumeuses	29	30
Nombre de souris contrôles	5	5
Sexe	♀	♀
Age	7 semaines	7 semaines
Time-points	J3, J7, J10, J15, J18, J30	J3, J7, J10, J15, J18, J60
Protocole d'exposition	24 cig/expo, 2 expositions/jour, 7 puffs/cig, 4 cig/groupe un puff toutes les 15 sec	24 cig/expo, 2 expositions/jour, 7 puffs/cig, 4 cig/groupe un puff toutes les 15 sec

2.1 Analyse des lavages bronchoalvéolaires

En regroupant ces deux séries d'expériences, nous avons observé que le nombre total de cellules inflammatoires présentes dans les LBA de souris exposées à la fumée de cigarettes, était significativement supérieur à celui des groupes contrôles à différents moments du protocole (Figure 12).

Pool Série A et B

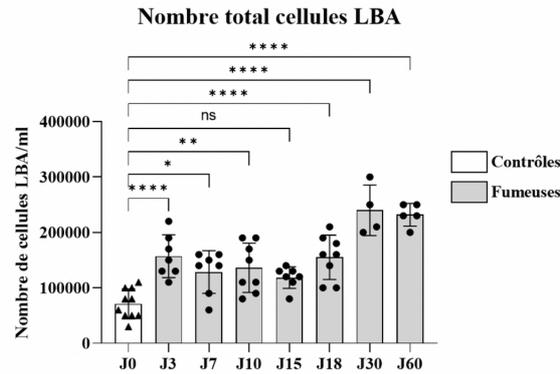


Figure 12: Évolution temporelle de la composition cellulaire immunitaire du liquide de lavage bronchoalvéolaire dans un modèle murin de BPCO.

Série A-B : Nombre de cellules immunitaires contenues dans le LBA/mL. Le J0 représente le groupe de souris contrôle tandis que les J3-7-10-15-18-30-60 représentent les différents time-points des souris fumeuses. Les *p* values ont été calculées avec une ANOVA suivie d'un test de *t* et d'une correction de Bonferroni (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, non significatif).

Nous nous sommes donc penchés sur l'origine de cette augmentation. Pour cela, nous avons analysé le nombre de macrophages, neutrophiles, lymphocytes et éosinophiles en regroupant ces deux séries d'expériences (Figure 13).

Nous avons observé une augmentation significative du nombre de macrophages durant les J3,7,10,18 et 30 chez les souris exposées à la fumée de cigarettes. Une tendance similaire est remarquée pour les neutrophiles, bien que leur nombre continue d'augmenter au-delà de cette période.

En ce qui concerne les lymphocytes, leur augmentation devient significative à partir du trentième jour d'exposition, tandis que l'élévation du nombre d'éosinophiles n'est significative qu'au moment de ce J30.

Pool Série A et B

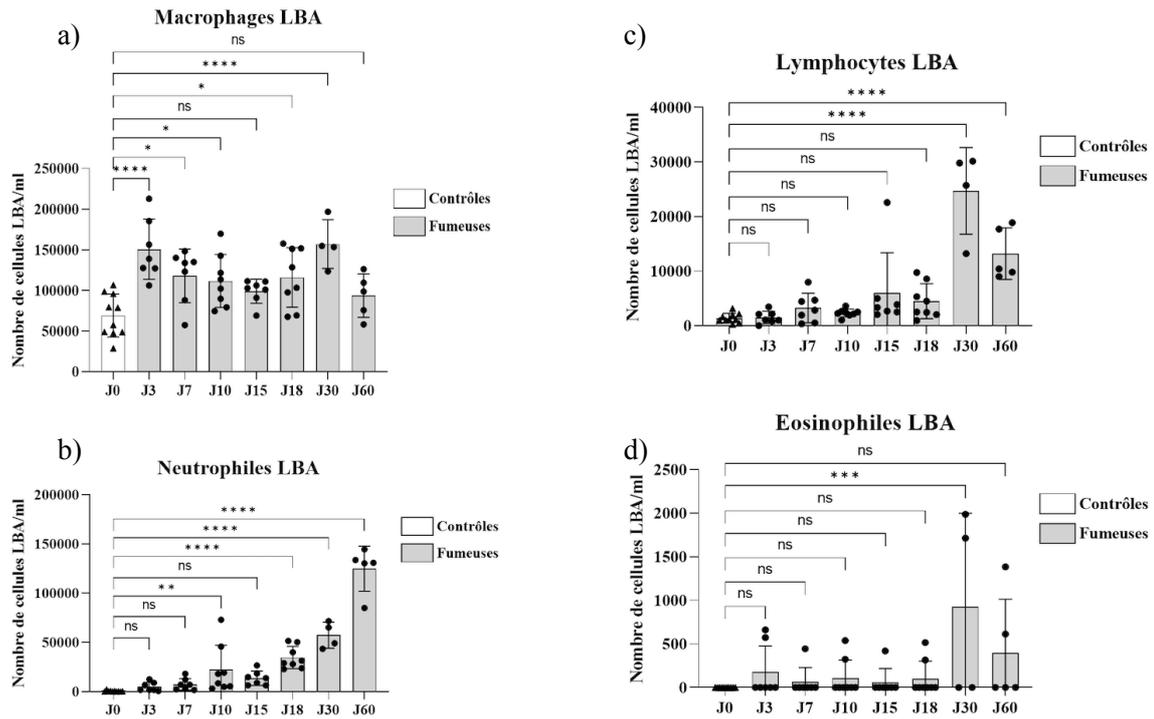


Figure 13 : Évolution temporelle de la composition cellulaire immunitaire du liquide de lavage bronchoalvéolaire dans un modèle murin de BPCO. a) macrophages b) neutrophiles c) lymphocytes d) éosinophiles.

Série A-B : Nombre de cellules immunitaires contenue dans le LBA/mL (a) Macrophages, (b) Neutrophiles, (c) Lymphocytes, (d) Eosinophiles. Le J0 représente le groupe de souris contrôle tandis que les J3-7-10-15-18-30-60 représente les différents time-point des souris fumeuses. Les p value ont été calculées avec une ANOVA suivie d'un test de t et d'une correction de Bonferroni (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, non significatif).

2.2 Analyse par la cytométrie en flux

Afin d'approfondir notre étude, nous avons réalisé une analyse par cytométrie en flux du parenchyme pulmonaire de souris exposées à la fumée de cigarettes et de souris contrôles.

Ces résultats, basés également sur un pool des données des séries A et B, ont révélé une diminution du nombre de MAs dès le début des expositions et une augmentation des Mregs dans les poumons des souris exposées à la fumée de cigarettes, par rapport aux souris témoins après 60 jours d'exposition (Figure 14).

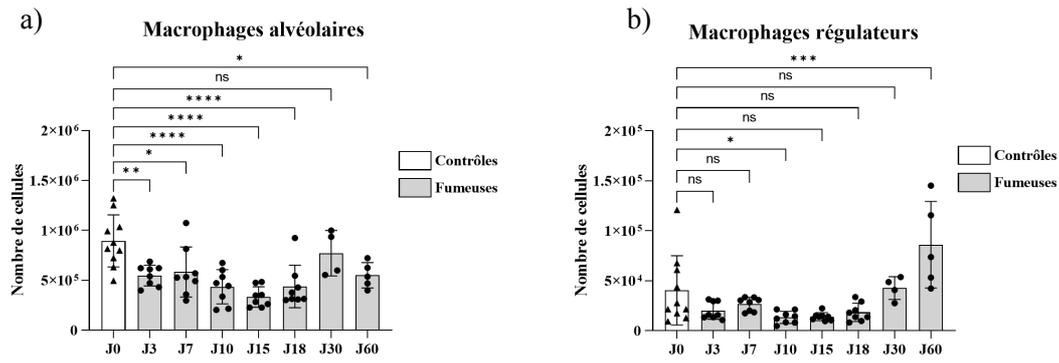


Figure 14 : Évolution temporelle des différentes populations de macrophages contenus dans le parenchyme pulmonaire chez les souris fumeuses et contrôles.

a) : Nombre de macrophages alvéolaires issus, d'un pool de série (série A et série B), contenus dans le parenchyme pulmonaire chez les souris fumeuses et contrôles (J0).

b) : Nombre de macrophages régulateurs issus, d'un pool de série (série A et série B), contenus dans le parenchyme pulmonaire chez les souris fumeuses et contrôles (J0).

Les p values ont été calculées avec une ANOVA suivie d'un test de t et d'une correction de Bonferroni (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, non significatif).

En ce qui concerne les monocytes, les graphiques montrent que la population de monocytes classiques, Ly-6C^{hi}, tend à diminuer, significativement chez les souris exposées à la fumée de cigarettes, au J3,10,15 et 18 par rapport aux souris témoins. Cependant, au jour 60 d'exposition, leur nombre se rapproche progressivement de celui des souris contrôles. Les monocytes patrouilleurs semblent quant à eux chuter au cours des premiers jours d'exposition, puis augmenter à partir du soixantième jour (Figure 15).

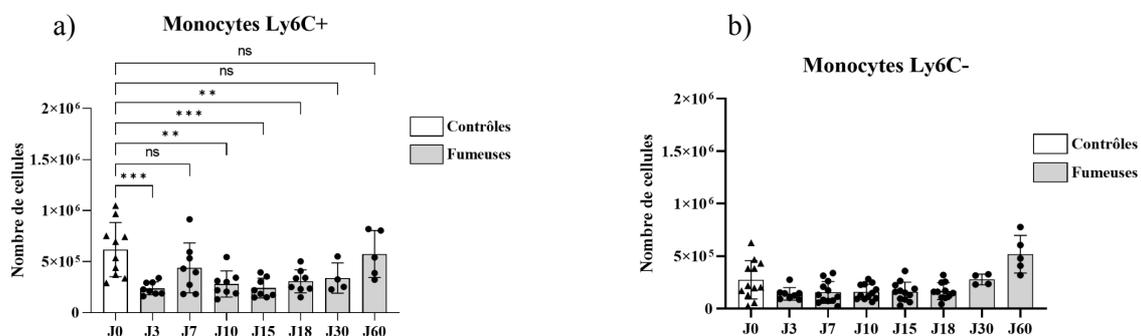


Figure 15 : Évolution temporelle des différentes populations de monocytes retrouvées dans le parenchyme pulmonaire des souris fumeuses/ contrôles.

a) : Nombre de monocytes classiques issus, d'un pool de séries (série A et série B), contenus dans le parenchyme pulmonaire chez les souris fumeuses et contrôles (J0).

b) : Nombre de monocytes patrouilleurs issus, d'un pool de séries (série A et série B), contenus dans le parenchyme pulmonaire chez les souris fumeuses et contrôles (J0).

Les p values ont été calculées avec une ANOVA suivie d'un test de t et d'une correction de Bonferroni (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, non significatif).

Les neutrophiles et les cellules dendritiques chez les souris exposées à la fumée augmentent significativement au soixantième jour d'exposition. En revanche, nous n'observons pas de modification au sein de la population d'éosinophiles (Figure 16).

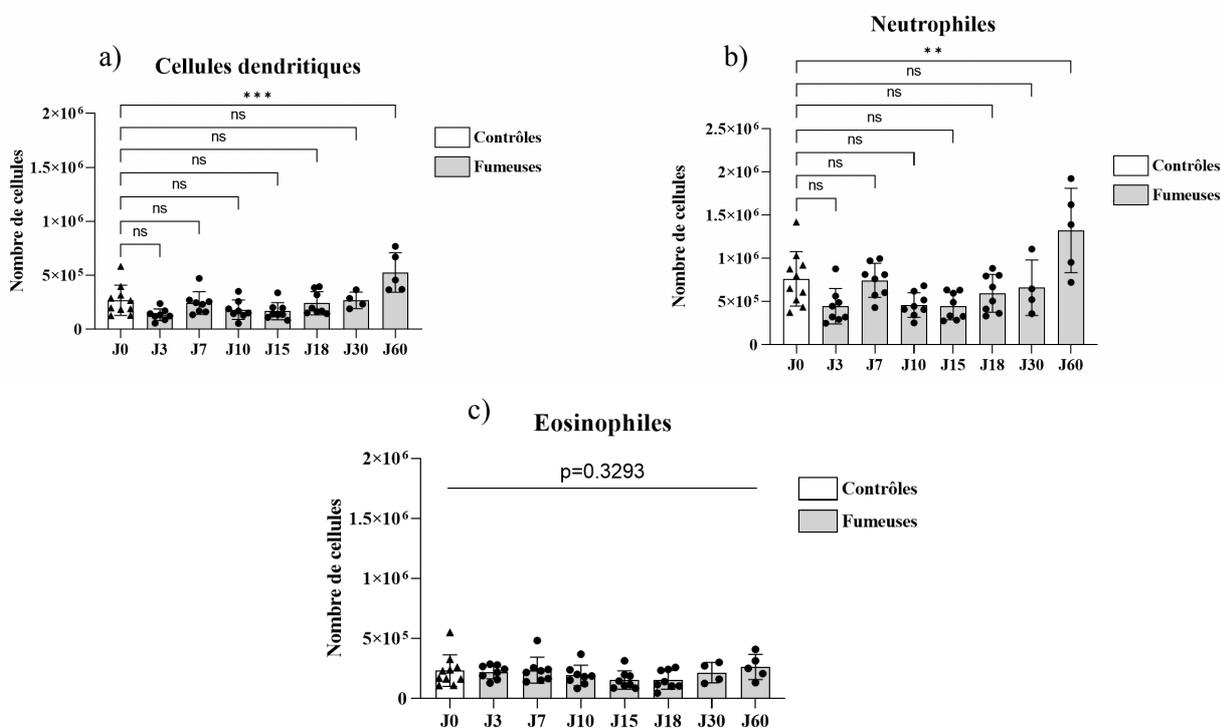


Figure 16 : Évolution temporelle des populations de cellules dendritiques, de neutrophiles et d'éosinophiles contenues dans le parenchyme pulmonaire chez les souris fumeuses/ contrôles.

a) : Nombre de cellules dendritiques issues, d'un pool de séries (série A et série B), contenues dans le parenchyme

pulmonaire chez les souris fumeuses et contrôles (J0).

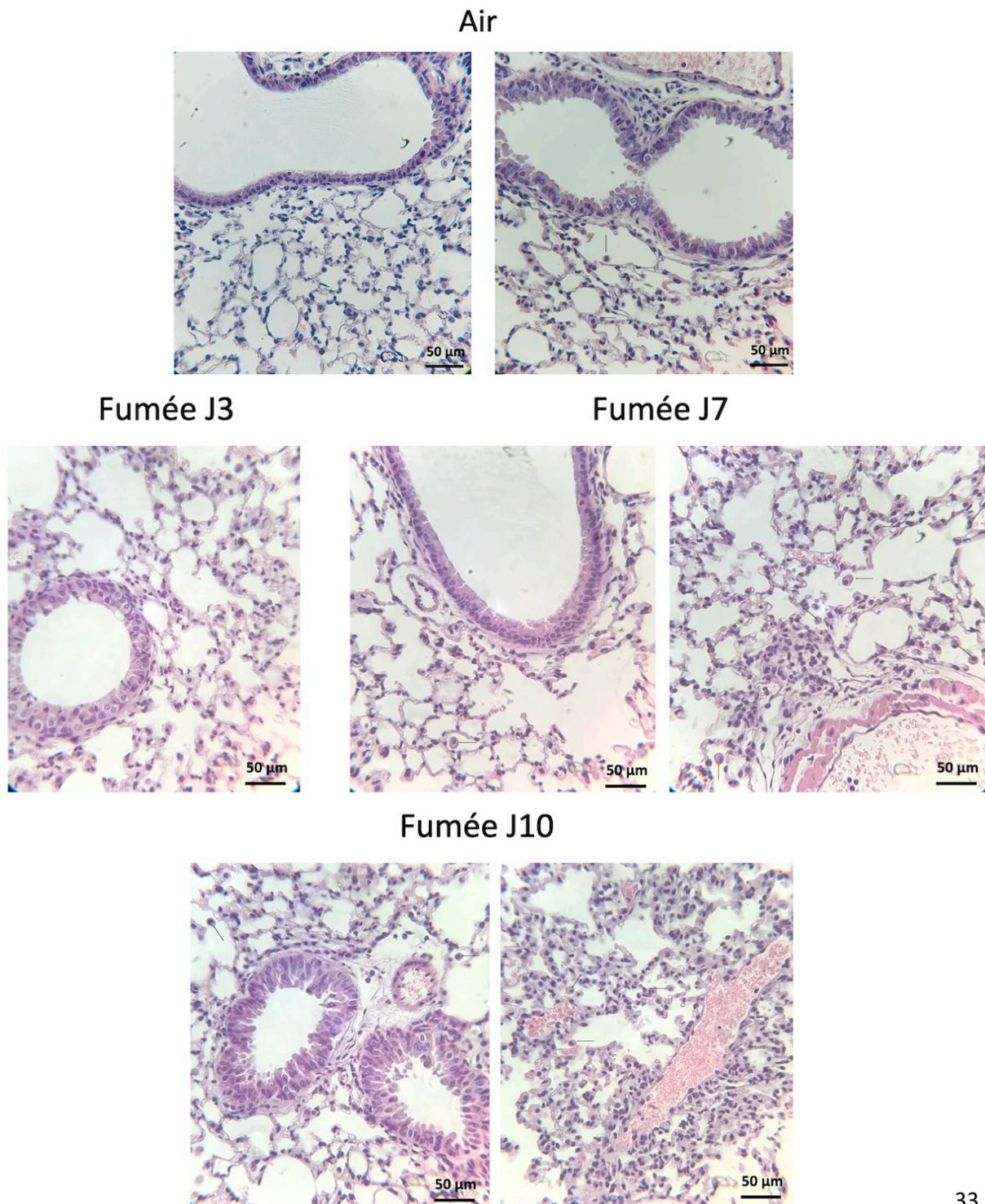
b) : Nombre de neutrophiles issus, d'un pool de séries (série A et série B), contenus dans le parenchyme pulmonaire chez les souris fumeuses et contrôles (J0).

c) : Nombre d'éosinophiles issus, d'un pool de séries (série A et série B), contenus dans le parenchyme pulmonaire chez les souris fumeuses et contrôles (J0).

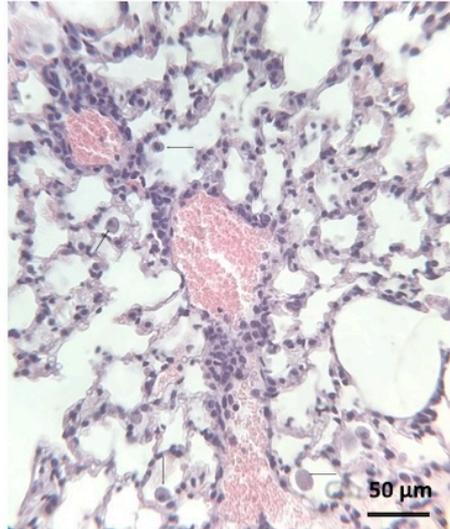
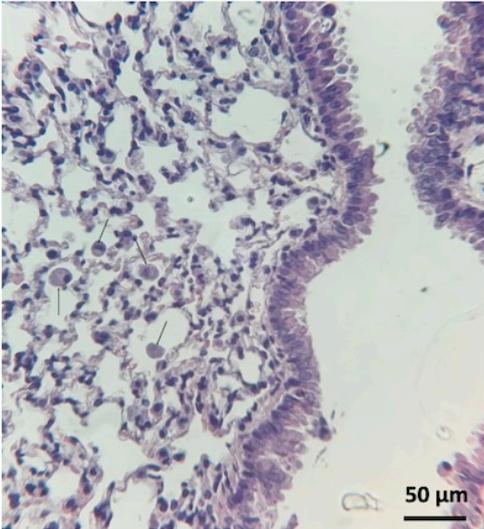
Les p values ont été calculées avec une ANOVA suivie d'un test de t et d'une correction de Bonferroni (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, non significatif).

2.3 Histologie

Nous avons donc étudié l'histologie du poumon afin de confirmer la présence d'inflammation dans notre modèle. Au niveau des bronches et des bronchioles des souris exposées à la fumée de cigarettes, nous remarquons une infiltration limitée de cellules inflammatoires, qui sont par contre particulièrement présentes dans les régions péri-vasculaires (Figure 17).

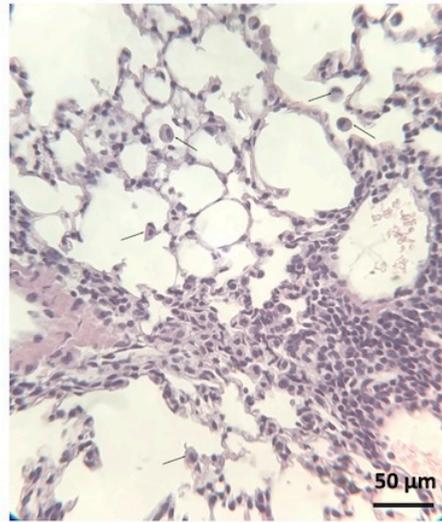
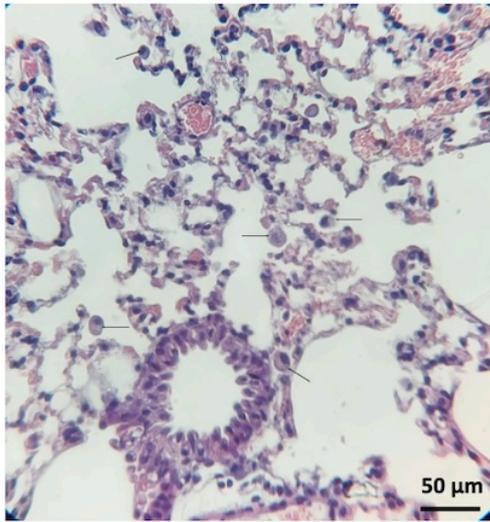


Fumée J15

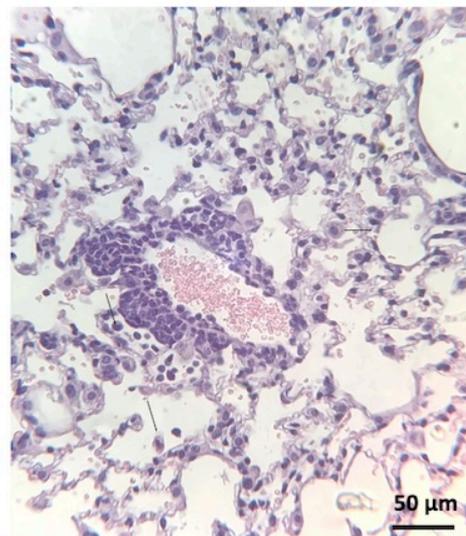


En

Fumée J18



Fumée J30



Fumée J60

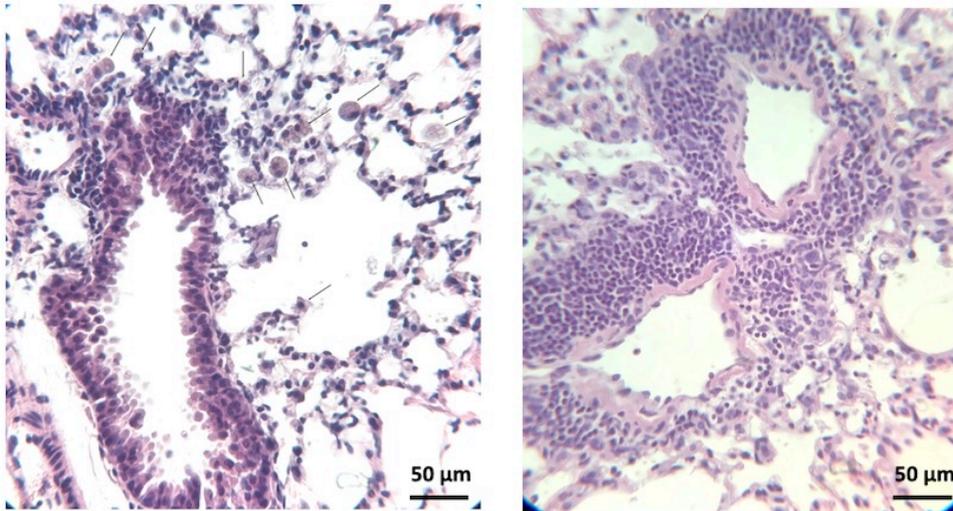


Figure 17: Évaluation histologique de l'inflammation pulmonaire. Coloration hématoxyline éosine de coupes de poumons ($\times 200$) d'une souris témoin (air) et de souris exposées à la fumée de cigarettes durant 3,7,10,15,18,30 et 60 jours.

Les flèches noires mettent en évidence les cellules inflammatoires.

En examinant plus attentivement, nous observons une tendance des macrophages à accumuler de la nicotine, se manifestant par une coloration brunâtre. Nous observons, de plus, dans beaucoup de ces cellules, de grandes vacuoles (Figure 18).

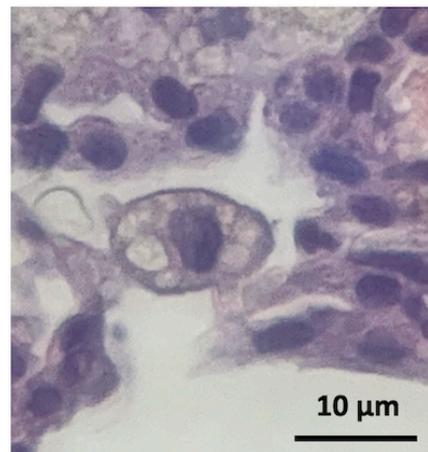
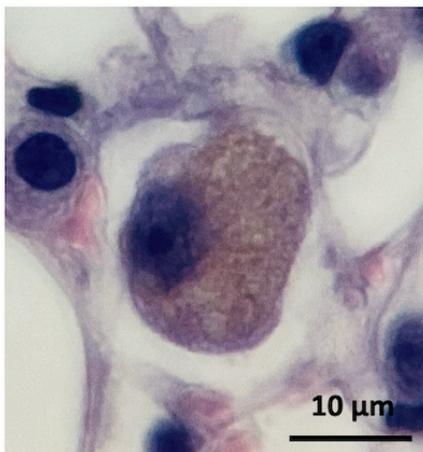


Figure 18: Morphologie des macrophages en réponse à l'exposition à la fumée de cigarettes.

3. Production d'IL-10 par les macrophages régulateurs

En parallèle, nous nous sommes intéressés à la production d'IL-10 par les macrophages pulmonaires afin de voir si celle-ci variait avec l'exposition à la fumée de cigarettes.

Tout d'abord, nous avons isolé les 2 sous-types de cette population par cytométrie et les avons mis en culture durant 16 heures. Nous avons ensuite évalué la présence d'IL-10 dans le surnageant de culture de ces cellules par ELISA.

Comme nous le montre ce graphique (Figure 19), la quantité de cytokines produites par les macrophages régulateurs est significativement plus élevée que celle produite par les macrophages alvéolaires. De plus, les Mregs pulmonaires des souris témoins montrent une production d'IL-10 plus faible que celle observée chez les souris exposées à la fumée.

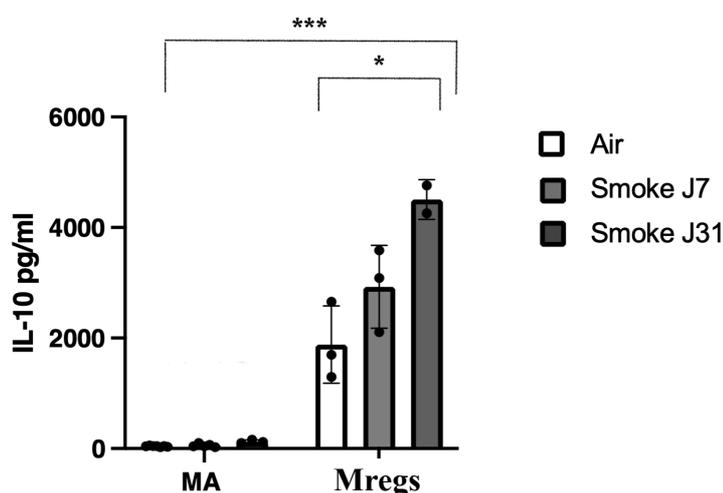


Figure 19 : Quantification de la production d'IL-10 par les différentes populations de macrophages contenues dans les poumons de souris fumeuses/ contrôles.

Les p values ont été calculées avec une ANOVA suivie d'un test de t et d'une correction de Bonferroni (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

Discussion & Perspectives

L'appareil respiratoire, constamment exposé aux agressions environnementales, dispose d'un système immunitaire hautement développé, comprenant une diversité de cellules. Parmi celles-ci, nous retrouvons les macrophages jouant un rôle non négligeable au sein de l'homéostasie immunitaire. Ces cellules, divisées en deux catégories, les MAs et les Mregs, contribuent à l'élimination d'agents pathogènes inhalés, préservant ainsi l'intégrité pulmonaire. Les Mregs possèdent également des fonctions immunosuppressives, telles que la capacité de sécrétion d'IL-10, permettant de prévenir les réponses immunes inappropriées. Cette cytokine est une molécule capable d'inhiber les fonctions pro-inflammatoires des cellules phagocytaires mononucléées comme la présentation d'antigènes (Bedoret et al, 2009 ; Liégeois et al., 2018).

Les Mregs, découverts chez la souris par l'équipe de Bedoret et ses collaborateurs en 2009, ont été l'objet de nombreuses études. Dans le contexte de l'asthme, le laboratoire d'immunologie cellulaire et moléculaire du Professeur Fabrice Bureau, a démontré que l'exposition de souris à des motifs CpG augmentait le nombre de Mregs ainsi que leur production d'IL-10 dans les poumons (Bedoret et al, 2009 ; Sabatel et al., 2017). Ces découvertes ont donc incité les chercheurs à explorer leurs rôles dans d'autres maladies, comme la BPCO. Des cellules similaires aux Mregs murins ont été décelées chez l'homme dans le liquide bronchoalvéolaire de patients fumeurs « sains », fumeurs atteints de BPCO, et non-fumeurs. Il a été observé que ces cellules étaient d'autant plus présentes chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Cependant, bien que leur présence soit semblable chez les fumeurs "sains" et les patients atteints de BPCO, elles semblaient produire moins d'IL-10 chez ces derniers, suggérant qu'une perte fonctionnelle de ces macrophages pourrait être impliquée dans le développement de la maladie (Liegeois et al., 2018). Les Mregs pourraient ainsi jouer un rôle préventif dans le développement de cette atteinte pendant plusieurs décennies avant de perdre leur fonctionnalité.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons mis en place un modèle murin court d'exposition à la fumée de cigarettes afin d'imiter les premières années de tabagisme. Ce modèle nous a permis, dans un premier temps, de caractériser l'inflammation présente dans le LBA et le parenchyme pulmonaire. Nous avons, ensuite, évalué le nombre de Mregs pulmonaires et la quantité d'IL-10 produite par ceux-ci.

1. Mise au point du modèle murin de BPCO

L'évolution des principales cellules immunitaires pulmonaires à différents intervalles a été quantifiée à la fois dans le LBA et le parenchyme pulmonaire de souris exposées, ou non, à la fumée de cigarettes. En réponse à ces expositions, une infiltration de cellules inflammatoires a été observée dans le LBA des souris exposées à la fumée. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par d'autres chercheurs, tels que Ghorani et Saini (Ghorani et al., 2017 ; Saini et al., 2018). Les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes et les éosinophiles, en particulier, sont responsables de cette accumulation. Toutefois, il est important de noter que l'augmentation significative des éosinophiles ne concerne que deux souris dans notre étude. L'implication de ce type de cellules dans la réponse à la fumée de cigarettes est généralement associée à des cas spécifiques comme les exacerbations, ce qui pourrait laisser supposer que ces souris étaient peut-être dans de telles conditions durant nos expériences (Barnes et al., 2003). Cette observation souligne également l'importance de prendre en compte les variations individuelles et les limites de notre modèle expérimental.

L'infiltration relativement précoce des macrophages et des neutrophiles par rapport aux lymphocytes, aussi observée par le scientifique D'hulst, pourrait indiquer une activation séquentielle du système immunitaire inné suivie du système adaptatif en réponse à cette agression (Retamales et al., 2001 ; Hogg et al., 2004 ; D'hulst, 2005).

Nos observations dans le LBA sont ainsi cohérentes avec celles rapportées par ces différents chercheurs ce qui renforce, dans un premier temps, la validité de notre modèle.

L'analyse des populations cellulaires dans le parenchyme pulmonaire a révélé une diminution des macrophages alvéolaires. Concernant les macrophages régulateurs, bien que leur nombre semble initialement suivre une tendance similaire à celle des MAs, à partir du jour 15, ils montrent une augmentation atteignant, au jour 60, une valeur, significativement, plus élevée que leur niveau initial. En revanche, ce phénomène n'est pas observé pour les MAs. Ces observations suggèrent que, face à cette exposition nocive, les macrophages alvéolaires sont d'abord détruits, tandis que les Mreg tentent de se reconstituer à long terme pour contrôler la réponse inflammatoire (Liégeois et al., 2018).

Concernant les monocytes, les résultats nous montrent que la population Ly-6C^{hi} diminue significativement chez les souris exposées à la fumée par rapport aux souris témoins. En revanche, la population de monocytes patrouilleurs chute au cours des premiers jours d'exposition, puis semble augmenter à partir du soixantième jour. Ces observations concordent avec celles rapportées par le scientifique Da Silva et ses collègues, suggérant que les monocytes classiques et patrouilleurs pourraient jouer un rôle distinct dans le renouvellement des sous-populations de macrophages pulmonaires (Da Silva et al., 2017).

Nous avons également examiné l'histologie du poumon afin d'évaluer la présence d'inflammation. Chez les souris exposées à la fumée de cigarettes, nous avons observé une augmentation progressive de l'infiltration de cellules inflammatoires, notamment dans les régions péri-vasculaires. De plus, les macrophages alvéolaires de ces souris présentaient des altérations visibles, telles qu'une coloration brunâtre du cytoplasme et l'apparition de vacuoles, comme indiqué dans les travaux du scientifique Rossi et de son équipe (Rossi et al., 2017).

En résumé, nos observations concernant la mise au point de notre modèle d'inflammation convergent avec celles faites par plusieurs chercheurs, ce qui renforce la validité de ce modèle.

À l'avenir, nous pourrions envisager de prolonger la durée d'exposition à la fumée de tabac afin d'explorer d'autres caractéristiques de la BPCO, comme les signes d'emphysème. Ces manifestations, fréquemment décrites dans la littérature scientifique, nécessitent

généralement des périodes d'exposition bien plus longues que 60 jours, comme l'ont souligné Yang et ses collaborateurs (Yang et al., 2021).

2. Production d'IL-10 par les macrophages régulateurs

Concernant la production d'IL-10, nos résultats ont révélé que les macrophages régulateurs sécrétaient une quantité de cytokines significativement plus élevée que les macrophages alvéolaires. De plus, chez les souris exposées à la fumée de cigarette, on observe généralement une augmentation de la production d'IL-10 par rapport aux souris témoins. Pour renforcer la précision de nos observations, nous pourrions utiliser des souris rapportrices pour l'IL-10 (Bouabe et al., 2011). Celles-ci expriment la beta-lactamase sous le contrôle du promoteur de l'IL-10, ce qui signifie que seules les souris produisant de l'IL-10 produiront la beta-lactamase capable de cliver un substrat, générant ainsi une fluorescence à une longueur d'onde donnée. Ce système rapporteur est très spécifique et sensible, ce qui permet d'identifier toutes les cellules produisant de l'IL-10. Sans l'utilisation de ce type de souris, il est nécessaire de trier chaque catégorie cellulaire afin de les mettre en culture, ce qui devient contraignant lorsque certaines populations sont présentes en faible quantité, limitant ainsi le nombre total de cellules obtenues.

Ces résultats, concernant la production d'IL-10 soutiennent donc, encore une fois, l'hypothèse de la chercheuse Liegeois et de son équipe, selon laquelle ces cellules pourraient envahir les poumons afin de contrer l'inflammation causée par la fumée de cigarettes (Liegeois et al., 2018). Pour vérifier cet effet immunosuppresseur, ces cellules pourraient être injectées à des souris fumeuses afin de confirmer, d'une part, leur innocuité *in vivo* et, d'autre part, leurs capacités immunorégulatrices dans ce modèle inflammatoire.

Le possible dysfonctionnement des Mregs dans certaines maladies amène l'idée que ces cellules pourraient être utilisées en thérapie cellulaire pour pallier ce déficit. En 2017, la chercheuse Catherine Sabatel a démontré que l'administration de Mregs était capable de réduire les réactions allergiques chez la souris receveuse (Sabatel et al., 2017). Nous pourrions donc envisager une thérapie à base de Mregs dans le cadre de patients BPCO.

Cependant, cette initiative est à envisager avec précaution car la présence de bactéries dans le poumon du patient est souvent un facteur participant au phénomène d'exacerbation. L'utilisateur d'agent immunosuppresseur diminuerait donc les capacités de l'organisme à se défendre contre ces bactéries (Zhu et al., 2009; Bhat et al., 2015).

En conclusion, malgré les limites mentionnées, notamment celles de notre modèle expérimental et les variations interindividuelles, ces résultats renforcent l'intérêt des Mregs comme cibles potentielles pour des interventions thérapeutiques futures dans les maladies pulmonaires inflammatoires comme la BPCO. Des études supplémentaires sont, évidemment, nécessaires afin de valider pleinement ces résultats et élargir la compréhension des mécanismes immunorégulateurs impliqués.

Références

- Abbal, M. (2013). L'immunité innée partenaire essentiel de l'immunité adaptative. *Revue Française D'allergologie*, 53(7), 598-600. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2013.03.002>
- Agustí, A. and Hogg, J. C. (2019) 'Update on the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease', *New England Journal of Medicine*, 381(13), pp. 1248–1256.
- Ardain, A., Marakalala, M. J. and Leslie, A. (2020) 'Tissue-resident innate immunity in the lung', *Immunology*, 159(3), pp. 245–256
- Barnes, P. J. (2013) 'New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease', *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(7), pp. 543–559.
- Barnes, P. J. (2016) 'Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), pp. 16–27
- Barnes, P., Shapiro, S., & Pauwels, R. (2003). Chronic obstructive pulmonary disease : molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal/The European Respiratory Journal*, 22(4), 672-688. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00040703>
- 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.
- Bhat, T. A., Panzica, L., Kalathil, S. G. and Thanavala, Y. (2015) 'Immune dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease', in *Annals of the American Thoracic Society*, pp. S169–S175.
- Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bösl, M.R., and Heesemann, J. (2011). Novel highly sensitive IL-10- beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL10 in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 3165–3176.
- Brusselle, G. G., Joos, G. F. and Bracke, K. R. (2011) 'New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 378(9795), pp. 1015–1026.
- Burnet, F. M. (1959) The clonal selection theory of acquired immunity., The clonal selection theory of acquired immunity.
- Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G.,

- Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., and Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153, 362–375.
- (Chakarov et al., 2019) : Chakarov, S., Lim, H. Y., Tan, L., Lim, S. Y., See, P., Lum, J., Zhang, X., Foo, S., Nakamizo, S., Duan, K., Kong, W. T., Gentek, R., Balachander, A., Carbajo, D., Bleriot, C., Malleret, B., Tam, J. K. C., Baig, S., Shabeer, M., . . . Ginhoux, F. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science*, 363(6432). <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>
- Chen, K. and Kolls, J. K. (2013) ‘T Cell–Mediated Host Immune Defenses in the Lung’, *Annual Review of Immunology*, 31(1), pp. 605–633.
- Chung, K. F. and Adcock, I. M. (2008) ‘Multifaceted mechanisms in COPD: Inflammation, immunity, and tissue repair and destruction’, *European Respiratory Journal*, 31(6), pp. 1334– 1356.
- Curtis, J. L., C. M. Freeman, and J. C. Hogg (2007). The Immunopathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Insights from Recent Research. *Proceedings of the American Thoracic Society* 4(7): 512– 521.
- Czernielewski, J.M., and Demarchez, M. (1987). Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 88, 17–20.
- Da Silva, C. O., Monte-Alto-Costa, A., Renovato-Martins, M., Nascimento, F. J. V., Valença, S. D. S., Lagente, V., Pôrto, L. C., & Victoni, T. (2017). Time Course of the Phenotype of Blood and Bone Marrow Monocytes and Macrophages in the Lung after Cigarette Smoke Exposure In Vivo. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(9), 1940. <https://doi.org/10.3390/ijms18091940>
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995.
- Decramer, M., Rennard, S., Troosters, T., Mapel, D. W., Giardino, N., Mannino, D., Wouters, E., Sethi, S., & Cooper, C. B. (2008). COPD as a Lung Disease with Systemic Consequences – Clinical Impact, Mechanisms, and Potential for Early Intervention. *COPD*, 5(4), 235-256. <https://doi.org/10.1080/15412550802237531>
- Degano, B., & Soumagne, T. (2014). Explorations cliniques et fonctionnelles dans la BPCO :

- de la détection au suivi. *la Presse Médicale*, 43(12), 1344-1352. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.05.019>
- D'hulst, A. I. (2005). Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *European Respiratory Journal/The European Respiratory Journal*, 26(2), 204-213. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00095204>
- Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014a). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21–35.
- Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014b). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91–104.
- Fathi, M., Johansson, A., Lundborg, M., Orre, L., Sköld, C. M. and Camner, P. (2001) 'Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial macrophages', *Experimental and Molecular Pathology*, 70(2), pp. 77–82
- Freeman, C. M. and Curtis, J. L. (2017) 'Lung dendritic cells: Shaping immune responses throughout chronic obstructive pulmonary disease progression', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 56(2), pp. 152–159.
- Fuhrman, C., & Delmas, M. (2010). Épidémiologie descriptive de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) en France. *Revue des Maladies Respiratoires*, 27(2), 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2009.08.003>
- Gao, W., Li, L., Wang, Y., Zhang, S., Adcock, I. M., Barnes, P. J., Huang, M. and Yao, X. (2015) 'Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?', *Respirology*, 20(5), pp. 722–729.
- Ghorani, V., Boskabady, M. H., Khazdair, M. R., & Kianmeher, M. (2017). Experimental animal models for COPD : a methodological review. *Tobacco Induced Diseases*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12971-017-0130-2>
- Gibbins, S. L., Thomas, S. M., Atif, S. M., McCubbrey, A. L., Desch, A. N., Danhorn, T., Leach, S. M., Bratton, D. L., Henson, P. M., Janssen, W. J., & Jakubzick, C. V. (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, 57(1), 66-76. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0361oc>

- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.
- Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, 49(4), 595-613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
- Hartl, D., Tirouvanziam, R., Laval, J., Greene, C. M., Habel, D., Sharma, L., Yildirim, A. Ö., Dela Cruz, C. S. and Hogaboam, C. M. (2018) ‘Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine’, *Journal of Innate Immunity*, 10(5–6), pp. 487–501
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 14, 821–830.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small- airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645–2653.
- Hogg, J. C., & Timens, W. (2009). The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annual Review Of Pathology*, 4(1), 435-459. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092145>
- Hoppstädter, J., Diesel, B., Zarbock, R., Breinig, T., Monz, D., Koch, M., Meyerhans, A., Gortner, L., Lehr, C.-M., Huwer, H., et al. (2010). Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir. Res.* 11, 124.
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D. J., Yanaba, K., Venturi, G. M., Szabolcs, P. M., Bernstein, S. H., Magro, C. M., Williams, A. D., Hall, R. P., St Clair, E. W. and Tedder, T. F. (2011) ‘Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells’, *Blood*, 117(2), pp. 530–541.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599–610.
- Jasper, A. E., McIver, W. J., Sapey, E. and Walton, G. M. (2019) ‘Understanding the role of neutrophils in chronic inflammatory airway disease’, *F1000Research*, 8.

- Johansson, A., Lundborg, M., Sköld, C.M., Lundahl, J., Tornling, G., Eklund, A., and Camner, P. (1997). Functional, morphological, and phenotypical differences between rat alveolar and interstitial macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16, 582–588.
- Joshi, N., Walter, J. M. and Misharin, A. V. (2018) ‘Alveolar Macrophages’, *Cellular Immunology* (January), pp. 86–90.
- Kaku, Y., Imaoka, H., Morimatsu, Y., Komohara, Y., Ohnishi, K., Oda, H., Takenaka, S., Matsuoka, M., Kawayama, T., Takeya, M. and Hoshino, T. (2014) ‘Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease’, *PLoS ONE*, 9(1), pp. 1–8.
- Kanazawa, H., Tochino, Y., Asai, K. and Hirata, K. (2014) ‘Simultaneous assessment of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in epithelial lining fluid from patients with COPD’, *Chest*, 146(5), pp. 1159–1165.
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., and Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 731–744.
- Legrand, C., Vanneste, D., Hego, A., Sabatel, C., Mollers, K., Schyngs, J., Maréchal, P., Abinet, J., Tytgat, A., Liégeois, M., Polese, B., Meunier, M., Radermecker, C., Fiévez, L., Bureau, F., & Marichal, T. (2024). Lung interstitial macrophages can present soluble antigens and induce Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*.
- Liegeois, M., Legrand, C., Desmet, C.J., Marichal, T., and Bureau, F. (2018). The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell Immunol* 330, 91–96.
- MacNee, W. (2005) ‘Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease’, in *Proceedings of the American Thoracic Society*, pp. 258–266.
- Matzinger, P. (1994) ‘TOLERANCE, DANGER, DANGER, AND AND THE THE EXTENDED FAMILY * FAMIL y * EXTENDED’, *Annu. Rev. Immunol.* 12, pp. 991–1045.
- Metchnikoff, E. (1892) *Leçons sur la pathologie comparée de l’inflammation faites à l’Institut Pasteur en Avril et Mai 1891*.
- Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul,

- F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., et al. (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP β Transcription Factor Dependence of Ly6C(-) Cells. *Immunity* 46, 849–862.e7.
- Misharin, A.V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., and Perlman, H. (2013). Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 503–510.
- Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P.K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A.R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., et al. (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* 211, 2151–2158.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737.
- Naito, M., Umeda, S., Yamamoto, T., Moriyama, H., Umezu, H., Hasegawa, G., Usuda, H., Shultz, L.D., and Takahashi, K. (1996). Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 59, 133–138.
- O’Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK (1997). Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155: 852–857.
- Park, M. D., A., Ginhoux, F., & Mérad, M. (2022). Macrophages in health and disease. *Cell*, 185(23), 4259-4279. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.007>
- Parwaresch, M.R., and Wacker, H.H. (1984). Origin and kinetics of resident tissue macrophages. Parabiosis studies with radiolabelled leucocytes. *Cell Tissue Kinet.* 17, 25–39
- Pilette, C., Colinet, B., Kiss, R., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H. J., Delos, M., Vaerman, J.P., Decramer, M. and Sibille, Y. (2007) ‘Increased galectin-3 expression and intraepithelialneutrophils in small airways in severe chronic obstructive pulmonary disease’, *Eur.Respir.J.*
- Pons, A. R. (2005). Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD. *European Respiratory Journal/The European Respiratory Journal*, 25(4), 647-652. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00062304>
- Pouwels, S. D., Hesse, L., Faiz, A., Lubbers, J., Bodha, P. K., Hacken, N. H. T. T., Van

- Oosterhout, A. J. M., Nawijn, M. C., & Heijink, I. H. (2016). Susceptibility for cigarette smoke-induced DAMP release and DAMP-induced inflammation in COPD. *American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology*, 311(5), L881-L892. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00135.2016>
- Pugliese, S.C., Kumar, S., Janssen, W.J., Graham, B.B., Frid, M.G., Riddle, S.R., El Kasmi, K.C., and Stenmark, K.R. (2017). A Time- and Compartment-Specific Activation of Lung Macrophages in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 198, 4802–4812.
- Radermecker, C., Detrembleur, N., Guiot, J., Cavalier, E., Henket, M., D’Emal, C., Vanwinge, C., Cataldo, D., Oury, C., Delvenne, P., & Marichal, T. (2020). Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *The Journal Of Experimental Medicine/The Journal Of Experimental Medicine*, 217(12). <https://doi.org/10.1084/jem.20201012>
- Retamales I, Elliott WM, Meshi B, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 469–473.
- Rossi, G., Cavazza, A., Spagnolo, P., Bellafiore, S., Kuhn, E., Carassai, P., Caramanico, L., Montanari, G., Cappiello, G., Andreani, A., Bono, F., & Nannini, N. (2017b). The role of macrophages in interstitial lung diseases. *European Respiratory Review*, 26(145), 170009. <https://doi.org/10.1183/16000617.0009-2017>
- Rothenberg, M. E. and Hogan, S. P. (2006) ‘THE EOSINOPHIL’, *Annual Review of Immunology*, 24(1), pp. 147–174.
- Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint,
- Saini, Y., Lewis, B. W., Yu, D., Dang, H., Livraghi-Butrico, A., Del Piero, F., O’Neal, W. K., & Boucher, R. C. (2018). Effect of LysM+ macrophage depletion on lung pathology in mice with chronic bronchitis. *Physiological Reports*, 6(8), e13677. <https://doi.org/10.14814/phy2.13677>
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775–787.
- Sallusto, F. (2016). Heterogeneity of Human CD4+T Cells Against Microbes. *Annual Review*

Of Immunology, 34(1), 317-334. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112056>

- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews. Immunology*, 10(3), 170-181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>
- Sawyer, R.T., Strausbauch, P.H., and Volkman, A. (1982). Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 46, 165–170.
- Schyns, J., Bai, Q., Ruscitti, C., Radermecker, C., De Schepper, S., Chakarov, S., Farnir, F., Pirottin, D., Ginhoux, F., Boeckxstaens, G., Bureau, F. and Marichal, T. (2019) 'Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung', *Nature Communications*, 10(1), pp. 1–16.
- Schyns, J., Qiang, B., Ruscitti, C., Radermecker, C., De Schepper, S., Chakarov, S., Farnir, F., Pirottin, D., Ginhoux, F., Boeckxstaens, G. E., Bureau, F., & Marichal, T. (2019b). Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11843-0>
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011 Oct 10;11(11):762-74. doi: 10.1038/nri3070. PMID: 21984070; PMCID: PMC3947780.
- Stoller, J. K., & Aboussouan, L. S. (2012b). A Review of α 1-Antitrypsin Deficiency. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 185(3), 246-259. <https://doi.org/10.1164/rccm.201108-1428ci>
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M. and Chilvers, E. R. (2010) 'Neutrophil kinetics in health and disease', *Trends in Immunology*, pp. 318–324.
- Tan, S. Y. S., & Krasnow, M. A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.129122>
- Tang, X., Kreuk, L., Cho, C., Metzger, R. J., & Allen, C. D. (2022). Bronchus-associated macrophages efficiently capture and present soluble inhaled antigens and are capable of local Th2 cell activation. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/elife.63296>
- Tregay, N., Begg, M., Cahn, A., Farahi, N., Povey, K., Madhavan, S., Simmonds, R., Gillett,

- D., Solanki, C., Wong, A., Maison, J., Lennon, M., Bradley, G., Jarvis, E., De Groot, M., Wilson, F., Babar, J., Peters, A. M., Hessel, E. M. and Chilvers, E. R. (2019) 'Use of autologous 99m Technetium-labelled neutrophils to quantify lung neutrophil clearance in COPD', *Thorax*, 74(7), pp. 659–666.
- Upham, J. W., & Yang, X. (2017). Dendritic Cells in Human Lung Disease. *Chest*, 151(3), 668-673. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.09.030>
- Van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128, 415–435.
- Vassallo, R., Walters, P. R., Lamont, J., Kottom, T. J., Yi, E. S. and Limper, A. H. (2010) 'Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study', *Respiratory Research*, 11, pp. 1–13.
- Weitnauer, M., Mijošek, V. and Dalpke, A. H. (2016) 'Control of local immunity by airway epithelial cells', *Mucosal Immunology*, pp. 287–298.
- Yang, Y., Di, T., Zhang, Z., Liu, J., Fu, C., Wu, Y., & Bian, T. (2021b). Dynamic evolution of emphysema and airway remodeling in two mouse models of COPD. *BMC Pulmonary Medicine*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01456-z>
- Yáñez, A., Coetzee, S. G., Olsson, A., Muench, D. E., Berman, B. P., Hazelett, D. J., Salomonis, N., Grimes, H. L., & Goodridge, H. S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity*, 47(5), 890-902.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.021>
- Zhao, H., Liao, X. and Kang, Y. (2017) 'Tregs: Where we are and what comes next?', *Frontiers in Immunology*, 8(NOV).
- Zhu, X., Gadgil, A. S., Givelber, R., George, M. P., Stoner, M. W., Scirba, F. C. and Duncan, S. R. (2009) 'Peripheral T Cell Functions Correlate with the Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease', *The Journal of Immunology*, 182(5), pp. 3270–3277.