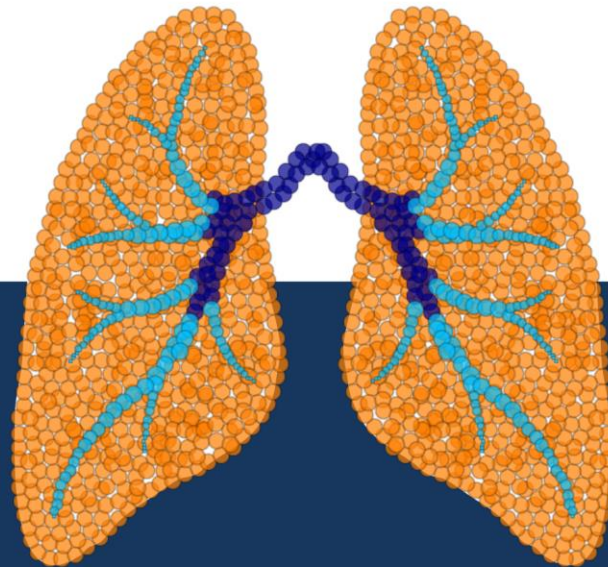


**Caractérisation non-biaisée de l'hétérogénéité des
macrophages interstitiels pulmonaires murins et mise en
évidence de précurseurs monocytaires locaux**



**Unbiased characterization of mouse lung interstitial
macrophages and highlight of local monocyte precursors**

Joey Schyns

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade

de Docteur en Sciences Vétérinaires
Année académique 2019-2020



**UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES
LABORATOIRE D'IMMUNOPHYSIOLOGIE**

**Caractérisation non biaisée de l'hétérogénéité des macrophages interstitiels
pulmonaires murins et mise en évidence de précurseurs monocytaires
locaux**

**Unbiased characterization of mouse lung interstitial macrophages and
highlight of local monocyte precursors**

Joey SCHYNS

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Sciences Vétérinaires**

ANNEE ACADEMIQUE 2019-2020

Remerciements

Une thèse est définitivement une aventure complète. Faite d'opportunités, de chance, de surprises, de joies, d'espoirs et de victoires, cette expérience est aussi la confrontation de soi-même à une succession de doutes, de frustrations, d'incompréhension et d'échecs. Dans ces circonstances, les pires ou les meilleures, nous ne sommes heureusement jamais seuls. C'est alors que des mains s'ouvrent, des bras se tendent, des oreilles s'appêtent à écouter et des sourires se dessinent, pour apprendre, encourager, supporter, rassurer, féliciter. L'heure est venue de remercier bon nombre de personnes qui m'ont permis d'accéder à cette expérience, de surmonter ces épreuves, et de ce fait de me rendre plus fort.

La première personne que je souhaite remercier est évidemment mon promoteur, le Pr Thomas Marichal. J'ai eu l'honneur d'être son premier doctorant à plein temps, dès son retour de Stanford. De la préparation au FRIA à la rédaction de notre article de recherche, en passant par pas moins de cinq projets différents et les vagues émotionnelles qui en surgissent, les occasions n'ont pas manqué pour mettre à l'épreuve notre collaboration. Thomas, merci pour ton optimisme et ton enthousiasme à toute épreuve qui ont pallié à mes doutes, pour ton ambition qui dynamise le laboratoire, pour ta disponibilité, et merci d'avoir accepté de m'encadrer et de me soutenir jusqu'à l'obtention de ma thèse. Je souhaite au Laboratoire d'Immunophysiologie de bénéficier encore longtemps de ton impulsion et de ton énergie, pour qu'il continue à être un endroit où les défis scientifiques se relèvent dans un environnement de qualité, tant sur le plan technique qu'humain.

Merci également au Pr Fabrice Bureau qui m'a accueilli dans son laboratoire, en tant que stagiaire d'abord, candidat FRIA ensuite, et enfin doctorant. Son analyse philosophique singulière et sa capacité à voir différemment le monde qui nous entoure, auront marqué ma construction intellectuelle. Merci également pour le soutien, tantôt scientifique, tantôt gastronomique, du Pr Nathalie Jacobs et du Dr Christophe Desmet.

J'ai eu la chance d'être entouré, au sein des Laboratoires d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire et d'Immunophysiologie de personnes formidables parmi lesquelles j'ai pu découvrir non seulement des collègues efficaces et attentifs, mais aussi des amis bienveillants. Commençons par le commencement : merci à Thibaut Janss de m'avoir accompagné et supervisé durant mon stage, et m'avoir enseigné, dès tôt le matin, les savoirs et les techniques essentielles à mes débuts dans le laboratoire. J'en profite pour envoyer une pensée pleine de gratitude aux autres membres, ou Docteurs devrais-je dire, qui ont quitté « officiellement » le laboratoire durant mon doctorat : Geneviève Paulissen, Stéphanie Raulier, Julien Pujol, Claire Mesnil, Jérôme Nicol et Catherine Sabatel. Je tiens

également à remercier et à encourager deux de mes collègues que je n'ai plus la chance de croiser au labo, mais toujours en quête du grade académique de Docteur² : merci à Sophie El Abbas, ma « co-oisillon » au rire, à l'anxiété, et aux goûts musicaux inoubliables ; et à Pierre Lemaître, mon partenaire de pauses café à l'énergie débordante, à l'humour bien trempé et à l'implication démesurée (comme...). Puissiez-vous bientôt, vous aussi, être récompensés pour vos efforts !

Parmi ceux qui sont toujours au laboratoire, il y a tout d'abord les post-docs, empreints de sagesse et de bons conseils. Merci à Laurence Fievez, la mémoire vive du labo en ce qui concerne l'analyse technique des macrophages interstitiels. Merci à Dimitri Pirottin, dont l'expertise en génétique, les compétences pédagogiques et la bienveillance ne sont plus à démontrer. Merci aussi au Dr Qiang Bai, particulièrement pour son apport dans les analyses bioinformatiques précieuses dans la réalisation de cette étude. Je souhaite aussi beaucoup de succès aux plus nouveaux : Shakir Hasan, Hashini Batugedara et Marco Gianfrancesco.

Bien sûr, une légion de doctorants est à remercier. Parmi eux, il y a d'abord les irréductibles : ceux qui étaient là à mes débuts, sont toujours là aujourd'hui, et seront encore là dans le futur. Merci d'abord à Coraline Radermecker, mon binôme à une folle époque où il était normal de faire des photos d'intestins sur la porte d'une armoire, ou d'utiliser une Csf1r-Cre comme outil spécifique des macrophages. Merci pour ces moments de partages, que ce soit de savoirs ou d'émotions, et notre cohésion qui a été un réel moteur. Merci également à Adeline Rosu, pour son aide technique dans les manip de chimères, les soupers dans les Vennes, et les bons conseils kiwis. Je m'adresse ensuite aux « plus jeunes » qui ont rejoint les troupes du laboratoire. Merci d'abord à Aude Delferrière qui, bien qu'elle ait pris son envol depuis, a pu partager avec nous sa force de travail, sa volonté de feu et sa sensibilité. Un grand merci à Céline Legrand pour nos échanges critiques et constructifs concernant l'exploration des macrophages de la souris, son rire éclatant et réconfortant, sa détermination ... et son RPMI. Vient ensuite Maude Liégeois, que je remercie particulièrement pour sa constante bonne humeur, empreinte de douceur et de légèreté. Merci à Marlon Arnone, pour la transmission de ses savoirs, son altruisme et ses interventions divertissantes qui font de lui un doctorant singulier et inoubliable. Merci à Cecilia Ruscitti dont l'aide précieuse dans les manip a été essentielle afin d'aboutir à notre publication. Sa gentillesse, son humour, son exotisme et sa curiosité sont autant de qualités qui font d'elle une collègue comme on en fait peu. Merci enfin aux plus nouveaux de l'équipe « éosinos » : Joseph Jorssen pour son regard toujours si particulier sur à peu près tout et sa volonté de bien faire, et Glenn Van Hulst, particulièrement pour son humour pas si « gulzig » que ça. Enfin, bonne chance et merci à la potentielle future recrue du laboratoire, Margot Meunier, pour son optimisme et son énergie débordante. Je souhaite souligner la motivation, les efforts et l'énergie démontrés par tous ces collègues au quotidien, qui nourrissent, stimulent et dynamisent le travail au laboratoire, dans les bons comme

dans les mauvais jours. Merci aussi à Cédric François, Ilham Sbai et Axelle Lio pour leur soutien technique, mais aussi à Pauline Maréchal qui contribue, depuis peu mais de manière plus qu'intensive, au bon fonctionnement du laboratoire.

J'adresse un remerciement à nos voisins, les membres des laboratoires de Pneumologie et de Génétique Fonctionnelle, pour nous avoir supportés et avoir participé à la bonne entente entre collègues dans notre chaleureux open space.

Je remercie aussi le personnel des plateformes du GIGA : Raafat Stefan, Jean-Jacques Goval et Sandra Ormenese de la plateforme d'imagerie ; Chantal Humblet, Tiffany di Salvo et Hülya Kocadag de la plateforme d'immunohistologie ; Luc Duwez, Gaëlle Lambert, Pierre Drion et les autres collaborateurs de l'animalerie ; Latifa Karim, Benoît Charlotheaux et Manon Deckers de la plateforme de génomique.

Je suis également reconnaissant envers les Prs Laurent Gillet et Renaud Louis de mon comité de thèse, pour m'avoir accompagné, conseillé et soutenu durant les cinq années de mon doctorat. Merci en outre pour votre présence indéfectible à chacune de ces réunions !

Merci aux Prs Cécile Clerx, François Huaux, Jean-Michel Sallenave, Jo Van Ginderachter, et aux Drs Benjamin Dewals et Bénédicte Machiels pour avoir évalué avec attention mon manuscrit de thèse, pour la discussion intéressante et constructive lors de la défense privée, et pour vos retours positifs par rapport à mon travail.

Merci aussi aux étudiants que j'ai eu la chance d'encadrer durant mon doctorat : Céline Legrand (encore), Amandine Schul, Nicolas Burton, Iseult Lambert, etc. J'espère qu'ils auront au moins autant appris grâce à moi que je n'aurai appris grâce à eux.

Je souhaite également remercier du fond du cœur ma famille, mes amis et mes proches qui m'ont soutenu, de près ou de loin, durant cette aventure. Je suis heureux de pouvoir leur présenter aujourd'hui le fruit de mon travail, même s'il n'est pas facile à appréhender, et que certains me demanderont encore si je fais plutôt les petits ou les gros animaux.

Enfin, merci à Estelle, qui m'a soutenu et encouragé dans les moments difficiles et a toujours fait preuve d'une grande compréhension, lorsque je devais travailler jusque tard au labo ou chez nous, ou encore lors de manip prévues le week-end, pour lesquelles elle m'a même parfois aidé ! Elle illumine ma vie en m'offrant chaque jour une pétillante bulle de douceur, de tendresse et d'amour. Aujourd'hui c'est une nouvelle aventure qui commence pour nous deux, et qui nous réservera encore des recherches et découvertes, mais d'un tout autre ordre !

Abréviations

ADNc	ADN complémentaire
AM	<i>Alveolar macrophage</i> (cf MA)
AREG	<i>Amphiregulin</i> , amphiréguline
ARNm	ARN messenger
BM	<i>Bone marrow</i> , moelle osseuse
BMDC	<i>Bone marrow-derived dendritic cell</i> , cellule dendritique dérivée de la moelle osseuse
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CD	Cluster de différenciation
cDC	Cellule dendritique conventionnelle
CDP	Précurseur commun aux cellules dendritiques
cMoP	Progéniteur commun aux monocytes
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CpG	Dinucléotides CpG non-méthylés
Cre	Cre-recombinase
CSFE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DC	<i>Dendritic cell</i> , cellule dendritique
DTR	Récepteur de la toxine diphtérique
EMP	Progéniteur érythro-myéloïde
FcR	Récepteur à fraction constant des immunoglobulines
FDR	<i>False discovery rate</i>
GEM	<i>Gel-bead in emulsion</i> , bille fonctionnalisée en émulsion
GMP	Progéniteur granulocytaire-monocytaire
GO	<i>Gene Ontology</i>
HDM	<i>House dust mite</i> , extraits d'acariens
HIF	Facteur induit par l'hypoxie
HSC	Cellule souche hématopoïétique
i.t.	<i>Intratracheal</i> , intratrachéal
i.v.	<i>Intravenous</i> , intraveineux
IL	Interleukine

IL-1Ra	Antagoniste au récepteur de l'IL-1
IM	<i>Interstitial macrophage</i> (cf MI)
ITIB	IL-10- β -lactamase
LBD	Domaine de liaison du ligand
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> , facteur inhibiteur de la leucémie
LLBA	Liquide de lavage broncho-alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
LSL	Cassette STOP flanquée de deux sites loxP
MA	Macrophage alvéolaire
MAT	Macrophage associé aux tumeurs
MDP	Progéniteur commun aux monocytes et aux cellules dendritiques
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> , moyenne d'intensité de fluorescence
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex class II</i> , complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2
MI	Macrophage interstitiel
MMP	Métalloprotéase matricielle
MPS	<i>Mononuclear phagocyte system</i> , système phagocytaire mononucléé
MT	Macrophage tissulaire
NES	<i>Normalized enrichment score</i>
OVA	Ovalbumine
PC	<i>Principal component</i> , composante principale
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PTX3	<i>Pentatraxin 3</i> , pentatraxine 3
RT	<i>Room temperature</i> , température ambiante
RTM	<i>Resident tissue macrophage</i> , macrophage tissulaire résident
s.c.	<i>Subcutaneous</i> , sous-cutanée
scRNA-seq	<i>Single-cell RNA sequencing</i> , séquençage d'ARN de cellules individuelles
SP	Protéine du surfactant
SPF	<i>Specific-pathogen-free</i> , exempt de pathogènes spécifiques
SSC	<i>Side scatter</i> , diffusion latérale
TAM	<i>Tamoxifen</i> , tamoxifène
TCR	Récepteur de cellule T

Th1	T auxiliaire de type
Th2	T auxiliaire de type 2
Th17	T auxiliaire de type 17
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , récepteur Toll-like
Treg	T régulateur
t-SNE	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
UMI	<i>Unique molecular identifier</i> , séquence d'identification moléculaire unique
WT	<i>Wild-type</i> , sauvage
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Résumé - Abstract	1
Résumé	2
Summary.....	3
Préambule général.....	5
Introduction	7
1. Le système phagocytaire mononucléé pulmonaire: discrimination phénotypique, ontogénique et spatiale	8
1.1 Macrophages pulmonaires	8
1.1.1 Aperçu historique: de la découverte des macrophages pulmonaires à leur dichotomisation.....	8
1.1.2 Caractéristiques morphologiques et phénotypiques des macrophages pulmonaires.....	10
1.1.3 Localisation tissulaire des macrophages pulmonaires.....	11
1.2 Monocytes pulmonaires	12
1.3 Cellules dendritiques.....	14
2. Origine et maintenance des macrophages pulmonaires	15
2.1 Outils d'étude de l'origine des macrophages pulmonaires	17
2.2 Origine embryonnaire des macrophages pulmonaires	19
2.3 Contribution myéloïde dans la maintenance des macrophages pulmonaires	19
2.4 Différenciation de précurseurs circulants en macrophages au sein du tissu pulmonaire	21
3. Spécialisations fonctionnelles des macrophages pulmonaires.....	22
3.1 Macrophages interstitiels	23
3.1.1 Capacité de phagocytose: clearance et défense du tissu pulmonaire	23
3.1.2 Capacité de présentation d'antigènes	23
3.1.3 Maintien de l'homéostasie pulmonaire dans un contexte allergique	24
3.2 Macrophages alvéolaires.....	26
4. Hétérogénéité des macrophages interstitiels.....	27
4.1 Hétérogénéité des macrophages interstitiels à l'état basal	27
4.2 Plasticité des macrophages interstitiels.....	29
4.3 Le séquençage d'ARN de cellules individuelles comme outil d'étude de l'hétérogénéité des macrophages	30
Objectifs	33

Section expérimentale	35
Abstract.....	38
Introduction	39
Results	41
Material and methods	58
Acknowledgments	69
References	70
Supplementary material	73
Discussion - Perspectives.....	89
Bibliographie.....	101

Résumé - Abstract

Résumé

Les macrophages résidant dans les tissus font partie intégrante des organes des mammifères et peuvent accomplir diverses tâches dans le développement, l'homéostasie, l'inflammation ou encore la réparation tissulaire. Au sein des poumons, les macrophages non-alvéolaires, appelés macrophages interstitiels (MIs), contribuent de manière importante à l'homéostasie pulmonaire et à la prévention de désordres à médiation immune tels que l'asthme, mais restent peu caractérisés. Dans cette étude, nous avons analysé 3596 cellules mononucléées du tissu pulmonaire de la souris, exprimant le récepteur Fc de haute affinité pour les immunoglobulines gamma (Fcγr1, ou CD64), par séquençage d'ARN sur cellules individuelles (*single-cell RNA-sequencing*, scRNA-seq). Nous avons identifié deux sous-populations de MIs phénotypiquement distinctes, à savoir les populations CD206⁺ et CD206⁻, ainsi qu'une population discrète de monocytes CD64⁺CD16.2⁺ jusqu'à présent inconnue. Des expériences de destinée cellulaire (*fate-mapping*) supportent que les deux sous-populations de MIs possèdent une durée de vie importante et sont lentement remplacés par des monocytes chez l'adulte, la population de MIs CD206⁺ présentant un plus haut potentiel d'auto-maintenance par comparaison aux MIs CD206⁻. Les MIs CD206⁺ possèdent une taille plus importante, sont principalement localisés dans l'interstitium bronchique et produisent de hauts niveaux de cytokines et chimiokines immuno-régulatrices, telles que l'interleukine (IL)-10. Par comparaison, les MIs CD206⁻ peuplent préférentiellement l'interstitium alvéolaire et possèdent des caractéristiques de cellules présentatrices d'antigènes. De plus, nous fournissons des indications suggérant que les monocytes CD64⁺CD16.2⁺ dérivent de monocytes patrouilleurs Ly-6C^{lo} intravasculaires qui subissent une reprogrammation transcriptomique extensive lors de leur entrée dans le tissu pulmonaire, afin de devenir des précurseurs locaux des MIs CD206⁻. Cette étude étend notre connaissance de la diversité des MIs pulmonaires, et révèle une nouvelle voie ontogénique impliquée dans le développement d'une sous-population de MIs, constituant une étape importante dans l'élaboration d'approches ciblées dans des conditions impliquant les (dys)fonctions des MIs.

Summary

Resident tissue macrophages constitute an integral part of mammalian tissues and can fulfill various tasks during development, homeostasis, inflammation and repair. In the lung, non-alveolar macrophages, called interstitial macrophages (IM), importantly contribute to lung homeostasis and the prevention of immune-mediated disorders such as asthma but remain little characterized. In this study, we analyzed 3,596 mouse lung tissue mononuclear cells expressing the high affinity immunoglobulin gamma Fc receptor (Fcgr1, or CD64) by single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq). We identified two phenotypically distinct subpopulations of IM, i.e. CD206⁺ and CD206⁻ populations, as well as an as-yet unknown discrete population of extravasating CD64⁺CD16.2⁺ monocytes. Fate-mapping experiments supported that both IM subsets had an extended lifespan and were slowly replaced by monocytes in adults, with CD206⁺ IM exhibiting an increased self-maintenance potential as compared to CD206⁻ IM. CD206⁺ IM are larger, are mainly found in the bronchial interstitium and constitutively produce high levels of immuno-regulatory cytokines and chemokines, including interleukin (IL)-10. Conversely, CD206⁻ IM preferentially populate the alveolar interstitium and exhibit features of antigen-presenting cells. In addition, we provide evidence that CD64⁺CD16.2⁺ monocytes arise from intravascular Ly-6C^{lo} patrolling monocytes that underwent an extensive specification program upon entering the lung tissue to become local precursors of CD206⁻ IM. This study expands our knowledge about the complexity of lung IM and reveals a novel ontogenic pathway for one IM subset, an important step towards the elaboration of targeted approaches for conditions implicating IM (dys)functions.

Préambule général

Le poumon est un organe dont le rôle principal est d'assurer les échanges gazeux vitaux entre le compartiment sanguin et les espaces alvéolaires, et donc l'air qui y circule en permanence. Les muqueuses respiratoires sont donc constamment exposées à divers composants aéroportés auxquels elles doivent faire face, qu'il s'agisse de micro-organismes, de substances irritantes, de polluants, d'antigènes inoffensifs, etc. Le réseau capillaire pulmonaire est le plus irrigué de l'organisme, rendant également le poumon particulièrement sensible aux lésions d'origine sanguine (par exemple à des infections par des micro-organismes ou parasites sanguins, aux embolies ou au développement de métastases). Le système immunitaire pulmonaire, impliqué dans les différentes phases de l'inflammation mais aussi dans la réparation tissulaire, est donc confronté en permanence à une série d'événements auxquels il doit répondre, sans compromettre la fonction respiratoire. Le système immunitaire joue donc un rôle pivot important dans le développement ou non d'une réponse immune. Cette réponse est la plupart du temps désirée et bénéfique, et permet par exemple de débarrasser l'organe de micro-organismes pathogènes, ou encore de soutenir la réparation tissulaire consécutive à une lésion. Dans certaines situations néanmoins, le système immunitaire est responsable d'une réponse aberrante et délétère, par exemple à l'encontre d'antigènes inoffensifs exogènes ou endogènes, ou encore en exerçant des fonctions protumorales favorisant le développement de tumeurs.

Parmi les acteurs du système immunitaire pulmonaire, on distingue d'une part le compartiment non-leucocytaire, composé majoritairement des cellules épithéliales, et d'autre part le compartiment leucocytaire, lui-même constitué des cellules lymphoïdes, des granulocytes et du système phagocytaire mononucléé. Parmi les leucocytes résidents, les macrophages représentent le type cellulaire le plus représenté dans le poumon sain. Les macrophages pulmonaires sont décrits depuis plusieurs décennies, mais le développement de techniques permettant la dissection précise des populations de macrophages dans différents organes et l'étude de leur origine et implication fonctionnelle a amplifié l'intérêt porté par la communauté scientifique à ces cellules particulièrement plastiques et impliquées dans l'homéostasie, le développement, l'inflammation et la réparation tissulaires. Au sein du poumon, on distingue les macrophages alvéolaires (MAs) qui résident dans les voies aériennes, des macrophages interstitiels (MIs). De par leur isolation aisée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire ou le sputum, les MAs représentent les macrophages pulmonaires les plus étudiés, et participent activement au retrait des particules ou micro-organismes étrangers et à la clairance des protéines du surfactant. Les MIs, quant à eux, restent encore à ce jour peu étudiés. Néanmoins, il apparaît que ces cellules sont impliquées dans les défenses pulmonaires et le maintien de l'homéostasie tissulaire. De plus, de récentes études suggèrent que ces macrophages représentent une population hétérogène, englobant plusieurs sous-populations distinctes. Face à l'intérêt croissant pour les MIs, notre objectif au sein de ce travail est d'étudier de manière non biaisée l'hétérogénéité des MIs dans le poumon de la souris adulte, et de caractériser chaque sous-population en terme de phénotype, d'origine, de localisation et de fonctions.

Introduction

1. Le système phagocytaire mononucléé pulmonaire: discrimination phénotypique, ontogénique et spatiale

Proposé par Ralph van Furth et collègues afin de regrouper des cellules présentant des similarités en termes de morphologie, de fonction et d'origine, le système phagocytaire mononucléé (*mononuclear phagocyte system*, MPS) comprend originellement les promonocytes et leurs précurseurs au sein de la moelle osseuse, lesquels se différencient en monocytes qui circulent dans le compartiment sanguin et qui pénètrent le tissu pour devenir des macrophages (van Furth et al., 1972). Il a plus tard été proposé que les cellules dendritiques (*dendritic cells*, DCs) intègrent le MPS étant donné leur capacité de phagocytose et les similitudes ontogéniques et phénotypiques que ces cellules peuvent partager avec les macrophages (Guilliams et al., 2014; Hume, 2008; Hume et al., 2002). Dans cette section, nous introduirons les caractéristiques phénotypiques, ontogéniques et spatiales permettant de discriminer les différents composants du MPS au sein du poumon.

1.1 Macrophages pulmonaires

Les macrophages tissulaires sont présents dans la majorité des organes et accomplissent des fonctions spécifiques du tissu dans lequel ils résident, en participant au développement, à l'homéostasie, à l'inflammation ou à la réparation tissulaire (Davies et al., 2013; Epelman et al., 2014a; Okabe et Medzhitov, 2016). Dans ce travail, nous nous focaliserons sur les propriétés des macrophages pulmonaires. Nous introduirons dans cette section les concepts de macrophages alvéolaires et interstitiels pulmonaires, et décrirons leurs caractéristiques morphologiques, phénotypiques et spatiales. Leurs particularités ontogéniques, fonctionnelles et leur hétérogénéité seront détaillées dans les sections 2, 3 et 4 ci-dessous respectivement.

1.1.1 Aperçu historique: de la découverte des macrophages pulmonaires à leur dichotomisation.

Au sein des poumons de patients atteints de sténose mitrale, Rudolf Virchow observa en 1847 des cellules alvéolaires contenant des pigments sanguins (Bertalanffy, 1964; Virchow, 1847). Plus tard, les « cellules à poussières » ont été décrites comme des cellules alvéolaires incorporant des particules de poussières inhalées (Bertalanffy, 1964; von Jns, 1876). Ces cellules phagocytaires alvéolaires, appelées par la suite « macrophages alvéolaires » (MAs), forment la population de macrophages pulmonaires la plus étudiée, et ce grâce à leur facilité d'isolation dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA).

En parallèle, les « cellules septales », phagocytes observés par Melvin Kaplan et collègues en 1950 représentent le premier exemple de macrophages non-alvéolaires, localisés dans la paroi alvéolaire des poumons de la souris (Kaplan et al., 1950). La théorie proposée au début des années 70 par Ralph van Furth et Zanvil Cohn impliquait que, comme pour tout macrophage, les MAs provenaient de précurseurs myéloïdes, se différenciant en monocytes qui circulent dans le sang et se spécialisent en macrophages au sein des alvéoles (van Furth et Cohn, 1968). Ceci supposait alors l'existence d'un stade intermédiaire de maturation de MAs, localisé dans l'interstitium pulmonaire, entre le compartiment sanguin et les voies aériennes. En 1972, les « cellules interstitielles » identifiées dans des cultures d'explants pulmonaires murins furent proposées comme étant des précurseurs de MAs (Bowden et Adamson, 1972), et restèrent des années considérées uniquement comme un état de transition entre les monocytes sanguins et les macrophages des espaces alvéolaires (Blussé van Oud Alblas et al., 1981; Landsman et Jung, 2007).

Le développement de méthodes d'isolation des macrophages pulmonaires employant des traitements mécaniques et enzymatiques a permis, chez les rongeurs, d'établir une comparaison entre les MAs, récupérés dans le LLBA, et les macrophages non-alvéolaires ou tissulaires (MTs), bien que ces derniers soient contaminés par des MAs résiduels (van oud Alblas et van Furth, 1979; Holt et al., 1985). Alors que MAs et MTs partagent des caractéristiques classiques de macrophages comme la capacité de phagocytose et l'expression de récepteurs des fractions constantes des immunoglobulines (FcR), ces traits sont néanmoins plus discrets chez les MTs par comparaison aux MAs (Bilyk et al., 1988; Chandler et al., 1986; Franke-Ullmann et al., 1996; Johansson et al., 1997; Lagranderie et al., 2003). De nombreuses autres différences ont été observées entre les MTs et MAs. Chez la souris, les MTs présentent un pourcentage plus élevé de cellules exprimant le récepteur de la protéine du complément C3 ou Mac-1, une intégrine composée d'une chaîne $\beta 2$ et du cluster de différenciation (CD)11b (van oud Alblas et van Furth, 1979; Bilyk et al., 1988), une production plus importante de métabolites de l'acide arachidonique (leucotriène C4 et prostacycline) après phagocytose (Rouzer et al., 1982) et une plus grande aptitude à l'étalement lorsqu'elles sont exposées à du plasma (Bilyk et al., 1988). Chez le rat, les MTs montrent une activité peroxydase plus importante (Drath et al., 1982), une expression plus élevée du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (*major histocompatibility complex class II*, MHC-II) (Steinmüller et al., 2000) et de plus nombreux filopodes (Brody et al., 1992). Après stimulation *ex vivo* aux lipopolysaccharides (LPS), des composés de la paroi des bactéries Gram négatif, les MAs présentent une activité cytotoxique et antimicrobienne plus élevée par rapport aux MTs qui, de leur côté, sécrètent plus d'interleukine (IL)-1 et d'IL-6 chez le rat (Steinmüller et al., 2000) et chez la souris où ils soutiennent la prolifération de lymphocytes spléniques activés par un facteur mitogène (Franke-Ullmann et al., 1996).

Malgré ces différences morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles, de nombreux scientifiques considéraient les MTs comme faisant partie du processus de transition entre les monocytes et les MAs (Blussé van Oud Alblas et al., 1981; Bowden et Adamson, 1972; Franke-Ullmann et al., 1996; Landsman et Jung, 2007). Toutefois, d'autres auteurs ont émis la possibilité que les MTs pulmonaires, aussi appelés macrophages interstitiels pulmonaires (MIs), représentent une population distincte et entièrement compétente (Johansson et al., 1997; Laskin et al., 2001; Steinmüller et al., 2000), un concept qui est de nos jours bien accepté dans le domaine (Guilliams et al., 2013a; Byrne et al., 2016; Tan et Krasnow, 2016).

1.1.2 Caractéristiques morphologiques et phénotypiques des macrophages pulmonaires

La plupart des études mentionnées ci-dessus ont été réalisées *ex vivo* et ont défini les MTs comme étant les cellules récoltées au sein des poumons digérés enzymatiquement, et adhérentes lorsqu'elles sont remises en culture. Cette technique ne permet évidemment pas une isolation spécifique des MIs, et les cellules étudiées devaient probablement être contaminées par des quantités variables d'autres cellules mononucléées, comme des MAs résiduels (malgré des lavages broncho-alvéolaires préalables (Crowell et al., 1992; Johansson et al., 1997; Kobzik et al., 1988; Lehnert et al., 1985)), des cDCs ou des monocytes (Jakubzick et al., 2013; Sabatel et al., 2017). De plus, considérant que les macrophages subissent des modifications morphologiques et phénotypiques rapides une fois extraits de leur microenvironnement naturel et cultivés *ex vivo* (Okabe et Medzhitov, 2016), les conclusions tenues sur des MIs cultivés sous ces conditions doivent être interprétées avec précaution.

Robert Sebring et Bruce Lehnert furent à notre connaissance les premiers à combiner une technique basée sur l'affinité des FcR avec la cytométrie en flux afin d'isoler les MIs de rats, et les identifiaient morphologiquement comme étant plus petits, présentant une surface plus lisse et un noyau plus irrégulier contenant davantage d'hétérochromatine par comparaison aux MAs (Sebring et Lehnert, 1992). Chez la souris, des études plus récentes ont montré que les MIs fraîchement isolés contiennent un noyau plus irrégulier et de nombreuses vacuoles dans leur cytoplasme, alors que les MAs présentent une taille plus élevée (Sabatel et al., 2017) et des pseudopodes plus importants (Misharin et al., 2013). Ces données sont cohérentes avec celles observées chez l'humain, où les MIs apparaissent comme étant plus hétérogènes et plus petits que les MAs (Fathi et al., 2001; Hoppstädter et al., 2010; Dewhurst et al., 2017).

L'accès à des technologies permettant l'analyse de suspensions de cellules fraîchement récoltées, comme la cytométrie multiparamétrique, en flux ou de masse, a significativement amélioré la caractérisation phénotypique des cellules immunes pulmonaires (Becher et al., 2014; Gibbings et al., 2017; Guilliams et al., 2013a; Jakubzick et al., 2013; Misharin et al., 2013; Sabatel et al., 2017).

Chez la souris à l'état basal, les MIs et MAs partagent l'expression de marqueurs généralement exprimés par les macrophages comme le CD64 et la tyrosine kinase transmembranaire MerTK, mais différent de par l'expression de différents marqueurs : les MAs sont identifiés comme des cellules autofluorescentes SiglecF⁺CD11c⁺CD11b⁻CX3CR1⁻, et expriment en outre EAR2 et CSF2Rb, alors que les MIs sont définis comme des cellules non-autofluorescentes SiglecF⁻CD11c^{+/+}CD11b⁺CX3CR1⁺ (Cohen et al., 2018; Gibbings et al., 2017; Misharin et al., 2013; Sabatel et al., 2017). Les MAs sont par ailleurs 10 fois plus abondants que les MIs au sein d'une suspension cellulaire obtenue après digestion enzymatique et mécanique des poumons de souris adultes à l'état basal (Sabatel et al., 2017). Dans un contexte inflammatoire, la sélection des MIs comme mentionnée ci-dessus peut englober des sous-types inflammatoires de monocytes ou de cellules dérivées de monocytes. Néanmoins, les MIs sont distincts de par leur faible expression du marqueur de surface Ly-6C, exprimé par les monocytes classiques (voir section 1.2). Chez l'humain, plusieurs études identifient des marqueurs permettant de discriminer les MIs des autres populations de monocytes et de macrophages. Les MAs et monocytes peuvent être définis comme des cellules hautement autofluorescentes SSC^{hi}CD169^{hi}CD206^{hi}, et non-autofluorescentes SSC^{lo}CD169⁻CD206⁻CD14⁺CD16^{lo/hi} respectivement, alors que des cellules identifiées comme étant HLA-DR⁺CD169^{lo}CD206^{int}, présentant une taille intermédiaire entre celle des monocytes et des MAs, pourraient correspondre aux MIs humains (Bharat et al., 2016; Desch et al., 2016; Yu et al., 2016).

1.1.3 Localisation tissulaire des macrophages pulmonaires

À l'état basal, les MIs sont considérés comme étant des macrophages pulmonaires non-alvéolaires et sont dès lors virtuellement absents dans les voies respiratoires, alors que les MAs regroupent les macrophages présents dans la lumière des voies respiratoires et des alvéoles. Toutefois, à ce jour, les informations relatives à la localisation exacte des MIs au sein du tissu pulmonaire sont peu nombreuses et reposent principalement sur l'analyse de marquages immunohistochimiques ou immunofluorescents à l'aide de marqueurs de macrophages peu spécifiques (Bedoret et al., 2009; Gibbings et al., 2017). À l'aide d'un marquage immunohistochimique des protéines F4/80 et CD11c, Denis Bedoret et collègues identifièrent au sein de l'interstitium pulmonaire murin des cellules F4/80⁺CD11c⁻, définis comme étant des MIs, alors que les MAs, identifiés comme étant F4/80⁺CD11c⁺, étaient principalement localisés dans la lumière des alvéoles (Bedoret et al., 2009). Plus récemment, Sophie Gibbings et collègues ont réalisé un marquage de MerTK sur des sections de poumons de souris reportrice *Cx3cr1*^{GFP}, permettant la visualisation de MIs MerTK⁺CX3CR1⁺ dans l'interstitium bronchique, proches des vaisseaux lymphatiques, mais pas dans le parenchyme pulmonaire (Gibbings et al., 2017), alors que d'autres études suggèrent que les MIs peuvent peupler l'interstitium du parenchyme chez la souris adulte (Rodero et al., 2015; Tan and Krasnow, 2016). Notons que dans l'étude de Sophie Gibbings et collaborateurs, aucune cellule MerTK⁺CX3CR1⁺ n'a été observé à la surface

pleurale ou dans les vaisseaux sanguins (Gibbins et al., 2017). En effet, à ce jour, les macrophages pulmonaires intravasculaires ne sont pas décrits à l'état basal dans plusieurs espèces, dont la souris, le rat et les primates (Staub, 1994), bien qu'ils puissent être recrutés dans les vaisseaux pulmonaires après une ligature du canal biliaire chez le rat (Gill et al., 2008). Au sein de notre laboratoire, nous avons montré que l'injection intraveineuse (i.v.) de liposomes contenant du clodronate, lesquels déplètent efficacement les phagocytes du compartiment sanguin, n'a aucun impact sur le nombre total de MIs (Sabatel et al., 2017). De plus, dans le cadre d'expériences de marquage *in vivo* par injection i.v. d'un anticorps couplé à un fluorochrome dirigé contre le marqueur pan-leucocytaire CD45, les MIs ne sont pas significativement marqués par les anticorps ayant circulé dans le compartiment sanguin, à l'inverse d'une majorité des monocytes (Sabatel et al., 2017), supportant que les MIs à l'état basal ne sont effectivement pas associés aux vaisseaux sanguins mais sont réellement situés dans le tissu pulmonaire, dans les espaces péri-bronchiques (Chakarov et al., 2019; Gibbins et al., 2017), mais aussi potentiellement au sein du parenchyme pulmonaire (Rodero et al., 2015; Tan et Krasnow, 2016). La quantification de l'association des MIs avec des zones ou des structures particulières du poumon n'est cependant pas systématique et permettra à l'avenir de préciser la localisation exacte des MIs au sein des poumons.

1.2 Monocytes pulmonaires

Chez la souris, on distingue deux populations majeures de monocytes : les monocytes dits « classiques » et « patrouilleurs », correspondant aux monocytes CD14⁺CD16⁻ et CD14^{int}CD16⁺ respectivement chez l'humain (Passlick et al., 1989; Geissmann et al., 2003; Cros et al., 2010; Ginhoux et Jung, 2014). Ces deux populations partagent l'expression de F4/80, CD11b et CD115 (CSF1R) (Geissmann et al., 2003; Hettinger et al., 2013; Mildner et al., 2017; Yona et al., 2013).

Les monocytes classiques, ou Ly-6C^{hi}, sont identifiés comme des cellules CCR2⁺CX3CR1^{int}Ly-6C^{hi}, dérivent du progéniteur commun aux monocytes et aux cellules dendritiques (MDP) et du progéniteur commun aux monocytes (cMoP) dans la moelle osseuse, et quittent la moelle pour entrer dans la circulation sanguine par un mécanisme dépendant du CCR2 (Geissmann et al., 2003; Ginhoux et Jung, 2014; Hettinger et al., 2013; Serbina et Pamer, 2006). Notons que ce modèle classique hiérarchique est récemment remis en question, étant donné que des modèles proposent un engagement dans la lignée monocyttaire dès le stade de cellules souches hématopoïétiques (HSCs), et un continuum de différenciation de ces cellules plutôt qu'un processus séquentiel nécessitant des précurseurs pluripotents intermédiaires (Guilliams et al., 2018), voire suggèrent une contribution du progéniteur granulocytaire-monocytaire (GMP) sans l'intervention du MDP pour la différenciation de monocytes, et ce de manière plus importante après exposition au LPS (Yáñez et al., 2017). Les monocytes classiques circulants sont préférentiellement recrutés au niveau des sites inflammatoires (Geissmann et al., 2003)

et sont capables de repeupler plusieurs compartiment de phagocytes mononucléés à l'état basal, par exemple les macrophages du cœur (Epelman et al., 2014b; Molawi et al., 2014), du derme (Tamoutounour et al., 2013), de la lamina propria intestinale (Bain et al., 2014), du pancréas (Calderon et al., 2015) et une sous-population de macrophages du péritoine (Bain et al., 2016; Kim et al., 2016).

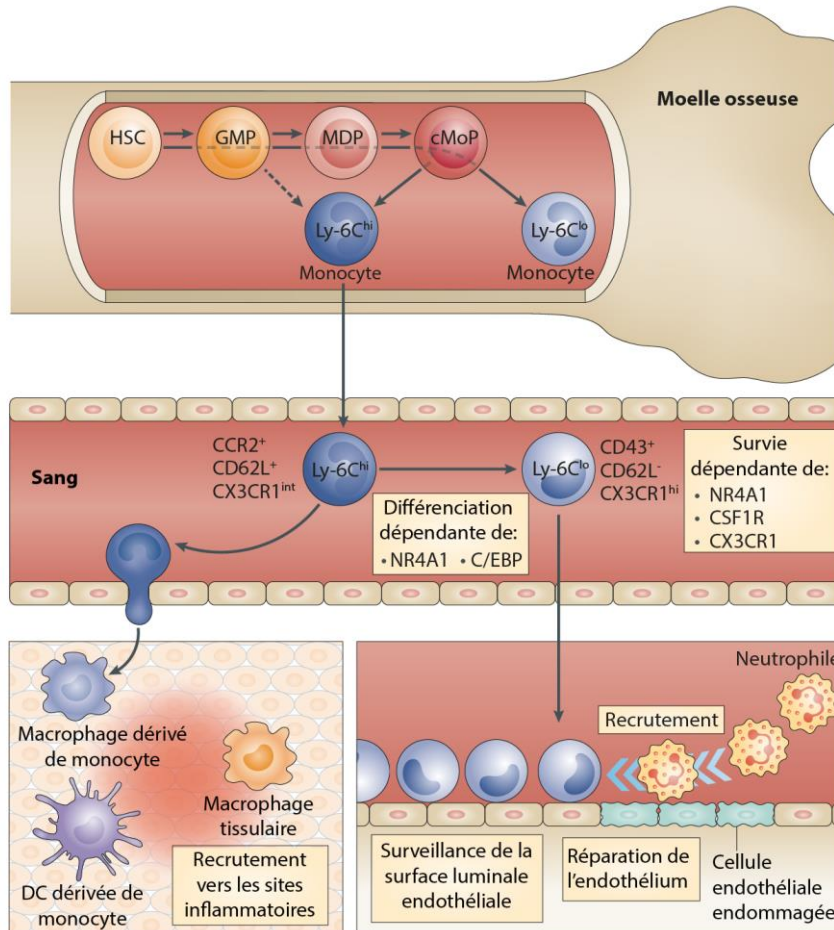


Figure Introduction 1 Les monocytes classiques et patrouilleurs de la souris. Cette figure illustre les différences en termes d'origine, de développement, de phénotype et de fonction entre les monocytes classiques Ly-6C^{hi} et les monocytes patrouilleurs Ly-6C^{lo} de la souris, comme discutées dans la section 1.2. 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)*

Les monocytes patrouilleurs, ou Ly-6C^{lo}, sont caractérisés comme des cellules CCR2⁻ CX3CR1^{hi} Ly-6C^{lo} qui adhèrent et rampent à la surface luminale de l'endothélium, notamment via l'interaction de leurs intégrines LFA-1, Mac-1 (composées d'une chaîne β2 et du CD11a ou du CD11b respectivement), VLA4 et du CX3CR1, avec leurs ligands exprimés par les cellules endothéliales (Auffray et al., 2007; Buscher et al., 2017; Geissmann et al., 2003; Ginhoux et Jung, 2014). Ils phagocytent des microparticules attachées à la surface des cellules endothéliales et, en cas de dommage ou de nécrose de l'endothélium, ingèrent les débris cellulaires et orchestrent la réparation tissulaire (Carlin et al., 2013). Les monocytes patrouilleurs ont en outre une demi-vie de circulation plus élevée que les monocytes circulants, à savoir environ 5 jours contre 20 heures, respectivement (Geissmann et

al., 2003; Tacke et al., 2006; Yona et al., 2013). À l'état basal, les monocytes patrouilleurs se différencient au départ de monocytes classiques, probablement au sein du compartiment sanguin (Ginhoux et Jung, 2014; Hettinger et al., 2013; Yona et al., 2013; Sunderkötter et al., 2004; Varol et al., 2007), par un mécanisme dépendant des facteurs de transcriptions C/EBP β (Mildner et al., 2017) et NR4A1, ce dernier étant en outre important pour leur survie (Hanna et al., 2011), à l'instar de CX3CR1 (Landsman et al., 2009) (voir Figure Introduction 1). En accord avec cette théorie, une population de monocyte Ly-6C^{int} est également décrite, arborant un profil transcriptomique partageant des similitudes avec les monocytes Ly-6C^{hi} et les Ly-6C^{lo} (Mildner et al., 2017; Sunderkötter et al., 2004). Bien que ce continuum de différenciation soit bien décrit, il n'est pas exclu que les monocytes Ly-6C^{lo} dérivent directement du cMoP dans la moelle osseuse (Ginhoux et Jung, 2014). En effet, s'ils provenaient uniquement des monocytes Ly-6C^{hi} qui dépendent de CCR2 pour leur sortie de la moelle osseuse (Serbina et Pamer, 2006), le nombre de monocytes Ly-6C^{lo} devrait être réduit chez des souris déficientes pour CCR2 (*Ccr2*^{-/-}), ce qui n'est pas complètement le cas (Carlin et al., 2013; Yona et al., 2013). D'un autre côté, la dépendance des monocytes Ly-6C^{hi} au CCR2 n'est pas absolue. En effet la rate, qui représente un site d'hématopoïèse secondaire extra-médullaire chez la souris adulte (Kiel et Morrison, 2008) et qui contient des progéniteurs comme le MDP et le cMoP qui se différencient en monocytes (Hettinger et al., 2013), constitue un réservoir de monocytes Ly-6C^{hi} et Ly-6C^{lo}, qui présentent un profil transcriptomique similaire aux monocytes sanguins Ly-6C^{hi} et Ly-6C^{lo} respectivement, qui sont présents en nombres sensiblement identiques chez des souris *Ccr2*^{-/-} et des contrôles sauvages, et sont donc CCR2-indépendants (Swirski et al., 2009).

Dans le poumon également, comme antérieurement suggéré par Claudia Jakubzick et collègues (Jakubzick et al., 2013), Catherine Sabatel et ses collaborateurs ont décrit l'existence d'une population de monocytes Ly-6C^{hi} tissulaires CCR2-indépendants qui possèdent un profil transcriptomique identique aux monocytes classiques du sang (Sabatel et al., 2017). Au sein des poumons de souris sauvages préalablement perfusés au PBS, ces monocytes tissulaires CCR2-indépendants constituent environ 40% des monocytes Ly-6C^{hi} (Sabatel et al., 2017). Il est intéressant de noter que dans cette étude, une fraction (i.e. environ 20%) des monocytes Ly-6C^{lo} semble également tissulaire, laquelle est CCR2-indépendante.

1.3 Cellules dendritiques

Au sein du poumon de la souris à l'état basal, on distingue 3 sous-types de DCs : les DCs conventionnelles CD103⁺ ou de type 1 (cDC1s), CD11b⁺ ou de type 2 (cDC2s) et une population mineure de DCs plasmacytoïdes (pDCs) (Guilliams et al., 2014). Les pDCs, identifiées comme des cellules CD11c⁺F4/80^{lo}CX3CR1⁻CD11b^{lo}SiglecH⁺, sont importantes pour l'immunité antivirale de par leur production d'interférons de type I au cours d'infections virales, alors que les cDCs produisent

davantage de cytokines et chimiokines et sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) professionnelles qui échantillonnent le tissu, migrent vers les ganglions drainants afin d'activer et polariser des lymphocytes T naïfs en lymphocyte T effecteurs ou régulateurs (Guilliams et al., 2013b; Lambrecht et Hammad, 2009). En particulier, les cDC1s sont identifiées comme des cellules $CD11c^+MHC-II^+F4/80^{lo}CX3CR1^+CD11b^{lo}CD103^+$, sont localisées au sein de l'épithélium des voies respiratoires et émettent des dendrites vers la lumière des voies aériennes, et sont impliqués dans la présentation croisée d'antigènes exogènes aux lymphocytes T cytotoxiques (Guilliams et al., 2013b; Lambrecht et Hammad, 2009). Les cDC2s sont quant à elles caractérisées comme des cellules $CD11c^+MHC-II^+F4/80^{int}CX3CR1^{int}CD103^{lo}CD11b^{hi}$, sont localisées dans la lamina propria du tractus respiratoire, et sont responsables de l'initiation d'une réponse des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2) spécifiques d'un antigène, lesquels orchestrent notamment le développement d'une réponse à l'encontre des helminthes, ou d'une inflammation allergique des voies aériennes chez les souris exposées à un allergène et du LPS (Eisenbarth et al., 2002; Guilliams et al., 2013b; Hammad et al., 2009; Lambrecht et Hammad, 2009; Mesnil et al., 2012; Plantinga et al., 2013). Les DCs possèdent une origine distincte des macrophages et des monocytes. L'origine des pDCs est controversée puisqu'elles dériveraient soit d'un précurseur commun aux cellules dendritiques (CDP), en aval du MDP, générant des pré-pDCs (lesquels se différencient en pDCs au sein de la moelle osseuse), soit de pré-pDCs dérivant du précurseur lymphoïde commun (Dress et al., 2019; Sichié et al., 2017). Les cDCs dérivent quant à elles du CDP qui génère des pré-cDCs qui expriment le facteur de transcription Zbtb46, conservé au sein de leur descendance (Satpathy et al., 2012), quittent la moelle, circulent via le sang et colonisent le tissu où ils se différencient en cDCs matures (Sichié et al., 2017). La différenciation *in vitro* de DCs dérivées de la moelle osseuse (*bone marrow-derived DCs*, BMDCs) en présence de GM-CSF (ou CSF2) constitue un outil généré afin de modéliser la fonction des DCs. En effet, le transfert intratrachéal (i.t.) de BMDCs stimulées au préalable par un antigène et du LPS permet la sensibilisation allergique des souris à cet allergène, et le développement d'allergie respiratoire suite à une provocation allergénique (Bedoret et al., 2009; Lambrecht et al., 2000). Nous référons à l'utilisation de ce modèle dans l'étude de la fonction des MIs à la section 3.1.3.

2. Origine et maintenance des macrophages pulmonaires

Le modèle linéaire proposé par van Furth et Cohn en 1968 suggérait que les macrophages provenaient nécessairement de monocytes circulants, eux-mêmes dérivants de précurseurs myéloïdes (van Furth et Cohn, 1968). Notons que ces auteurs fondaient leurs conclusions sur l'analyse de souris irradiées, ce qui ne reflète pas les conditions homéostatiques mais plutôt un contexte d'inflammation extrême induite par des dommages tissulaires. Ce modèle a d'ailleurs par la suite été fortement remis en question, de par l'observation notamment de macrophages proliférant localement (Sawyer et al., 1982;

Parwaresch et Wacker, 1984; Czernielewski et Demarchez, 1987), et de la présence de macrophages dans le sac vitellin avant même la survenue de l'hématopoïèse primaire (Naito et al., 1989, 1996; Palis et al., 1999). Aujourd'hui, il est accepté que de nombreux macrophages résidant dans le tissu, en conditions basales, proviennent de la différenciation de précurseurs embryonnaires qui colonisent les tissus avant la naissance et persistent à l'âge adulte, avec une contribution mineure ou inexistante des monocytes circulants (Guilliams et al., 2013a; Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012; Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013; Gomez Perdiguero et al., 2015; Sheng et al., 2015; Ensan et al., 2016). Ces précurseurs, générés en trois vagues successives, comprennent d'abord des progéniteurs primitifs du sac vitellin, générés dès le 7^{ème} jour de développement embryonnaire (E7.0) ; des progéniteurs érythro-myéloïdes (EMPs) du sac vitellin ensuite à partir de E8.0, lesquels migrent vers le foie fœtal dès la circulation sanguine établie, à partir de E8.5; et enfin des HSCs générées par l'épithélium hémogénique de l'embryon dès E10.5, lesquelles colonisent également le foie fœtal qui devient l'organe hématopoïétique majeur dès E12.5 (Epelman et al., 2014a; Ginhoux et Guilliams, 2016; Guilliams et Scott, 2017). Les exceptions connues à la règle établie ci-dessus concernent les macrophages du derme (Tamoutounour et al., 2013), de la lamina propria de l'intestin (Bain et al., 2014), du cœur (Epelman et al., 2014b) et du pancréas (Calderon et al., 2015), qui nécessitent un constant processus de réapprovisionnement et de différenciation à partir de monocytes circulants pour leur maintenance à l'état basal (voir Figure Introduction 2). En revanche, dans de nombreux organes en conditions inflammatoires, des monocytes circulants peuvent être recrutés dans les tissus lésés et se différencient en macrophages, contribuant à la réponse inflammatoire ou au repeuplement des macrophages résidants altérés (Ginhoux et al., 2016; Guilliams et al., 2014).

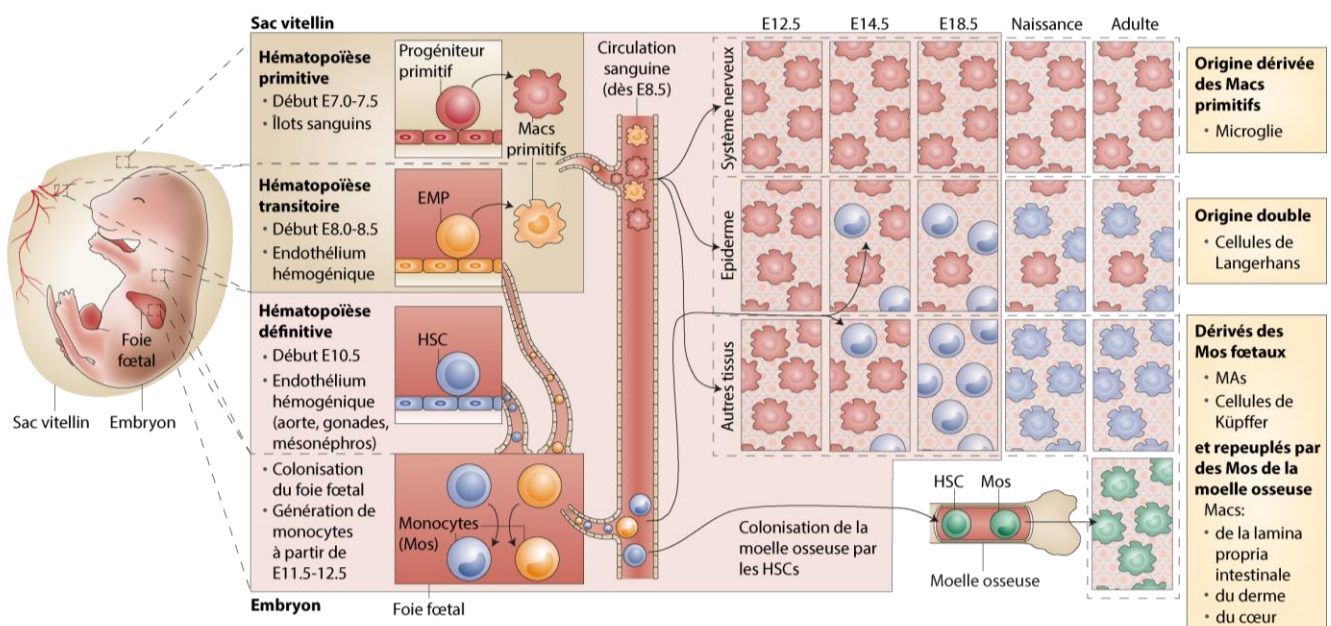


Figure Introduction 2 Origine embryonnaire et myéloïde des macrophages résidents chez la souris, telle qu'exposée dans la section 2. HSC, cellule souche hématopoïétique ; Macs, macrophages ; EMP, progéniteur érythro-myéloïde. *Figure inspirée de (Ginhoux et Guilliams, 2016; Ginhoux et al., 2016) et créée selon le style graphique de Nature Reviews Immunology.*

Dans cette section, nous nous focaliserons sur les indices permettant de définir l'origine des macrophages pulmonaires, et plus particulièrement des macrophages interstitiels. À ces fins, nous introduirons au préalable les techniques qui ont permis l'étude de l'ontogénie des macrophages pulmonaires dans les différentes études auxquelles nous nous référons.

2.1 Outils d'étude de l'origine des macrophages pulmonaires

Nous décrivons trois catégories d'outils utilisés dans l'étude de l'origine des macrophages : l'emploi d'abord de souris transgéniques permettant d'établir une cartographie de la destinée cellulaire ou *fate-mapping*, de parabioses ensuite, et enfin de greffes de moelle chimérique.

Le ciblage d'un type cellulaire repose fréquemment sur l'activité d'une Cre-recombinase (Cre) exprimée sous le contrôle du promoteur d'un gène ici symbolisé « X », spécifique de la lignée à cibler. Dans certains cas, la Cre est fusionnée à un domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur humain de l'œstrogène, et peut être activée au moment désiré par un traitement au tamoxifène (TAM), un ligand du LBD (Metzger et al., 1995). Ce type de Cre inductible est symbolisé Cre^{ER}. Au sein de la progéniture issue du croisement de souris X^{Cre} ou X^{CreER} avec des souris reproductrices Rosa26-LSL-fluo (chez lesquelles le locus Rosa26, exprimé de manière ubiquitaire, contient une cassette STOP flanquée de deux sites loxP (LSL), précédant et empêchant l'expression d'un gène codant pour une protéine fluorescente), après traitement au TAM dans le cas des croisements impliquant la Cre^{ER}, l'expression du gène X conduira à la recombinaison des sites loxP par la Cre, la délétion de la cassette STOP et ainsi l'expression du traceur fluorescent (Epelman et al., 2014a; Lavin et al., 2015) (voir Figure Introduction 3). Par exemple, l'utilisation de souris gestantes $Runx1^{CreER}.Rosa26-LSL-TdTomato$ traitées au TAM permet de suivre au sein de leur progéniture les cellules dérivées du sac vitellin, étant donné que *Runx1* est exprimé uniquement par les cellules hématopoïétiques primitives du sac vitellin, entre E7 et E8 (Samokhvalov et al., 2007; Tan et Krasnow, 2016). Au sein des souris $S100a4^{Cre}.Rosa26-LSL-EYFP$, toutes les cellules dérivées des monocytes du foie fœtal ou des HSCs de la moelle osseuse sont constitutivement fluorescentes (Hashimoto et al., 2013; Hoeffel et al., 2015). Chez l'adulte, l'augmentation du nombre de cellules fluorescentes au sein d'une population au cours du temps suggère donc une contribution de précurseurs dérivés des HSCs pour leur maintien (Chakarov et al., 2019; Hashimoto et al., 2013).

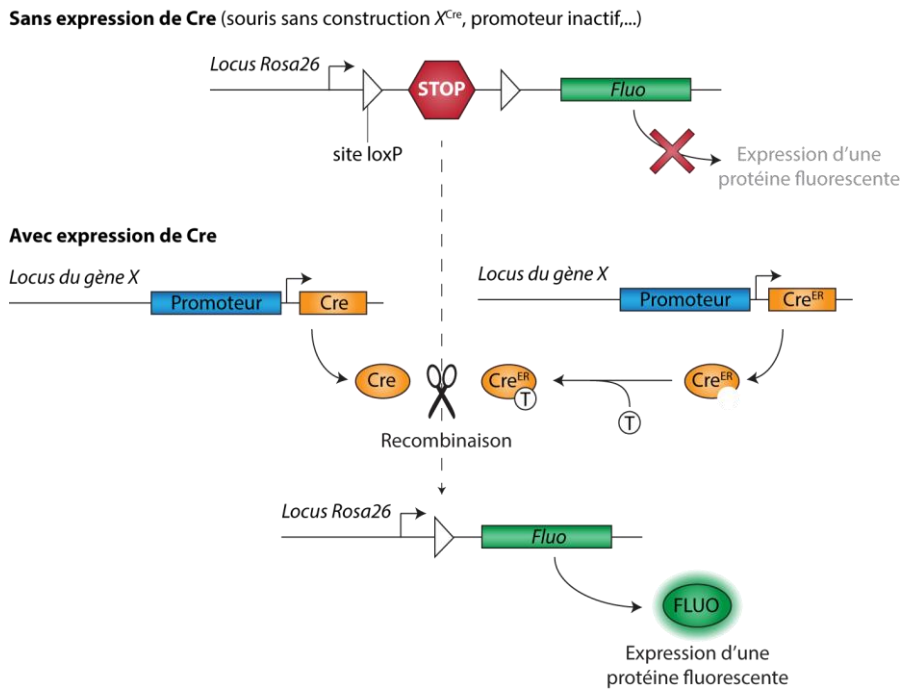


Figure Introduction 3 Mécanisme de recombinaison induite par une Cre-recombinase constitutive (moitié gauche) ou inducible par un traitement au tamoxifène (moitié droite), comme exposé à la section 2.1. Cre, Cre-recombinase ; Cre^{ER} , Cre-recombinase inducible ; *Fluo*, gène codant pour la protéine fluorescente FLUO ; T, tamoxifène.

Un second outil est le recours aux études de parabiose qui consistent en l'association chirurgicale de deux animaux, appelés parabiontes, dans le but de joindre leurs systèmes circulatoires et ainsi permettre le trafic de précurseurs circulants d'un individu à l'autre. Cette technique permet notamment d'étudier le remplacement d'une population cellulaire par des précurseurs circulants, sans recourir à la déplétion préalable de cette population, et donc dans un contexte relativement physiologique (Epelman et al., 2014a; Ginhoux et Jung, 2014). Lors de l'association d'un partenaire sauvage à un partenaire transgénique (déficient pour un gène, exprimant un allotype différent du CD45, un traceur fluorescent, etc.), les précurseurs circulants comprennent des cellules dérivées des deux partenaires génétiquement différents et sont dits « chimériques » (Epelman et al., 2014a).

Enfin, le troisième outil est la greffe de moelle chimérique, autrement dit d'un mélange de cellules de moelle provenant de souris génétiquement différentes (généralement de par l'allèle a ou b du gène *Ptprc* qu'elles portent, codant pour le CD45.1 ou le CD45.2 respectivement), consécutive à une irradiation sublétales ou létale de l'animal, permettant respectivement l'élimination partielle ou totale des macrophages, des autres leucocytes et des HSCs, et l'étude de leur repeuplement (Epelman et al., 2014a; Hashimoto et al., 2013).

2.2 Origine embryonnaire des macrophages pulmonaires

Chez la souris à l'état basal, les MAs proviennent de monocytes dérivant du foie fœtal qui colonisent la lumière des voies aériennes dans les deux premières semaines suivant la naissance (Guilliams et al., 2013a). Des expériences de parabiose et de *fate-mapping* ont en outre permis de montrer que ces macrophages se maintiennent sans contribution majeure de monocytes sanguins chez l'adulte (Guilliams et al., 2013a; Hashimoto et al., 2013), à l'instar de nombreux autres macrophages tissulaires d'origine embryonnaire (Ensan et al., 2016; Ginhoux et al., 2010; Gomez Perdiguero et al., 2015; Hashimoto et al., 2013; Schulz et al., 2012; Sheng et al., 2015; Yona et al., 2013). Néanmoins, cette image est certainement plus complexe au sein d'un organisme soumis, tout au long de sa vie, à divers épisodes inflammatoires, au cours desquels les monocytes peuvent contribuer à long terme à la maintenance, voire au remplacement de ces macrophages (Guilliams and Scott, 2017; Machiels et al., 2017; Scott et al., 2016).

L'origine des MIs est, quant à elle, moins documentée et semble plus compliquée. En 2016, Serena Tan et Mark Krasnow ont étudié le développement des macrophages pulmonaires en se basant sur leur expression de plusieurs marqueurs et le traçage génétique de lignées dérivées de l'embryon (Tan et Krasnow, 2016). L'utilisation de souris transgéniques *Runx1^{CreER}.Rosa-LSL-TdTomato* leur a permis de mettre en évidence une sous-population de pré-macrophages F4/80⁺ dérivés du sac vitellin qui colonisent le poumon de façon homogène à partir de E10.5, et persisteraient en tant que MIs « primitifs » au sein des poumons de la souris adulte, préférentiellement dans les espaces sous-mésothéliaux et périvasculaires, alors que les MIs du parenchyme pulmonaire disparaissent rapidement après la naissance au profit d'un afflux postnatal de MIs dérivés de précurseurs circulants (voir section 2.3 ci-dessous) (Tan et Krasnow, 2016).

2.3 Contribution myéloïde dans la maintenance des macrophages pulmonaires

À l'état basal, la plupart des macrophages d'origine embryonnaire, comme les MAs, les macrophages de la microglie au sein du système nerveux central ou les macrophages hépatiques (aussi appelés cellules de Küpffer), peuvent s'auto-entretenir sans contribution majeure des monocytes circulants chez la souris (Ginhoux et Guilliams, 2016; Gomez Perdiguero et al., 2015; Guilliams et al., 2013a; Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013). L'origine des MIs est quant à elle plus complexe. Une étude de *fate-mapping* sur des souris *S100a4^{Cre}.Rosa-LSL-EYFP* (voir section 2.1), permettant de rendre fluorescentes les cellules dérivées des monocytes du foie fœtal ou des HSCs, a permis de montrer une accumulation de cellules fluorescentes au sein des MIs durant les 20 premières semaines de vie, suggérant une contribution de précurseurs circulants dans le maintien des MIs, contrairement aux MAs (Chakarov et al., 2019). Par ailleurs, des études de parabiose ont confirmé que les MIs se maintiennent

via une contribution, au moins partielle, de monocytes circulants (Chakarov et al., 2019; Sabatel et al., 2017; Tan et Krasnow, 2016). Après avoir associé durant 6 mois des souris sauvages avec des souris *Ccr2*^{-/-}, les poumons du partenaire *Ccr2*^{-/-} ont été analysés et, selon les études, 12 à 35% des MIs (contre moins d'1% des MAs) provenaient du donneur sauvage, démontrant que des précurseurs circulants peuvent participer au maintien des MIs à l'état basal, contrairement aux MAs (Chakarov et al., 2019; Sabatel et al., 2017). Ces résultats sont contradictoires par rapport à ceux initialement observés par Jakubzick et collègues (Jakubzick et al., 2013), mais confortent les résultats préliminaires publiés ensuite par Tan et Krasnow qui observent eux aussi la contribution de précurseurs circulants à la génération de MIs dans le parenchyme alvéolaire (Tan et Krasnow, 2016). Le pourcentage relativement faible de MIs de l'hôte *Ccr2*^{-/-} remplacés par des cellules dérivées de précurseurs circulants du donneur sauvage dans ces études suggère deux hypothèses, qui ne sont pas incompatibles.

Dans une première hypothèse, les MIs des souris hôtes *Ccr2*^{-/-} sont remplacés, au moins partiellement, au départ de précurseurs du donneur mais aussi de l'hôte de manière CCR2-indépendante, à l'instar par exemple des lymphocytes B du sang qui sont dérivés à 40-50% du donneur sauvage, et connus comme circulant de manière CCR2-indépendante (Chakarov et al., 2019; Sabatel et al., 2017). Cet apport de monocytes de l'hôte n'est alors pas détectable, et le pourcentage de cellules dérivés du donneur ne reflète pas la contribution monocyttaire totale au maintien des MIs. En cohérence avec cette hypothèse, les MIs sont présents en nombre similaires chez des souris sauvages ou *Ccr2*^{-/-} de 6 à 10 semaines, et une diminution partielle des MIs a été observée chez des *Ccr2*^{-/-} âgées d'un an, par comparaison aux souris sauvages du même âge (Sabatel et al., 2017). De plus, dans un modèle de greffe de moelle chimérique après irradiation, la niche des MIs est repeuplée d'abord par des précurseurs CCR2-dépendants 56 jours après la greffe, mais est maintenue à long terme par une contribution de précurseurs CCR2-indépendants, au vu de l'enrichissement en MIs dérivant de cellules *Ccr2*^{-/-} observé 84 jours après la greffe (Sabatel et al., 2017).

La seconde hypothèse est qu'une fraction de MIs est maintenue via une contribution de cellules circulantes, alors qu'une seconde fraction présente une durée de vie plus importante et/ou est capable de s'auto-renouveler au sein du tissu. Cette idée est par ailleurs supportée par l'étude de Sophie Gibbings et collègues, identifiant au sein des poumons de la souris à l'état basal trois sous-populations de MIs (voir section 4.1), dont une présente un turnover plus élevé et un repeuplement par des précurseurs circulants plus rapide par comparaison aux deux autres sous-populations (Gibbings et al., 2017).

Ces résultats sont donc cohérents avec l'idée que les MIs dérivent au moins partiellement du sac vitellin et du foie fœtal, et sont maintenus par la contribution de précurseurs circulants, probablement monocytaires, à un rythme plus ou moins élevé selon la sous-population concernée. Néanmoins, l'étude de l'origine des MIs reste complexe et requiert encore davantage d'intérêt.

2.4 Différenciation de précurseurs circulants en macrophages au sein du tissu pulmonaire

L'origine mixte des MIs est en ligne avec le concept actuel supposant que la plupart des macrophages tissulaires de l'humain adulte dérivent de précurseurs hématopoïétiques, qui colonisent les différentes niches altérées au cours des épisodes inflammatoires rencontrés au long de la vie (Guilliams et Scott, 2017). À cet effet, les monocytes circulants sont instruits par des facteurs spécifiques du tissu concerné qui induisent la différenciation des monocytes, en adaptant leur profil transcriptomique qui définira l'identité des macrophages tissulaires néoformés. Par exemple, le traitement à la toxine diphtérique de souris *Clec4f-DTR*, au sein desquelles l'expression du récepteur de la toxine diphtérique (DTR) est conditionnée par l'activité du promoteur du gène *Clec4f* particulièrement exprimé par les cellules de Küpffer, a permis de dépléter spécifiquement ces macrophages et d'observer que des monocytes circulants dérivés de la moelle osseuse sont capables de repeupler cette niche, présentent un phénotype et un profil transcriptomique très similaire aux cellules de Küpffer d'origine, et sont capables de s'auto-renouveler dans le tissu (Scott et al., 2016), une propriété jusqu'alors reconnue comme étant restreinte aux macrophages dérivés de précurseurs embryonnaires (Gentek et al., 2014). Au sein des poumons, des macrophages dérivés du sac vitellin, des monocytes du foie foetal et des monocytes dérivés de la moelle osseuse transférés par instillation intranasale à des souriceaux *Csf2rb^{-/-}*, dépourvus de MAs, peuvent repeupler les espaces alvéolaires, acquérir un profil transcriptomique et des capacités fonctionnelles similaires aux MAs d'origine embryonnaire, et s'auto-maintenir (van de Laar et al., 2016), comme suggéré par un autre groupe (Takata et al., 2017). Ces données expérimentales supportent la théorie actuelle proposant que l'identité des macrophages tissulaires est davantage définie par l'intégration de signaux dérivés du microenvironnement, ou niche, que par leur origine, supposant donc que divers précurseurs sont capables d'exprimer sous ces conditions un programme de différenciation et un profil transcriptomique et épigénétique spécifiques d'une population précise de macrophages tissulaires (Guilliams et Scott, 2017; van de Laar et al., 2016; Lavin et al., 2014; Scott et al., 2016; Takata et al., 2017), bien que l'expression de certains gènes liés à l'origine des précurseurs puisse être conservée (Gibbins et al., 2015), ce qui est particulièrement observé lors de la recolonisation des tissus par des précurseurs hématopoïétiques consécutive à une irradiation létale (Bruttger et al., 2015; Lavin et al., 2014).

La différenciation des macrophages est contrôlée par divers régulateurs de la transcription : d'une part des régulateurs principaux de la lignée de macrophages, et d'autre part des facteurs de transcription induits par des signaux spécifiques du tissu concerné (Okabe et Medzhitov, 2016). Dans la première catégorie hiérarchique sont décrits des facteurs de transcription tels que PU.1, ainsi que C/EBP α , C/EBP β , etc. qui contrôlent l'expression d'ensembles de gènes, ou modules transcriptionnels, communs à tous les macrophages, en se liant à des séquences amplificatrices de la transcription, et facilitant alors l'accès d'autres facteurs de transcription aux promoteurs de gènes spécifiques des

macrophages (Gautier et al., 2012; Glass, 2015; Gosselin et al., 2014; Lavin et al., 2015; Lawrence et Natoli, 2011). PU.1 est un facteur de transcription particulièrement décrit et important pour la différenciation des macrophages, illustré par l'absence absolue de macrophages (mais aussi de lymphocytes B) chez des souris présentant une mutation homozygote du gène codant pour PU.1 (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994). Son expression, et par conséquent du module transcriptionnel qu'il contrôle, est maintenue par l'activation du CSF1R par ses ligands, typiquement le M-CSF et l'IL-34 (Gosselin et al., 2014; Mossadegh-Keller et al., 2013). Le second niveau de hiérarchie comprend les facteurs de transcriptions induits par l'intégration des signaux délivrés par le tissu concerné, comme par exemple GATA6, induit par l'acide rétinoïque dans les macrophages péritonéaux (Gosselin et al., 2014; Okabe et Medzhitov, 2014), ou PPAR γ , induit par le CSF2 dans les macrophages alvéolaires au cours de leur développement périnatal (Schneider et al., 2014). Néanmoins, les facteurs tissulaires et régulateurs de la transcription impliqués dans la différenciation des MIs restent jusqu'à ce jour inconnus, bien qu'ils représentent de potentielles cibles thérapeutiques dans des contextes impliquant les fonctions et/ou dysfonctions de ces macrophages.

3. Spécialisations fonctionnelles des macrophages pulmonaires

Les macrophages sont historiquement connus pour leurs rôles en tant que cellules immunitaires innées. En effet, leur capacité de phagocytose, mise en évidence par les travaux d'Elie Metchnikoff à la fin du 19^{ème} siècle, est importante pour la défense de l'organisme contre l'invasion de pathogènes, mais aussi pour des fonctions « ménagères », comme l'élimination des cellules apoptotiques ou le remodelage de la matrice extra-cellulaire (Epelman et al., 2014a; Gordon, 2016; Okabe et Medzhitov, 2016). Il est aujourd'hui reconnu qu'au-delà de leur capacité de phagocytose, les macrophages sont impliqués dans divers processus biologiques, comme le développement, le maintien de l'homéostasie et la réparation tissulaires (Epelman et al., 2014a; Okabe et Medzhitov, 2016).

Dans cette section, nous décrivons les spécialisations fonctionnelles des macrophages pulmonaires, avec une emphase particulière sur les fonctions connues ou suggérées des macrophages interstitiels.

3.1 Macrophages interstitiels

3.1.1 Capacité de phagocytose: clearance et défense du tissu pulmonaire

À l'instar des MAs, les MIs sont des cellules phagocytaires (A-Gonzalez et al., 2017; Bedoret et al., 2009; Chandler et al., 1986; Fathi et al., 2001; Franke-Ullmann et al., 1996; Gibbings et al., 2017; Johansson et al., 1997), et pourraient dès lors être considérés comme des cellules « ménagères » débarrassant l'interstitium pulmonaire d'agents pathogènes, de cellules endommagées par une agression extérieure ou suite à leur apoptose, contribuant à la défense de l'hôte et à l'homéostasie tissulaire (A-Gonzalez et al., 2017; Gordon, 2016). Noelia A-Gonzales et collègues ont étudié un système de parabiose joignant une souris sauvage CD45.1 à une souris transgénique CD45.2 dont les cellules expriment la protéine fluorescente dsRed, permettant d'étudier à l'état basal la capture de leucocytes circulants fluorescents qui infiltrent le tissu (mais pas l'espace alvéolaire), par les macrophages tissulaires du partenaire sauvage (A-Gonzalez et al., 2017). Les MIs représentent, MAs exclus, la population pulmonaire manifestant la plus grande capacité de phagocytose, laquelle varie selon le rythme circadien avec un pic au début de la phase active de la souris. Néanmoins, la fraction de cellules phagocytaires est moindre au sein des MIs que des macrophages des autres organes analysés (i.e. moelle osseuse, rate, intestin et foie). Par ailleurs, il a également été montré *in vivo* que les MIs sont capables de phagocyter des particules microbiennes (i.e. des bioparticules d'*Escherichia coli* fluorescentes) instillées par voie intranasale (Gibbings et al., 2017), suggérant que ces macrophages peuvent agir comme une seconde ligne de défense à l'encontre des pathogènes véhiculés par voie aérienne.

3.1.2 Capacité de présentation d'antigènes

Les macrophages, à l'instar des DCs et des lymphocytes B, sont généralement considérés comme des CPAs professionnelles (Schuijs et al., 2019). Etant donné leur capacité de phagocytose (A-Gonzalez et al., 2017; Bedoret et al., 2009; Chandler et al., 1986; Fathi et al., 2001; Franke-Ullmann et al., 1996; Gibbings et al., 2017; Johansson et al., 1997) et leur expression du MHC-II (Sabatel et al., 2017; Misharin et al., 2013; Hoppstädter et al., 2010; Gibbings et al., 2017; Bedoret et al., 2009; Fathi et al., 2001; Kawano et al., 2016; Ferrari-Lacraz et al., 2001), il est donc également probable que les MIs possèdent une capacité de présentation d'antigènes.

Une récente étude a utilisé un système de coculture de lymphocytes T CD4⁺ de souris transgéniques OT-II.*Rag1*^{-/-} (chez lesquelles les cellules T CD4⁺ expriment un récepteur de cellule T (TCR) spécifique d'un peptide de l'ovalbumine (OVA) présenté par le MHC-II) marqués au carboxyfluorescein diacétate succinimidyl ester (CFSE) avec des CPAs (i.e. des MAs, des MIs, ou des DCs) de souris sauvages en présence d'OVA, afin d'évaluer la capacité de présentation de cet antigène par les différentes cellules étudiées (Chakarov et al., 2019). En effet, après 3 jours de coculture, la

prolifération des lymphocytes T spécifiques de l'OVA, évaluée par la dilution de leur contenu en CFSE, témoigne de la présentation préalable de l'antigène par les CPAs via le MHC-II à ces lymphocytes T (Chakarov et al., 2019). Ils ont montré que, contrairement aux MAs qui n'expriment pas le MHC-II, les MIs sont capables d'induire l'activation et la prolifération des lymphocytes T, mais néanmoins dans une moindre mesure par comparaison aux DCs (Chakarov et al., 2019). Il est intéressant de souligner que dans ce système de coculture, un sous-type de MI (i.e. Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi}, voir section 4.1) présente une capacité supérieure aux DCs à induire des lymphocytes T régulateurs (Treg) activés (Chakarov et al., 2019), suggérant un potentiel rôle immuno-régulateur des MIs à la frontière entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

3.1.3 Maintien de l'homéostasie pulmonaire dans un contexte allergique

La plupart des études fonctionnelles réalisées sur les MIs se sont focalisées sur leurs potentielles propriétés immuno-régulatrices. Les MIs murins et humains expriment de l'IL-10 à l'état basal, alors que les MAs, cDC2s et monocytes pulmonaires n'expriment pas ou très peu cette cytokine immuno-régulatrice, détectée soit dans le surnageant des macrophages en culture, soit par marquage intracellulaire, ou encore grâce à l'utilisation de souris reportrices (Sabatel et al., 2017; Bedoret et al., 2009; Kawano et al., 2016; Hoppstädter et al., 2010; Toussaint et al., 2013; Nie et al., 2017). Par exemple, chez la souris reportrice IL-10- β -lactamase (ITIB), les cellules expriment une enzyme β -lactamase spécifiquement sous le contrôle du promoteur du gène *Il10* (Bouabe et al., 2011). Les cellules sont incubées avec un substrat fluorescent, le CCF4-AM qui émet une lumière verte après excitation par un laser violet au cours de l'analyse au cytomètre en flux, mais qui, une fois clivé par la β -lactamase, émet une lumière bleue dont l'intensité permet de quantifier la transcription du gène *Il10*. L'expression d'IL-10 par les MIs augmente en réponse à des stimuli environnementaux, comme l'exposition à du LPS (Hoppstädter et al., 2010; Sabatel et al., 2017), des dinucléotides CpG non-méthylés (CpG) (Sabatel et al., 2017), ou des extraits d'acariens (*house dust mite*, HDM) (Kawano et al., 2016; Toussaint et al., 2013). Etant donné que la muqueuse pulmonaire est constamment exposée à une grande variété d'allergènes et de molécules immunostimulantes, notre laboratoire a postulé que les MIs pourraient contribuer au maintien de l'homéostasie pulmonaire en altérant la fonction des cDCs qui sont responsables de la sensibilisation allergique et du développement d'inflammation allergique des voies aériennes (Bedoret et al., 2009; Sabatel et al., 2017; Toussaint et al., 2013).

En utilisant un système de coculture de MIs avec des BMDCs prétraitées à l'OVA et au LPS, il a été montré que les MIs perturbent la capacité de maturation et de migration des BMDCs vers le ganglion drainant et l'induction subséquente des caractéristiques de l'allergie respiratoire, une fois les BMDCs instillées dans la trachée de souris receveuses (Bedoret et al., 2009; Toussaint et al., 2013). L'utilisation de MIs provenant de souris donneuses transgéniques a en outre permis de montrer que

l'inhibition des BMDCs est dépendante du récepteur Toll-like (*Toll-like receptor*, TLR)-4 (i.e. le principal récepteur du LPS), du facteur de transcription HIF1 α et de l'IL-10 (Bedoret et al., 2009; Toussaint et al., 2013). *In vivo*, l'injection intra-péritonéale d'anticorps déplétants dirigés contre le marqueur F4/80 induit une déplétion des MIs, mais pas des MAs, et augmente l'activation des DCs et le développement d'allergie respiratoire lorsque les souris sont exposées à de faibles doses d'allergène et de LPS, auxquelles les souris ne répondent normalement pas (Bedoret et al., 2009), supportant l'importance des MIs dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire. Il est à noter que dans ces premières études, les MIs isolés et cocultivés englobaient également d'autres types cellulaires F4/80⁺CD11c⁻ comme des monocytes pulmonaires et des éosinophiles (Mesnil et al., 2016; Sabatel et al., 2017). Néanmoins, les MIs comme identifiés actuellement sont les seuls à exprimer de l'IL-10, et leur capacité à inhiber les fonctions des DCs a par ailleurs été confirmée ultérieurement (Mesnil et al., 2016; Sabatel et al., 2017).

Au-delà du contrôle de l'asthme allergique chez la souris, les MIs peuvent être impliqués dans le contrôle d'autres phénotypes de l'asthme. En effet, Hideo Kawano et collègues ont suggéré que les MIs contribuent à la prévention de l'inflammation neutrophilique des voies respiratoires dépendante de la réponse de lymphocytes T auxiliaires de type 17 (Th17), par des mécanismes médiés par l'IL-10 (Kawano et al., 2016). Ces auteurs ont utilisé un modèle d'asthme neutrophilique basé sur des instillations de HDM chez des souris *Il10*^{-/-}, augmentant significativement le nombre de neutrophiles dans le LLBA, l'inflammation pulmonaire neutrophilique et l'expression de cytokines associées aux réponses Th17, par rapport aux souris sauvages exposées au HDM (Kawano et al., 2016). Dans ce modèle, le transfert de MIs WT par instillation intranasale aux souris *Il10*^{-/-} avant la sensibilisation au HDM mène à une diminution de l'inflammation neutrophilique, de la production de mucus et de la production de l'IL-13 et de cytokines Th17 (Kawano et al., 2016).

La sensibilité des MIs à une exposition au LPS et aux CpG, deux dérivés microbiens omniprésents dans l'environnement (Braun-Fahrlander et al., 2002; Roy et al., 2003), rappelle l'« hypothèse de l'hygiène » qui postule qu'une exposition réduite aux microbes environnementaux ou à leurs dérivés, en conséquence de l'augmentation du niveau d'hygiène dans le mode de vie actuel, augmente la susceptibilité à développer de l'asthme allergique (von Mutius, 2016; Strachan, 1989). Cette théorie pourrait expliquer l'importante augmentation de la prévalence de cette maladie au cours des dernières décennies (Eder et al., 2006). En concordance avec cette théorie, l'exposition de souris ou d'humains à des CpG microbiens semble réduire le risque de sensibilisation allergique (Beeh et al., 2013; Broide et al., 1998; Creticos et al., 2006; Kline et al., 2002; Krieg, 2012; Sur et al., 1999), suggérant un effet protecteur des CpG à l'encontre du développement d'allergie respiratoire. Dans des modèles murins, une instillation intranasale de CpG induit l'amplification du nombre de MIs via leur différenciation au départ de monocytes pulmonaires ou du réservoir splénique, par un mécanisme

indépendant du CCR2 (Sabatel et al., 2017). Ces MIs CpG-induits présentent un phénotype différent des MIs à l'état basal, produisent de plus grandes quantités d'IL-10, et leur transfert avant la sensibilisation ou la provocation allergénique récapitule l'effet protecteur des CpG à l'encontre du développement d'allergie respiratoire (Sabatel et al., 2017). Cet effet protecteur n'est en outre pas observé après un transfert de MIs de souris *Il10^{-/-}* traitées aux CpG, démontrant l'importance de cette cytokine dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire (Sabatel et al., 2017).

3.2 Macrophages alvéolaires

En conditions homéostatiques, une des fonctions majeures des MAs consiste en la clairance des protéines et des lipides du surfactant, afin de prévenir leur accumulation et le développement d'une protéinose alvéolaire (Dranoff et al., 1994; Trapnell et Whitsett, 2002). L'axe impliquant le GM-CSF, ses récepteurs (i.e. CSF2Ra et CSF2Rb) et le récepteur nucléaire PPAR γ , est largement impliqué dans ce processus (Schneider et al., 2014; Suzuki et al., 2014).

De par leur localisation particulière, les MAs sont constamment exposés à des particules et agents microbiens inoffensifs face auxquels ils ne répondent pas. En effet, afin de limiter les réponses inflammatoires non-désirées et de ne pas compromettre les échanges gazeux, les MAs sont maintenus dans un état quiescent via l'intégration de signaux apportés par le contact avec le CD200 et le complexe $\alpha\beta6$ -TGF β des cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques, mais aussi par des médiateurs solubles comme l'IL-10 et les protéines de surfactant (SP)-A et SP-D (Garbi et Lambrecht, 2017; Hussell et Bell, 2014). Ces macrophages possèdent en outre une faible capacité de présentation d'antigènes et de costimulation, induisant davantage une anergie des lymphocytes T que leur activation *in vitro* (Blumenthal et al., 2001; Hussell et Bell, 2014). Les MAs contribuent également, via leur production de TGF β et d'acide rétinoïque, à la génération de lymphocytes Treg (CD4⁺Foxp3⁺) *in vitro* (Coleman et al., 2013; Soroosh et al., 2013) et *in vivo* (Soroosh et al., 2013), et le transfert de MAs stimulés à l'OVA *ex vivo* avant la sensibilisation à cet allergène permet de réduire l'inflammation pulmonaire à la suite d'une provocation allergénique, par comparaison à un transfert de MAs non stimulés à l'OVA (Soroosh et al., 2013), suggérant qu'ils peuvent contribuer au développement d'une tolérance envers des allergènes dans un contexte non-inflammatoire. En revanche, après la sensibilisation, dans un contexte inflammatoire établi, les MAs participent à la réponse inflammatoire médiée par les DCs (Lauzon-Joset et al., 2014), et la déplétion des MAs n'influence en outre pas le nombre de lymphocytes Tregs (Zasłona et al., 2014). Cette dualité illustre que le contexte dans lequel les MAs se trouvent balance et définit leur potentiel fonctionnel.

Les MAs sont situés en première ligne lors de l'invasion d'agents pathogènes par voie aérienne, et constituent dès lors aussi une ligne de défense importante à l'encontre des agressions extérieures

(Garbi et Lambrecht, 2017). En effet, les dérivés microbiens sont reconnus par les nombreux TLRs des MAs qui, en s'activant, contrebalancent les signaux inhibant les MAs, et induisent alors une augmentation de leur activité phagocytaire ainsi que de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, afin d'augmenter la clearance de l'agent pathogène (Hussell et Bell, 2014). La capture des pathogènes permet non seulement de réduire leur charge pulmonaire, mais limite aussi leur acquisition par les DCs, et donc leur dissémination et le développement d'une réponse inflammatoire adaptative à leur rencontre (Guilliams et al., 2013b). En effet, la déplétion des MAs avant une infection par le virus influenza A ou le virus respiratoire syncytial augmente la charge virale pulmonaire, la mortalité, et réduit la production d'interférons de type 1 qui exercent un rôle antiviral et dont les MAs sont les principaux producteurs au cours d'une infection virale (Guilliams et al., 2013b; Reed et al., 2008; Tumpey et al., 2005). En cas d'infection bactérienne, l'absence des MAs mène également à une aggravation de l'inflammation pulmonaire, bien que dans le cas particulier d'une infection à *Mycobacterium tuberculosis*, les MAs sont incapables de tuer ces bactéries intracellulaires et participent dès lors à leur survie et au développement de la maladie qui engage le pronostic vital des animaux infectés (Guilliams et al., 2013b; Leemans et al., 2001).

4. Hétérogénéité des macrophages interstitiels

Les MIs étaient étudiés jusqu'à peu comme une population homogène, et référaient à l'ensemble des macrophages pulmonaires non-alvéolaires, lesquels sont de plus en plus envisagés comme constituant une population hétérogène. La plupart des études réalisées jusqu'alors reflétaient davantage une signature globale des MIs et sous-estimaient l'existence de potentielles sous-populations qui pourraient présenter leur propre identité en terme de phénotype, de localisation, d'origine et de fonction. Dans cette section, nous synthétiserons les connaissances actuelles sur l'hétérogénéité des MIs à l'état basal, et leur plasticité en conditions stimulées. Nous terminerons enfin par une introduction à la technique de séquençage d'ARN de cellules individuelles, qui constitue actuellement la méthode de choix dans l'évaluation non biaisée de l'hétérogénéité d'un ensemble cellulaire.

4.1 Hétérogénéité des macrophages interstitiels à l'état basal

L'existence de sous-populations de MIs a initialement été proposée chez le rat par David Chandler et collègues en 1986 (Chandler et al., 1986) et lors d'études ultérieures (Chandler et Brannen, 1990; Chandler et al., 1988), fondant leurs observations sur le fractionnement d'un gradient de densité. Les fractions de densité plus faible présentent des capacités fonctionnelles plus évidentes (i.e. opsonisation et phagocytose médiées par le FcR, production de prostaglandines et de thromboxanes, capacité de migration suite à un stimulus chimiotactique) par comparaison aux fractions de plus haute

densité (Chandler et Brannen, 1990; Chandler et al., 1986, 1988). Toutefois, il est difficile de savoir si les différences observées doivent être attribuées à une réelle hétérogénéité des MIs, ou à la contamination de la fraction de plus haute densité par des granulocytes, comme rapporté dans leur première publication (Chandler et al., 1986).

Néanmoins, plusieurs études récentes ont fourni des données indiquant que les MIs représentent une population hétérogène au sein du poumon à l'état basal. En effet, Sophie Gibbings et collègues ont décrit l'existence de trois sous-populations de MIs, sur base de leur expression relative du CD11c et du MHC-II, distinguant les MIs CD11c^{lo}MHC-II^{lo} (IM1), CD11c^{lo}MHC-II^{hi} (IM2) et CD11c⁺MHC-II^{hi} (IM3) (Gibbings et al., 2017). Phénotypiquement, les IM1 et IM2 expriment des niveaux plus élevés de CD206, Lyve-1 et CD169 que les IM3, qui eux montrent une expression plus élevée du CD11c et de CCR2 (Gibbings et al., 2017). Fonctionnellement, les IM1 et IM2 montrent une plus grande capacité que les IM3 à phagocyter des bioparticules d'*Escherichia coli* ou du zymosane A (Gibbings et al., 2017). En outre, des expériences de parabiose et de transfert de moelle osseuse chimérique ont permis de montrer que les IM3 présentent un turnover plus rapide par rapport aux IM1 et IM2 (Gibbings et al., 2017). Il est à noter qu'à ce stade, les IM1 et IM2 sont très similaires et pourraient représenter deux états d'activation d'un même type cellulaire. De plus, la distinction des sous-populations repose sur l'analyse subjective d'un nombre restreint de marqueurs.

En 2019, Svetoslav Chakarov et collègues ont utilisé le séquençage d'ARN de cellules individuelles afin d'analyser de manière non biaisée un nombre limité de MIs, et ont identifié deux sous-populations de MIs dans le poumon, différents notamment de par l'expression de molécules du MHC-II (Chakarov et al., 2019). Les MIs MHC-II^{hi} et MHC-II^{lo} ont par la suite été triés et soumis à un séquençage d'ARN en « bulk », révélant 1837 gènes différentiellement exprimés entre ces deux sous-populations, nommées Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} et Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} (Chakarov et al., 2019). Cette dichotomie est par ailleurs observée au sein des macrophages de nombreux autres organes, incluant le cœur, la peau et la graisse viscérale (Chakarov et al., 2019). Ces auteurs suggèrent que les MIs Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} expriment de plus hauts niveaux de CX3CR1, CD44, CLEC7A et CD72 au niveau protéique, seraient davantage localisés près des fibres nerveuses, possèdent une plus grande capacité de présentation d'antigène et d'induction de lymphocytes Treg dans un modèle de coculture (Chakarov et al., 2019) (voir section 3.1.1). Les MIs Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} expriment quant à eux davantage de CD36, CD38, CD88, CD169, CD206 et MAFB au niveau protéique, présentent une taille plus importante, sont localisés à proximité des vaisseaux sanguins et expriment de plus hauts niveaux d'IL-10, évalués grâce à l'analyse de souris reportrices ITIB (Chakarov et al., 2019). Grâce à un modèle de déplétion spécifique de la sous-population Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo}, les auteurs suggèrent que cette sous-population participe au maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins et réduit l'inflammation et le développement de fibrose pulmonaire consécutive à une instillation intranasale de bléomycine (Chakarov et al., 2019).

Ces résultats mettent en évidence la diversité potentielle des MIs murins à l'état basal. Il est très probable que la situation se complexifie lorsque les poumons sont exposés à des signaux de stress, comme dans le cadre de dommages tissulaires, d'inflammation ou d'infection.

4.2 Plasticité des macrophages interstitiels

En conditions stimulées, les MIs sont capables d'adapter leur phénotype et leur fonction afin de répondre aux besoins du tissu pulmonaire, et d'autre part, des monocytes inflammatoires peuvent également être recrutés dans le poumon et acquérir des caractéristiques de MIs. À ce titre, Hideo Kawano et collègues ont montré chez la souris que le nombre de MIs produisant de l'IL-10 augmente suite à une provocation allergénique au HDM (Kawano et al., 2016). De plus, notre laboratoire a décrit qu'une instillation intranasale de LPS, de CpG ou d'autres ligands de TLRs induit une augmentation du nombre de MIs, ainsi qu'une modification substantielle de leur phénotype, alors qu'aucune modification du nombre de MIs n'a été observée lors d'une exposition au virus Influenza A ou à *Streptococcus pneumoniae* (Sabatel et al., 2017). L'impact fonctionnel de ces modifications a précédemment été discuté dans la section 3.1.2. Jessica Hoppstädter et collègues ont montré que les MIs isolés de biopsies humaines et cultivés *in vitro* sécrètent davantage d'IL-6, d'IL-10 et d'antagoniste au récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra) que les MAs, en conditions basales ou après une stimulation au LPS (Hoppstädter et al., 2010). Au niveau transcriptomique, l'expression d'*Il10* est en outre plus importante après une stimulation au LPS ou à l'ADN de certaines bactéries par comparaison à l'état basal, cohérent avec les observations réalisées chez la souris, alors que les MAs sécrètent davantage de cytokines pro-inflammatoires (i.e. IL-1 β , IFN- γ , IL12p40 et IL12p70) après une stimulation au LPS (Hoppstädter et al., 2010).

Si l'amplification de MIs fortement immunorégulateurs est favorisée par une exposition à des composants microbiens, le microbiome des voies aériennes pourrait potentiellement influencer le développement et la fonction des MIs. Si aucune différence n'a pu être observée en comparant l'expression d'IL-10 par les MIs de souris exemptes de germes (dites « *germ-free* ») ou hébergées en animalerie exempte de pathogènes spécifiques (SPF) (Kawano et al., 2016), il n'est néanmoins pas exclu que la quantité ou la qualité des composants du microbiome local puisse moduler le potentiel immunorégulateur des MIs, comme il l'a par exemple été proposé pour les macrophages régulateurs de la lamina propria intestinale (Kim et al., 2018).

Les MIs sont certes sensibles aux dérivés microbiens, mais également aux dommages tissulaires et à l'hypoxie (Florentin et al., 2018; Misharin et al., 2013; Pugliese et al., 2017). En effet, trois jours après le début d'un modèle de lésion pulmonaire aiguë basé sur une instillation intratrachéale de bléomycine, les MIs sont plus nombreux, et expriment de plus hauts niveaux de marqueurs de

macrophages classiquement activés (i.e. CD40, CD80, CD86) par rapport aux MIs à l'état basal (Aran et al., 2019; Misharin et al., 2013). Dans ce modèle, la déplétion du compartiment CX3CR1⁺ réduit non seulement le nombre de macrophages induits, mais également l'accumulation de fibroblastes et de collagène dans les poumons, suggérant un rôle pro-fibrotique des MIs recrutés (Aran et al., 2019). Toutefois, aux stades avancés de remodelage tissulaires chez la souris, le nombre de MIs et leur phénotype redeviennent comparables à ceux observés initialement (Misharin et al., 2013). Dans un contexte d'hypoxie, utilisé dans l'étude de l'hypertension pulmonaire, une expansion des MIs dans les espaces péri-bronchiques/péri-vasculaires est observée chez la souris (Florentin et al., 2018; Pugliese et al., 2017) et chez l'humain (Florentin et al., 2018). Ces MIs induits proviennent du recrutement et de la différenciation de monocytes circulants, expriment de faibles niveaux de MHC-II (Florentin et al., 2018), subissent, comme les MAs, une reprogrammation transcriptomique spécifique de l'hypoxie, puis acquièrent progressivement un profil transcriptomique anti-inflammatoire (Pugliese et al., 2017), cohérent avec l'observation que le facteur induit par l'hypoxie (HIF)1 α favorise l'activité immunorégulatrice des MIs dans un contexte allergique (Toussaint et al., 2013). Enfin, les MIs isolés à partir des marges saines de biopsies humaines prélevées lors d'une résection de carcinome pulmonaire produisent de plus hauts niveaux de métalloprotéase matricielle (MMP)-1, MMP-9 et d'un inhibiteur de MMPs (i.e. TIMP-1) lorsqu'ils sont mis en contact avec des membranes de lymphocytes T stimulés, suggérant une possible contribution des MIs humains dans la régulation du remodelage tissulaire suite à une inflammation (Ferrari-Lacraz et al., 2001).

4.3 Le séquençage d'ARN de cellules individuelles comme outil d'étude de l'hétérogénéité des macrophages

L'évaluation de l'hétérogénéité des MIs était jusqu'il y a peu menée en utilisant un nombre limité de marqueurs de surface, sélectionnés de manière subjective (Gibbins et al., 2017). Le développement de méthodes permettant d'analyser sans biais une population à l'échelle unicellulaire a offert au monde de l'immunologie une alternative à la méthode classique de dissection des compartiments cellulaires, et l'opportunité de réexaminer la composition de nombreuses populations cellulaires. À ce titre, le séquençage d'ARN de cellules individuelles, ou *single-cell RNA-sequencing* (scRNA-seq), est aujourd'hui une méthode bien établie qui fournit, pour chaque cellule analysée, un instantané de la présence et de la quantité d'ARN messager (ARNm) à un moment donné (Giladi et Amit, 2017; Lavin et al., 2015; Neu et al., 2017).

Une des méthodes permettant d'analyser simultanément un grand nombre de cellules préalablement triées est celle de scRNA-seq en gouttelettes, ou *droplet-based*. Cette technique repose sur l'élaboration de *gel beads in emulsion* (GEMs), à savoir des gouttes en émulsion dans l'huile contenant chacune une seule bille fonctionnalisée ou *gel bead*, une seule cellule, et divers réactifs.

Chaque *gel bead* comporte à sa surface une multitude d'oligonucléotides, chacun comportant plusieurs séquences : une séquence appelée « code-barres », propre à chaque bille ; une séquence d'identification moléculaire unique (*unique molecular identifier*, UMI) différente entre chaque oligonucléotide d'une même bille, permettant de distinguer les différents transcrits d'un même gène ; et une séquence constituée de désoxythymidines, appelée « amorce poly(dT) ». Une fois au sein de la GEM, la cellule est lysée, les transcrits polyadénylés qu'elle contenait se lient aux amorces poly(dT) de la *gel bead*, la transcription inverse s'initie et chaque molécule d'ADN complémentaire (ADNc) générée contient alors ses identifiants (son code-barres et son UMI). Ensuite, l'émulsion est rompue et les étapes suivantes (i.e. l'amplification, la génération de la librairie et le séquençage) sont donc réalisées sur le mélange de tous les ADNc obtenus. Les données obtenues sont traitées afin de générer une matrice gène/code-barres indiquant, pour chaque cellule/code-barres, le nombre de transcrits/UMIs pour chaque gène détecté (Zheng et al., 2017). Ces données sont alors utilisées afin d'observer des regroupements, ou clusters, de cellules partageant un transcriptome similaire, et possédant potentiellement une identité singulière, en termes de phénotype, d'origine, de localisation et de fonctions (Giladi et Amit, 2017; Neu et al., 2017) (voir Figure Introduction 4). En dressant une liste de gènes différentiellement exprimés entre ces différents clusters, il est alors possible de déterminer les gènes caractéristiques de chaque sous-population identifiée, mais aussi de comparer ces listes à une base de données, par exemple celle du consortium Gene Ontology, reprenant pour divers processus biologiques une liste de gènes déterminée, et d'ainsi identifier statistiquement un enrichissement de gènes impliqués dans un ou plusieurs processus biologique(s) particulier(s).

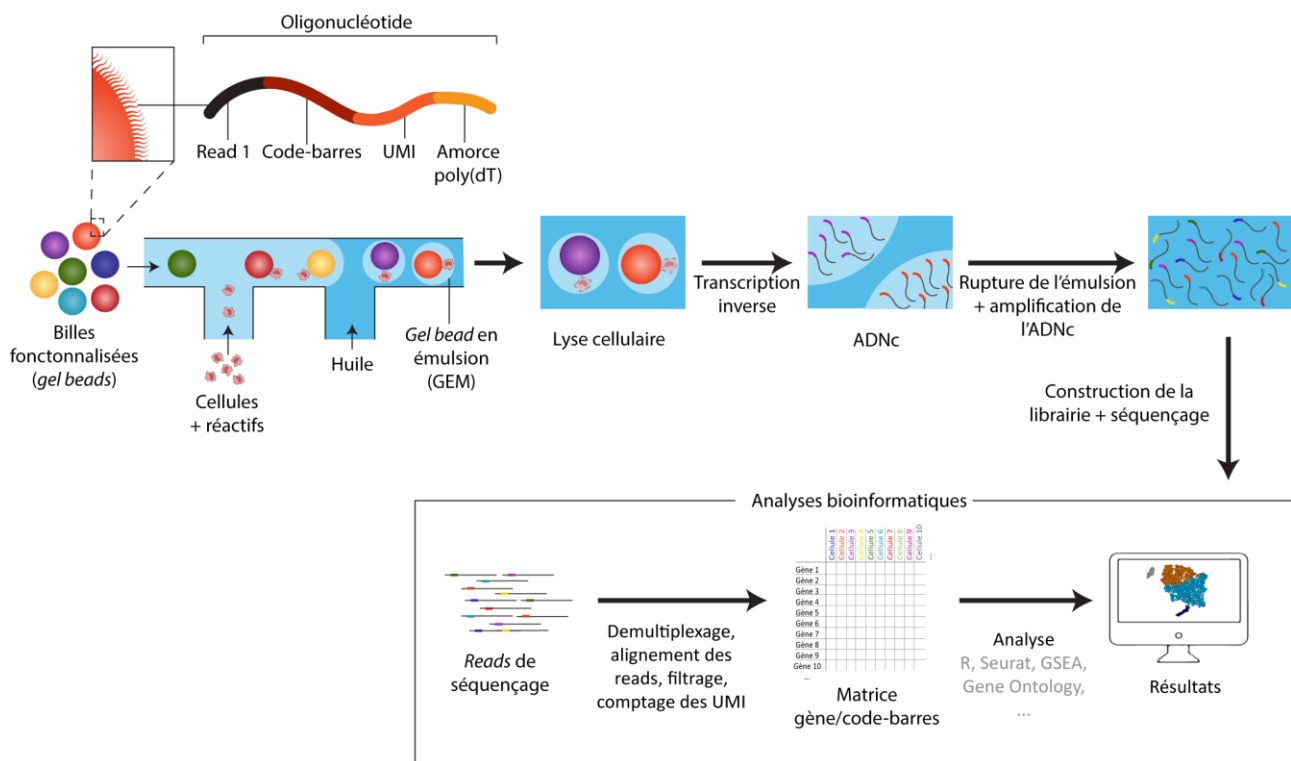


Figure Introduction 4 Schématisation du procédé expérimental du scRNA-seq, comme exposé dans la section 4.3 ADNc, ADN complémentaire ; UMI, *unique molecular identifier*, identifiant moléculaire unique.

Les données de séquençage offrent donc l'opportunité de définir une image statique des cellules isolées à un instant donné. Néanmoins, elles renferment d'autres informations plus dynamiques, à savoir le rapport entre les transcrits épissés et non-épissés pour chaque gène détecté, permettant aussi de prédire l'état futur des cellules analysées. En effet, lorsque ces cellules sont en cours de développement ou de différenciation, une augmentation du rythme de la transcription résulte en une accumulation rapide d'ARNm non-épissés, suivie d'une augmentation des quantités d'ARNm épissés, jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre soit atteint (La Manno et al., 2018). La balance entre les niveaux d'ARN épissés et non-épissés permet de calculer la vitesse d'ARN, ou *RNA velocity*, qui représente la dérivée par rapport au temps de l'abondance d'ARNm non-épissé, et constitue un indicateur prédictif de l'abondance d'ARNm mature, et donc de l'état futur de la cellule analysée (La Manno et al., 2018). Ces données permettent donc de réaliser une inférence de trajectoire, c'est-à-dire de conférer un ordre temporel à ces cellules, de modéliser une trajectoire de développement et de prédire le devenir d'une cellule dans les heures qui suivent leur analyse (La Manno et al., 2018; Neu et al., 2017; Street et al., 2018).

Le scRNA-seq en gouttelettes est la méthode que nous avons choisi d'utiliser dans ce travail afin de disséquer de manière non-supervisée l'hétérogénéité des macrophages pulmonaires, et particulièrement des MIs.

Objectifs

Au sein du compartiment phagocytaire mononucléé du poumon, les macrophages interstitiels représentent une population relativement peu étudiée, et le plus souvent investiguée comme une population homogène. Toutefois, de plus en plus d'évidences montrent que cette population est hétérogène et comprend, selon les auteurs, deux ou trois sous-populations de MIs (Chakarov et al., 2019; Gibbings et al., 2017). Une compréhension fine et non biaisée de ces cellules, impliquées notamment dans l'homéostasie pulmonaire et la prévention de désordres allergiques tels que l'asthme, constitue une étape essentielle non seulement dans l'étude à haute résolution de l'impact de ces macrophages dans diverses situations physiologiques et pathologiques, mais aussi à long terme dans le développement de thérapies ciblant uniquement une sous-population particulière de ces macrophages dans des situations où leurs fonctions sont altérées ou potentialisées.

L'objectif premier de ce travail est d'évaluer, de manière non biaisée, l'hétérogénéité des MIs par scRNA-seq afin de rendre compte d'éventuels clusters de macrophages aux profils transcriptomiques distincts. Par ailleurs, l'analyse d'un grand nombre de MIs, qui représentent une population relativement peu abondante, permet potentiellement l'identification de sous-populations particulièrement rares. Ensuite, nous analyserons ces données transcriptomiques afin de définir la signature particulière à chaque sous-population, et par la suite choisir des marqueurs de surface spécifiques permettant de valider (ou non) l'existence de ces sous-populations phénotypiquement distinctes *in vivo*. La capacité à détecter ces sous-populations par immunofluorescence nous permettra ensuite, en combinaison aux données de scRNA-seq, d'attribuer des caractéristiques spécifiques à chaque sous-population, en termes de phénotype, de localisation, d'origine et de fonction à l'état basal. Enfin, nous évaluerons à travers une analyse cinétique l'impact d'une exposition locale à des dérivés microbiens sur le nombre et le phénotype de ces sous-populations de MIs.

Les résultats générés dans cette étude font l'objet d'une publication en tant qu'article de recherche original dans Nature Communications.

Section expérimentale

———— Section expérimentale

Etude 1 :

Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung

———— Nature Communications, 10, 3964 (2019)

Joey Schyns, Qiang Bai, Cecilia Ruscitti, Coraline Radermecker, Sebastiaan De Schepper, Svetoslav Chakarov, Frédéric Farnir, Dimitri Pirottin, Florent Ginhoux, Guy Boeckxstaens, Fabrice Bureau, Thomas Marichal

Abstract

Resident tissue macrophages (RTM) can fulfill various tasks during development, homeostasis, inflammation and repair. In the lung, non-alveolar RTM, called interstitial macrophages (IM), importantly contribute to tissue homeostasis but remain little characterized. Using single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq), we identify two phenotypically distinct subpopulations of long-lived monocyte-derived IM, i.e. CD206⁺ and CD206⁻ IM, as well as a discrete population of extravasating CD64⁺CD16.2⁺ monocytes. CD206⁺ IM are large, self-maintaining peribronchial RTM that constitutively produce high levels of immuno-regulatory cytokines and chemokines. Conversely, CD206⁻ IM preferentially populate the alveolar interstitium and exhibit features of antigen-presenting cells. In addition, we provide evidence that CD64⁺CD16.2⁺ monocytes arise from intravascular Ly-6C^{lo} patrolling monocytes that enter the tissue at steady-state to become local precursors of CD206⁻ IM. This study expands our knowledge about the complexity of lung IM and reveals an ontogenic pathway for one IM subset, an important step for elaborating future macrophage-targeted therapies

Introduction

Resident tissue macrophages (RTM) are present in most mammalian tissues. Historically known for their roles in host defense and clearance of dead cells, RTM are now recognized as an integral part of the tissues in which they reside, where they can contribute to a wide range of physiological and pathological processes (Epelman et al., 2014a; Ginhoux and Guilliams, 2016; Okabe and Medzhitov, 2016).

RTM populations are very heterogeneous, phenotypically and functionally (Epelman et al., 2014a; Ginhoux and Guilliams, 2016; Okabe and Medzhitov, 2016) and the tissue of residence is thought to be a major driver of such diversity (Guilliams and Scott, 2017; Lavin et al., 2014). According to the niche model, RTM are imprinted by niche-derived tissue-instructive signals that trigger expression of specific differentiation programs, thus tailoring a particular identity, i.e., a phenotypic and functional specialization that fulfills the functional needs of a given tissue (Guilliams and Scott, 2017). Supporting this, recent mouse studies have shown that distinct precursors had the potential to give rise to the same particular RTM population when the niche is empty (Guilliams and Scott, 2017; van de Laar et al., 2016; Scott et al., 2016; Takata et al., 2017).

In mice, the well-known alveolar macrophages (AM) differentiate from fetal monocytes, are maintained by self-renewal and are specialized in removal and recycling of surfactant molecules (Guilliams et al., 2013c; Hussell and Bell, 2014; Schneider et al., 2014). Besides AM, non-alveolar tissue macrophages, i.e., the interstitial macrophages (IM), have been shown to contribute to lung immune homeostasis by spontaneously producing the immunosuppressive cytokine IL-10 and preventing the development of aberrant type 2 immune responses against inhaled allergens (Bedoret et al., 2009; Kawano et al., 2016; Liegeois et al., 2018; Schyns et al., 2018). In addition, they may substantially contribute to the reduced risk of asthma in a microbe-rich environment (i.e., the so-called 'hygiene hypothesis' (von Mutius, 2016; Strachan, 1989)). Indeed, we have reported that exposure to bacterial unmethylated CpG-DNA (CpG) expands tolerogenic IM from monocyte precursors, thereby conferring robust protection against allergic asthma (Sabatel et al., 2017). IL-10-producing IM have also been described in humans (Hoppstädter et al., 2010), and clinical evidence suggests that they may be functionally impaired in asthmatic patients (Draijer et al., 2017).

Despite their functional relevance, IM were long merely investigated as a bulk population (Bedoret et al., 2009; Liegeois et al., 2018; Sabatel et al., 2017; Schyns et al., 2018). In 2017, Gibbings *et al.* have proposed the existence of three phenotypically distinct IM populations in the steady-state lung based on the differential expression of MHC-II and CD11c (Gibbings et al., 2017). More recently,

Chakarov and colleagues identified two conserved monocyte-derived IM subpopulations across tissues, in mice and humans (Chakarov et al., 2019). In the mouse lung, they characterized nerve-associated Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} and blood vessel-associated Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} monocyte-derived IM subsets, supporting that the lung IM pool is heterogeneous and encompasses distinct populations carrying their own identity.

Here, we analyze >3,000 lung tissue mononuclear cells expressing the high affinity immunoglobulin gamma Fc receptor (Fcgr1, CD64) by droplet-based single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) in adult mice. Our study independently confirms the existence of two main subpopulations of lung IM (Chakarov et al., 2019) and further expands our knowledge about their origin, half-life, localization, functional properties and dynamics upon local exposure to microbial products. Moreover, we uncover a discrete population of extravascular NR4A1-dependent monocytes transitioning from intravascular Ly-6C^{lo} patrolling monocytes towards a specific subset of IM. These results contribute to a better appreciation of the diversity of the lung mononuclear phagocyte system (MPS), an important step toward greater precision and effectiveness of macrophage-targeted therapies.

Results

Two subsets of IM and monocytes populate the mouse lung

To map mouse lung tissue macrophages (i.e., lung IM) in naive C57BL/6 female wild-type (WT) mice, we performed scRNA-seq using the 10x Genomics platform (Zheng et al., 2017). Lung IM were defined as singlet mononuclear cell-enriched CD45⁺ non-autofluorescent SSC^{lo}F4/80⁺CD11c⁻Ly-6C^{lo}CD64⁺ cells (Sabatel et al., 2017) (Fig. 1a, and Supplementary Table 1). Exclusion of lung-resident F4/80⁺Siglec-F⁺ eosinophils (Mesnil et al., 2016) based on side scatter (SSC) was efficient and resulted in minimal loss of IM (Supplementary Fig. 1). In a first experiment, 10-week-old mice were used and a total of 1,715 IM, together with 199 AM, were analyzed (Fig. 1b, and Supplementary Fig. 2). In addition, a second scRNA-seq experiment was performed through an independent platform using older mice (i.e., 6-month-old) coming from a different animal facility, and 1,682 IM were analyzed (Fig. 1b, and Supplementary Fig. 2).

Non-linear dimensional reduction (t-distributed stochastic neighbor embedding [t-SNE]) and graph-based clustering of single cells merged from both experiments identified 4 transcriptionally distinct clusters of monocytes/macrophages (Fig. 1c, and Supplementary Fig. 3a, b) (Cohen et al., 2018; Scott et al., 2018). Cluster 3 represented AM (Supplementary Fig. 3c, d) (Schneider et al., 2014), and Clusters 1, 2 and 4 were distributed in the same proportions in both experiments and were characterized by higher expression of *Cx3cr1*, *Mafb*, *Cd14* and *Cd74*, as compared to AM (Supplementary Fig. 3c, d), supporting the contention that it comprised lung tissue IM.

Clusters 1, 2 and 4 exhibited unique transcriptional signatures (Supplementary Fig. 4a, b), including upregulation of transcripts encoding proteins detectable by flow cytometry: MHC-II-related transcripts (e.g., *H2-Eb1*, *H2-Ab1*, *Cd74*) in Cluster 1; transcripts encoding macrophage mannose receptor (*Mrc1*, encoding CD206), the scavenger receptor *Cd163*, folate receptor beta precursor (*Folr2*) and lymphatic endothelium hyaluronan receptor-1 (*Lyve1*) in Cluster 2; and transcripts encoding angiotensin converting enzyme (*Ace*) and low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor IV (*Fcgr4*, encoding CD16.2) in Cluster 4 (Fig. 1d, and Supplementary Fig. 4c).

Using antibodies directed against CD206 and CD16.2, we showed that expression of these markers was mutually exclusive within CD64⁺ IM and 3 subpopulations were identified: a minor population of CD16.2⁺CD206⁻ cells, which co-expressed ACE and corresponded to Cluster 4 (dark blue cells, defined as [CD64⁺]CD16.2⁺ [monocytes] hereafter, Fig. 1, e-h); CD16.2⁻CD206⁺ cells, in which a fraction uniquely expressed Lyve-1 and FOLR2, and corresponding to Cluster 2 (orange cells, defined as CD206⁺ [IM] hereafter, Fig. 1, e-h); and CD16.2⁻CD206⁻ cells, which were expressing significantly

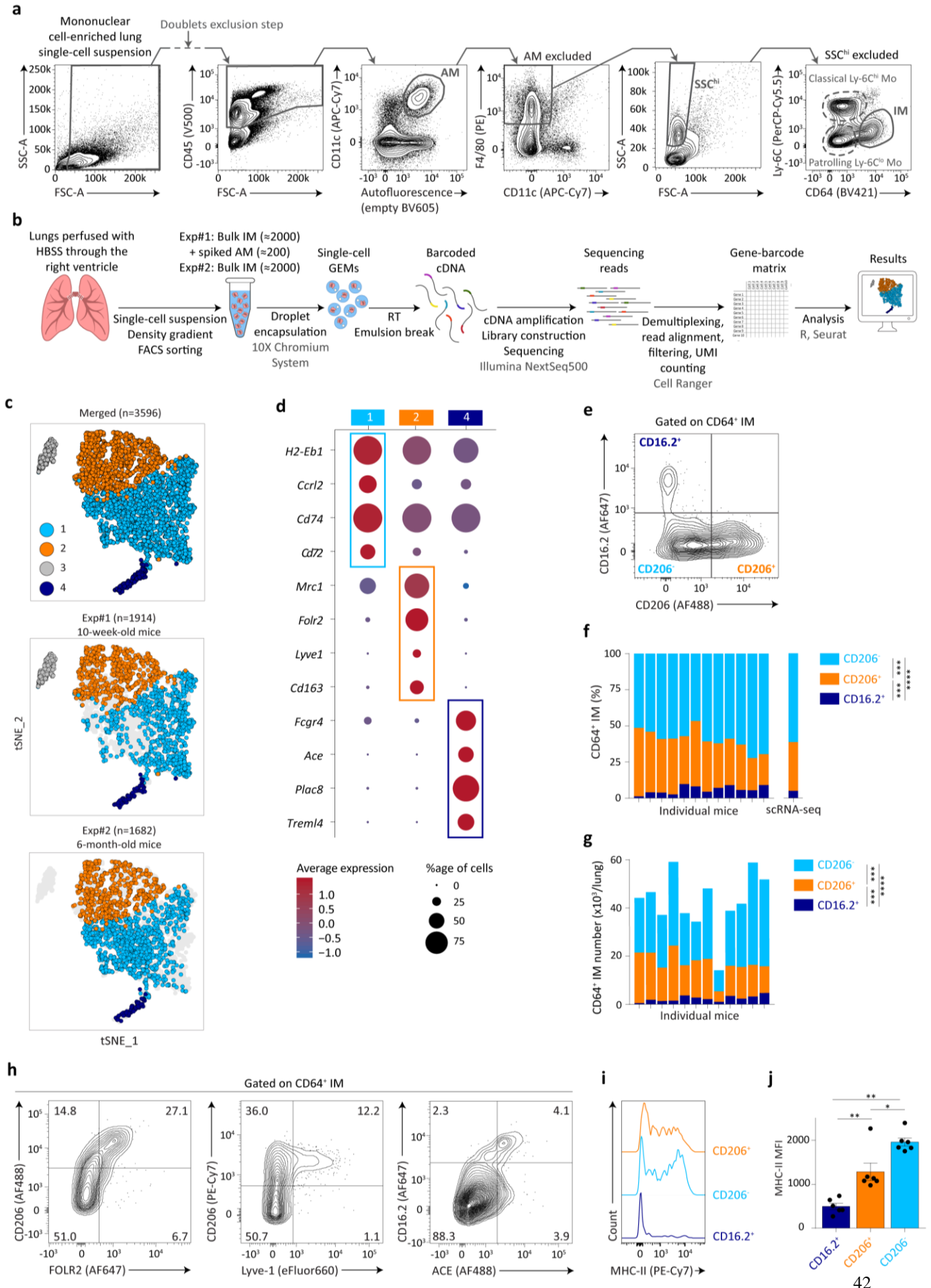


Fig. 1 ScRNA-seq analysis of CD64⁺ mononuclear cells in lungs of naive C57BL/6 WT mice. **a** Gating strategy used for FACS sorting prior to scRNA-seq experiments. **b** Experimental pipeline of scRNA-seq experiments. **c** *t*-SNE plots depicting the CD64-expressing cells analyzed by scRNA-seq. *n* indicates the number of cells analyzed after quality control and filtering. **d** Dot plots showing average expression of the indicated genes and percentages of cells expressing the genes within each cluster. Examples of transcripts significantly differentially regulated ($P_{adj} < 10^{-2}$) between Cluster 4, 2 or 1 vs. the 2 other clusters are depicted. **e** Representative contour plot of CD16.2 and CD206 expression within CD64⁺ IM, whose quantification is shown in **(f)**. **f** Percentage of each mononuclear phagocyte subset among CD64⁺ bulk IM, assessed by flow cytometry. Stacked bars represent individual mice, and the % of cells per cluster as identified by scRNA-seq (right bar). **g** Numbers of each mononuclear phagocyte subset within the steady-state lung. Stacked bars represent individual mice. **h** Representative contour plot of the indicated markers within CD64⁺ IM. Numbers indicate the percentage of cells within the respective gates. The plots are representative of one of 6 individual mice analyzed, each of them giving similar results. **i** Representative histograms of surface MHC-II expression within each mononuclear phagocyte subset, whose quantification is shown in **(j)**. **j** Quantification of MHC-II MFI. **f, g** Data show individual mice and are pooled from 3 independent experiments (n=12). **j** Data show mean \pm s.e.m. and are pooled from 2 independent experiments, each symbol representing individual mice (n=6). *P* values were calculated using non-parametric **f, g** Friedman or **j** Mann-Whitney tests for pairwise comparisons. * $P < 0.05$; ** $P < 10^{-2}$; *** $P < 10^{-3}$; **** $P < 10^{-4}$. Source data are provided as a Source Data File. AM, alveolar macrophage; Exp, experiment; GEM, gel bead in emulsion; IM, interstitial macrophage (sorted in bulk, as shown in **a**); MFI, Mean Fluorescence Intensity; Mo, monocyte; RT, reverse transcription

higher levels of MHC-II as compared to the other subsets and corresponded to Cluster 1 (light blue cells, defined as CD206⁻ [IM] hereafter, Fig. 1, e-j). Of note, CD206⁻ and CD206⁺ subsets largely overlapped with Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} and Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} IM subsets described by Chakarov *et al.* (Chakarov *et al.*, 2019), as well as with ‘IM3’ and ‘IM1/IM2’ subsets described by Gibbings *et al.*, respectively (Supplementary Fig. 5).

Morphologically, CD206⁺ IM uniquely displayed vacuoles in their cytoplasm and a larger size as compared to CD206⁻ IM and CD64⁺CD16.2⁺ cells (Fig. 2a, b). Immunostaining against Lamp-1, a lysosomal marker, suggested that the vacuoles seen in CD206⁺ IM were lysosomes (Fig. 2c, and Supplementary Fig. 6). Phenotypically, CD206⁻ IM expressed higher levels of CX3CR1, and CD206⁺ IM expressed higher levels of the macrophage-associated markers MerTK and CD68 as compared to the 2 other subpopulations (Fig. 2c, and Supplementary Fig. 6). Moreover, CD64⁺CD16.2⁺ cells expressed higher levels of CD11b and CD115 and lower levels of MerTK as compared to both IM subsets (Fig. 2c, and Supplementary Fig. 6), consistent with the idea that CD64⁺CD16.2⁺ cells were monocytes.

Next, we injected fluorescent-conjugated anti-CD45 antibodies intravenously (i.v.) to label intravascular leukocytes before the sacrifice (Fig. 2d). AM, CD206⁺ and CD206⁻ IM were only marginally stained by such antibodies (Fig. 2e, f), confirming that these cells were mainly extravascular. Nearly all patrolling Ly-6C^{lo} monocytes and a majority of classical Ly-6C^{hi} monocytes were labeled, as expected, and confirming the existence of tissue-associated Ly-6C^{hi} monocytes (Fig. 2e, f) (Jakubzick *et al.*, 2013; Sabatel *et al.*, 2017). However, the percentage of CD64⁺CD16.2⁺ monocytes that were stained with the anti-CD45 in vivo exhibited a high variability and was significantly lower than the one

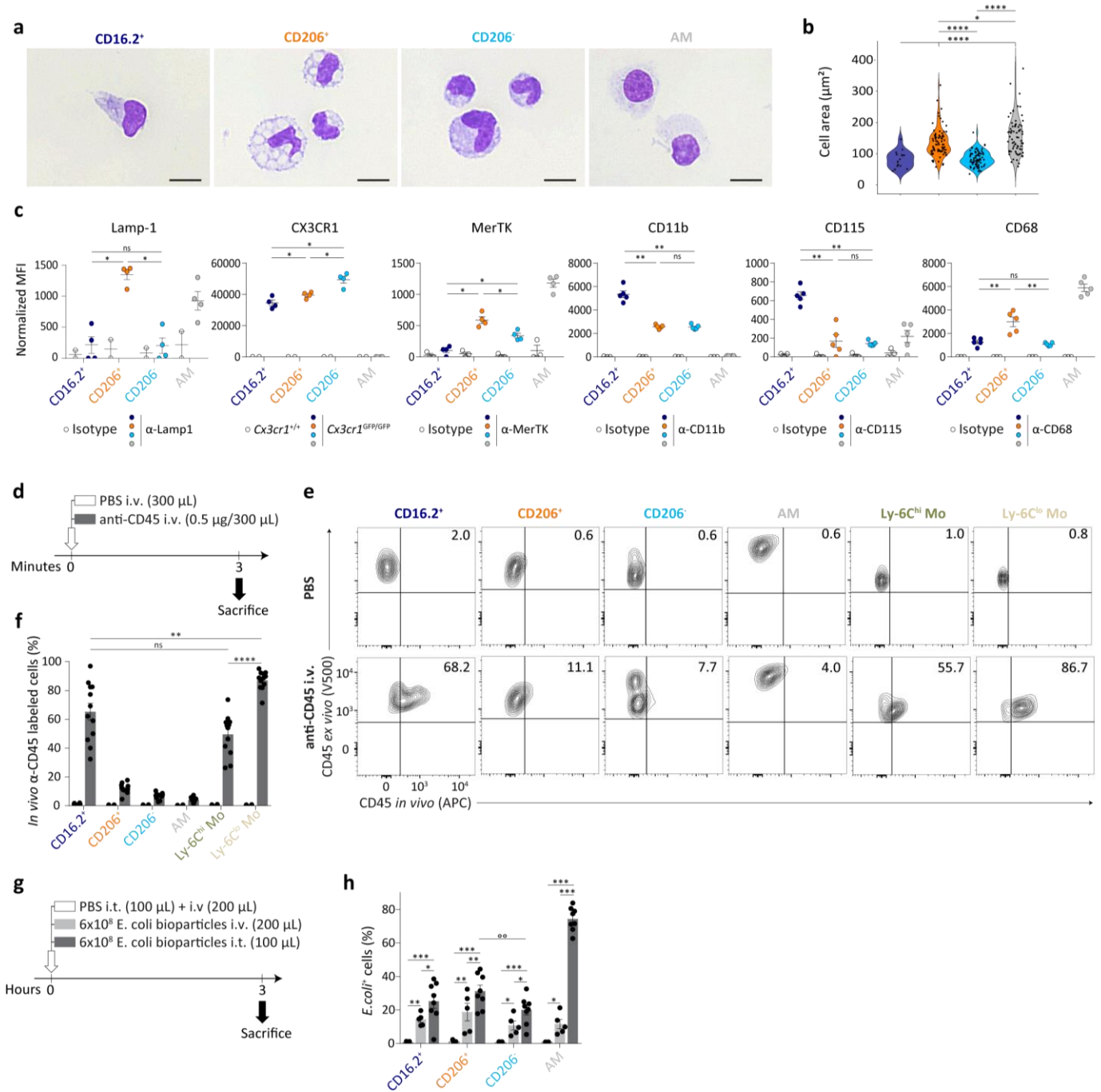


Fig. 2 Morphology, phenotype, tissue association and phagocytic abilities of lung CD64⁺ subpopulations. **a** Representative photograph of the indicated FACS-sorted populations. **b** Quantification of the size of cells presented as violin plots (height: cell area, width: abundance of cells) and individual dots representing single cells. **c** Quantification of expression of the indicated markers as compared to control cells. **d** Experimental outline for panels (e, f). **e** Representative contour plots showing binding of anti-CD45 in vivo vs. anti-CD45 ex vivo antibodies on the indicated cell populations. Numbers indicate the percentage of double-positive cells. **f** Percentage of cells positive for anti-CD45 in vivo and ex vivo stainings within the indicated populations. **g** Experimental outline for panel (h). **h** Percentage of *E. coli* bioparticle-positive cells 3 h after i.v. or i.t. administration. Data show (b) individual cells pooled from 3 independent sorting experiments (CD16.2⁺, CD206⁺, CD206⁻, AM: n=16, 77, 75, 72, respectively), or (c, f, h) mean ± s.e.m., as well as individual mice (c, n=4-5; f, n=12; h, n=5-8/group), and are pooled from 2 independent experiments. *P*-values were calculated using (c,f) non-parametric Mann-Whitney tests for pairwise comparisons or (h) a linear mixed model on log(y+1)-transformed values with Tukey's post hoc test. * *P*<0.05; **^o *P*<10⁻²; *** *P*<10⁻³; **** *P*<10⁻⁴; ns, not significant Empty circles compare % of *E. coli*⁺ cells after i.t. injection in CD206⁺ vs. CD206⁻ IM subsets. Source data are provided as a Source Data file. i.t., intratracheal; i.v., intravenous; MFI, Mean Fluorescence Intensity. Scale bar = 10 µm

of patrolling Ly-6C^{lo} monocytes (Fig. 2e, f), suggesting that a substantial fraction of CD64⁺CD16.2⁺ monocytes was truly located in the lung tissue.

We also sought to test the ability of each subpopulation to engulf large particles (i.e. *E. coli* bioparticles conjugated with a pH-sensitive dye), i.e. a functional hallmark of macrophages (Fig. 2g). Like AM, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, CD206⁺ and CD206⁻ IM were able to phagocyte airborne and blood-borne particles, with significantly higher percentages of cells when particles were injected i.t. as compared to i.v. (Fig. 2h). After i.t. injection, percentages of fluorescent CD206⁺ IM were significantly higher than those of CD206⁻ IM, which might indicate a preferential localization around the airways (Fig. 2h).

So far, our data suggest that, in addition to dendritic cells (DCs) and tissue Ly-6C^{hi} classical monocytes (Jakubzick et al., 2013; Sabatel et al., 2017), the lung MPS comprises 3 subpopulations of Ly-6C^{lo}CD64⁺ mononuclear phagocytes, namely CD206⁺ IM, CD206⁻ IM and non-classical CD64⁺CD16.2⁺ monocytes.

IM subsets are long-lived, unlike NR4A1-dependent monocytes

While previous studies have provided evidence that IM were monocyte-derived cells in adults (Chakarov et al., 2019; Gibbins et al., 2017; Sabatel et al., 2017; Tan and Krasnow, 2016), they did not exclude the possibility that part of the IM compartment may be self-maintaining in the tissue. To assess the half-life of the IM subpopulations, we used the tamoxifen(TAM)-inducible *Cx3cr1*^{CreERT2}.*Rosa26-LSL-YFP* fate-mapping mouse model (Yona et al., 2013), and TAM-injected *Cx3cr1*^{CreERT2}.*Rosa26-LSL-YFP* mice were longitudinally evaluated for yellow fluorescent protein (YFP) labeling in lung mononuclear phagocytes (Fig. 3a). Two weeks after injection, YFP⁺ cells were uniquely found among CD64⁺ subpopulations and Ly-6C^{lo} patrolling monocytes, while YFP was virtually absent in lung Ly-6C^{hi} classical monocytes or DCs (Fig. 3b, c, and Supplementary Fig. 7). Of note, the majority of CD206⁺ and CD206⁻ IM subpopulations were YFP⁺. However, less than 20% of the CD64⁺CD16.2⁺ subset was YFP⁺, similarly to what was observed in Ly-6C^{lo} patrolling monocytes (Fig. 3b, c). In addition, CD64⁺CD16.2⁺ cells were all replaced by YFP⁻ monocytes at week 9 (Fig. 3b, c). Nine and 28 weeks after TAM treatment, the percentages of YFP⁺CD206⁺ and YFP⁺CD206⁻ IM remained high and were not significantly different to those observed 2 weeks post-injection (Fig. 3b, c), supporting that both IM subsets could self-maintain in adults. However, percentages of YFP⁺CD206⁺ and YFP⁺CD206⁻ cells were significantly decreased at week 52 as compared to week 2, confirming that both subpopulations were slowly replaced by YFP⁻ monocytes over time (Fig. 3b, c). Interestingly, more than half of the YFP⁺ labeling present at week 2 was still detected 50 weeks later in CD206⁺ IM, as opposed to less than

24 % in CD206⁻ IM (Fig. 3b, c). In addition, levels of the proliferation marker Ki-67 were significantly greater in CD206⁺ IM as compared to CD206⁻ IM and AM (Fig. 3d), suggesting that CD206⁺ IM can proliferate and have an increased self-maintenance potential as compared to CD206⁻ IM.

We have previously shown that bulk IM numbers were not significantly affected in 6-10 week-old *Ccr2*^{-/-} or *Nr4a1*^{-/-} mice (Sabatell et al., 2017), whose numbers of blood classical Ly-6C^{hi} and patrolling Ly-6C^{lo} monocytes are impaired, respectively (Hanna et al., 2011; Serbina and Pamer, 2006) (Supplementary Fig. 8). While numbers of CD206⁺ and CD206⁻ IM were similar in WT, *Ccr2*^{-/-} and *Nr4a1*^{-/-} mice (Fig. 3e, f), numbers of CD64⁺CD16.2⁺ monocytes were significantly reduced in *Nr4a1*^{-/-} mice as compared to WT mice (Fig. 3e, f), like those of Ly-6C^{lo} monocytes, demonstrating that CD64⁺CD16.2⁺ monocytes depend on NR4A1 for their presence in the lung.

The similarities between CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and intravascular Ly-6C^{lo} patrolling monocytes (i.e., half-life, dependence on NR4A1 and surface phenotype [Supplementary Figs. 9a, b]) supported the possibility that CD64⁺CD16.2⁺ monocytes actually derive from Ly-6C^{lo} patrolling monocytes, but express CD64 and are partly extravascular. If they enter the tissue, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes should be imprinted by tissue-instructive signals and, hence, exhibit a transcriptomic profile that is distinct from the one of intravascular Ly-6C^{lo} patrolling monocytes. Hence, we compared CD64⁺ Ly-6C^{lo} patrolling monocytes (Supplementary Figs. 9c-e) with CD64⁺CD16.2⁺ monocytes by scRNA-seq and found that they segregated in separated clusters (Supplementary Figure 9f). Moreover, we found that many of the most upregulated transcripts in CD64⁺CD16.2⁺ monocytes (Supplementary Figs. 9g-i) were also found to be significantly upregulated in IM as compared to AM (see Supplementary Fig. 3d). These data support the notion that CD64⁺CD16.2⁺ monocytes can be distinguished from Ly-6C^{lo} patrolling monocytes by their expression of tissue-specific IM-related genes, likely as a result of tissue-derived imprinting.

Altogether, our data identified two main subsets of long-lived monocyte-derived IM, with CD206⁺ IM exhibiting a greater half-life than CD206⁻ IM, as well as short-lived NR4A1-dependent CD64⁺CD16.2⁺ monocytes.

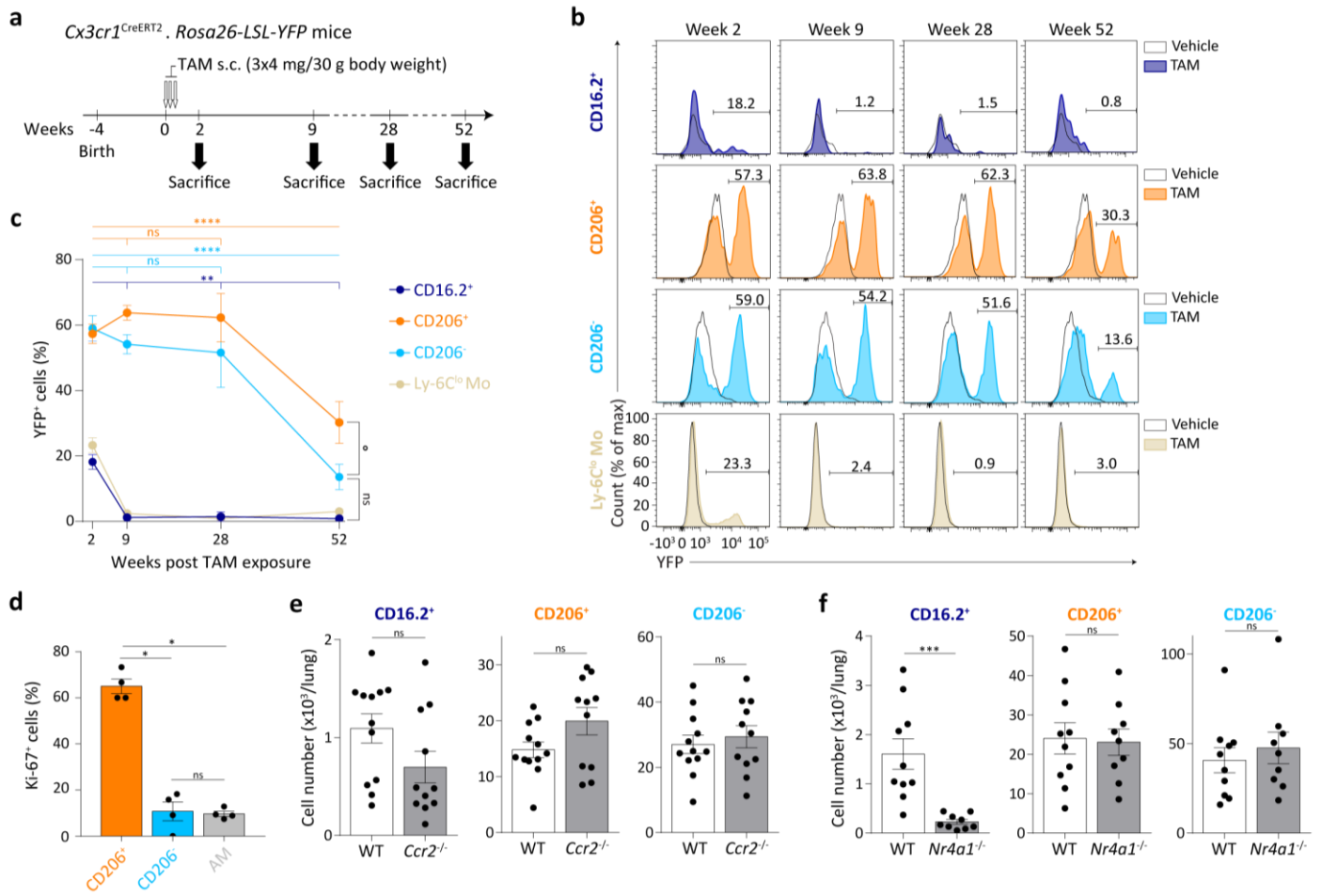


Fig. 3 Maintenance of lung tissue CD64⁺ mononuclear phagocytes in adult C57BL/6 mice. **a** Experimental outline for panels (b, c). Briefly, at 4 weeks of age, *Cx3cr1^{CreERT2}; Rosa26-LSL-YFP* mice were treated with TAM s.c. 3 times, 48h apart. Mice were analyzed for YFP expression 2, 9, 28, and 52 weeks later. **b** Representative histograms of YFP expression within the indicated populations. Numbers indicate the percentage of YFP⁺ cells, as quantified in (c). **c** Percentage of YFP⁺ cells within the indicated populations, assessed by flow cytometry. **d** Percentages of Ki-67⁺ cells in the indicated populations. **e, f** Absolute numbers of the indicated cell populations in the lungs of **e** *Ccr2*^{-/-} or **f** *Nr4a1*^{-/-} and control WT mice. **c-f** Data show mean ± s.e.m., as well as individual mice in (d-f) (c, n= 10; d, n= 4; e-f, n=9-12) and are pooled from 2 to 3 independent experiments. *P*-values were calculated using (c) a two-way ANOVA with Tukey's post hoc test, **d** non-parametric Mann-Whitney test for pairwise comparisons or **e, f** a two-tailed unpaired Student's *t* test. °/* *P*<0.05; ** *P*<10⁻²; *** *P*<10⁻³; **** *P*<10⁻⁴; ns, not significant. In **c** the empty circle compares CD206⁺ and CD206⁻ IM at week 52. Source data are provided as a Source Data file. s.c., subcutaneous; TAM, tamoxifen

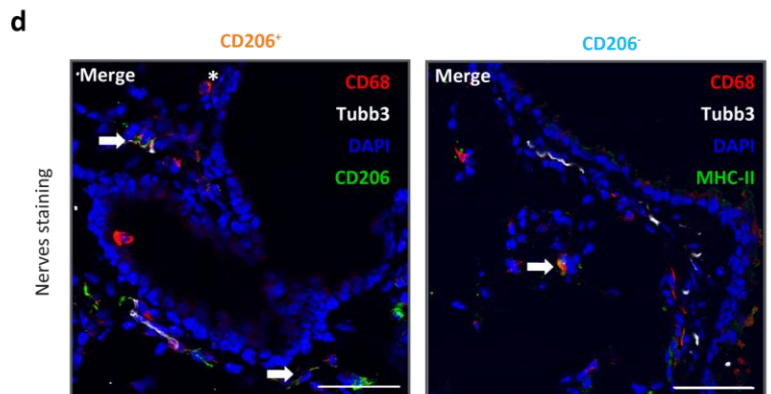
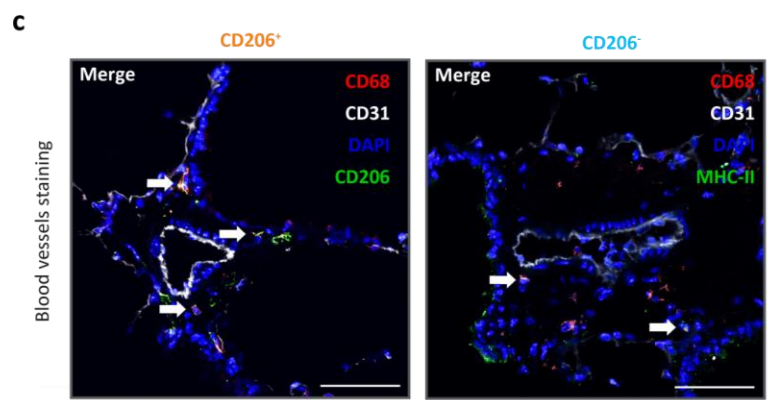
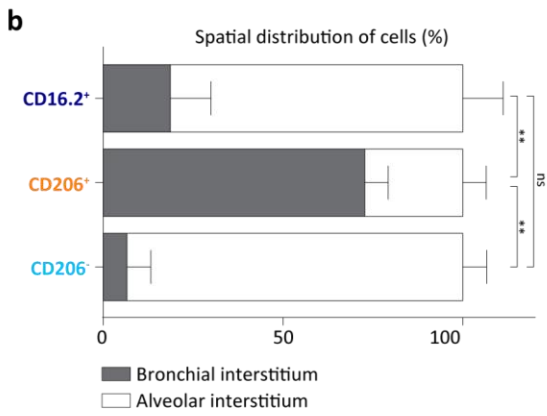
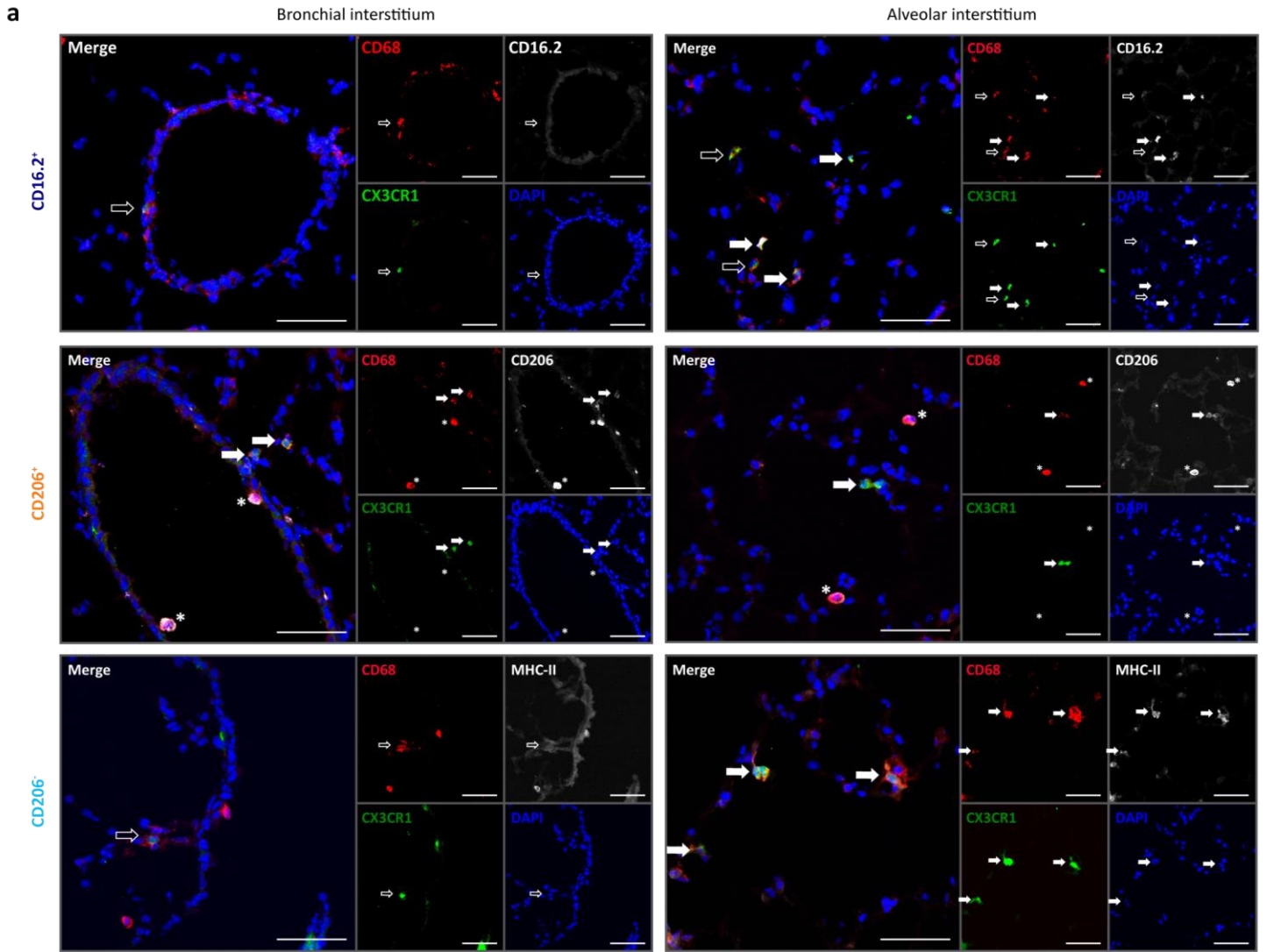


Fig. 4 Localization of lung CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, CD206⁺ IM and CD206⁻ IM subpopulations **a** Confocal microscopy pictures of lung sections from *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice (CX3CR1 [green]; CD68 [red]; DAPI [blue]; CD16.2, MHC-II or CD206 [white]). CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, CD206⁺ IM and CD206⁻ IM were identified as CX3CR1⁺CD68⁺CD16.2⁺, CX3CR1⁺CD68⁺CD206⁺ and CX3CR1⁺CD68⁺MHC-II⁺ cells, respectively. Asterisks indicate CX3CR1⁺CD68⁺ AM; plain or empty arrows indicate CX3CR1⁺CD68⁺ cells expressing or not the marker of interest (i.e., CD16.2, CD206 or MHC-II), respectively. **b** Preferential distribution of the indicated populations in the peribronchial/perivascular area vs. the alveolar parenchyma. **c,d** Lung sections of C57BL/6 WT mice were analyzed: CD68 [red]; **c** CD31 or **d** Tubb3 [white]; DAPI [blue]; MHC-II, CD206 or CD16.2 [green]). CD206⁺ IM, CD206⁻ IM and CD64⁺CD16.2⁺ monocytes were identified as CD68⁺CD206⁺, CD68⁺MHC-II⁺ and CD68⁺CD16.2⁺ cells, respectively. **b** Data show mean \pm s.e.m. and are pooled from 2 independent batches of mice (n= 4-6). *P*-values were calculated using a Kruskal-Wallis test, and pairwise comparisons were estimated using Mann-Whitney tests. **, *P*<10⁻²; ns, not significant. Source data are provided as a Source Data file. Scale bars = **(a)** 100 μ m; **(c,d)** 50 μ m

CD206⁺ and CD206⁻ IM preferentially populate distinct niches

To assess the preferential localization of the two IM subpopulations and of CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, we used confocal microscopy. Lung sections of *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice were stained with antibodies directed against GFP, CD68 (as a macrophage marker) and either CD206, MHC-II or CD16.2. Of note, we observed only a minor fraction of CD68⁺ cells expressing simultaneously CD206 and MHC-II using a combined anti-CD206 and anti-MHC-II staining (Supplementary Fig. 10). Hence, CX3CR1⁺CD68⁺CD206⁺, CX3CR1⁺CD68⁺MHC-II⁺ and CX3CR1⁺CD68⁺CD16.2⁺ triple-positive cells were quantified in multiple sections and fields to evaluate the spatial distribution of CD206⁺ IM, CD206⁻ IM and CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, respectively (Fig. 4a, b). On the one hand, we found that CD206⁺ IM were preferentially found in the bronchial interstitium, whereas CD206⁻ IM and CD64⁺CD16.2⁺ monocytes were mainly located in the alveolar interstitium (Fig. 4a, b). On the other hand, since Chakarov *et al.* reported that peribronchial Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} and Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} IM subsets were mainly associated with nerves and blood vessels, respectively (Chakarov *et al.*, 2019), we used antibodies against CD31 and Tubb3 to stain nerves and endothelial cells. While CD206⁺ IM were associated with blood vessels (Fig. 4c), the preferential localization of peribronchial CD206⁻ IM next to nerves was, however, less obvious, which is likely due to the close association of blood vessels and nerves in the peribronchial areas of the lung (Fig. 4d).

These data support that the two IM subpopulations are found in distinct micro-anatomical niches, which may dictate specific functional specializations.

CD206⁺ and CD206⁻ IM exhibit distinct functional properties

Next, we performed Gene Ontology (GO) enrichment analyses to gain insights into the functional properties of CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and IM subpopulations. First, comparison between CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and IM subsets revealed an enrichment, in CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, in transcripts involved in leukocyte cell-cell adhesion, integrin-mediated signaling pathway, positive regulation of cytoskeleton organization and myeloid leukocyte migration (Table 1, Supplementary Fig. 11 and Supplementary Table 2), supporting the possibility that CD64⁺CD16.2⁺ monocytes may be actively extravasating in the lung tissue. Second, we found that the upregulated transcripts in CD206⁺ IM were enriched for processes related to the positive regulation of leukocyte chemotaxis, response to wounding and receptor-mediated endocytosis, consistent with their phenotype and lysosomal vacuoles (Table 1, Supplementary Fig. 11 and Supplementary Table 2). Third, CD206⁻ IM had increased expression of transcripts associated with antigen processing and presentation, regulation of T cell activation and defense response (Table 1, Supplementary Fig. 11 and Supplementary Table 2).

To complement these mRNA data at the protein level, we performed a proteome profiling on the supernatants of FACS-sorted CD206⁺ and CD206⁻ IM (Fig. 5a, b). CD206⁺ IM were characterized by an elevated chemokine secretory profile (e.g., CXCL11, CXCL10, CXCL9, CXCL2, CCL12), a higher secretion of immunoregulatory cytokines (IL-10, IL-1-Ra) and factors regulating cell growth and differentiation, such as leukemia inhibitory factor (LIF), amphiregulin (AREG), or IL-7 (Fig. 5a, b). Conversely, CD206⁻ IM secreted larger amounts of Pentraxin 3 (PTX3), secreted in response to inflammatory signals and facilitating pathogen recognition (Garlanda et al., 2005), the p40 subunit of the type 1 helper T cell (Th1)-differentiating cytokine IL-12, and the B and T lymphocyte chemoattractant CXCL13 and CCL5, respectively (Fig. 5a, b). GO analysis also showed that both IM subsets expressed high levels of genes implicated in the cellular response to LPS as compared to CD64⁺CD16.2⁺ monocytes (Table 1, Supplementary Fig. 11 and Supplementary Table 2). Of note, ex vivo LPS stimulation potentiated the secretion of chemokines and immunoregulatory cytokines in CD206⁺ IM, and of PTX3, IL12p40 and CCL5 in CD206⁻ IM (Fig. 5a, b).

At steady-state, we and others have shown that, upon engagement of Toll like receptor (TLR)4 (i.e., the main receptor for LPS) and the adaptor molecule MYD88, bulk IM could fulfill important tolerogenic tasks by inhibiting DC functions via IL-10-dependent mechanisms, thus preventing development of asthma in animal models (Bedoret et al., 2009; Sabatel et al., 2017). Proteome profiler data supported that CD206⁺ IM were the main IL-10-secreting cells (Fig. 5a, b). To validate these findings, we assessed IL-10 expression in lung monocyte/macrophage populations from IL-10- β -lactamase reporter ITIB mice (Bouabe et al., 2011) (Fig. 5c, d). First, we observed that AM, Ly-6C^{hi} classical and Ly-6C^{lo} patrolling monocytes exhibited low percentages of IL-10⁺ cells (Fig. 5c, d). Second, we found that the percentage of CD206⁺ IM expressing IL-10 was significantly higher than the

one of CD206⁻ IM (Fig. 5c, d). Third, we showed that the percentage of IL10⁺CD64⁺CD16.2⁺ monocytes was significantly higher than the one of IL-10⁺ patrolling Ly-6C^{lo} monocytes (Fig. 5c, d), pointing out another notable difference between CD64⁺CD16.2⁺ and patrolling monocytes.

Altogether, our data support that, in addition to their distinct phenotype and localization, IM subpopulations are characterized by unique functional properties. CD206⁺ IM exhibit a prominent tolerogenic and chemokine secretory profile, whereas CD206⁻ IM have a typical antigen-presenting cell profile. Besides IM subsets, a fraction of CD64⁺CD16.2⁺ monocytes also express IL-10, a functional hallmark of lung IM (Bedoret et al., 2009; Hoppstädter et al., 2010; Kawano et al., 2016; Sabatel et al., 2017).

Exposure to TLR ligands differentially modulates IM subsets

We reported previously that local instillation of TLR ligands such as Pam3CSK4, LPS and CpG (i.e., TLR1/2, TLR4 and TLR9 ligands, respectively) promoted an expansion of bulk IM (Sabatel et al., 2017). Here we exposed mice to Pam3CSK4, LPS and CpG and performed time-course analysis of IM subsets (Fig. 5e). Pam3CSK4 and LPS induced similar dynamic changes, characterized by transient increases in numbers of CD64⁺CD16.2⁺ cells followed by a subsequent expansion of CD206⁻ IM (Fig. 5f, g). LPS also significantly increased numbers of CD206⁺ IM at day 3 as compared to baseline (Fig. 5f). After CpG treatment, the profile was drastically different as compared to LPS or Pam3CSK4, with a more robust and sustained increase in numbers of CD64⁺CD16.2⁺ cells, reaching a peak at day 7, and a gradual increase in numbers of CD206⁻ IM peaking at day 14 (Fig. 5f, g). Of note, increases in numbers of CD206⁻ cells were associated with a drop in global MHC-II expression by those cells (days 3-7, Fig. 5h). Conversely, MHC-II expression of CD64⁺CD16.2⁺ cells gradually increased from day 5 to day 14, regardless of the treatment. (Fig. 5h). Twenty-eight days after treatment, MHC-II expression was equal or even higher than day 0 in each subset, regardless of the treatment (Fig. 5h). Functionally, CpG was by far the most potent stimulus in triggering IL-10⁺ IM, which was restricted to the CD64⁺CD16.2⁺ compartment (Fig. 5i).

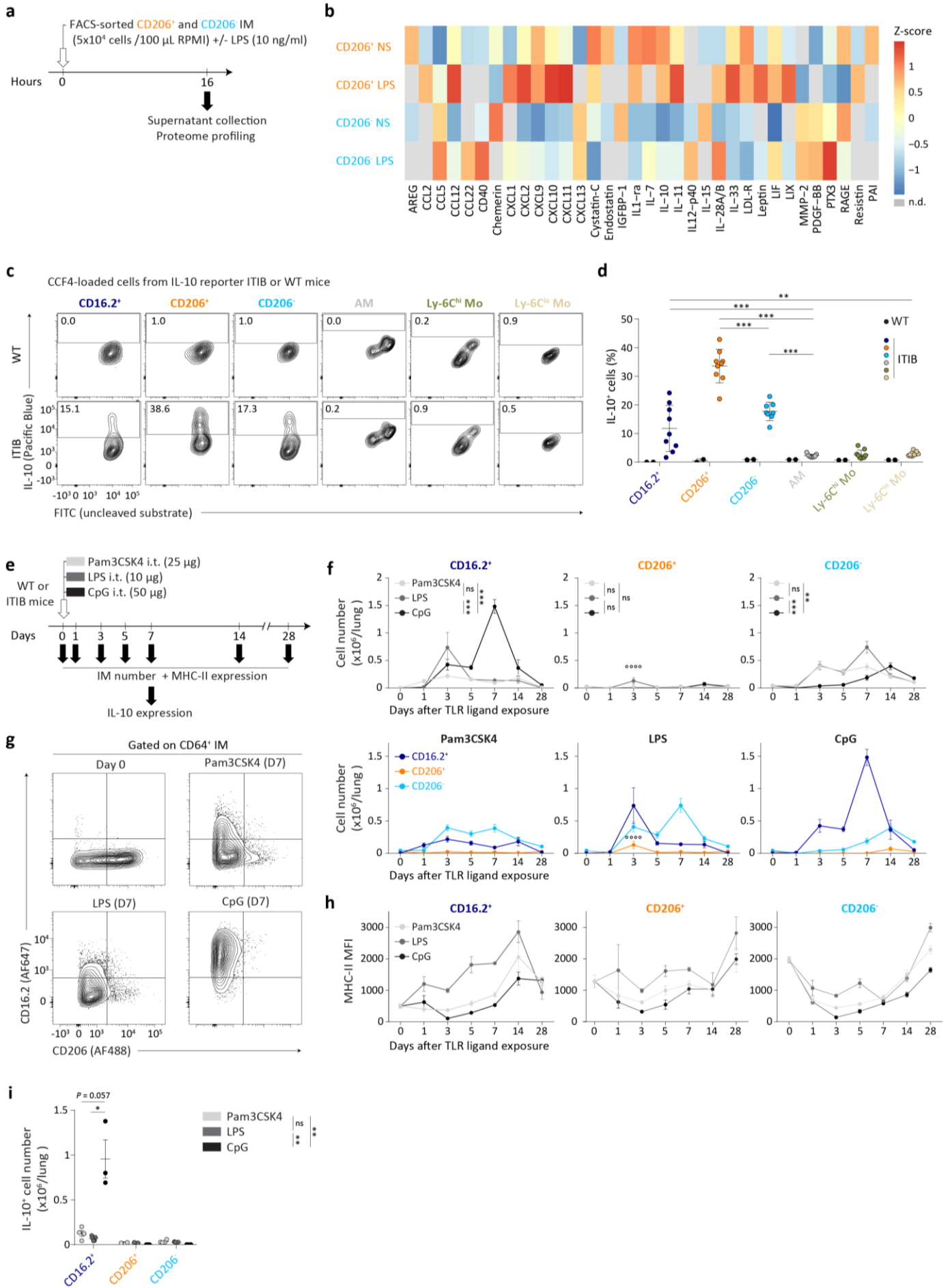


Fig. 5 Functional properties of IM subpopulations at steady-state and dynamic regulation after airway exposure to microbial products. **a** Experimental outline for **(b)**. FACS-sorted IM subpopulations were cultured ex vivo overnight with or without LPS, and supernatants were subjected to proteome profiling. **b** Heatmap depicting the relative abundance of the indicated molecules in the supernatants of non-stimulated (NS) or LPS-stimulated (LPS) lung IM subpopulations. Data represent the mean and are representative of one of 2 independent sorting experiments. **c** Representative contour plots showing steady-state IL-10 expression as assessed by detection of 450 nm fluorescence (blue fluorescent product of the cleaved CCF4 substrate) in CCF4-loaded cells isolated from IL-10- β -lactamase reporter ITIB or WT control mice. Numbers indicate % of IL-10⁺ cells within the cell populations, as quantified in **(d)**. **d** Percentages of IL-10⁺ cells in the indicated populations. **e** Experimental outline for panels **(f-i)**. **f** Kinetic analysis of numbers of each mononuclear phagocyte subset after i.t. instillation of Pam3CSK4, LPS and CpG. **g** Representative contour plot of CD16.2 and CD206 expression within CD64⁺ IM from control (Day 0), and Pam3CSK4-, LPS- and CpG-injected mice 7 days after treatment. **h** Kinetic analysis of MHC-II expression within the indicated populations after Pam3CSK4, LPS or CpG treatment. **i** Numbers of IL-10⁺ cells within the indicated subpopulations 7 days after treatment. **d,f,h,i**. Data show mean \pm s.e.m., as well as individual mice in **(d,i)**, and are pooled from 2 independent experiments (**d**, n=9; **f,h**, n=5-6/time point; **i**, n=3-5). *P*-values were calculated using **d,i** non-parametric Mann-Whitney tests for pairwise comparisons or **f,h** two-way ANOVA with Tukey's post hoc tests. *, *P*<0.05; **, *P*<10⁻²; ***, *P*<10⁻³; ****/*⁰⁰⁰⁰, *P*<10⁻⁴; ns, not significant. In **f**, empty circles compare numbers of CD206⁺ IM 3 days after LPS vs. day 0. Source data are provided as a Source Data file. i.t., intratracheal

Cluster	Biological Process	Reference	Expected	Specific genes	Fold enrichment	<i>P</i> -value
1 (CD206 ⁻)	Defense response	1296	7.09	33	4.65	7.62E-10
	Regulation of T cell activation	297	1.63	14	8.61	1.40E-05
	Antigen processing and presentation	95	0.52	9	17.31	4.76E-05
	Cellular response to lipopolysaccharide	197	1.08	11	10.20	1.65E-04
2 (CD206 ⁺)	Receptor-mediated endocytosis	130	1.07	12	11.25	1.76E-05
	Response to wounding	331	2.72	15	5.52	1.46E-03
	Positive regulation of leukocyte chemotaxis	85	0.70	8	11.47	8.04E-03
	Cellular response to lipopolysaccharide	197	1.62	11	6.80	9.98E-03
4 (CD16.2 ⁺)	Leukocyte cell-cell adhesion	48	1.02	12	28.22	2.81E-05
	Integrin-mediated signaling pathway	73	1.55	13	8.38	2.20E-04
	Positive regulation of cytoskeleton organization	206	4.38	19	4.34	2.41E-03
	Myeloid leukocyte migration	117	2.49	13	5.23	2.88 E-02

Table 1 Gene Ontology analysis of the transcriptomic profiles of IM subpopulations. 'Reference' indicates the number of genes in the gene set, 'Expected' the average number of genes expected to be present if there is no enrichment, and 'Specific genes' the number of genes from the gene set that are upregulated in the indicated Cluster. *P*-values were calculated using a two-tailed Mann-Whitney *U* test with Benjamini-Hochberg False Discovery Rate correction

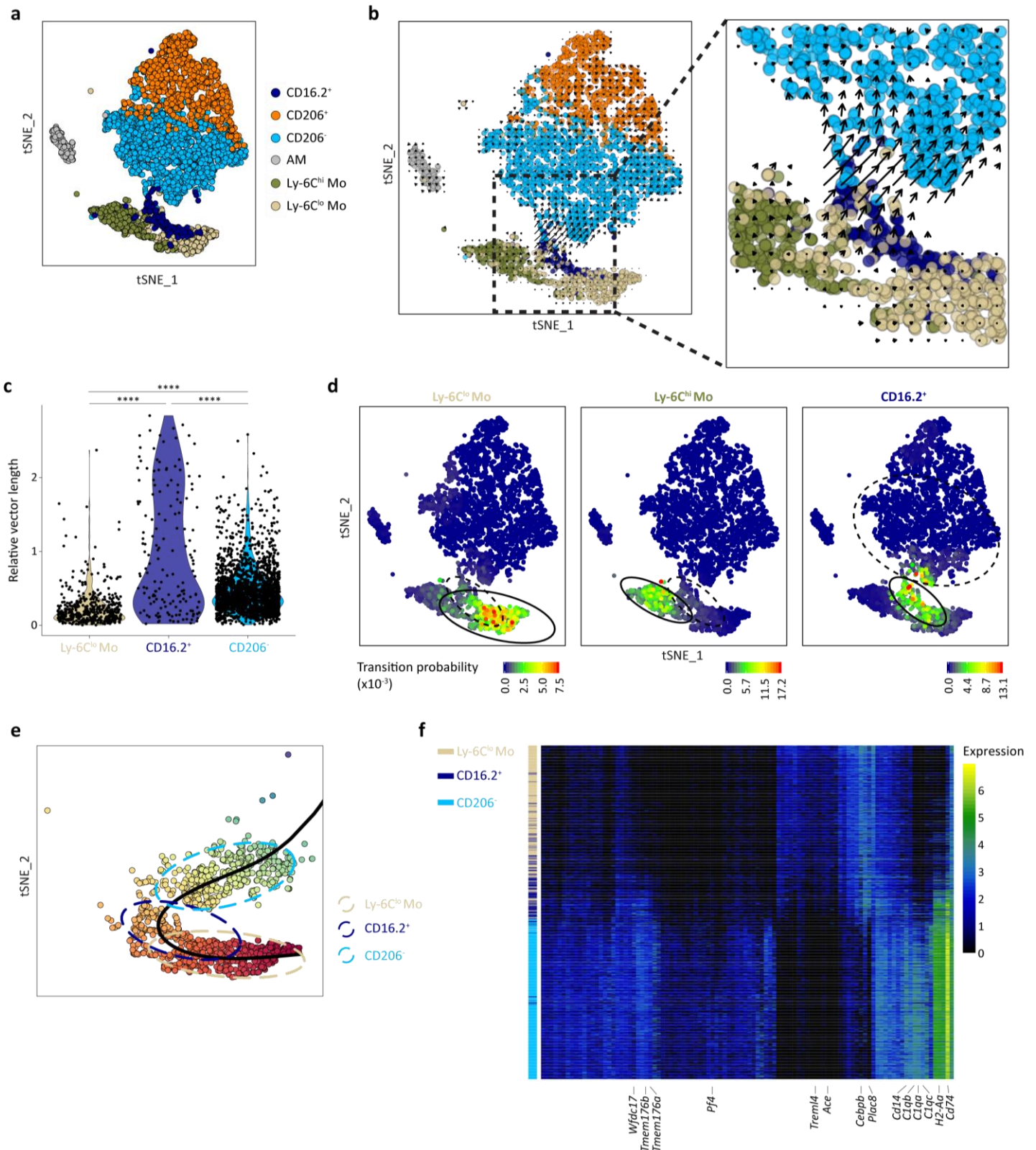


Fig. 6 RNA velocity and trajectory analyses of lung monocyte and IM subpopulations in steady-state C57BL/6 WT mice. **a** *t*-SNE plot depicting the merged scRNA-seq data of lung CD64-expressing cells (see Fig. 1c), Ly-6C^{lo} patrolling monocytes (see Supplementary Fig. 9) and Ly-6C^{hi} classical monocytes (see Supplementary Fig. 12). **b** Prevalent patterns of RNA velocities substantiated by arrows and visualized on the same *t*-SNE plot as shown in (a). Right panel shows a higher magnification of the area depicted by a black dashed line in the left panel (see single cell velocities in Supplementary Fig. 13). **c** Violin plot showing quantification of single cell relative 2D velocities in the indicated cell (sub)populations, as presented in Supplementary Fig. 13. **d** Visualization of single-step transition

probabilities from Ly-6C^{lo} patrolling monocytes (left), Ly-6C^{hi} classical monocytes (middle) or CD64⁺CD16.2⁺ monocytes (right) to neighboring cells. Ellipses represent 95% confidence. **e,f** Slingshot analysis of Ly-6C^{lo} patrolling monocytes, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and neighboring CD206⁻ IM. **e** Suggested pseudo-time trajectory from Ly-6C^{lo} patrolling monocytes to CD206⁻ IM. Ellipses represent 80% confidence. **f** Heatmap depicting gene expression profiles of Ly-6C^{lo} patrolling monocytes, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and neighboring CD206⁻ IM ordered according to Slingshot pseudo-time trajectory. Left color bars indicate annotation by cell type

RNA velocity identifies local precursors of CD206⁻ IM

To gain insights into cell fate decisions, we applied RNA velocity analysis (La Manno et al., 2018) to our scRNA-seq datasets, i.e. IM subsets, AM, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, Ly-6C^{lo} patrolling and Ly-6C^{hi} classical monocytes (Supplementary Fig. 12). RNA velocity utilizes the balance between unspliced and spliced mRNAs to estimate the transition probability of individual cells (La Manno et al., 2018). Velocities, substantiated by arrows, can easily be projected on the *t*-SNE plot representing the merged scRNA-seq datasets on the basis of the similarity between the extrapolated state of a single cell and the static state of other cells in the local neighborhood (Fig. 6a,b, and Supplementary Fig. 13b). Confirming the idea that both IM subsets arise from independent lineages (Chakarov et al., 2019), RNA velocities of CD206⁻ and CD206⁺ IM suggested that both IM subpopulations were relatively stable and independent from each other, as no clear transition could be observed from one subpopulation to the other (Fig. 6b, and Supplementary Fig. 14).

Interestingly, RNA velocities of CD64⁺CD16.2⁺ monocytes were significantly higher than those of Ly-6C^{lo} patrolling monocytes or CD206⁻ IM, supporting their dynamic transition state, and were pointing towards CD206⁻ IM (Fig. 6b, c). Moreover, transition probability analysis of Ly-6C^{lo} patrolling and CD64⁺CD16.2⁺ monocytes suggested that they could give rise to CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and CD206⁻ IM, respectively (Fig. 6d), supporting that CD64⁺CD16.2⁺ monocytes are mobilizable, on a timescale of hours (La Manno et al., 2018), to become CD206⁻ IM. Using Slingshot package for pseudo-time inference analysis (Street et al., 2018), we found a continuum from Ly-6C^{lo} monocytes towards CD206⁻ IM, with CD64⁺CD16.2⁺ monocytes as an intermediate state (Fig. 6e). Among the gene expression changes driving such transition, we observed a downregulation of a patrolling monocyte signature (e.g., *Cebpb*, encoding the transcription factor C/EBP β , essential for Ly-6C^{lo} monocyte survival (Mildner et al., 2017), *Plac8*, *Trem14*, *Ace* [see Supplementary Figs. 9g, h]) concomitantly to an upregulation of many previously identified IM-related transcripts, including MHC-II-related transcripts (see Supplementary Figs. 3d and 9h, i) (Fig. 6f).

NR4A1-dependent monocytes can differentiate into CD206⁻ IM

Finally, we sought to validate our computational-based conclusions *in vivo*. First, we generated bone marrow (BM) competitive CD45.1/2 chimeras engrafted with CD45.1⁺ WT and CD45.2⁺ *Nr4a1*^{-/-} BM cells (Fig. 7a). Six weeks after reconstitution, >85% of blood Ly-6C^{lo} patrolling monocytes were of CD45.1⁺ WT origin, whereas less than 25% of NR4A1-independent B lymphocytes and neutrophils were of CD45.1⁺ WT origin (Fig. 7b). After 14 weeks, repopulated lung AM and both IM subsets displayed a chimerism similar to NR4A1-independent cells, confirming that such niches were repopulated by CCR2-dependent classical monocytes after lethal irradiation (Fig. 7b) (Sabatel et al., 2017). Nevertheless, there was a significant enrichment, in repopulated CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, in cells of CD45.1⁺ WT origin as compared to NR4A1-independent cells (Fig. 7b), supporting the idea that even in such extreme conditions, Ly-6C^{lo} patrolling monocytes substantially contributed to the pool of CD64⁺CD16.2⁺ monocytes. Second, we performed *i.v.* adoptive transfers of blood donor CD45.1/2⁺ Ly-6C^{hi} classical and Ly-6C^{lo} patrolling monocytes into naïve CD45.2⁺ recipient hosts and analyzed the percentages of donor cells in Ly-6C^{lo} patrolling monocytes, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and CD206⁻ IM 7 days later (Fig. 7c). Transfer of Ly-6C^{lo} monocytes, unlike that of Ly-6C^{hi} monocytes, resulted in a significant increase in the percentages of donor Ly-6C^{lo} monocytes in the lung vasculature as compared to non-transferred mice (Fig. 7d). While donor cells were hardly detectable in CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, there was a trend towards an increase in percentages of donor cells in CD206⁻ IM when mice were transferred with Ly-6C^{lo} monocytes, but not with Ly-6C^{hi} monocytes (Fig. 7d).

In order to boost IM expansion, we injected CpG, which resulted in a drastic increase in numbers of CD64⁺CD16.2⁺ cells (Fig. 5f, g). To our surprise, we were not able to assess the chimerism of CpG-injected WT:*Nr4a1*^{-/-} BM mixed chimeras, since they died following CpG administration, suggesting that NR4A1-dependent BM cells were needed to counteract CpG-induced toxicity (Fig. 7e). Of note, we reported a similar death in CpG-injected *Il10*^{-/-} mice (Fig. 7e) (Sabatel et al., 2017), supporting the hypothesis that CpG-induced IL-10-producing IM counteract the toxicity of CpG, and, as a corollary, that NR4A1-dependent cells could be precursors of CpG-induced IM. We injected WT, *Nr4a1*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-} and *Il10*^{-/-} mice with CpG and found that, while WT and *Ccr2*^{-/-} mice all survived upon CpG injection, survival of *Nr4a1*^{-/-} and *Il10*^{-/-} mice was significantly decreased as compared to WT mice, and all surviving mice had to be euthanized after 3-6 days due to excessive weight loss (Fig. 7e). This was associated with an altered profile of CD64⁺ IM on the Ly-6C/CD64 plot and the abnormal presence of Ly-6C⁺CD64⁺ inflammatory monocytes in *Nr4a1*^{-/-} and *Il10*^{-/-} mice 3 days after CpG (Fig. 7f).

Together, our data support the notion that, at steady-state, Ly-6C^{lo} patrolling monocytes can enter the lung tissue to differentiate into CD206⁻ IM via an intermediate CD64⁺CD16.2⁺ state. After CpG, NR4A1 and IL-10 are needed to counteract CpG toxicity, probably through the expansion of IL-10-producing macrophages from NR4A1-dependent precursors.

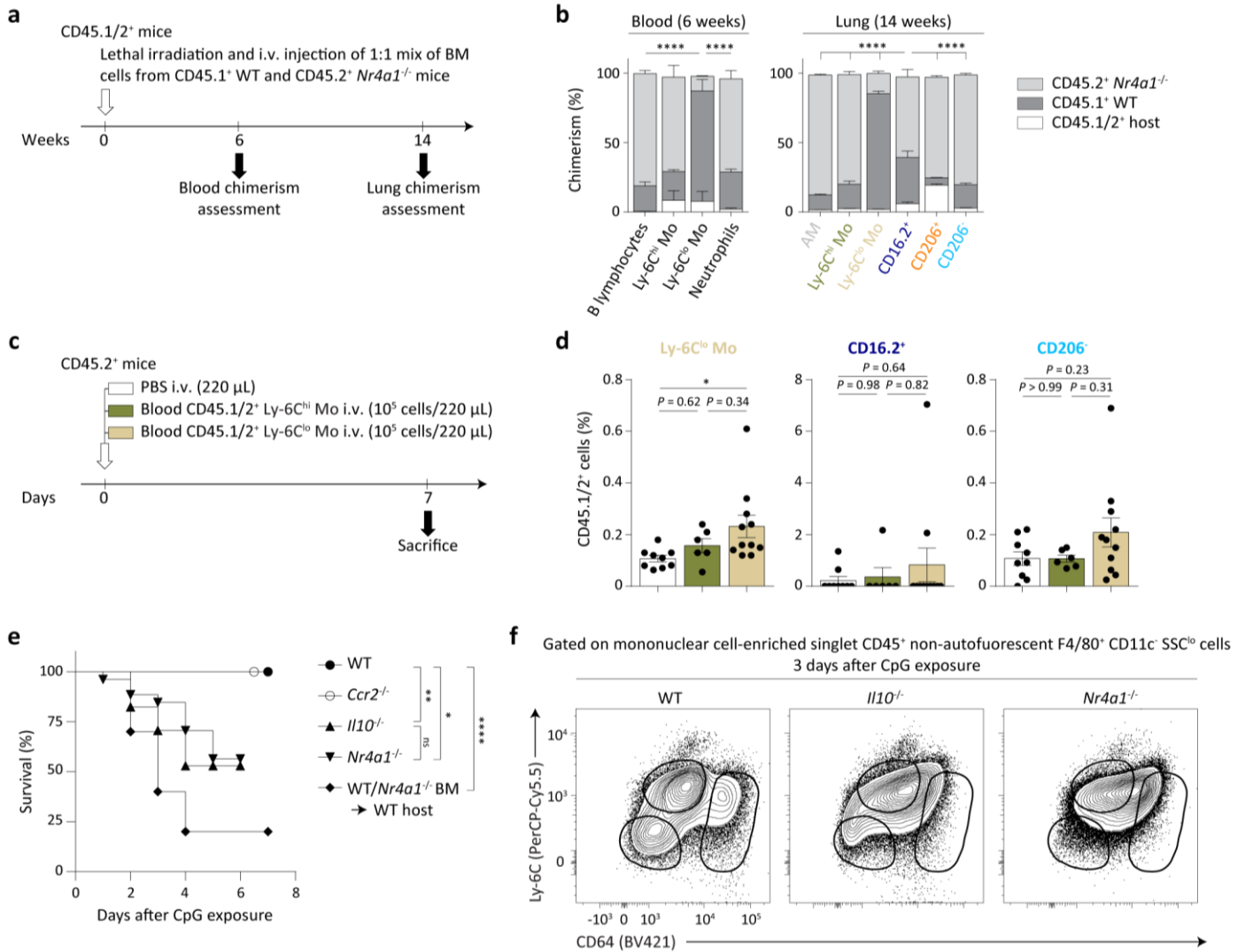


Fig. 7 Patrolling monocyte-derived NR4A1-dependent CD16.2⁺ monocytes are local precursors of CD206⁺ IM. **a** Experimental outline for experiments using mixed BM competitive chimeras shown in **(b)**. **b** Percentage of BM chimerism and radio-resistance of the indicated populations. **c** Experimental outline for **(d)**. **d** Percentages of CD45.1/2⁺ cells within the indicated cell populations. **e** Survival (% of live animals) were monitored at the indicated mice after CpG treatment. *P*-values are versus CpG-injected WT mice. **f** Representative contour plot of Ly-6C and CD64, gated on singlet mononuclear cell-enriched CD45⁺ non-autofluorescent SSC^{lo}F4/80⁺CD11c⁻ cells (see Fig. 1a). Data are representative of 1 of 4 mice analyzed, each giving similar patterns. Data in **b,d** shown mean ± s.e.m., as well as individual mice in **(d)**, and are pooled from **(b)** 2 or **(d)** 3 independent experiments (**b**, n=3 [blood] or 7 [lung]; **d**, n=6-11/group). **e** Data were pooled from 2-4 independent experiments (n=10-26/group). *P*-values were calculated using **b** a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests, **d** non-parametric Mann-Whitney tests for pairwise comparisons or **e** Mantel-Cox tests. * *P*<0.05; ** *P*<10⁻²; **** *P*<10⁻⁴; ns, not significant. i.v., intravenous

Material and methods

Mice

C57BL/6J WT mice were purchased from Janvier Laboratories. *Ccr2*^{-/-}, *Nr4a1*^{-/-}, *Il10*^{-/-}, WT CD45.1 and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} (B6.129P-*Cx3cr1*^{tm1Litt/J}) mice under the C57/BL6J background were purchased from the Jackson Laboratory (Cat. # 004999, 006187, 002251, 002014 and 005582, respectively). CD45.1/2⁺ were obtained by crossing CD45.1⁺ with CD45.2⁺ mice. IL-10- β -lactamase reporter (ITIB) C57BL/6 mice were described elsewhere (Bouabe et al., 2011). *Cx3cr1*^{CreERT2}.*Rosa26-LSL-YFP* C57BL/6 mice were kindly provided by Pr. G. Boeckxstaens (KU Leuven, Belgium). *Cx3cr1*^{CreERT2} mice were originally obtained from Steffen Jung, Weizmann Institute of Science (Yona et al., 2013), and *Rosa26-LSL-YFP* mice were originally obtained from Daniel Richardson, University College London and are described elsewhere (Srinivas et al., 2001). All mice were housed and bred in institutional SPF facilities at the GIGA Institute (Liège University, Belgium) and were used at 7-11 weeks of age, unless otherwise indicated. *Cx3cr1*^{CreERT2}.*Rosa26-LSL-YFP* mice were bred and maintained at KU Leuven (Belgium). All animals and experimental procedures, except experiments involving *Cx3cr1*^{CreERT2}.*Rosa26-LSL-YFP* mice were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Liège. Fate-mapping experiments were approved by the Animal Care and Animal Experiments Committee of the Medical Faculty of the KU Leuven. The "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, as well as European and local legislations, were followed carefully.

Reagents and antibodies

A complete list of the reagents and antibodies used in this study can be found in the Supplementary Table 3.

Lung single cell isolation, stainings and flow cytometry

To obtain single-lung-cell suspensions, lungs were extensively perfused with 3 ml of HBSS (Lonza) through the right ventricle, cut into small pieces with razor blades, and digested for 1 h at 37°C in HBSS containing 5% v/v of FBS (Gibco), 1 mg.ml⁻¹ collagenase A (Roche) and 0.05 mg.ml⁻¹ DNase I (Roche). After 45 min of digestion, the suspension was flushed using a 18G needle to dissociate aggregates. PBS (Gibco) containing 10 mM of EDTA (Merck Millipore) was added to stop the digestion

process. The suspension was then filtered and enriched in mononuclear cells by using a density gradient (Percoll from GE Healthcare) and harvesting cells from the 1.080:1.038 g.ml⁻¹ interface.

Staining reactions were performed at 4°C in FACS buffer (PBS containing 50% v/v of Brilliant Stain Buffer [BD Pharmingen], 2.5 mg.ml⁻¹ of BSA [Sigma], 0.5 mg.ml⁻¹ of sodium azide [Acros Organics]) with 2% v/v of Fc block (BD Pharmingen) to reduce non-specific binding. Cell phenotyping was performed on a FACSLSRFortessa (BD Biosciences). Cell sorting was performed on a FACSAriaIII (BD Biosciences) using the nozzle 85 at a rate allowing minimum 85% of efficiency. The purity of sorted cells was consistently above 95% for every samples. Results were analyzed using FlowJo V10 (Tree Star Inc.). Normalized MFI represents MFI for each sample with the mean of control cells MFI subtracted.

Anti-mouse CD68, Lamp-1 and Ki-67 intracellular staining was performed by resuspending extracellular-stained cells in 500 µl of Fixation Buffer (Biolegend) for 40 min at room temperature (RT). Cells were then washed twice with 1 ml of permeabilization buffer (Thermo Fisher Scientific). Cells were stained for intracellular protein in 100 µl of fixation/permeabilization buffer (Thermo Fisher Scientific) with 2% v/v of Fc block (BD Pharmingen) for 30 min at RT.

For experiments involving ex vivo cultures and morphology assessment, cell suspensions were enriched by a magnetic-activated cell sorting (MACS) using anti-mouse CD11b microbeads (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's protocol, instead of the density gradient method. The negative fraction was also collected for the staining of AM.

Lung cell numbers were counted after whole lung digestion and mononuclear cell enrichment. The numbers of cells within each population were determined according to the gating strategy shown in Fig. 1a.

Lung single cell preparation for scRNA-seq

Lung tissue CD64-expressing cells were FACS-sorted as singlet mononuclear cell-enriched CD45⁺ non-autofluorescent SSC^{lo}F4/80⁺CD11c⁻Ly-6C^{lo}CD64⁺ cells as shown in Fig. 1a. In the first replicate experiment, IM were isolated from lung single-cell suspensions pooled from three 10-week-old C57BL/6 female WT mice. In parallel, AM were FACS-sorted as singlet mononuclear cell-enriched CD45⁺CD11c⁺ autofluorescent cells and were spiked in as controls at a ratio of 1:10. Such experiment was performed at KU Leuven (Belgium), while the second replicate was performed by independent experimenters through an independent pipeline using a pool of 6-month-old C57BL/6 female WT mice that were maintained in a different animal facility at the GIGA Institute (Liège University, Belgium).

The 10x Genomics platform (Single Cell 3' Solution) was used for scRNA-seq, and sequencing was performed at the Genomics Platform of the GIGA Institute (Liège University, Belgium) for both experiments. For scRNA-seq analysis of lung Ly-6C^{lo} and Ly-6C^{hi} monocytes, lung CD45⁺F4/80⁺CD11c⁻Ly-6C^{lo}CD64⁻ cells and CD45⁺F4/80⁺CD11c⁻Ly-6C^{hi}CD64⁻ cells were FACS-sorted, respectively. For each sample, an aliquot of Trypan blue-treated cells was examined under the microscope for counting, viability and aggregate assessment following FACS sorting. Viability was above 80% for all samples and no aggregate were observed. Cell preparations were centrifuged at 1,503 RCF for 4 minutes and pellets were resuspended in calcium- and magnesium-free PBS containing 0.4 mg.ml⁻¹ of UltraPure BSA (Thermo Fisher Scientific).

Sequencing libraries were generated by using the Chromium™ Single Cell 3' Reagent Kits v2 (10x Genomics) following manufacturer's instructions. GEM-RT was performed in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). After RT, GEMs were broken and the cDNAs were cleaned up with DynaBeads MyOne Silane beads (Thermo Fisher Scientific). cDNAs were then amplified in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler. According to the expected cell recovery (based on a 60% recovery of total loaded cells), number of amplification cycles was set to 12. Amplified cDNA products were cleaned up using SPRIselect Reagent kit (Beckman Coulter), after what purified cDNAs were quality controlled and quantified using an Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent) on a 2100 Bioanalyser (Agilent). Illumina's P5, P7 and Read2 primers, as well as Sample Index were then added to generate sequencing libraries following Chromium™ Single Cell 3' Reagent Kits v2 protocol. Steps were as follows: (1) enzymatic fragmentation, end repair and A-tailing, (2) Double Sided Size Selection using SPRIselect reagent, (3) adaptor ligation, (4) post ligation cleanup with SPRIselect reagent, (5) Sample index PCR (number of cycles set to 14) and (6) Double Sided Size Selection using SPRIselect reagent. The barcoded sequencing libraries were quality controlled using an Agilent High Sensitivity DNA kit on a 2100 Bioanalyser and quantified by quantitative PCR (KAPA Biosystems Library Quantification Kit for Illumina platforms).

Sequencing libraries were loaded at 1.4 pM on an Illumina NextSeq500 with NextSeq 500/550 Mid Output v2 kit (150 cycles) (Illumina) using the following read lengths: 26 bp for Read1 (16 bp Barcode + 10 bp Randomer), 8 bp for Sample Index and 58 bp for Read2. Cell Ranger software (v1.2.0) (10x Genomics) was used to demultiplex Illumina BCL files to FASTQ files (cellranger mkfastq), to perform alignment (to mouse GRCm38/mm10 genome), filtering, UMI counting and to produce gene – barcode matrices (cellranger count).

Analysis of scRNA-seq samples

Analyses used R Bioconductor (Gentleman et al., 2004) (version 3.4.2), and the R package Seurat (Macosko et al., 2015) (version 2.3.4).

Briefly, for analysis of lung CD64-expressing mononuclear phagocytes, we first performed a quality control analysis and selected cells for further analysis in each replicate. Cells with a minimum of 200 and a maximum of 2,500 detected genes were included, and cells with more than 5% of mitochondrial genes were excluded (Supplementary Fig. 2). In addition, only genes detected in at least 3 cells were included. Gene counts were normalized by using a global-scaling method that normalizes the gene expression measurements for each cell by the total expression, multiplies it by 10,000 and log-transforms the result. The FindVariableGenes function was used to calculate highly variable genes with the *x.low.cutoff*, *x.high.cutoff* and *y.cutoff* parameters set to 0.0125, 3 and 0.5, respectively. Cell-cell variation in the number of detected unique molecular identifiers (UMI) was regressed out using the ScaleData function. To analyze both replicates simultaneously, we used the MergeSeurat function, creating a new object with the resulting combined data matrices and appending a given identifier to each cell name depending on which original object the cell comes from. Linear dimensional reduction was performed on the scaled data using the RunPCA function. To identify the number of statistically significant principal components (PC) to include for subsequent analyses, we used the JackStraw function, which implements a resampling test inspired by the JackStraw procedure (Macosko et al., 2015). Alternatively, we used the PCElbowPlot function, looked at a plot of the standard deviations of the PC and determined our cutoff where there is an elbow on the graph, located at ~PC8. PC 1:8 were thus used in the subsequent analyses. We also performed analyses including lower and higher numbers of PC (1:6 to 1:12) and did not find any substantial differences in the results obtained.

The cells were clustered via the FindClusters function. Several cluster resolutions were tested, and the resolution of 0.2 was chosen, since higher resolutions created additional subdivisions or clusters containing singlets, which were considered not biologically relevant. To visualize the data, non-linear dimensional reduction was used, and *t*-SNE plots were created by using the RunTSNE function, with the number of dimensions to use set to 8 (PC 1:8). To eliminate a potential contamination with cells outside the MPS, data were subset using the SubsetData function in order to only keep cell clusters expressing detectable levels of the *Csf1r* gene.

Differential expression (DE) analysis between clusters was performed using the FindMarkers function, which uses a likelihood ratio test based on zero-inflated data to identify positive and negative markers of a single cluster compared to some or all other clusters. Only DE genes with an adjusted *P*-value $<10^{-2}$ were retained. To compare Cluster 3 (i.e., AM) with Clusters 1, 2 and 4 (i.e., tissue CD64-expressing cells), lists of the significantly DE genes between Cluster 3 and Clusters 1, 2 and 4 were

generated. To compare the clusters of lung tissue CD64-expressing cells (i.e., Clusters 1, 2 and 4) with each other, lists of the significantly DE genes between Cluster 1 and Clusters 2 and 4, Cluster 2 and Clusters 1 and 4, or Cluster 4 and Clusters 1 and 2 were generated. Based on these lists of DE genes, Gene ontology analyses were performed using the Gene Ontology Consortium website (<http://geneontology.org/>) referring to the GO Ontology database released on 2018/12/01.

To visualize specific marker expression, the DotPlot function was used to show average expression of the genes and percentage of cells expressing the indicated genes within each cluster. Alternatively, the FeaturePlot or DoHeatmap functions were used to show specific gene expression across single cells.

For subsequent analyses, a similar procedure as described above was used with minor adaptations. For analysis of lung Ly-6C^{lo} and Ly-6C^{hi} monocytes, cells with a maximum of 3,000 detected genes were included, PC 1:8 were used and a resolution of 0.1 is shown for the cell clustering depicted in Supplementary Figs. 9d and 12. To compare Ly-6C^{lo} patrolling and lung CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, data of original Cluster 4 (i.e., CD64⁺CD16.2⁺ monocytes) were subset from the dataset of lung CD64-expressing mononuclear phagocytes and merged with the data of Ly-6C^{lo} monocytes. PC 1:8 and a resolution of 0.3 were used for the cell clustering and subsequent analyses depicted in Fig. 6, Supplementary Figs. 13 and 14a, b.

For the graphical representation of RNA velocities, a Seurat object encompassing lung CD64-expressing mononuclear phagocytes, Ly-6C^{lo} patrolling monocytes and Ly-6C^{hi} classical monocytes was created and the corresponding *t*-SNE plot (PC 1:8) was used as shown in Fig. 6, Supplementary Figs. 13 and 14a, b.

Transcriptomic comparison of lung IM subsets

To compare CD206⁻ and CD206⁺ IM subsets with Lyve1^{hi}MHCII^{lo} and Lyve1^{lo}MHCII^{hi} IM subsets reported in Chakarov et al. (Chakarov et al., 2019), we generated CD206⁻ and CD206⁺ IM signatures (i.e., upregulated genes in CD206^{-/+} vs. CD206^{+/+} IM, respectively) based on our scRNA-seq data. Briefly, in order to be comparable between two analyses, numbers of genes within the CD206⁻ and CD206⁺ IM signatures should be similar to those of Lyve1^{hi}MHCII^{lo} and Lyve1^{lo}MHCII^{hi} IM signatures. Using the FindMarkers function (Seurat package (Butler et al., 2018)), we selected genes with a log fold change threshold of 0.1, and that are expressed in more than 10% of cells. The Venn diagram was generated with a publicly available online tool (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was

performed to analyze enrichment of published Lyve1^{hi}MHCII^{lo} and Lyve1^{lo}MHCII^{hi} IM signatures (Chakarov et al., 2019) in CD206⁻ and CD206⁺ IM (see below).

To compare CD206⁻ and CD206⁺ IM subsets with the IM1, IM2 and IM3 populations reported in Gibbings et al. (Gibbings et al., 2017), data of expression counts were downloaded from Gene Expression Omnibus database (accession GSE94135) and analyzed with DESeq2 package (Love et al., 2014) for differential expression analysis, hierarchical clustering and PCA analysis. As a high similarity was found between IM1 and IM2 signatures, we generated an IM1&IM2 shared signature (634 genes) and an IM3 signature (97 genes), which were used as gene sets in the GSEA analysis described below.

For GSEA, in order to analyze enrichment of published signatures in our scRNA-seq data, the normalized counts were used as expression datasets in GSEA. Briefly, genes were ranked based on their expression in CD206⁺ and CD206⁻ macrophages by Signal2Noise method. Normalized Enrichment Score (NES), FDR and nominal p-value were calculated with 100 permutations between samples from different phenotypes.

Cytologic examination

Cytologic examination of FACS-sorted populations was performed on cytospin preparations stained with Hemacolor® (Merck, Cat. 111955, 111956, 111957). Sections were examined with a FSX100 microscope (Olympus) and size comparisons were performed using Image J software (NIH).

In vivo labelling of vascular leukocytes

Lightly isoflurane anesthetized C57BL/6J WT mice were injected i.v. with 300µL of PBS, or with 0.5 µg of mouse APC-conjugated anti-mouse CD45.2 antibodies in 300 µl PBS. The antibodies were allowed to circulate for 3 minutes prior to euthanasia in order to label all leukocytes present in the vascular compartment. Lungs were harvested without perfusion and were processed for flow cytometry analysis.

Assessment of phagocytic activity

Lightly isoflurane anesthetized C57BL/6J WT mice were injected i.t. or i.v. with 6.10⁸ pHrodo™ Green *E. coli* BioParticules™ (Thermo Fisher Scientific, Cat. P35366) in 100 µl and 200 µl of PBS respectively. Lungs were harvested 3 hours later for cell isolation, staining and flow cytometry analysis.

Fate-mapping of lung CX3CR1⁺ cells

The induction of Cre recombinase to trace CX3CR1⁺ cells was performed as described elsewhere (De Schepper et al., 2018). Briefly, 4 week-old *Cx3cr1*^{CreERT2}.*Rosa26-LSL-YFP* mice were treated three times subcutaneously with 4 mg TAM (Sigma, Cat. T5648) per 30 g body weight dissolved in corn oil (Sigma, Cat. C8267), 48 h apart. The mice were sacrificed after 2, 9, 28 and 52 weeks, and lungs were processed for flow cytometry analysis. Lungs from untreated *Cx3cr1*^{CreERT2}.*Rosa26-LSL-YFP* mice were used as negative control.

Immunostainings and confocal microscopy analyses

Freshly collected lungs from C57BL/6J WT and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice were embedded and frozen in OCT compound (Q Path Freeze gel, VWR), and then cut in 10 µm cryosections. Tissue sections were then fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at RT, permeabilized in 0.5% v/v of Triton-X100 (Sigma) for 2 min at RT and blocked in PBS containing 2% v/v of BSA and 2% of goat serum (Sigma) for 1 hour at RT. Sections were first stained with a rat anti-mouse CD68 (dilution 1:100) for 2 hours at RT, then with an AF568-conjugated goat anti-rat antibody (dilution 1:1000) for 2 hours at RT. For samples isolated from *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice, sections were then stained overnight at 4°C with AF488-conjugated antibodies against GFP (dilution 1:200) and AF647-conjugated antibodies against CD16.2 (1:20), CD206 (1:100) or MHC-II (1:50). For samples isolated from WT mice, sections were then stained overnight at 4°C with AF647-conjugated antibodies against CD31 (1:200) or Tubb3 (1:100), and AF488-conjugated antibodies against CD16.2, CD206 or MHC-II. For assessment of MHC-II and CD206 co-expression, WT sections were simultaneously stained with antibodies against MHC-II and CD206. Cell nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Biolegend) for 5 min at RT. Sections were mounted with Prolong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher) and stored for at least 5 hours at RT. Samples were rinsed 3 times in PBS between each of the above-mentioned steps. Images were acquired on a Zeiss LSM 880 confocal microscope (Zeiss) and analyzed using the ZEN 2.3 software (Zeiss).

Spatial distribution was quantified by analyzing, for each sample, 5 or 10 fields (magnification 20x) containing at least one CX3CR1⁺CD68⁺ cell in the peribronchial/perivascular area or the alveolar parenchyma, respectively. For each sample, the mean of the numbers of CX3CR1⁺CD68⁺CD206⁺, CX3CR1⁺CD68⁺MHC-II⁺ and CX3CR1⁺CD68⁺CD16.2⁺ cells per field was used to calculate the spatial distribution of these cells. Double positivity for CD206 and MHC-II was quantified by analyzing, for each sample, 5 fields (magnification 20x) in peribronchial/perivascular and alveolar parenchymal areas containing at least one CD68⁺CD206⁺ or CD68⁺MHC-II⁺ cell. For each sample, the numbers of

CD68⁺CD206⁺, CD68⁺MHC-II⁺ cells and CD68⁺CD206⁺MHC-II⁺ cells were used to calculate the percentage of CD206/MHC-II double positive cells.

Proteome profiler assay

CD206⁻ and CD206⁺ IM subpopulations were FACS-sorted from naive C57BL/6J WT mice and 5.10⁴ cells were cultured in an F-bottom 96-well plate during 16 hours in 100 µl of RPMI with L-glutamine (Lonza) supplemented with 10% v/v FBS, 1% v/v MEM non-essential amino acids (Gibco), 1 mM sodium pyruvate (GE Healthcare), 50 U.ml⁻¹ penicillin/streptomycin (Gibco), 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Gibco), with or without 10 ng.ml⁻¹ of LPS (Sigma). For each experimental condition, supernatants were tested for the presence of cytokines and chemokines using a proteome profiler mouse XL cytokine array (R&D Systems), according to manufacturer instructions. Results were visualized using a ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) and analyzed using ImageJ software. Results are expressed as Z-scores for each analyte ([individual value – analyte mean] per analyte standard deviation).

Assessment of IL-10 expression in ITIB mice

The assessment of IL-10 expression using IL-10-β-lactamase reporter ITIB mice (Bouabe et al., 2011), lung cells from IL-10-β-lactamase reporter ITIB and control WT mice were resuspended in a CCF4-AM (Thermo Fisher Scientific, Cat. K1028)-containing solution supplemented with probenecid (Thermo Fisher Scientific, Cat. P36400) prepared according to manufacturer's instructions, and incubated 90 minutes at 29°C. CCF4-loaded cells were then classically stained and analyzed by flow cytometry. CCF4-loaded cells from C57BL/6J WT mice were used as negative controls.

Predictive analyses of scRNA-seq

RNA velocities in single cells were estimated with RNA velocity (<http://velocity.org>) (La Manno et al., 2018). Briefly, spliced and non-spliced transcripts counts were calculated from CellRanger output using Python command line tool velocity with default run10x subcommand. Genes with minimum average expression of 0.5 (for spliced transcripts) or 0.05 (for non-spliced transcripts) within at least one cell cluster were filtered before velocity estimation. RNA velocities were estimated using 20 k-nearest neighbors (NN) in slope calculating smoothing, and fit quantile of 0.02. RNA velocities were then visualized using correlation-based transition probability matrix within the kNN graph, with same cluster labels and embedding as in Fig. 6a.

To compare RNA velocity across subsets of Ly-6C^{lo} patrolling monocytes, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and CD206⁻ IM, the relative distance from the cell position in the 2D-tSNE plot to the projected position (i.e., effective length of arrows displayed in Supplementary Fig. 13b) was used to illustrate the RNA velocity of each cell.

Cell fate decision estimation

Cell fate decision was represented by RNA-velocity-based single-step transition probabilities from starting cells to neighboring cells. To illustrate cell fate decision probabilities of all cells in a given subset (i.e., the starting subset), the total transition probability (TP_n) to neighboring cells *n* was calculated as the sum of all transition probabilities (TP_{in}) of single cells in the given subset (containing *j* cells), and corrected by the number of cells:

$$TP_n = \frac{\sum_{i=1}^j TP_{in}}{j}$$

For illustration, transition possibility of each cell position was indicated by a color gradient while an ellipse marked the starting subset of interest with 95% confidence on the cell positions in the subset.

Trajectory analyses

For trajectory analyses, the previously published package Slingshot (Street et al., 2018) was used. Briefly, Slingshot uses pre-existing clustering information to calculate development trajectory and pseudo-time of each cell in the development trajectory. To analyze the differentiation trajectory from Ly-6C^{lo} patrolling monocytes to CD206⁻ IM subpopulation, we reanalyzed the data sets shown in Fig. 6a with Seurat using higher resolution (i.e., 2.5), and the 5 clusters covering Ly-6C^{lo} patrolling monocytes, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and neighboring CD206⁻ IM were used for Slingshot analysis. For clarity purposes, the original *t*-SNE embedding of Fig. 6a was retained to illustrate cell positions in Fig. 6e and the ellipses with 80% confidence were drawn to illustrate their cluster belonging shown in Fig. 6a using the same colors. To find the temporally expressed genes through trajectory, we used the method suggested in the Slingshot package to regress genes on the pseudo-time variable using a general-additive model. Expression of the top 100 genes on p-value was showed in a heatmap across all cells in selected subsets.

White blood cell isolation

To obtain single-blood-cell suspensions, blood was collected in a tube containing 500 μ L of PBS (Gibco) containing 100 mM of EDTA (Merck Millipore) and red blood cells were lysed by adding distilled water containing 150 mM of ammonium chloride (VWR) and 10 mM of potassium bicarbonate (Sigma). Cells were then centrifuged, resuspended in FACS buffer and stained as described for lung cells in the respective section above.

Bone marrow mixed chimeras

Eighteen-week-old CD45.1/2⁺ WT mice were lethally irradiated with two doses of 6 Gy 3 hours apart. Two hours after the second irradiation, these mice were injected i.v. with 2 x 10⁶ bone marrow (BM) cells consisting of a 1:1 mix of BM cells obtained from CD45.1⁺ WT and CD45.2⁺ *Nr4a1*^{-/-} mice. From the day before irradiation, mice were treated for 4 weeks with 0.05 mg.ml⁻¹ of enrofloxacin (Baytril, Bayer). Chimerism was assessed by flow cytometry in the blood and the lung 6 and 14 weeks after irradiation, respectively. In the blood, B lymphocytes, Ly-6C^{lo} monocytes, Ly-6C^{hi} monocytes and neutrophils, were defined as CD45⁺ CD11b⁻Ly-6G⁻CD19⁺, CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁻CD115⁺Ly-6C⁻, CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁻CD115⁺Ly-6C⁺ and CD45⁺CD11b⁺ Ly-6G⁺ cells, respectively.

Monocyte adoptive transfers

Blood cells of CD45.1/2⁺ mice were collected and stained for FACS sorting of Ly-6C^{hi} and Ly-6C^{lo} monocytes, defined as CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly-6C⁺ and CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly-6C⁻ cells, respectively. These cells were then transferred to CD45.2⁺ WT recipient mice by injecting 10⁵ Ly-6C^{hi} or Ly-6C^{lo} monocytes i.v. into each mouse. Lungs were harvested 7 days later for cell isolation, staining and flow cytometry analysis.

Intratracheal instillations of TLR ligands

Lightly isoflurane anesthetized C57BL/6J WT mice were injected i.t. with Pam3CSK4, LPS or CpG (25 μ g, 10 μ g and 50 μ g, respectively) in 50 μ l of PBS. Lungs were harvested 1, 3, 5, 7, 14 or 28 days later for cell isolation, staining and flow cytometry analyses. C57BL/6J WT, *Ccr2*^{-/-}, *Nr4a1*^{-/-}, and *Il10*^{-/-} and WT *Nr4a1*^{-/-} 1:1 BM mixed chimeras mice were injected i.t. with 50 μ g of CpG in 50 μ l of PBS. The survival of these mice was assessed and lungs from WT, *Nr4a1*^{-/-} and *Il10*^{-/-} mice were harvested 3 days later for flow cytometry analysis. ITIB mice were injected i.t. with 50 μ g of CpG in 50

µl of PBS and their lungs were harvested 7 days later for cell isolation, staining and IL-10 production analysis by flow cytometry.

Statistical analysis

Data from independent experiments were pooled for analysis in each data panel, unless otherwise indicated. Statistical analyses were performed using Prism 7 (GraphPad Software), SAS (version 9.3) and R bioconductor (Gentleman et al., 2004) (version 3.4.2). Data were presented as mean \pm s.e.m., as well as individual values, unless otherwise indicated. We considered a *P*-value lower than 0.05 as significant. *, $P < 0.05$; **, $P < 10^{-2}$; ***, $P < 10^{-3}$; ****, $P < 10^{-4}$; ns, not significant. Details about the statistical tests used can be found in the respective Figure legends. Details about the analysis of scRNA-seq data can be found in the respective sections above.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The scRNA-seq data provided in this manuscript have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-7678>) under accession number E-MTAB-7678. The source data underlying Figs 1f, g and j; 2b, c, f and h; 3c-f; 4b; 5d, f, h and i; and 7b, d and e and Supplementary Figs. 7c; 8 b and d; 9b; and 10 are provided as a Source Data file, as mentioned in the respective Figure legends.

Acknowledgments

We thank all members of the Laboratories of Cellular and Molecular Immunology and Immunophysiology (GIGA Institute) for discussions; Michel Georges, Laurence Fievez and Catherine Sabatel for their precious help and advices; Sandra Ormenese, Raafat Stefan and Jean-Jacques Goval from the GIGA Flow Cytometry and Cell Imaging Platform; Pierre Drion and all staff members from the GIGA Mouse facility and Transgenics Platform; Chantal Humblet and staff members from the Immunohistology Platform; Benoît Charlotiaux, Manon Deckers, Latifa Karim and members from the GIGA Genomics Platform; Cédric François, Pauline Maréchal, Raja Fares and Ilham Sbai for their excellent technical and administrative support; the GIGA Genomics Platform and the VIB Single Cell Accelerator program for supporting the 10X genomics platforms. F.B. is supported by the F.R.S.-FNRS for the FRFS-WELBIO under grant CR-2012S-01R and by an Excellence Of Science (EOS) program from the F.R.S.-FNRS and FWO. T.M. is a Research Associate of the F.R.S.-FNRS and is supported by an Incentive Grant for Scientific Research of the F.R.S.-FNRS (F.4508.18), by the FRFS-WELBIO under grant CR-2017s-04, by the Acteria Foundation and by an ERC Starting Grant (ERC StG 2018 IM-ID: 801823).

Authors contributions

T.M. conceived the project. J.S., S.D.S., S.C., D.P., F.G., G.B., F.B. and T.M. were involved in experimental design. J.S. realized most experiments with the help of C.Ru. and C. Ra., S.D.S. and S.C. Q.B., D.P. and T.M. performed the bioinformatic analyses of scRNA-seq data. S.D.S. and G.B. helped with fate-mapping experiments involving *Cx3cr1^{CreERT2}.Rosa26-LSL-YFP* mice. F.F. helped with statistical analyses. J.S. compiled the data and prepared the figures with the help of Q.B. T.M. secured funding. T.M. wrote the manuscript with the help of J.S. All authors provided feedback on the manuscript.

References

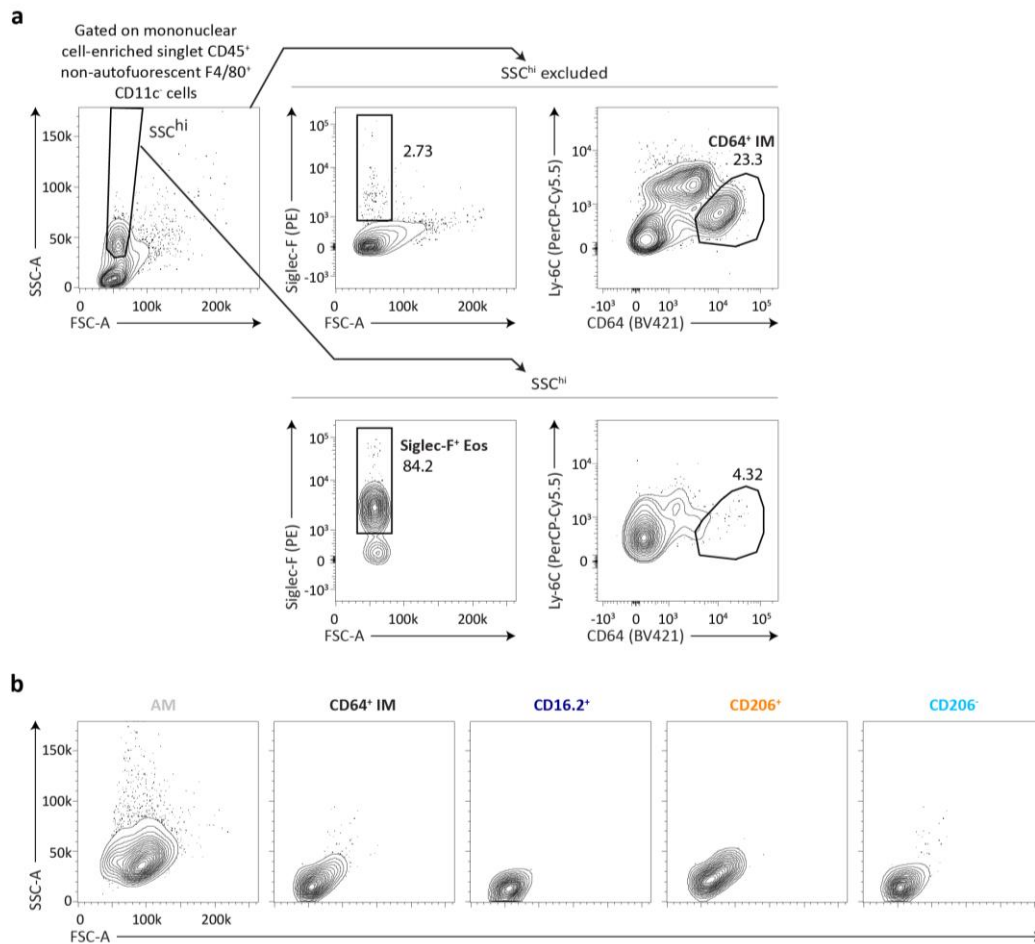
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., et al. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3723–3738.
- Bouabe, H., Liu, 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 IL-10 in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 3165–3176.
- Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., and Satija, R. (2018). Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* *36*, 411–420.
- Chakarov, S., Lim, H.Y., Tan, L., Lim, S.Y., See, P., Lum, J., Zhang, X.-M., Foo, S., Nakamizo, S., Duan, K., et al. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* *363*.
- Cohen, M., Giladi, A., Gorki, A.-D., Solodkin, D.G., Zada, M., Hladik, A., Miklosi, A., Salame, T.-M., Halpern, K.B., David, E., et al. (2018). Lung Single-Cell Signaling Interaction Map Reveals Basophil Role in Macrophage Imprinting. *Cell* *175*, 1031-1044.e18.
- De Schepper, S., Verheijden, S., Aguilera-Lizarraga, J., Viola, M.F., Boesmans, W., Stakenborg, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Boeckx, B., Dierckx de Casterlé, I., et al. (2018). Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* *175*, 400-415.e13.
- Draijer, C., Boorsma, C.E., Robbe, P., Timens, W., Hylkema, M.N., Ten Hacken, N.H., van den Berge, M., Postma, D.S., and Melgert, B.N. (2017). Human asthma is characterized by more IRF5+ M1 and CD206+ M2 macrophages and less IL-10+ M2-like macrophages around airways compared with healthy airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* *140*, 280-283.e3.
- Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014a). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* *41*, 21–35.
- Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., and Mantovani, A. (2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 337–366.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* *5*, R80.
- 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., et al. (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *57*, 66–76.
- Ginhoux, F., and Guillems, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* *44*, 439–449.
- Guillems, M., and Scott, C.L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 451–460.
- Guillems, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013a). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* *210*, 1977–1992.

- Guilliams, M., Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2013b). Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol.* *6*, 464–473.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013c). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* *210*, 1977–1992.
- Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat. Immunol.* *12*, 778–785.
- Hopstädter, 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.
- Hussell, T., and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 81–93.
- 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.
- Kawano, H., Kayama, H., Nakama, T., Hashimoto, T., Umemoto, E., and Takeda, K. (2016). IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *Int. Immunol.* *28*, 489–501.
- La Manno, G., Soldatov, R., Zeisel, A., Braun, E., Hochgerner, H., Petukhov, V., Lidschreiber, K., Kastrioti, M.E., Lönnerberg, P., Furlan, A., et al. (2018). RNA velocity of single cells. *Nature* *560*, 494–498.
- van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., et al. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* *44*, 755–768.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* *159*, 1312–1326.
- 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.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., et al. (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* *161*, 1202–1214.
- Mesnil, C., Raulier, S., Paulissen, G., Xiao, X., Birrell, M.A., Pirotin, D., Janss, T., Starkl, P., Ramery, E., Henket, M., et al. (2016). Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J. Clin. Invest.* *126*, 3279–3295.

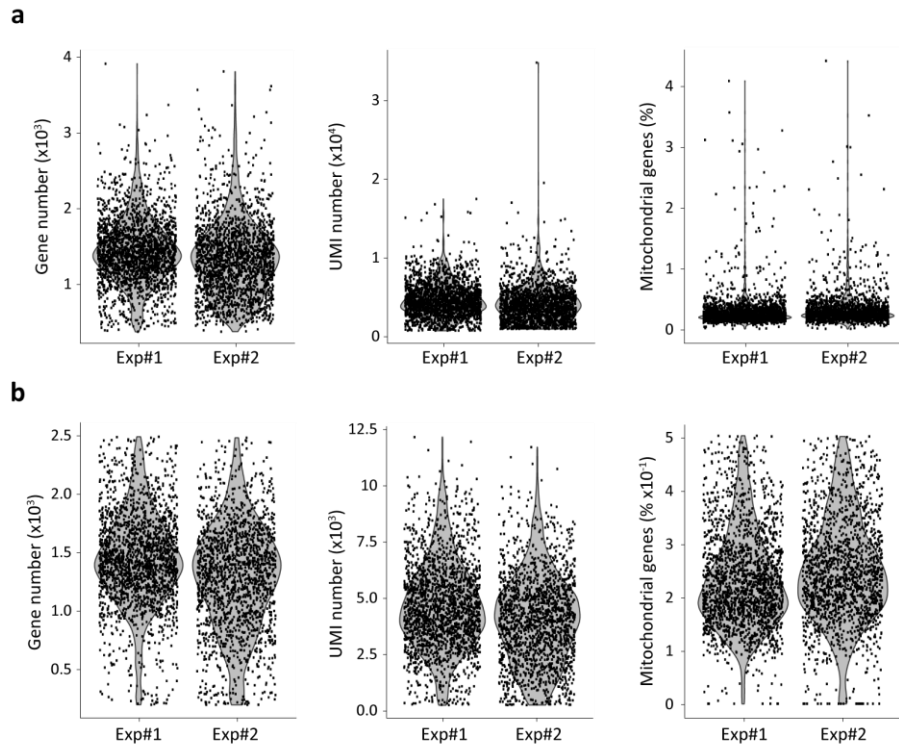
- Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul, F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., et al. (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP β Transcription Factor Dependence of Ly6C⁺ Cells. *Immunity* 46, 849-862.e7.
- von Mutius, E. (2016). The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 680–689.
- Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2016). Tissue biology perspective on macrophages. *Nat. Immunol.* 17, 9–17.
- Rodero, M.P., Poupel, L., Loyher, P.-L., Hamon, P., Licata, F., Pessel, C., Hume, D.A., Combadière, C., and Boissonnas, A. (2015). Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *ELife* 4, e07847.
- Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirottin, D., Xiao, X., et al. (2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* 46, 457–473.
- Schneider, C., Nobs, S.P., Kurrer, M., Rehrauer, H., Thiele, C., and Kopf, M. (2014). Induction of the nuclear receptor PPAR- γ by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat. Immunol.* 15, 1026–1037.
- Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., et al. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat. Commun.* 7, 10321.
- Scott, C.L., T'Jonck, W., Martens, L., Todorov, H., Sichien, D., Soen, B., Bonnardel, J., De Prijck, S., Vandamme, N., Cannoodt, R., et al. (2018). The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity* 49, 312-325.e5.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259–1260.
- Street, K., Risso, D., Fletcher, R.B., Das, D., Ngai, J., Yosef, N., Purdom, E., and Dudoit, S. (2018). Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics* 19, 477.
- Takata, K., Kozaki, T., Lee, C.Z.W., Thion, M.S., Otsuka, M., Lim, S., Utami, K.H., Fidan, K., Park, D.S., Malleret, B., et al. (2017). Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. *Immunity* 47, 183-198.e6.
- Tan, S.Y.S., and Krasnow, M.A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Dev. Camb. Engl.* 143, 1318–1327.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- Zheng, G.X.Y., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Zivaldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., et al. (2017). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.* 8, 14049.

Supplementary material

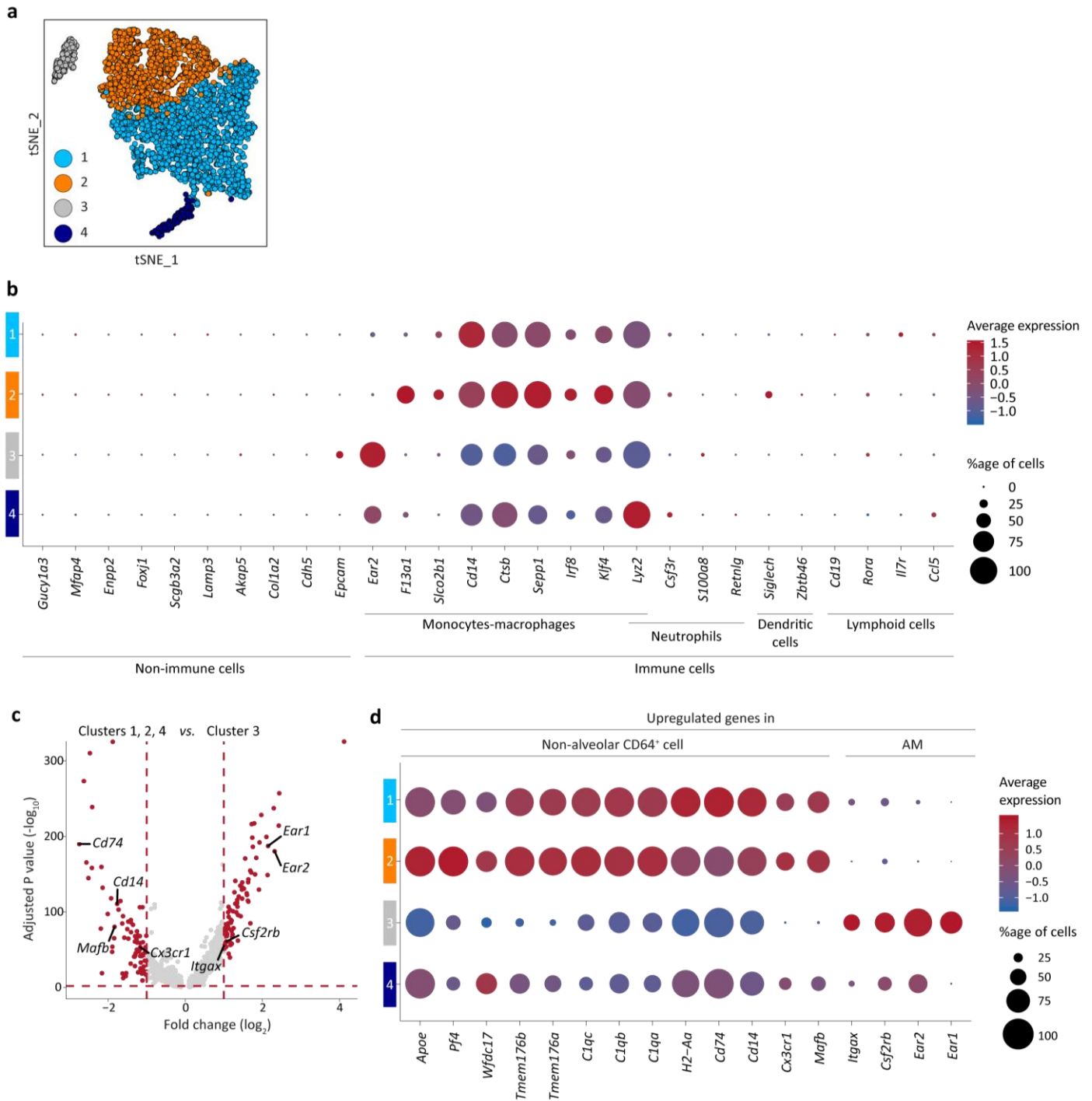
Supplementary figures



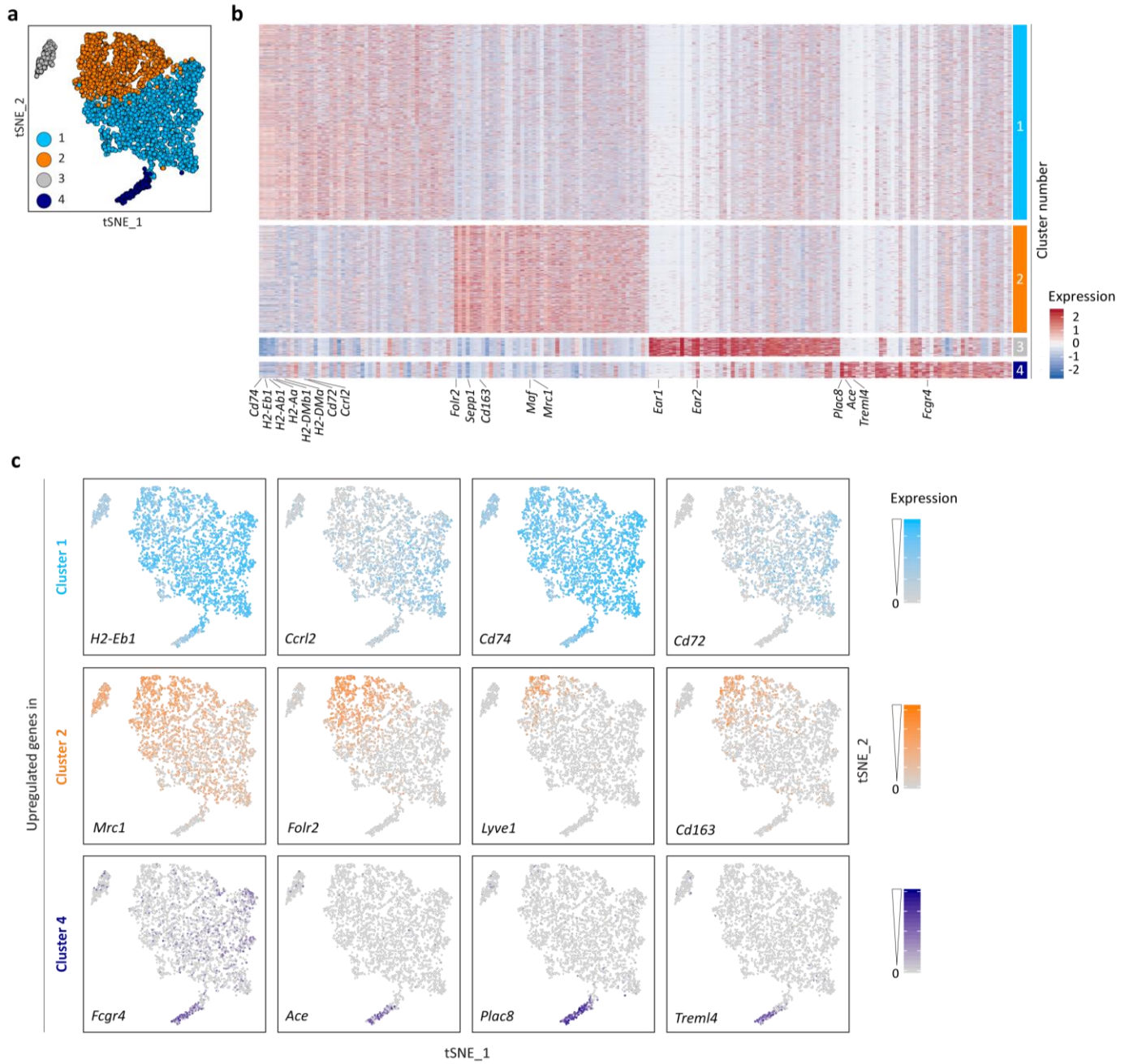
Supplementary Figure 1 Validation of the gating strategy used to delineate AM and IM subsets (see Fig. 1). **a** Siglec-F staining was used to confirm that eosinophils were efficiently excluded without substantial loss of CD64⁺ IM. Representative contour plots of the indicated markers are shown for (top) SSC^{hi}-excluded cells or (bottom) SSC^{hi} cells. Numbers indicate the percentage of cells within the indicated gate. **b** FSC/SSC back-gating of AM, CD64⁺ IM (as shown in Fig. 1a) and IM subsets (as shown in Fig. 1e).



Supplementary Figure 2 Homogeneity in the numbers of detected genes and UMIs, and low percentage of mitochondrial genes within the independent replicates analyzed by scRNA-seq in Figure 1. **(a,b)** Gene numbers (left), Unique Molecular Identifiers (UMI) numbers (middle) and percentage of mitochondrial genes (right) detected in single cells from the indicated groups **(a)** before and **(b)** after selection and filtering, presented as violin plots (height: gene numbers [left], UMI numbers [middle] and % Mitochondrial genes [right]; width: abundance of cells) and individual dots representing individual cells. Exp, experiment.

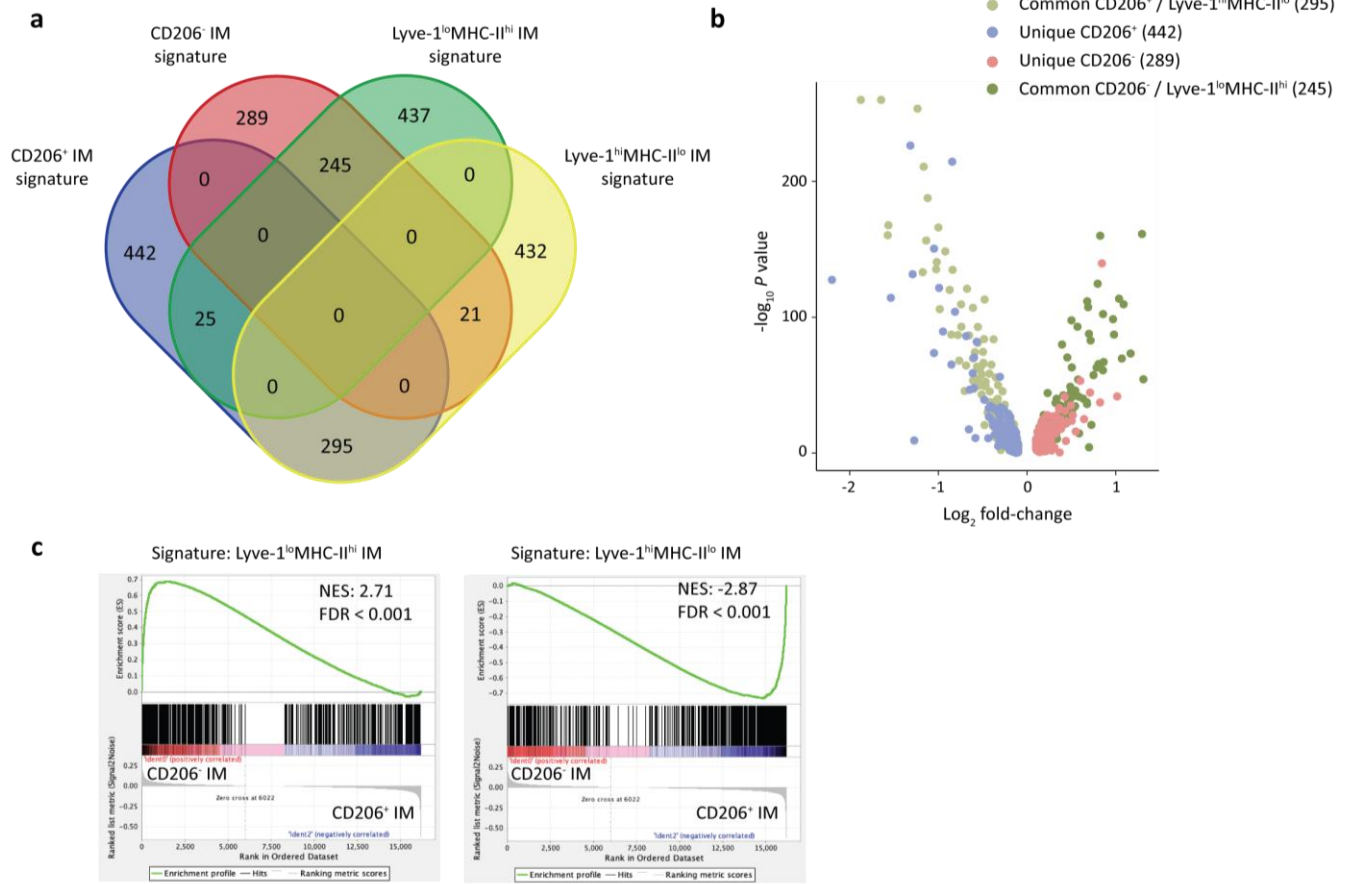


Supplementary Figure 3 The lung CD64⁺ cells analyzed by scRNA-seq were identified as monocytes/macrophages. **a** t-SNE plot depicting the cell clusters analyzed by scRNA-seq in Figure 1. **b** Dot plots showing average expression of genes within each cluster. We ruled out any contamination by non-immune cells, lymphoid cells, neutrophils or dendritic cells (DC) and confirmed a high expression of prototypical markers of the MPS, such as *Cd14*, *Ctsb*, *Irf8* and *Klf4* (Cohen et al., 2018; Scott et al., 2018). **c** Volcano plot representation of the differentially expressed genes between Clusters 1, 2 and 4 (i.e., non-alveolar CD64⁺ cells) and Cluster 3 (i.e., AM). Genes with an adjusted *P* value (*P*_{adj}) < 10⁻² and a biological FC > 2 are colored in red. A total of 1,332 genes were differentially expressed between Cluster 3 (AM) and Clusters 1, 2 and 4 (*P*_{adj} < 10⁻²). **d** Dot plots showing average expression of genes within each cluster. Examples of genes differentially regulated (*P*_{adj} < 10⁻²) between non-alveolar CD64⁺ cells and AM are depicted. Cluster 3 was characterized by high expression of *Itgax* (encoding CD11c), *Csf2rb*, *Ear1*, *Ear2*, thus representing AM (Schneider et al., 2014). AM, alveolar macrophage; FC, fold change.

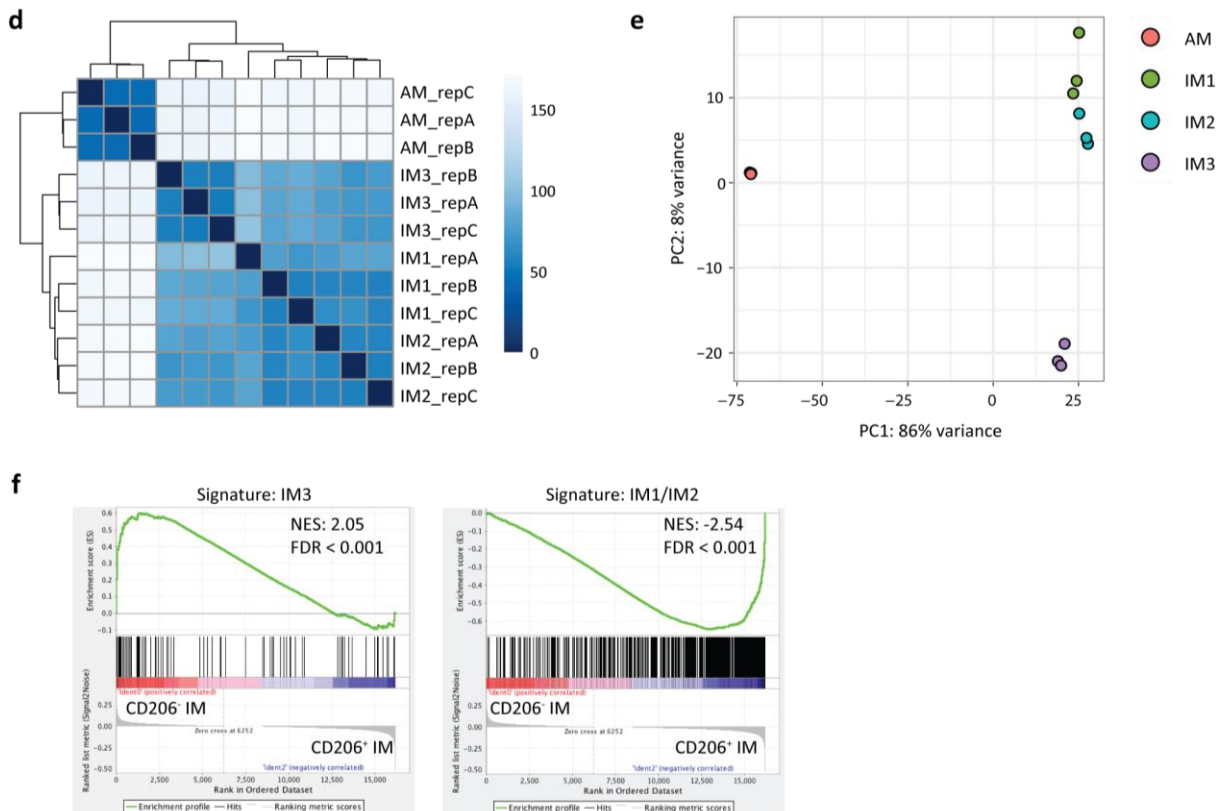


Supplementary Figure 4 Single cell expression of cluster-related genes. **a** *t*-SNE plot depicting the cell clusters analyzed by scRNA-seq in Figure 1. **b** Heatmap depicting the single-cell expression of the 50 most upregulated genes across identified clusters shown in the *t*-SNE plot in **a**. Inserts indicate the name of individual genes. **c** *t*-SNE plot showing single cell expression of the genes depicted in Fig. 1d.

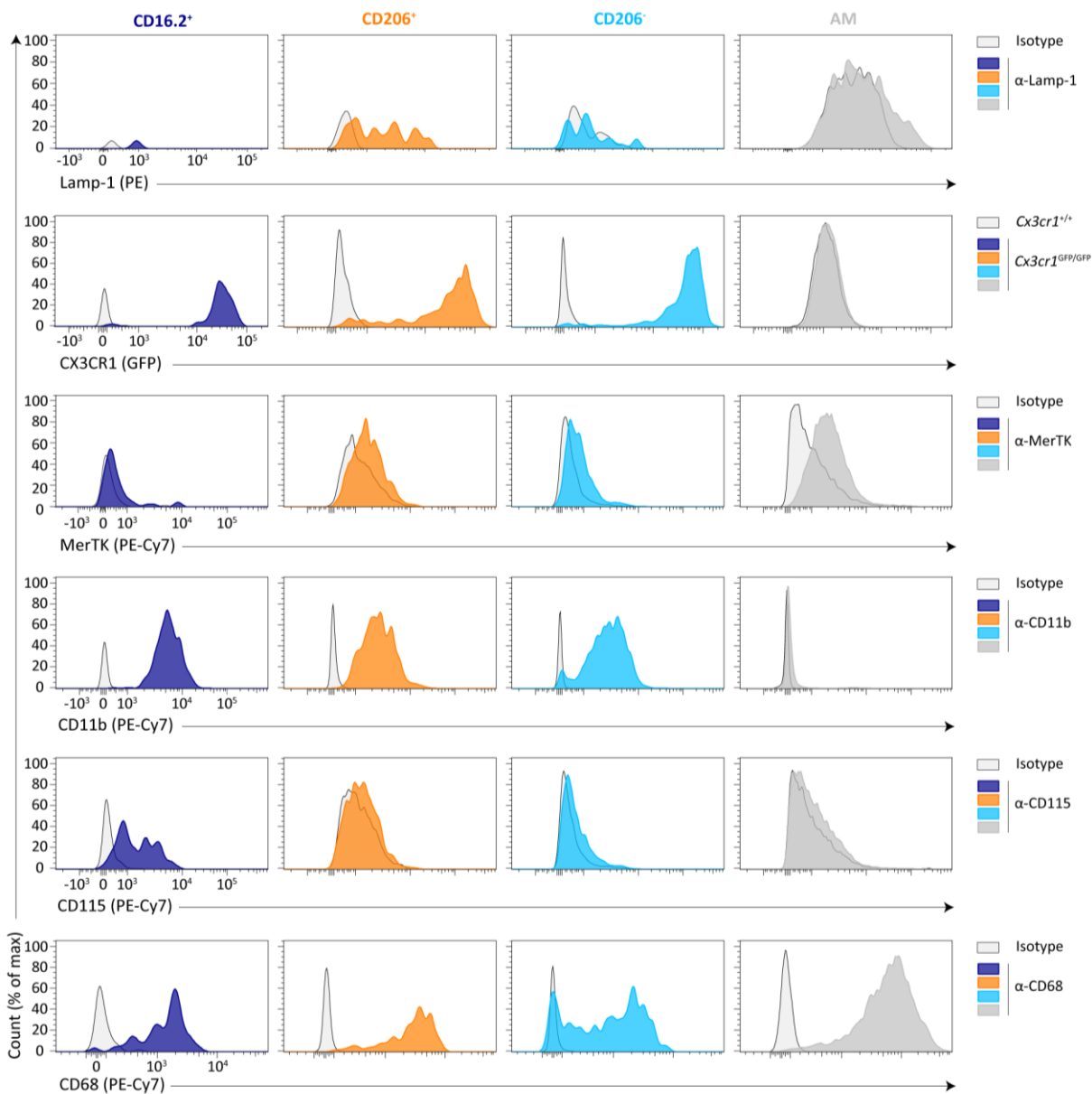
Comparison of CD206⁺ and CD206⁻ IM with Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} and Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} IM (Ckaravol *et al.*, *Science* **363** (6432), (2019))



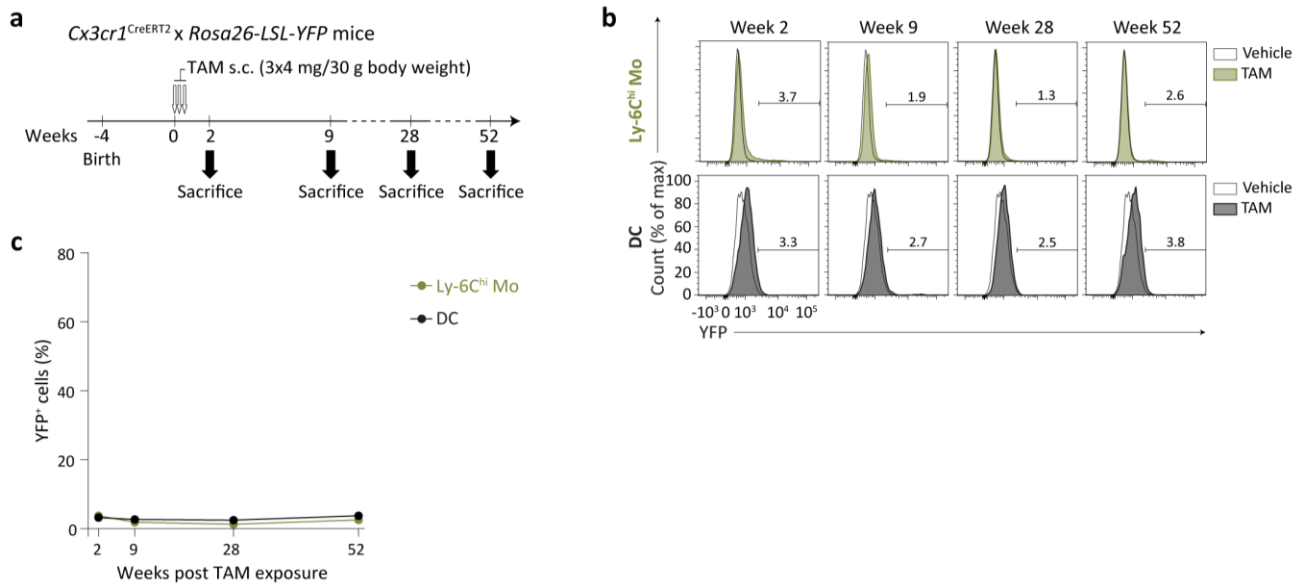
Comparison of CD206⁻ and CD206⁺ IM with IM1, IM2 & IM3 (Gibbins *et al.*, *Am J Resp Cell Mol Biol* **57**, 66-76 (2017))



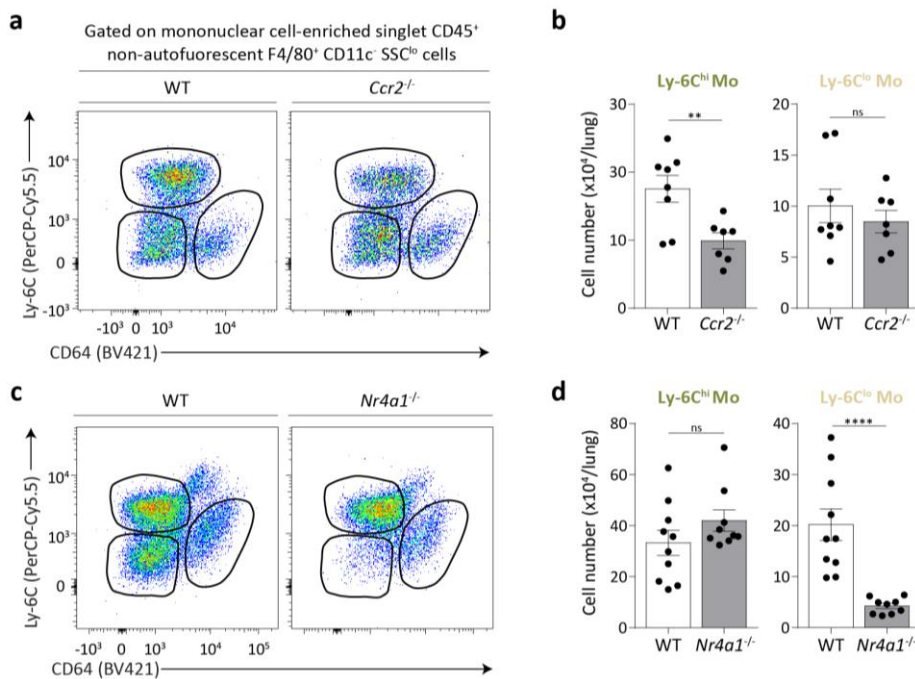
Supplementary Figure 5 Transcriptomic comparison of CD206⁺ and CD206⁻ IM subsets with previously described IM subsets. **(a-c)** Comparison between CD206⁺ and CD206⁻ IM with Lyve1^{hi}MHCII^{lo} and Lyve1^{lo}MHCII^{hi} IM (Chakarov et al., 2019). **a** Venn Diagram detailed overlap of DE genes between all 4 IM subpopulations. **b** Volcano plot representation of the genes belonging to the CD206⁺ and CD206⁻ IM signatures and discriminated between ‘common’ vs. ‘unique’ as compared with Lyve1^{hi}MHCII^{lo} and Lyve1^{lo}MHCII^{hi} IM signatures (Chakarov et al., 2019), respectively. **c** GSEA plots showing comparisons between CD206⁺ and CD206⁻ IM profiles and Lyve1^{hi}MHCII^{lo} and Lyve1^{lo}MHC-II^{hi} IM signatures (Chakarov et al., 2019). **(d-f)** Comparisons between CD206⁺ and CD206⁻ IM with IM1, 2 and 3 (Gibbins et al., 2017). **d** Unsupervised hierarchical clustering of biological replicates of AM, IM1, 2 and 3. **e** Two-dimensional PCA comparing AM, IM1, 2 and 3. Percentages indicate the variability explained by each component. **f** GSEA plots showing comparisons between CD206⁺ and CD206⁻ IM profiles with IM1/2 and IM3 signatures (Gibbins et al., 2017). DE, differentially expressed; FDR, false discovery rate; GSEA, Gene Set Enrichment Analysis, normalized enrichment score; NES, normalized enrichment score; PC(A), Principal Component (Analysis).



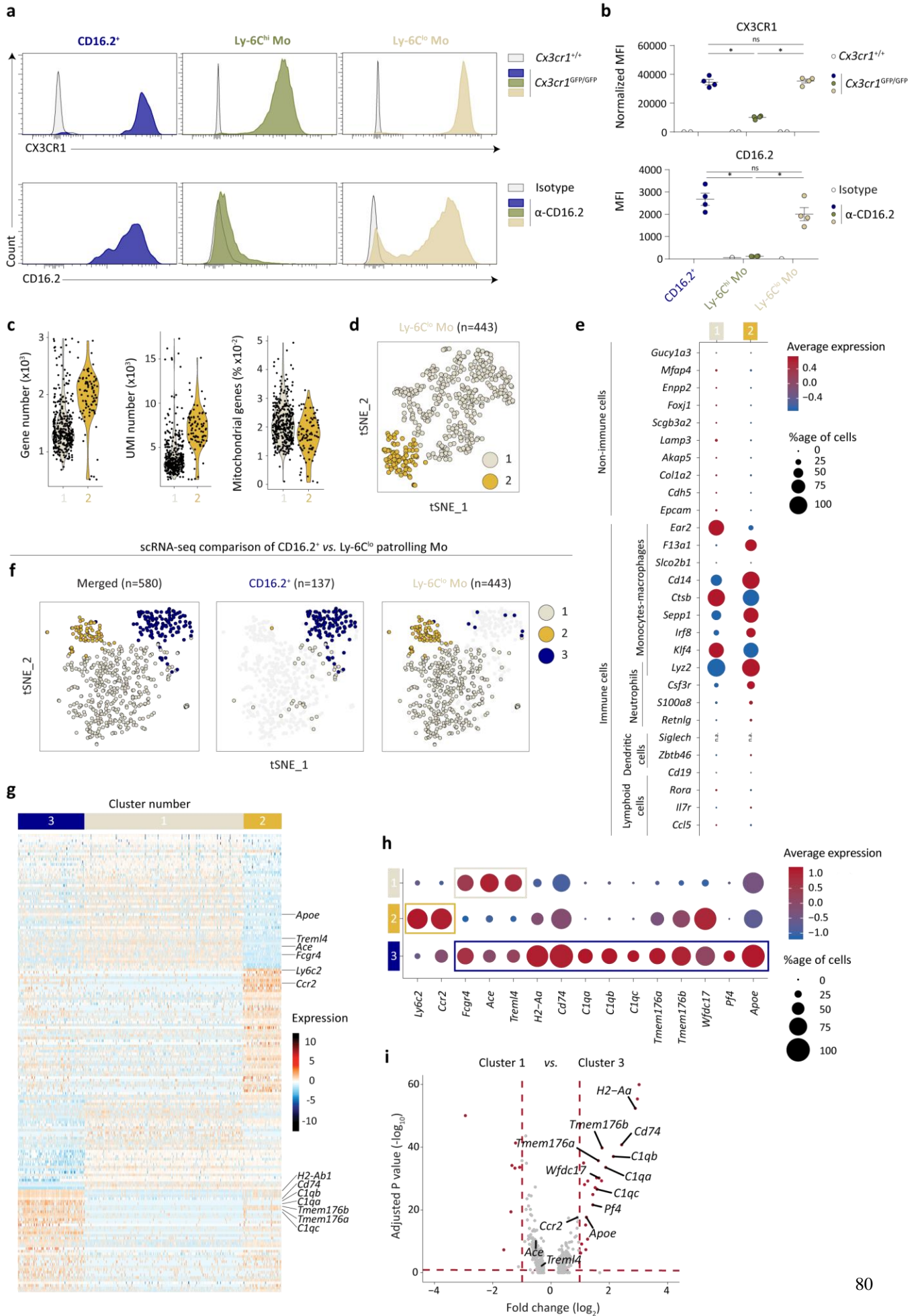
Supplementary Figure 6 Immunophenotyping of lung CD16.2⁺ monocytes and IM subpopulations. Representative histograms of the indicated markers are shown, whose quantification is provided in Fig. 2c. *Cx3cr1*^{+/+} or isotype-stained cells were used as controls.



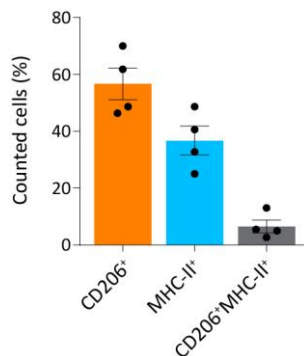
Supplementary Figure 7 Virtual absence of YFP labeling in Ly-6C^{hi} classical monocytes and lung DC 2 weeks after TAM exposure in *Cx3cr1^{CreERT2}.Rosa26-LSL-YFP* mice. **a** Experimental outline for panels **b,c**. Briefly, at 4 weeks of age, *Cx3cr1^{CreERT2}.Rosa26-LSL-YFP* mice were treated with TAM s.c. 3 times, 48h apart. Mice were analyzed for YFP expression 2, 9, 28 and 52 weeks later. **b** Representative histograms of YFP expression within the indicated populations (also see Supplementary Table 1 for gating strategies). Numbers indicate the percentage of YFP⁺ cells, as quantified in **c**. **c** Percentage of YFP⁺ cells within the indicated populations, assessed by flow cytometry. Data show mean \pm s.e.m. and are pooled from 2 independent experiments (n=10). Source data are provided as a Source Data file. DC, dendritic cell; s.c., subcutaneous; TAM, tamoxifen.



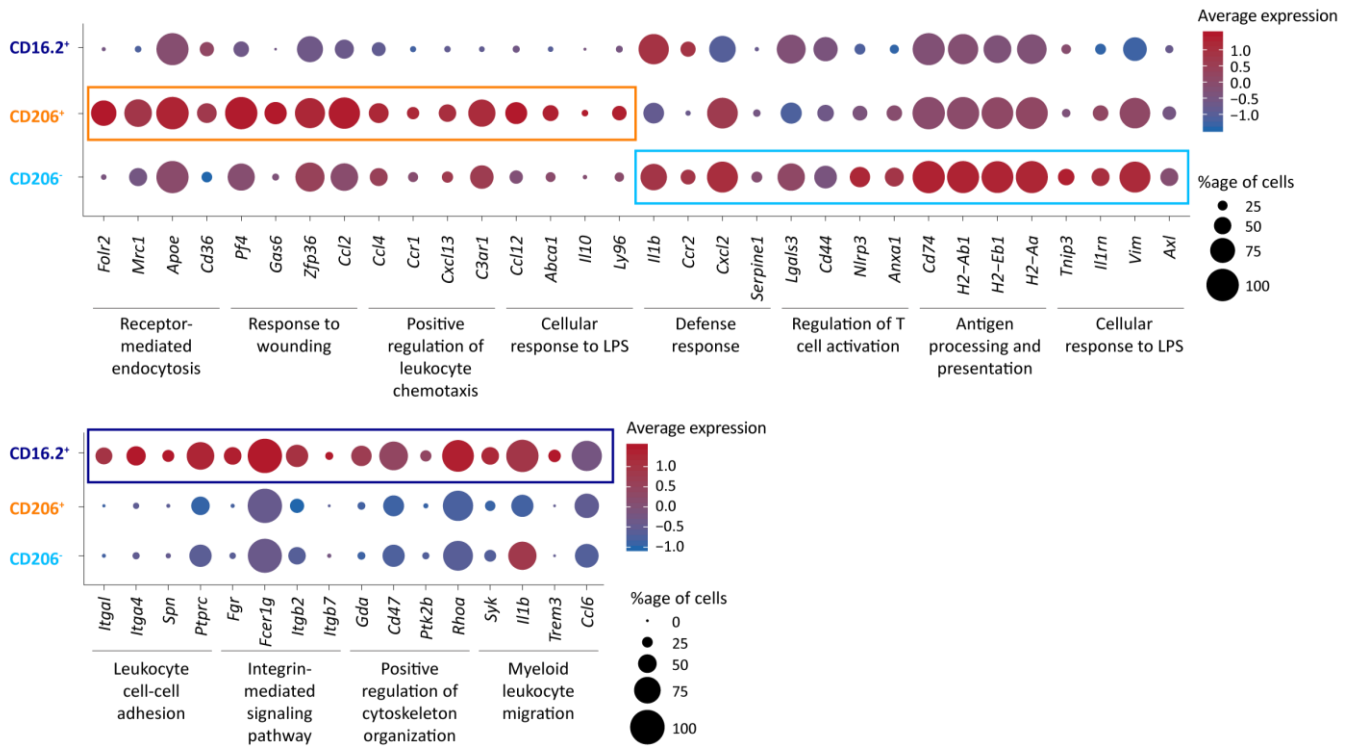
Supplementary Figure 8 Numbers of lung Ly-6C^{hi} and Ly-6C^{lo} monocytes in *Ccr2*^{-/-}, *Nr4a1*^{-/-} and WT control mice. **(a,c)** Representative dot plots of Ly-6C and CD64 expression gated on mononuclear cell-enriched singlet CD45⁺ non-autofluorescent F4/80⁺CD11c⁺SSC^{lo} cells and discriminating lung Ly-6C^{hi} classical, Ly-6C^{lo} patrolling monocytes and bulk IM in **(a)** *Ccr2*^{-/-}, **(c)** *Nr4a1*^{-/-} and corresponding control mice. **(b,d)** Absolute numbers of the indicated cell populations in the lungs of **(b)** *Ccr2*^{-/-} or **(d)** *Nr4a1*^{-/-} and control WT mice. Data show mean \pm s.e.m., as well as individual mice (n=7-10/group), and are pooled from 2-3 independent experiments. *P* values were calculated using a two-tailed unpaired Student's *t* test. Source data are provided as a Source Data file **, *P*<10⁻²; ***, *P*<10⁻³. ns, not significant.



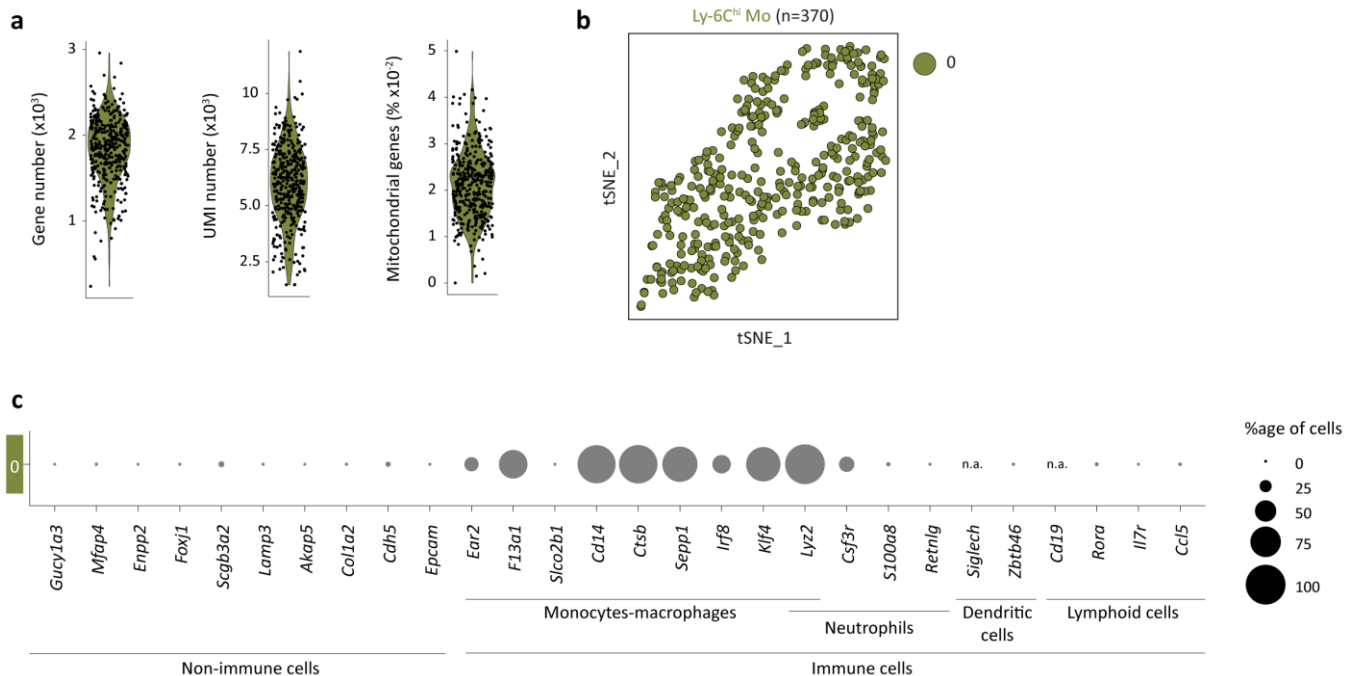
Supplementary Figure 9 Similarities and differences between lung CD64⁺CD16.2⁺ and Ly-6C^{lo} patrolling monocytes. **(a,b)** CX3CR1 and CD16.2 expression on lung CD64⁺CD16.2⁺ monocytes, Ly-6C^{hi} classical and Ly-6C^{lo} patrolling monocytes. **a** Representative histograms of the indicated markers. *Cx3cr1*^{+/+} or isotype-stained cells were used as controls. **b** Quantification of expression of the indicated markers as compared to control cells. Data show mean \pm s.e.m., as well as individual mice (n=2-4/group). *P* values were calculated using a two-way ANOVA with Tukey's post hoc test. **(c-e)** scRNA-seq analysis of lung Ly-6C^{lo} patrolling monocytes. **c** Gene numbers (left), Unique Molecular Identifiers (UMI) numbers (middle) and percentage of mitochondrial genes (right) detected in single cells from each cluster after selection and filtering, presented as violin plots (height: gene numbers [left], UMI numbers [middle] and % Mitochondrial genes [right]; width: abundance of cells) and individual dots representing individual cells. **d** *t*-SNE plot depicting the single cells analyzed by scRNA-seq. **e** Dot plots showing average expression of the genes characteristic of the indicated cell types within each cluster. **(f-i)** Comparison of lung CD64⁺CD16.2⁺ monocytes and Ly-6C^{lo} patrolling monocytes by scRNA-seq. **f** From left to right: *t*-SNE plot from the merged conditions, from CD64⁺CD16.2⁺ monocytes (i.e., Cluster 4 of Fig. 1c) or from Ly-6C^{lo} patrolling monocytes are shown. *n* indicates the number of cells analyzed after quality control and filtering. **g** Heatmap depicting the single-cell expression of the most upregulated genes within each cluster. Inserts indicate the name of individual genes. **h** Dot plots showing average expression of genes within each cluster. Cluster 2 expressed high levels of the classical monocyte markers *Ly6c2* and *Ccr2* when compared to Clusters 1 and 3, which were both characterized by a greater expression of *Fcgr4*, *Ace* and *Trem14*, supporting that Cluster 3 comprised Ly-6C^{lo} monocytes that recently arose from Ly-6C^{hi} classical monocytes and retained mRNA expression of *Ly6c2* and *Ccr2*. **i** Volcano plot representation of the differentially expressed genes between Cluster 1 (i.e., 'mature' Ly-6C^{lo} patrolling monocytes) and Cluster 3 (i.e., CD64⁺CD16.2⁺ monocytes) are shown. Genes with a *P*_{adj} < 10⁻² and a biological FC > 2 are colored in red. Inserts indicate the names of individual genes. *, *P* < 0.05; ns, not significant. MFI, Mean Fluorescence Intensity.



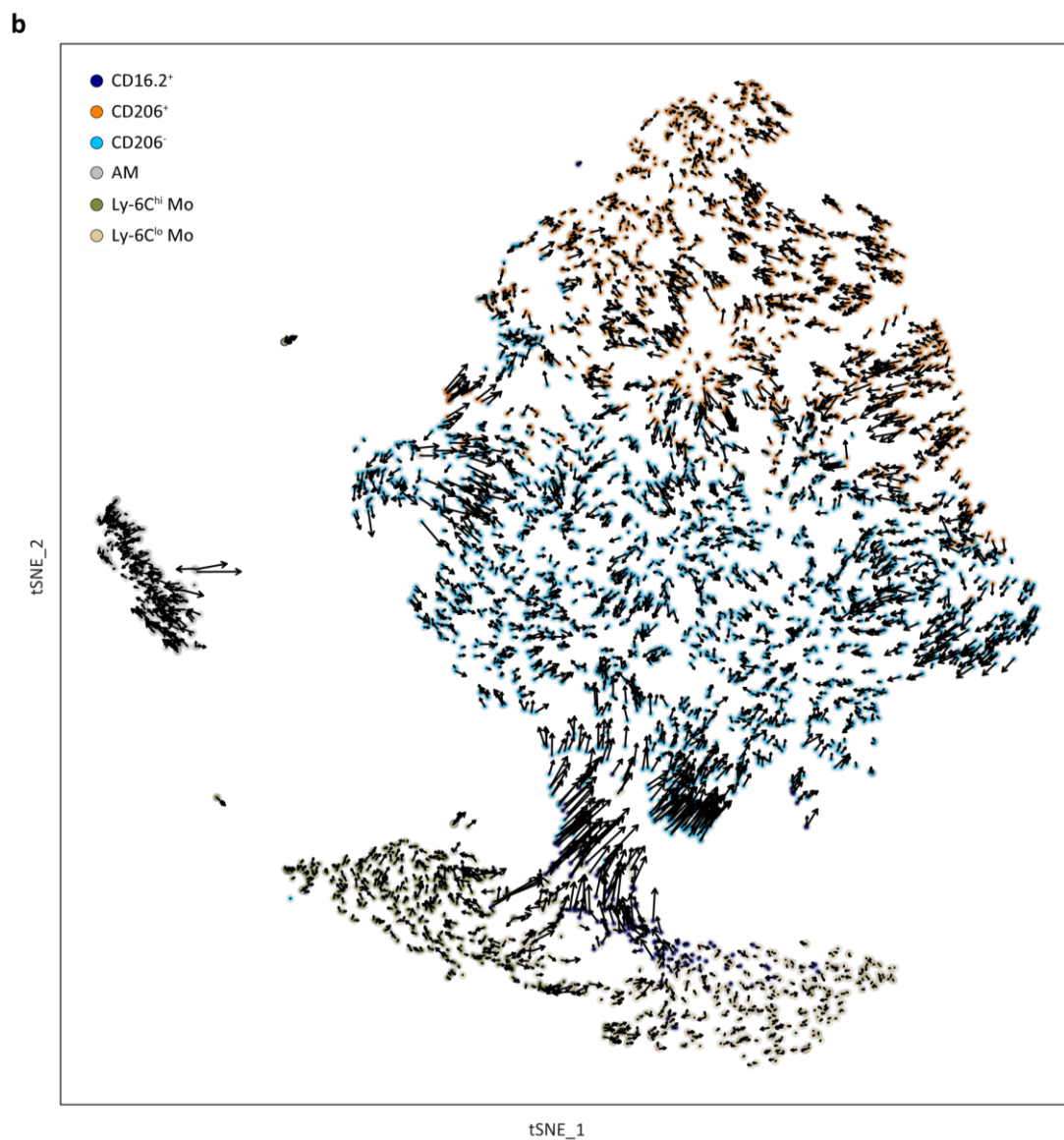
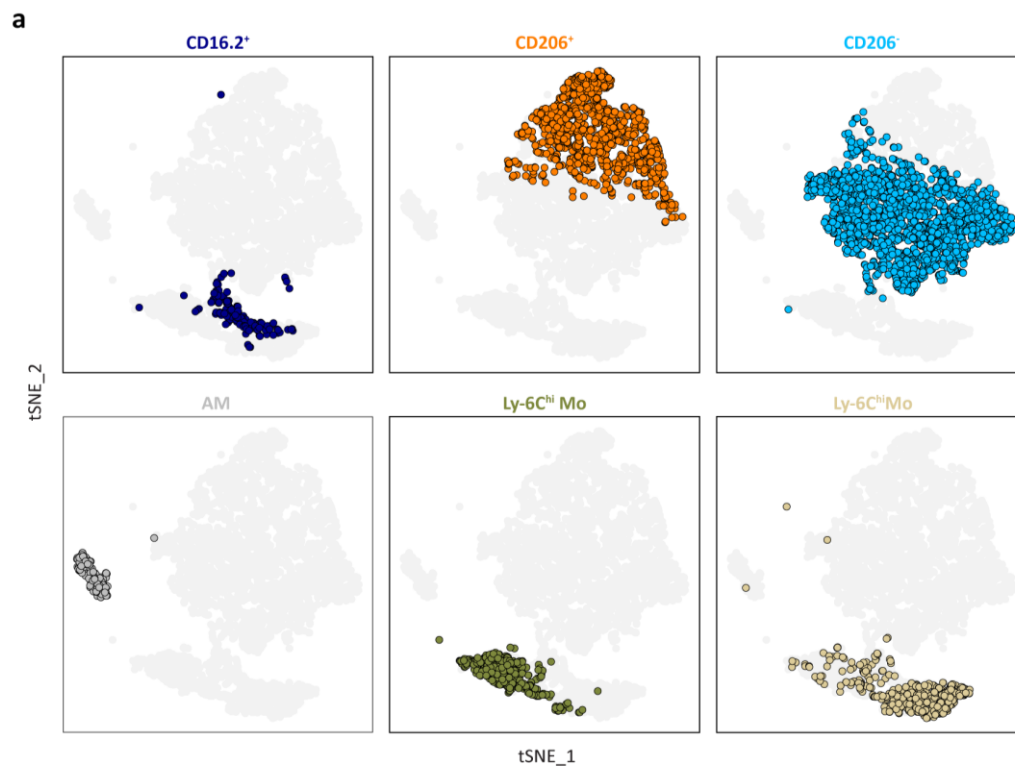
Supplementary Figure 10 Evaluation of MHC-II⁺CD206⁺ double-positive cells in high-resolution confocal microscopy pictures of lung sections. Lung sections of C57BL/6 WT mice were assessed for the presence of MHC-II⁺CD206⁺ double-positive cells. Bar graph shows the % of CD206⁺MHC-II⁻, CD206⁻MHC-II⁺ and CD206⁺MHC-II⁺ among counted cells. Data shown mean \pm s.e.m., as well as individual analyzed mice (n=4).



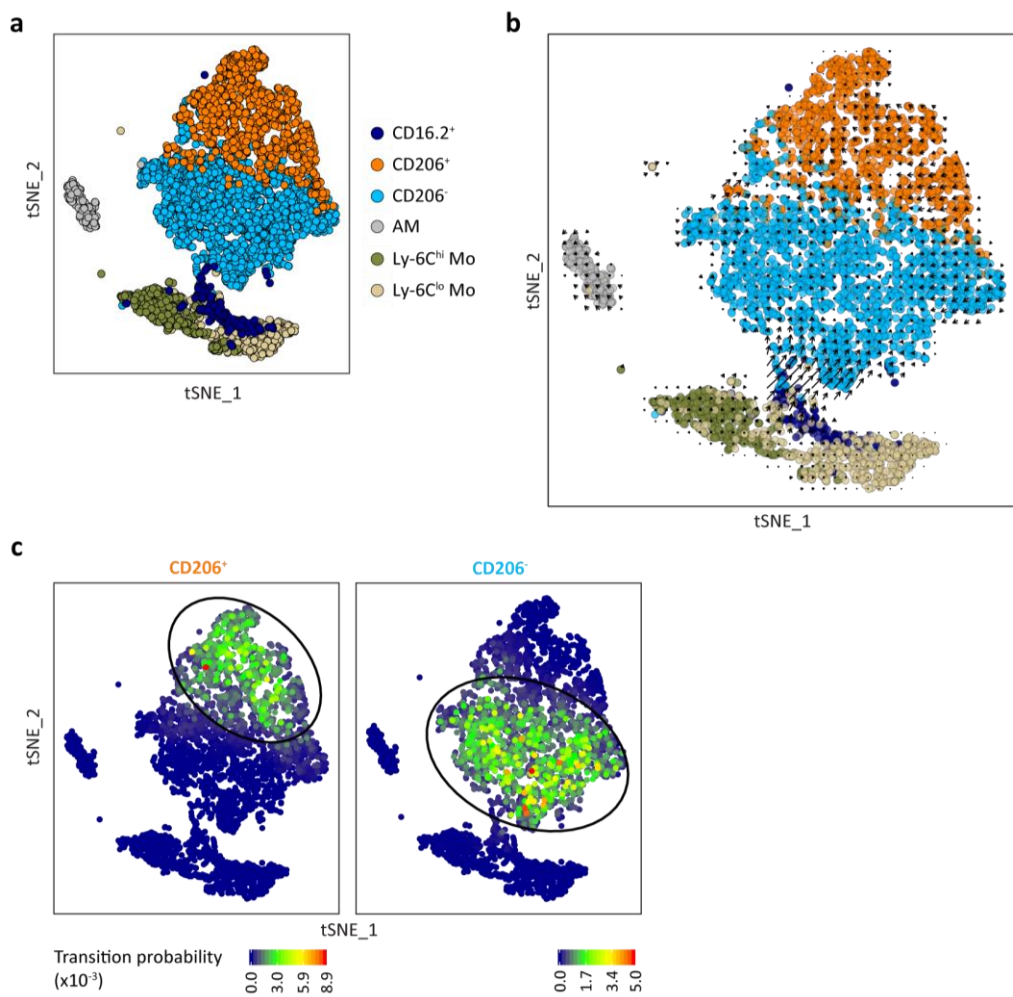
Supplementary Figure 11 Functional properties of CD206⁺ and CD206⁻ IM subsets and CD64⁺CD16.2⁺ monocytes based on scRNA-seq and Gene Ontology (GO) analyses. Dot plots showing average expression of the indicated genes and percentage of cells expressing the genes within each cluster. Examples of genes involved in the biological responses shown in Table 1 are shown.



Supplementary Figure 12 scRNA-seq analysis of lung Ly-6C^{hi} classical monocytes (also see Supplementary Table 1 for gating strategies). **a** Gene numbers (left), Unique Molecular Identifiers (UMI) numbers (middle) and percentage of mitochondrial genes (right) detected in single cells after selection and filtering, presented as violin plots (height: gene numbers [left], UMI numbers [middle] and % Mitochondrial genes [right]; width: abundance of cells) and individual dots representing individual cells. **b** *t*-SNE plot depicting the single cells analyzed by scRNA-seq. **c** Dot plots showing average expression of the indicated genes and the percentage of cells expressing such genes, characteristic of the indicated cell types.



Supplementary Figure 13 RNA velocity analysis of lung IM and monocyte subpopulations in steady-state C57BL/6 WT mice. **a** *t*-SNE plots depicting the merged scRNA-seq data of lung CD64-expressing cells (see Fig. 1c, encompassing AM, CD206⁻ IM, CD206⁺ IM, CD64⁺CD16.2⁺ monocytes), Ly-6C^{lo} patrolling monocytes (see Supplementary Figure 9) and Ly-6C^{hi} classical monocytes (see Supplementary Figure 12). Each individual (sub)population is highlighted separately. **b** Single cell RNA velocities, predictive of the extrapolated future states, are substantiated by arrows and embedded on the *t*-SNE plot shown in Fig. 6a.



Supplementary Figure 14 RNA velocity analysis of lung IM subsets in steady-state C57BL/6 WT mice: transition probabilities. **a** *t*-SNE plot depicting the merged scRNA-seq data of lung CD64-expressing cells (see Fig. 1c), Ly-6C^{lo} patrolling monocytes (see Supplementary Fig. 9) and Ly-6C^{hi} classical monocytes (see Supplementary Fig. 12). **b** Prevalent patterns of RNA velocities are substantiated by arrows and visualized on the same *t*-SNE plot as shown in (a). Single cell velocities are shown in Supplementary Figure 13b. **c** Visualization of single-step transition probabilities from CD206⁺ cells (left) or CD206⁻ cells (right) to neighboring cells. Ellipses represent 95% confidence.

Supplementary tables

(Sub)population name	Phenotype assessed by flow cytometry
IM	singlet mononuclear cell-enriched CD45 ⁺ non-autofluorescent SSC ^{lo} F4/80 ⁺ CD11c ⁻ Ly-6C ^{lo} CD64 ⁺
CD16.2 ⁺	singlet mononuclear cell-enriched CD45 ⁺ non-autofluorescent SSC ^{lo} F4/80 ⁺ CD11c ⁻ Ly-6C ^{lo} CD64 ⁺ CD16.2 ⁺
CD206 ⁺	singlet mononuclear cell-enriched CD45 ⁺ non-autofluorescent SSC ^{lo} F4/80 ⁺ CD11c ⁻ Ly-6C ^{lo} CD64 ⁺ CD206 ⁺
CD206 ⁻	singlet mononuclear cell-enriched CD45 ⁺ non-autofluorescent SSC ^{lo} F4/80 ⁺ CD11c ⁻ Ly-6C ^{lo} CD64 ⁺ CD16.2 ⁻ CD206 ⁻
AM	singlet mononuclear cell-enriched CD45 ⁺ autofluorescent CD11c ^{hi}
Ly-6C ^{hi} Mo	singlet mononuclear cell-enriched CD45 ⁺ non-autofluorescent SSC ^{lo} F4/80 ⁺ CD11c ⁻ Ly-6C ^{hi} CD64 ⁻
Ly-6C ^{lo} Mo	singlet mononuclear cell-enriched CD45 ⁺ non-autofluorescent SSC ^{lo} F4/80 ⁺ CD11c ⁻ Ly-6C ^{lo} CD64 ⁻
DC	singlet mononuclear cell-enriched CD45 ⁺ non-autofluorescent SSC ^{lo} F4/80 ⁻ CD11c ^{hi}

Supplementary Table 1 Flow cytometry phenotype of the lung mononuclear phagocyte populations investigated in this study.

Cluster	GO Term	Biological Process	Genes
1	GO:0006952	defense response	<i>Ccl2</i> ; <i>H2-Aa</i> ; <i>Mpeg1</i> ; <i>Cd44</i> ; <i>Actg1</i> ; <i>Cxcl2</i> ; <i>Capg</i> ; <i>Ccr2</i> ; <i>Cxcl16</i> ; <i>Clec4n</i> ; <i>Serpine1</i> ; <i>Cd74</i> ; <i>Ptgs2</i> ; <i>Axl</i> ; <i>Ccl22</i> ; <i>Lgals3</i> ; <i>Ptafr</i> ; <i>Tnfaip8</i> ; <i>H2-Eb1</i> ; <i>Il1b</i> ; <i>Ly86</i> ; <i>Cotl1</i> ; <i>Itgax</i> ; <i>Cd14</i> ; <i>Slamf7</i> ; <i>Anxa1</i> ; <i>Vim</i> ; <i>Nlrp3</i> ; <i>Acp5</i> ; <i>Tlr2</i> ; <i>Il1rn</i> ; <i>H2-Ab1</i> ; <i>Lsp1</i>
	GO:0050863	regulation of T cell activation	<i>H2-Aa</i> ; <i>Cd44</i> ; <i>Sdc4</i> ; <i>Ccr2</i> ; <i>H2-DMA</i> ; <i>Tnfsf9</i> ; <i>Cd74</i> ; <i>Lgals3</i> ; <i>Il1b</i> ; <i>Tnfsf13b</i> ; <i>Anxa1</i> ; <i>Nlrp3</i> ; <i>Cd83</i> ; <i>H2-Ab1</i>
	GO:0019882	antigen processing and presentation	<i>H2-Aa</i> ; <i>H2-DMb2</i> ; <i>H2-DMA</i> ; <i>Cd74</i> ; <i>H2-Eb1</i> ; <i>H2-M2</i> ; <i>H2-DMb1</i> ; <i>Ctss</i> ; <i>H2-Ab1</i>
	GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	<i>Cxcl2</i> ; <i>Cxcl16</i> ; <i>Serpine1</i> ; <i>Tnip3</i> ; <i>Axl</i> ; <i>Nfkb1</i> ; <i>Il1b</i> ; <i>Cd14</i> ; <i>Vim</i> ; <i>Nlrp3</i> ; <i>Il1rn</i>
2	GO:0006898	receptor-mediated endocytosis	<i>Folr2</i> ; <i>Eps15</i> ; <i>Cltc</i> ; <i>Cd36</i> ; <i>ApoE</i> ; <i>Msr1</i> ; <i>Ap2a2</i> ; <i>Siglech</i> ; <i>Dab2</i> ; <i>Mrc1</i> ; <i>Clta</i> ; <i>Lrp6</i>
	GO:0009611	response to wounding	<i>Hmox1</i> ; <i>P2ry12</i> ; <i>Zfp3611</i> ; <i>Zfp36</i> ; <i>Ccl2</i> ; <i>Pf4</i> ; <i>Thbd</i> ; <i>Jun</i> ; <i>Hbegf</i> ; <i>F13a1</i> ; <i>Gas6</i> ; <i>Sulf2</i> ; <i>Ninj1</i> ; <i>Clec10a</i> ; <i>Igf1</i>
	GO:0002690	positive regulation of leukocyte chemotaxis	<i>Cxcl13</i> ; <i>Ccl2</i> ; <i>Ccr1</i> ; <i>Pla2g7</i> ; <i>C3ar1</i> ; <i>Lgmn</i> ; <i>Ccl4</i> ; <i>Gas6</i>
	GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	<i>Abca1</i> ; <i>Il10</i> ; <i>Cxcl13</i> ; <i>Zfp36</i> ; <i>Ccl2</i> ; <i>Cd36</i> ; <i>Ly96</i> ; <i>Pf4</i> ; <i>Ccl12</i> ; <i>Mrc1</i> ; <i>Arid5a</i>
4	GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	<i>Itga4</i> ; <i>Ptprc</i> ; <i>Itgal</i> ; <i>Rac2</i> ; <i>Syk</i> ; <i>Stk10</i> ; <i>Il1b</i> ; <i>Itgb2</i> ; <i>Sema4d</i> ; <i>Spn</i> ; <i>Itgb7</i> ; <i>Msn</i>
	GO:0007229	integrin-mediated signaling pathway	<i>Itga4</i> ; <i>Fgr</i> ; <i>Itgal</i> ; <i>Syk</i> ; <i>Ptk2b</i> ; <i>Itgb2</i> ; <i>Rhoa</i> ; <i>Tln1</i> ; <i>Tyropb</i> ; <i>Fcer1g</i> ; <i>Itgb7</i> ; <i>Fyb</i> ; <i>Zyx</i>
	GO:0051495	positive regulation of cytoskeleton organization	<i>Pfn1</i> ; <i>Arpc3</i> ; <i>Arpc2</i> ; <i>Cd47</i> ; <i>Pam3k1</i> ; <i>Stap1</i> ; <i>Rps3</i> ; <i>Cdc42ep3</i> ; <i>Ptk2b</i> ; <i>Flna</i> ; <i>Arhgef10l</i> ; <i>Cdc42ep2</i> ; <i>Evl</i> ; <i>Rhoa</i> ; <i>Cdkn1b</i> ; <i>Gda</i> ; <i>Arpc1b</i> ; <i>Arpc5</i> ; <i>Hck</i>
	GO:0097529	myeloid leukocyte migration	<i>Rps19</i> ; <i>Stat5b</i> ; <i>Cd47</i> ; <i>Syk</i> ; <i>Il17ra</i> ; <i>Il1b</i> ; <i>Ccl6</i> ; <i>Itgb2</i> ; <i>Trem1</i> ; <i>Trem3</i> ; <i>Fcer1g</i> ; <i>Rpl13a</i> ; <i>Gpr35</i>

Supplementary Table 2 GO enrichment analysis of IM-related clusters: significantly enriched genes involved in each biological process.

Reagent	Source	Cat. number
Antibodies and secondary reagents		
Mouse anti-mouse CD45.2, V500, clone 104	BD Pharmingen	562129
Mouse anti-mouse CD45.2, PE-Cy7, clone 104	BD Pharmingen	560696
Mouse anti-mouse CD45.2, APC, clone 104	BD Pharmingen	558702
Mouse anti-mouse CD45.1, APC, clone A20	BD Pharmingen	558701
Rat anti-mouse F4/80, PE, clone BM8	Sony Biotechnology	1215550
Rat anti-mouse F4/80, BV605, clone BM8	Biologend	123133
Hamster anti-mouse CD11c, APC-Cy7, clone HL3	BD Pharmingen	561241
Rat anti-mouse Ly-6C, PerCP-Cy5.5, clone AL-21	BD Pharmingen	560525
Mouse anti-mouse CD64, BV421, clone X54-5/7.1	Sony Biotechnology	1296545
Mouse anti-mouse CD64 a and b, PE, clone XB54-5/7.1.1	BD Pharmingen	558455
Armenian Hamster anti-mouse CD16.2, AF647, clone 9E9	Biologend	149526
Armenian Hamster anti-mouse CD16.2, AF488, clone 9E9	Biologend	149523
Rat anti-mouse CD206, AF488, clone C068C2	Biologend	141710
Rat anti-mouse CD206, AF647, clone C068C2	Biologend	141712
Rat anti-mouse CD206, PE-Cy7, clone C068C2	Biologend	141719
Mouse anti-mouse I-Ab, AF647, clone AF6-120.1	Biologend	116412
Mouse anti-mouse I-Ab, AF488, clone AF6-120.1	Biologend	116410
Mouse anti-mouse I-Ab, PE-Cy7, clone AF6-120.1	Biologend	116420
Rat anti-mouse ACE, AF647, clone 230214	R&D Systems	FAB15131R
Rabbit anti-mouse/human FOLR2, purified, polyclonal	Biorbyt	orb35326
Rat anti-mouse CD107a (LAMP-1), PE, clone 1D4B	BD Pharmingen	558661
Rat anti-mouse CD11b, PE-Cy7, clone M1/70	BD Pharmingen	552850
Rat anti-mouse CD11b, V450, clone M1/70	BD Pharmingen	560455
Rat anti-mouse CD115, biotin, clone AFS98	Thermo Fisher Scientific	13-1152-82
Rat anti-mouse CD115, APC, clone AFS98	Thermo Fisher Scientific	17-1152-82
Goat anti-mouse MerTK, biotin, polyclonal	R&D Systems	BAF591
Rat anti-mouse CD68, PE-Cy7, clone FA-11	Biologend	137015
Rat anti-mouse CD68, purified, clone FA-11	Biorad	MCA1957GA
Rat anti-mouse Ly-6G, PE-Cy7, clone 1A8	BD Pharmingen	560601
Rat anti-mouse CD19, APC-Cy7, clone 1D3	BD Pharmingen	557655
Rat anti-mouse Siglec-F, PE, clone E50-2440	BD Pharmingen	552126
Rat anti-mouse Ki-67, PE, clone 16A8	Biologend	657406
Rabbit anti-GFP, AF488, polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A21311
Rat anti-mouse CD31, AF647, clone MEC13.3	Biologend	102515
Rat anti-mouse Lyve-1, eFluor660, clone ALY7	Thermo Fisher Scientific	5016437
Mouse anti-mouse TUBB3, AF647, clone AA10	Biologend	657406
Rat anti-mouse/human CD11b microbeads	Miltenyi Biotec	130-049-601
Donkey anti-rabbit IgG, AF647, clone Poly4064	Biologend	406414
Goat anti-rat IgG, AF568, polyclonal	Thermo Fisher Scientific	A11077
Streptavidin, PE-Cy7	BD Pharmingen	557598
Isotypes		
Rat IgG2a κ , biotin, clone R35-95	BD Pharmingen	553928
Rat IgG2a κ , PE, clone eBR2a	Thermo Fisher Scientific	12-432181
Rat IgG2b κ , PE-Cy7, clone RTK4530	Biologend	400617
Rat IgG2a , PE-Cy7, clone RTK 2758	Biologend	400521
Armenian Hamster IgG, AF647, clone HTK888	Biologend	400924
Goat IgG, biotin, polyclonal	R&D Systems	BAF108
Media, chemicals and other reagents		
Calcium- and magnesium-free PBS	Gibco	14190-094
HBSS with Phenol Red	Lonza	BE10-508F
RPMI with L-glutamine	Lonza	BE12-702F

Fetal Bovine Serum	Gibco	10270-098
Goat serum	Sigma	G9023
Collagenase A	Roche	10103586001
DNase I	Roche	11284932001
EDTA	Merck Millipore	1084181000
Bovine Serum Albumin	Sigma	A7906
UltraPure Bovine Serum Albumin	Thermo Fisher Scientific	AM2616
Sodium azide	Acros Organics	190385000
Mouse Fc block (purified rat anti-mouse CD16/CD32)	BD Pharmingen	553142
Brilliant Stain Buffer	BD Pharmingen	563794
Fixation Buffer	Biologend	420801
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Fisher Scientific	00-5523-00
CCF4-AM	Thermo Fisher Scientific	K1028
Probenecid	Thermo Fisher Scientific	P36400
Ammonium chlorure	VWR	21236267
Potassium bicarbonate	Sigma	60338
Percoll	GE Healthcare	17089101
Hemacolor Solution 1 – fixing solution	Merck	111955
Hemacolor Solution 2 – colour reagent red	Merck	111956
Hemacolor Solution 3 – colour reagent blue	Merck	111957
2-mercaptoethanol	Gibco	31350-010
MEM NEAA	Gibco	11140-035
Sodium pyruvate	GE Healthcare	SH30239.01
Penicillin/streptomycin	Gibco	15070-063
Proteome profiler mouse XL cytokine array	R&D Systems	ARY028
Q Path Freeze gel	VWR	07111247
Triton X-100	Sigma	93443
DAPI	Biologend	422801
Lipopolysaccharides from <i>E.coli</i> O55:B5	Sigma	L4524
pHrodo™ Green <i>E.coli</i> BioParticles™	Thermo Fisher Scientific	P35366
CpG-DNA, Mouse	Hycult Biotech	HC4033
PAM3CSK4	InvivoGen	tlr-pms
Tamoxifen	Sigma	T5648
Corn oil	Sigma	C8267
DynaBeads MyOne Silane	Thermo Fisher Scientific	37002D
SPRIselect Reagent	Beckman Coulter	B23317
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent	5067-4626

Supplementary Table 3 List of reagents and antibodies used in this study.

Discussion - Perspectives

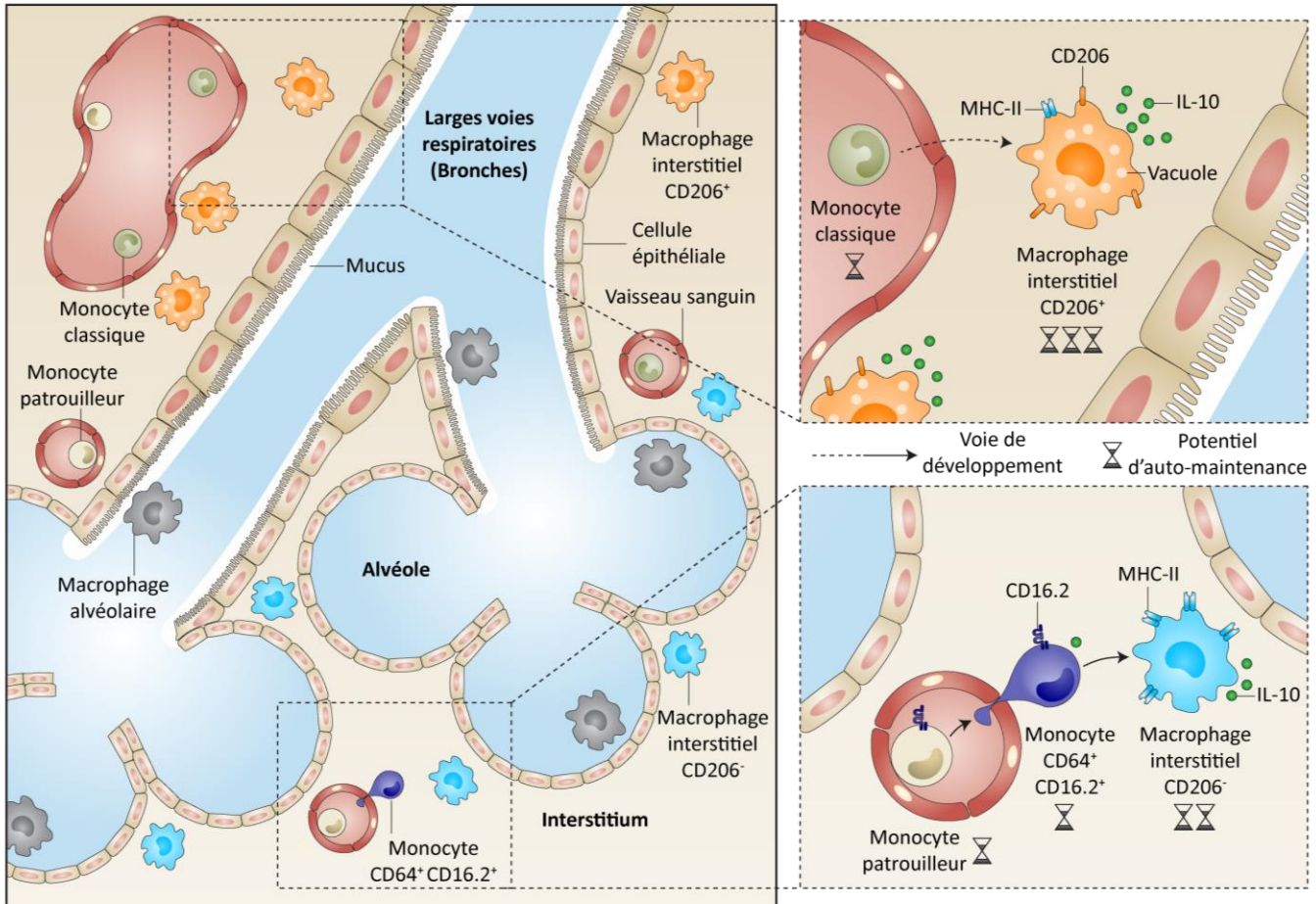


Figure Discussion 1 Résumé graphique des conclusions concernant la caractérisation des sous-populations de macrophages interstitiels (MIs) et leurs précurseurs locaux chez la souris adulte. Deux sous-populations de MIs coexistent au sein du poumon. Les MIs $CD206^+$ peuplent préférentiellement l'interstitium bronchique, présentent de nombreuses vacuoles dans leur cytoplasme, sont plus larges, présentent un plus haut potentiel d'auto-maintenance et sécrètent davantage de cytokines et chimiokines immuno-régulatrices (dont l'IL-10) par comparaison aux MIs $CD206^-$, qui sont localisés principalement dans le parenchyme alvéolaire, expriment de plus hauts niveaux de MHC-II et sont plus rapidement remplacés par des cellules dérivées de monocytes. À ce titre, notre modèle suggère que la population discrète de monocytes $CD64^+CD16.2^+$ dérive de monocytes patrouilleurs qui quittent le compartiment sanguin et entrent dans le tissu où ils subissent des modifications de leur profil transcriptomique, phénotypique, et fonctionnel, et constituent des précurseurs de MIs $CD206^-$. *Figure créée selon le style graphique de Nature Reviews Immunology tel que dans* (Hussell et Bell, 2014).

Au travers de cette étude, nous avons mis en évidence la diversité des phagocytes mononucléés CD64⁺ du poumon de la souris. Deux expériences indépendantes de scRNA-seq ont révélé la présence de trois sous-populations de cellules, clairement distinctes des macrophages alvéolaires, et dont l'existence a ultérieurement été validée *in vivo* par cytométrie en flux. En effet, nous avons identifié au sein des MIs une petite fraction de cellules CD206⁻CD16.2⁺(ACE⁺), correspondant à un cluster exprimant de hauts niveaux de *Fcgr4* (codant pour le CD16.2) et *Ace* ; une population CD206⁺CD16.2⁻ (FOLR2⁺) correspondant au cluster caractérisé par une surexpression de *Mrc1* (codant pour le CD206) et *Folr2* ; et enfin des cellules CD206⁻CD16.2⁻ exprimant de hauts niveaux de MHC-II, correspondant au cluster riche en expression de molécules du MHC-II (i.e. *H2-Eb1*, *H2-Ab1*, *H2-Aa*, *Cd74*). La population de cellules CD206⁻CD16.2⁺ présente plutôt des caractéristiques de monocytes, qui sont néanmoins distincts des monocytes classiques Ly-6C^{hi} et patrouilleurs Ly-6C^{lo} du poumon, et sont appelés monocytes CD64⁺CD16.2⁺. Les deux sous-populations majeures CD206⁺CD16.2⁻ et CD206⁻CD16.2⁻ sont constituées de macrophages interstitiels à proprement parler, qui sont appelés MIs CD206⁺ et CD206⁻ respectivement, et dont l'identité confirme les résultats publiés récemment par Svetoslav Chakarov et ses collaborateurs (Chakarov et al., 2019). Nos résultats apportent néanmoins des données supplémentaires concernant la maintenance et la localisation de ces populations à l'état basal, ainsi que leur régulation complexe et spécifique dans un contexte inflammatoire. De plus, nous avons découvert une nouvelle voie de développement de macrophages tissulaires, provenant de monocytes patrouilleurs qui migrent à travers l'endothélium, deviennent des monocytes CD64⁺CD16.2⁺ et subissent un remodelage de leur identité transcriptomique pour devenir des MIs CD206⁻. Nos conclusions sont résumées graphiquement dans la Figure Discussion 1 ci-contre.

Au sein de cette section, nous discuterons successivement :

- la mise en évidence de deux populations majeures de MIs à l'état basal, à la lumière des données publiées par d'autres groupes d'études ;
- la localisation des sous-populations de MIs et des monocytes CD64⁺CD16.2⁺ ;
- la dualité fonctionnelle des sous-populations de MIs à l'état basal et en conditions inflammatoire, mise en relation avec d'autres populations de macrophages CD206⁺ et CD206⁻ de l'organisme murin ;
- les caractéristiques ontogéniques et la maintenance des sous-populations de MIs, ainsi que la mise en évidence de monocytes CD64⁺CD16.2⁺ comme précurseurs de MIs CD206⁻ ;
- la transposition potentielle de nos données à l'humain, selon la littérature disponible à ce jour.

L'évaluation non biaisée de l'hétérogénéité du compartiment CD64⁺ du poumon de la souris a conduit à la visualisation de deux clusters majeurs de macrophages et d'une population mineure de cellules présentant davantage un phénotype monocyttaire. La mise à disposition publique des données de séquençage relatives aux études de Sophie Gibbings et collègues (Gibbings et al., 2017) et du groupe de Svetoslav Chakarov (Chakarov et al., 2019) nous a permis de comparer ces données avec celles

générées dans notre étude et de confirmer que la population de MIs CD206⁺ est largement similaire aux populations « IM1/IM2 » et « Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} » de ces deux groupes, tandis que les MIs CD206⁻ apparaissent similaires aux macrophages « IM3 » et « Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} ». À l'instar des MIs « Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} » et « IM1/IM2 », les MIs CD206⁺ présentent une taille plus importante, expriment le CD206 et Lyve-1, produisent davantage d'IL-10 et montrent une meilleure capacité de capture de particules instillées par voie aérienne, par comparaison aux autres sous-populations (Chakarov et al., 2019; Gibbings et al., 2017). Les MIs CD206⁻, quant à eux, sont plus petits, n'expriment pas Lyve-1 mais de plus hauts niveaux de MHC-II et de CX3CR1, et présentent un turnover plus élevé par comparaison aux autres MIs, rejoignant les caractéristiques des MIs « IM3 » et « Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} » (Chakarov et al., 2019; Gibbings et al., 2017). La distinction de deux sous-populations majeures de MIs est par ailleurs renforcée par le fait que ces similitudes transcriptomiques et phénotypiques aient été observées malgré des méthodologies expérimentales différentes. En effet, dans la première étude, le groupe de Sophie Gibbings a identifié 3 sous-populations de MIs sur base de l'expression différentielle de deux marqueurs de surface (i.e. CD11c et MHC-II) sélectionnés de façon empirique, et les analyses transcriptomiques proviennent de données de séquençage de ces sous-populations triées par FACS (Gibbings et al., 2017). Notons que ces sous-populations ont été triées sur base de leur expression du CD206 et du MHC-II, menant potentiellement à l'analyse de cellules qui ne correspondent pas aux populations identifiées initialement. La stratégie de sélection des sous-populations de MIs pour la suite de leurs expériences n'est par ailleurs pas clairement indiquée. Notons que le regroupement hiérarchique non-supervisé et l'analyse en composantes principales des échantillons séquencés dans cette étude montrent que les sous-populations IM1 et IM2 partagent un transcriptome fortement similaire. De plus, phénotypiquement, seule l'intensité d'expression du MHC-II distingue ces deux sous-populations, et fonctionnellement, seuls les IM3 diffèrent en terme de capacité de phagocytose *in vivo* et de rapidité de turnover par comparaison aux deux autres sous-populations, supportant que les populations IM1 et IM2 ne sont pas clairement distinctes et forment probablement une seule sous-population de MIs. Svetoslav Chakarov et ses collaborateurs ont quant à eux identifié par scRNA-seq deux sous-populations de MIs, distinctes de par leur expression du MHC-II. Les analyses transcriptomiques ont ensuite été effectuées sur les données de séquençage en bulk des deux sous-populations de MIs, MHC-II⁻ et MHC-II⁺, préalablement triées par FACS (Chakarov et al., 2019). Pour certaines expériences ultérieures, la distinction des deux sous-populations a été réalisée sur base de leur expression différentielle de CX3CR1. Notons également que les trois études comparées adoptent une stratégie de sélection des MIs différente. Si de nombreuses différences techniques sont donc à constater, rappelant que nos comparaisons doivent toujours être interprétées avec précautions, elles n'empêchent pas la convergence de ces études indépendantes vers un message général commun, révélant l'existence de deux sous-populations majeures de MIs aux caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles distinctes.

Les premières études évoquant les MIs utilisent une classification simple des macrophages pulmonaires, basée sur leur présence dans la lumière ou à l'extérieur des alvéoles. Néanmoins, il est apparaît aujourd'hui essentiel de prendre en compte la complexité de l'architecture pulmonaire et d'évaluer la localisation des MIs en analysant les différents compartiments anatomiques du poumon, étant donné que les signaux du microenvironnement peuvent déterminer le programme transcriptomique et dès lors le destin et la fonction des macrophages tissulaires (Okabe et Medzhitov, 2016). Notons que ces différences sont à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats obtenus au départ d'espèces différentes, à l'organisation histologique spécifique. La question de la localisation des MIs et de leurs relations spatiales et temporelles avec leur microenvironnement et les acteurs qui le constituent (i.e. les cellules épithéliales des voies aériennes ou des alvéoles, les cellules stromales, endothéliales, immunitaires, etc.) reste jusqu'à ce jour controversée et nourrie de peu de données quantitatives (Bedoret et al., 2009; Chakarov et al., 2019; Gibbings et al., 2017). Néanmoins, la découverte de différentes sous-populations de MIs est cohérente avec l'hypothèse qu'elles puissent résider au sein de niches anatomiques différentes. En 2009, notre laboratoire décrit la présence de MIs $F4/80^+CD11c^-$ dans le parenchyme alvéolaire, confirmée ensuite par l'observation de MIs $CX3CR1^+$ dans ces zones par un autre groupe (Rodero et al., 2015). A contrario, Sophie Gibbings et collègues proposent quant à eux, sur base de l'évaluation de la co-expression de MerTK et de CX3CR1, que les MIs sont présents uniquement dans les espaces péri-bronchiques, mais pas dans le parenchyme alvéolaire. Notre étude montre la présence de MIs à la fois dans les espaces péri-bronchiques et dans le parenchyme alvéolaire, et révèle de manière quantitative la localisation préférentielle des MIs $CD206^+$ et $CD206^-$ dans l'interstitium bronchique et alvéolaire, respectivement. Au niveau des zones péri-bronchiques, Chakarov et collaborateurs ont proposé que les MIs $Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo}$ et $Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi}$ sont associés aux vaisseaux sanguins et aux nerfs, respectivement (Chakarov et al., 2019). Néanmoins, les conditions expérimentales utilisées permettent difficilement d'avoir une image non biaisée de l'association réelle des sous-populations de MIs avec les structures étudiées. Au cours de notre étude, la localisation préférentielle des MIs $CD206^+$ dans l'interstitium péri-bronchique les prédispose à une association avec les faisceaux nerveux et les larges vaisseaux sanguins, lesquels courent le long des voies respiratoires. Les MIs $CD206^-$ sont, dans leur majorité, associés davantage aux vaisseaux de plus petit calibre, présents dans l'interstitium alvéolaire. Néanmoins, les quelques MIs $CD206^-$ présents dans les espaces péri-bronchiques sont, *ipso facto*, également présents à proximité des nerfs et des larges vaisseaux sanguins.

A côté des deux sous-populations majeures de MIs, lesquelles sont exclusivement extravasculaires et résident dans le tissu, les monocytes $CD64^+CD16.2^+$ apparaissent comme étant partiellement intravasculaires et sont principalement localisés au sein de l'interstitium alvéolaire. En utilisant des souris reportrices, Rodero et collègues ont précédemment décrit une population de monocytes localisés à l'interface entre les capillaires pulmonaires et les espaces alvéolaires (Rodero et al., 2015). Ces monocytes partagent des caractéristiques de monocytes patrouilleurs, mais se distinguent

de par un coefficient de mobilité plus faible que les monocytes patrouilleurs, mais similaire à celui des MIs CX3CR1^{hi} (Rodero et al., 2015), ce qui est cohérent avec nos observations. Au vu de la complexité et des régulations dynamiques du réseau des monocytes et des macrophages pulmonaires, de plus amples recherches et l'utilisation combinée d'outils transgéniques et de technologies d'imagerie innovantes seront donc nécessaires afin de connaître la distribution spatio-temporelle précise des sous-populations de MIs et leur association avec les structures environnantes *in vivo*.

La distinction des deux sous-populations majeures de MIs s'accompagne également de différences fonctionnelles. En effet, nous avons découvert que les MIs CD206⁺ à l'état basal présentent dans leur cytoplasme de nombreuses vacuoles, probablement des lysosomes, ainsi qu'un potentiel de phagocytose plus important par comparaison aux MIs CD206⁻, ce qui est cohérent avec les résultats de Noelia A-Gonzales et collègues qui montrent que les macrophages du compartiment phagocytaire des intestins et de la moelle osseuse expriment de plus hauts niveaux de CD206 au niveau transcriptomique et protéique que les macrophages non-phagocytaires (A-Gonzalez et al., 2017). Dans les intestins et dans la moelle osseuse, les cellules identifiées comme étant phagocytaires ou CD206^{hi} expriment de plus hauts niveaux de CD163 au niveau transcriptomique que les cellules non-phagocytaires et CD206^{lo} respectivement (A-Gonzalez et al., 2017), à l'instar des MIs CD206⁺ pulmonaires. Les MIs CD206⁺ possèdent en outre une capacité à sécréter des cytokines et chimiokines immuno-régulatrices, y compris de l'IL-10, comme proposé par Svetoslav Chakarov et collègues (Chakarov et al., 2019). Leur localisation, leur capacité à produire de l'IL-10 et les précédents travaux réalisés au sein de notre laboratoire suggèrent que cette sous-population est responsable de l'inhibition des cDC2s, localisées dans la lamina propria des voies respiratoires (Guilliams et al., 2013b; Lambrecht et Hammad, 2009), et donc de la prévention du développement d'asthme allergique (Bedoret et al., 2009; Sabatel et al., 2017). Les analyses transcriptomiques indiquent par ailleurs que ces macrophages peuvent être impliqués dans la réponse aux lésions, ce qui est cohérent avec le rôle décrit des MIs Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} dans la régulation de l'inflammation et de la fibrose induites par un dommage tissulaire (Chakarov et al., 2019), et suggère que ces cellules peuvent également être impliquée dans le remaniement de la matrice extracellulaire et le remodelage des bronches lors de maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires. Un objectif de notre laboratoire concerne le développement d'outils transgéniques permettant la déplétion spécifique des MIs, afin de pouvoir évaluer précisément leur implication dans ces différents phénomènes. Les MIs CD206⁻ présentent, quant à eux, un profil typique de CPAs, à l'instar des MIs Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} qui potentialisent davantage la prolifération des lymphocytes T spécifiques d'un antigène, et l'induction de lymphocytes Treg, par comparaison aux MIs Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} (Chakarov et al., 2019). Ces résultats générés *in vitro* conduisent à une réflexion quant à leur potentiel rôle *in vivo*. En effet, le siège de l'instruction des lymphocytes T naïfs est le ganglion lymphatique drainant, vers lequel les DCs matures migrent après avoir capturé un antigène. Il serait intéressant de savoir si ces cellules sont capables, elles aussi, de migrer vers le ganglion, et alors comprendre si elles

exercent un rôle redondant avec les DCs, ou si au contraire elles restent au sein de l'interstitium pulmonaire, où elles pourraient par exemple jouer un rôle dans la réactivation de lymphocytes T mémoires, lesquels nécessitent de moindres signaux antigéniques et de costimulation par comparaison aux lymphocytes T naïfs (MacLeod et al., 2010).

Nous savons que la fonction immuno-régulatrice des MIs est potentialisée après l'exposition des souris à des CpG, et que l'instillation intranasale de divers ligands de TLR modifie le nombre de MIs (Sabatel et al., 2017). Dans cette étude, nous avons élargi la fenêtre temporelle et augmenté la résolution de l'analyse des nombres de MIs au sein de chaque sous-population après une exposition par voie aérienne à trois ligands de TLR différents, révélant la complexité du compartiment monocytaire-macrophagique dans un contexte inflammatoire. De manière générale, les MIs CD206⁻ et les monocytes CD64⁺CD16.2⁺ sont davantage affectés par les traitements appliqués que les MIs CD206⁺. L'exposition aux LPS et CpG, qui augmentent tous deux le nombre de MIs mais par des mécanismes dépendants et indépendants du CCR2 respectivement, présentent des dynamiques de populations différentes. En effet, le traitement au LPS mène à l'expansion des 2 sous-populations de MIs et des monocytes CD64⁺CD16.2⁺ 3 jours après l'injection, mais surtout des MIs CD206⁻ 7 jours après l'injection. Les CpG, quant à eux, amplifient de manière spectaculaire le nombre de monocytes CD64⁺CD16.2⁺ qui constituent alors la source principale d'IL-10 sept jours après l'injection. Ce pic de cellules CD64⁺CD16.2⁺ est ensuite suivi d'une augmentation des MIs CD206⁻ observée 14 jours après l'injection. Il est fort probable que l'identité des MIs telle que caractérisée à l'état basal soit profondément modifiée dans un contexte inflammatoire, et dès lors que leur distinction sur base de l'expression du CD206 et du CD16.2 ne soit plus appropriée. Nous avons notamment remarqué une diminution de l'expression du MHC-II par les cellules CD206⁻ après chaque traitement, reflétant potentiellement un afflux de monocytes MHC-II^{lo} au sein de cette fenêtre de sélection, lesquels peuvent participer à la génération de cellules CD206⁻MHC-II^{hi} 14 jours après l'injection lorsque l'expression du MHC-II retourne à des niveaux identiques, voire augmentés par rapport au jour 0. L'utilisation de méthodes étudiant davantage de paramètres après stimulation, comme le scRNA-seq, la cytométrie spectrale ou de masse, permettra à l'avenir de compléter nos résultats. Néanmoins, l'association de nos données avec des conséquences fonctionnelles *in vivo*, telles que la protection conférée par les MIs induits par les CpG précédemment décrite (Sabatel et al., 2017), est d'ores et déjà intéressante. De plus, il serait intéressant d'investiguer les modifications dynamiques de ces populations lors d'une exposition chronique à des dérivés microbiens, et d'analyser l'impact d'une modification de la flore commensale sur le potentiel fonctionnel de ces différentes cellules. Dans les conditions testées, nous n'avons pas pu observer une augmentation durable du nombre de MIs CD206⁺. Il est néanmoins suggéré que la fonction de ces cellules se révèle dans un modèle de fibrose induite par des dommages tissulaires (Chakarov et al., 2019), ouvrant les perspectives d'études de ces cellules dans des contextes non-microbiens, par

exemple de réparation tissulaire, d'exposition à des composants de l'air ambiant (la fumée de tabac, l'ozone, les particules de diesel,...) ou d'immunité anti-tumorale.

À ce titre, dans des modèles tumoraux, d'adénocarcinomes mammaires ou de carcinomes pulmonaires, deux types de macrophages associés aux tumeurs (MATs) et dérivés de monocytes ont été décrits au sein de la tumeur : d'une part des macrophages MHC-II^{hi}, et d'autre part des macrophages MHC-II^{lo} qui expriment davantage *Mrc1* (codant pour CD206), *Cd163*, *Lyve1*, *Stab1* et *Il10* au niveau transcriptomique et CD206 au niveau protéique (Movahedi et al., 2010), à l'instar des MIs CD206⁺ (Figure S4 et données non-montrées), reflétant de manière intéressante la dualité CD206⁺ / CD206⁻, présente dans différents types de tumeurs, au sein de différents organes. En outre, ces MATs MHC-II^{lo} résident principalement dans les zones hypoxiques (Movahedi et al., 2010), ce qui est cohérent avec l'expansion dans l'interstitium péri-bronchique de MIs MHC-II^{lo} dérivés de monocytes dans un modèle murin d'hypoxie (Florentin et al., 2018), et possèdent un potentiel pro-angiogénique important (Movahedi et al., 2010), favorisant hypothétiquement le développement tumoral. À l'état basal également, l'expression différentielle du CD206 permet de distinguer dans d'autres organes que le poumon deux populations de macrophages. C'est notamment le cas dans l'intestin et la moelle osseuse où l'on peut distinguer un compartiment de macrophages phagocytaires CD206^{hi} (exprimant au niveau transcriptomique de plus hauts niveaux de *Cd163*) d'un compartiment non-phagocytaire CD206^{lo} (A-Gonzalez et al., 2017).

À propos de la maintenance des sous-populations de MIs à l'état basal, notre étude, celle de Sophie Gibbings et de Svetoslav Chakarov convergent vers l'idée que ces sous-populations sont lentement remplacées par des cellules dérivées de monocytes chez la souris adulte (Chakarov et al., 2019; Gibbings et al., 2017). Ici, nous avons mis en évidence que les MIs CD206⁺ possèdent un potentiel d'auto-maintenance plus élevé que les MIs CD206⁻. L'origine embryonnaire de ces sous-populations reste à investiguer formellement, bien que nous ayons observé que les deux sous-populations majeures de MIs, ainsi que les monocytes CD64⁺CD16.2⁺, sont présents chez les souriceaux nouveau-nés, deux jours après leur naissance (voir Figure Discussion 2). Serena Tan et Mark Krasnow ont identifié une sous-population de pré-macrophages dérivés du sac vitellin qui persisteraient en tant que MIs « primitifs » au sein des espaces sous-mésothéliaux et périvasculaires des poumons de la souris adultes (Tan et Krasnow, 2016), lesquels pourraient correspondre aux MIs CD206⁺, préférentiellement localisés dans les espaces péri-bronchiques / péri-vasculaires. Dans cette même étude, les MIs appelés « définitifs », dérivant de précurseurs circulants dès la naissance, peuplent davantage le parenchyme pulmonaire (Tan et Krasnow, 2016), à l'instar des MIs CD206⁻. Récemment, Merav Cohen et collaborateurs ont identifié, par scRNA-seq, 3 clusters de macrophages dans le poumon de la souris adulte, dont un cluster (appelé « macrophage I ») exprime de hauts niveaux de *Cx3cr1*, *C1qa* et *C1qb* par rapport aux deux autres populations de macrophages (« macrophage II-III »), lesquelles expriment

davantage *Ear2*, *Pparg* et *Itgax* (codant pour le CD11c) (Cohen et al., 2018), suggérant que les macrophages I et II-III représentent des MIs et des MAs respectivement, au vu de la signature identifiée dans notre travail (voir Figure S3). Il est intéressant de noter que durant le développement embryonnaire, les macrophages I représentent près de 50% des cellules myéloïdes à E12.5, suggérant que les MIs peuvent être originaires du sac vitellin comme proposé précédemment (Tan et Krasnow, 2016) ; puis diminuent dès E16.5 au profit des macrophages II puis des macrophages III, qui dérivent des monocytes du foie fœtal. Néanmoins, la résolution de ces analyses ne permettent malheureusement pas de savoir à ce stade si ce phénomène concerne préférentiellement une sous-population particulière de MIs.

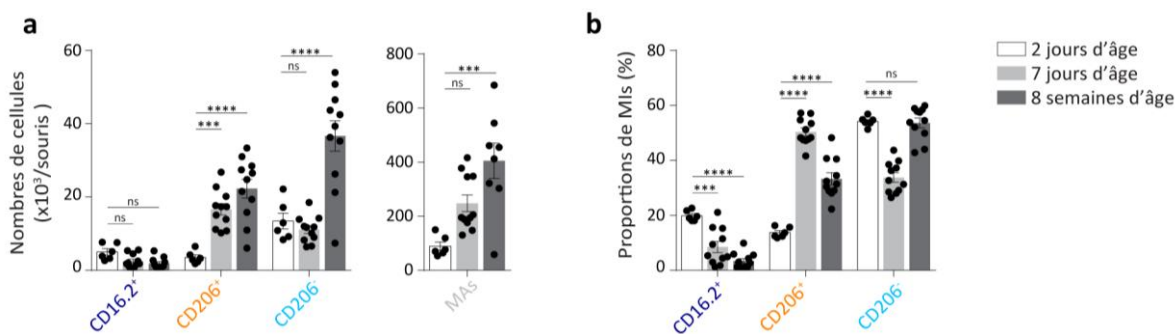


Figure Discussion 2 Evolution temporelle des nombres et proportions des sous-populations de MIs et des monocytes CD64⁺CD16.2⁺ après la naissance. **a** Nombres de monocytes CD64⁺CD16.2⁺ (CD16.2⁺), de MIs CD206⁺ (CD206⁺), de MIs CD206⁻ (CD206⁻) et de MAs et **b** proportions de chaque sous-population parmi les cellules non-alvéolaires CD64⁺, au sein des poumons de souris C57BL/6 sacrifiées 2 jours, 7 jours et 8 semaines après leur naissance. **(a,b)** Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes et montrent la moyenne \pm s.e.m, chaque symbole représentant une souris individuelle (n=6-11 souris/condition). Les résultats statistiques ont été obtenus à l'aide d'analyses de variance (**a panel de droite**) à un facteur (*one-way* ANOVA) ou (**a panel de gauche, b**) à deux facteurs (*two-way* ANOVA), suivies de post-tests de Tuckey. **, $P < 10^{-3}$; ****, $P < 10^{-4}$; ns, non-significatif. MAs, macrophages alvéolaires; MIs, macrophages interstitiels.

À côté des sous-populations de MIs, nous avons identifié une population mineure de monocytes CD64⁺CD16.2⁺ NR4A1-dépendants. Ces monocytes sont phénotypiquement distincts des monocytes pulmonaires tissulaires Ly-6C^{hi} qui sont quant à eux NR4A1-indépendants, expriment Ly-6C mais pas ou peu CX3CR1, CD64 (Jakubzick et al., 2013; Sabatel et al., 2017) et CD16.2, contrairement aux monocytes CD64⁺CD16.2⁺. Leur localisation dans l'interstitium alvéolaire, leur phénotype, leur profil transcriptomique, les analyses d'inférence de trajectoire et les données obtenues dans les expériences de chimères et de transferts adoptifs de monocytes supportent la notion que ces monocytes CD64⁺CD16.2⁺ dérivent de monocytes patrouilleurs Ly-6C^{lo} et représentent un état intermédiaire de leur différenciation en MIs CD206⁻. Premièrement, les monocytes CD64⁺CD16.2⁺ et les MIs CD206⁺ peuplent préférentiellement la même niche anatomique, à savoir l'interstitium alvéolaire. Deuxièmement, les monocytes CD64⁺CD16.2⁺ partagent des similarités évidentes avec les monocytes patrouilleurs, à savoir le niveau d'expression de différents marqueurs de surface (i.e. CX3CR1, CD16.2, Ly-6C), la demi-vie et la dépendance à NR4A1. Troisièmement, contrairement aux monocytes patrouilleurs Ly-6C^{lo}, les monocytes CD64⁺CD16.2⁺ ont la particularité d'être partiellement extravasculaires, d'exprimer CD64 et de produire de l'IL-10 à l'état basal, une caractéristique restreinte aux MIs (Bedoret et al., 2009;

Kawano et al., 2016; Sabatel et al., 2017). Quatrièmement, au niveau transcriptomique, les monocytes CD64⁺CD16.2⁺ expriment de plus hauts niveaux de différents gènes caractéristiques des MIs par comparaison aux monocytes patrouilleurs, suggérant que le profil transcriptomique de ces cellules est façonné par l'intégration de signaux spécifiques du tissu. Cinquièmement, les analyses de vélocité d'ARN révèlent un état dynamique de transition de ces cellules, caractérisé par leur haute probabilité à rejoindre le cluster des MIs CD206⁻ endéans les heures suivant l'analyse (La Manno et al., 2018). Sixièmement, la reconstitution des monocytes CD64⁺CD16.2⁺ après irradiation létale apparaît comme étant au moins partiellement NR4A1-dépendante, supportant que ces cellules dérivent de monocytes patrouilleurs Ly-6C^{hi}. Septièmement, nous avons détecté au sein des monocytes CD64⁺CD16.2⁺, et dans une moindre mesure au sein des MIs CD206⁻, une faible proportion de cellules dérivées de monocytes Ly-6C^{lo} sanguins transférés 7 jours avant l'analyse. Dans ces expériences, réalisées à l'état basal, la détection de cellules dérivées des fragiles monocytes transférés est néanmoins très difficile. Enfin, le profil d'expansion des MIs induits par une exposition des voies aériennes aux CpG est altéré au sein des souris déficientes pour *Nr4a1*. Chez les souris *Nr4a1*^{-/-}, l'instillation de CpG, généralement bien tolérée par les souris sauvages ou *Ccr2*^{-/-}, favorise la mort de l'animal, un phénomène également observé chez les souris *Il10*^{-/-}, suggérant que la production d'IL-10 et la fonction de cellules dépendantes de NR4A1 sont essentielles pour contrer la toxicité des CpG. Or, après une injection de CpG à des souris sauvages, le nombre de cellules CD64⁺CD16.2⁺, dont une majorité produit de l'IL-10, augmente fortement dès 3 jours, avec un pic à 7 jours après injection, suivi d'une augmentation des MIs CD206⁻, suggérant que ces cellules jouent un rôle protecteur important à l'encontre de l'inflammation induite par l'exposition aux CpG. La séquence d'expansion du nombre de MIs CD206⁻ précédée d'une augmentation du nombre de cellules CD64⁺CD16.2⁺ est également observée consécutivement à une injection de LPS, ce qui peut être cohérent avec le continuum de différenciation des monocytes CD64⁺CD16.2⁺ en MIs CD206⁻ suggéré à l'état basal. Il n'est néanmoins pas exclu que les monocytes CD64⁺CD16.2⁺ puissent aussi être à l'origine des MIs CD206⁺ et que les monocytes classiques puissent aussi se différencier en MIs CD206⁺ ou CD206⁻. En effet, le nombre de MIs n'est pas affecté chez des souris *Nr4a1*^{-/-} et *Ccr2*^{-/-}, dont les nombres de monocytes patrouilleurs Ly-6C^{lo} et classiques Ly-6C^{hi} sont diminués respectivement. À la lumière des analyses d'inférence de trajectoire, il est possible que les deux types de monocytes représentent des sources redondantes dans le développement des deux sous-populations de MIs, ce qui est cohérent avec l'idée que différents précurseurs peuvent participer au repeuplement d'une niche particulière (Guilliams et Scott, 2017; van de Laar et al., 2016; Takata et al., 2017). La génération d'outils déficients en monocytes classiques et patrouilleurs, tels que des souris *Ccr2*^{-/-}*Nr4a1*^{-/-} potentiellement, permettrait à l'avenir de tester cette hypothèse.

À notre connaissance, le développement de macrophages tissulaires au départ de monocytes patrouilleurs à l'état basal n'a, jusqu'à ce jour, pas encore été décrit. Après un traumatisme ou une exposition à une substance irritante dans le derme, au cours d'une infection à *Listeria monocytogenes*

dans le péritoine, une étude décrit l'extravasation de monocytes patrouilleurs (CX3CR1⁺Gr1⁻) qui adoptent un programme de différenciation et un profil transcriptomique typique de macrophages (Auffray et al., 2007). Au niveau du poumon à l'état basal, il a été suggéré que les monocytes patrouilleurs peuvent constituer des précurseurs de DCs CD11b⁺ (Jakubzick et al., 2008), mais pas de MAs (Landsman et al., 2007). Des expériences de transfert adoptif de monocytes ont permis de montrer que contrairement aux monocytes classiques, les monocytes patrouilleurs CX3CR1⁺Gr1⁻ sont capables de participer au repeuplement non seulement des DCs CD11b⁺, mais aussi des MAs suite à une déplétion de ces cellules consécutive à l'injection de toxine diphtérique à des souris CD11c-DTR, ou suite à une exposition de souris sauvages au LPS (Landsman et al., 2007). Ces données appuient donc l'hypothèse que les monocytes patrouilleurs peuvent constituer les précurseurs d'autres phagocytes mononucléés du poumon, à l'état basal ou en conditions stimulées. Certains auteurs proposent même que les monocytes patrouilleurs représentent des macrophages différenciés intravasculaires (Ginhoux et Jung, 2014), idée par ailleurs appuyée par l'expression plus importante de marqueurs de macrophages tissulaires (Apoe, CD36) au niveau transcriptomique par les monocytes patrouilleurs Ly-6C^{lo}, par comparaison aux monocytes classiques Ly-6C^{hi} dans le sang (Mildner et al., 2017). Le potentiel de développement de monocytes patrouilleurs en macrophages tissulaires est donc possible, et à ce titre notre étude se révèle donc être une étape supplémentaire dans la compréhension de la fonction de cellules dérivées de monocytes patrouilleurs et leur implication dans le développement de MIs.

La comparaison de nos données avec la situation à l'état basal dans l'organisme humain est compliquée par l'accès limité à des échantillons provenant d'individus sains. L'utilisation des marges saines collectées lors de la résection de tumeurs pulmonaires représente dès lors une alternative pour explorer la biologie des macrophages tissulaires pulmonaires. Svetoslav Chakarov et collègues ont identifié, dans les données de scRNA-seq obtenues à partir de cellules des marges saines de tumeurs pulmonaires, une fraction substantielle de macrophages partageant la signature spécifique des MIs Lyve-1^{hi}MHC-II^{lo} et Lyve-1^{lo}MHC-II^{hi} de la souris, à savoir 1003 et 784 cellules respectivement sur un total de 3873 macrophages analysés (Chakarov et al., 2019). Néanmoins, le phénotypage par cytométrie en flux de ces macrophages, identifiés comme étant CD45⁺CD11b⁺CD14⁺CD16⁻, ne permet pas clairement de distinguer les deux populations de macrophages, mais révèle toutefois une fraction de cellules exprimant de plus hauts niveaux de CD206, de CD163 et de CD169 (Chakarov et al., 2019). Jennifer Dewhurst et collaborateurs ont récemment caractérisé les macrophages pulmonaires de patients souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Dewhurst et al., 2017). Dans ce rapport, les MIs peuvent être divisés en deux sous-populations : une population de macrophages présentant une taille plus grande et exprimant de plus hauts niveaux de CD206, et une population de macrophages plus petits, plus abondants, potentiellement dérivés de monocytes, et exprimant davantage HLA-DR, CD14, CD36 et CD38 et des gènes pro-inflammatoires par comparaison aux autres macrophages (Dewhurst et al., 2017). L'évident parallèle avec les sous-populations de MIs murins

décrites dans notre travail est très intéressant, et encourage la mise en relation de nos découvertes avec la biologie humaine. Il est par exemple tentant de transposer la particularité spatiale des MIs CD206⁺ et CD206⁻ chez la souris à une implication potentielle de ces macrophages dans des maladies humaines, connues pour se développer dans des zones particulières des poumons. D'une part, les espaces péri-bronchiques, enrichis en MIs CD206⁺ chez le souris, correspondent aux zones touchées par des maladies des voies respiratoires, telle que l'asthme ou la BPCO (Locksley, 2010; Hogg, 2004). À ce titre, dans l'interstitium bronchique des patients asthmatiques, le nombre de macrophages produisant de l'IL-10, et exprimant également CD206 selon les auteurs, est réduit par rapport aux sujets sains, au profit d'une augmentation de MIs CD206⁺(IL10⁻) (Draijer et al., 2017). Dans cette étude, le traitement aux corticostéroïdes inhalés permet de rétablir au moins partiellement le nombre de MIs (CD206⁺)IL10⁺ qui est corrélé à une meilleure fonction respiratoire, suggérant que chez les patients asthmatiques, le nombre de MIs CD206⁺ augmente alors qu'ils n'exercent plus leur fonction protectrice, leur capacité à produire de l'IL-10 étant compromise. D'autre part, l'interstitium alvéolaire, qui abrite chez la souris davantage de MIs CD206⁻, est quant à lui davantage lésé durant le développement de maladies interstitielles, telles que la fibrose pulmonaire idiopathique ou la sarcoïdose pulmonaire (Antoniou et al., 2014). À ce titre, une expansion de macrophages CD68⁺MAFB⁺, probablement des MIs est observée chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, et les données de séquençage obtenues dans un modèle murin de fibrose induite à la bléomycine montrent que ces MIs, par comparaison aux MAs, expriment de plus hauts niveaux de nombreux gènes de la signature des MIs identifiée à l'état basal dans ce travail (*H2-Aa, H2-Ab1, C1qa, C1qb, C1qc, Cx3cr1, Mafb, Aif1, Socs3,...*), mais aussi de plusieurs gènes davantage exprimé par les MIs CD206⁻ (*H2-Aa, H2-Ab1, Ccr2, Il1b, Cxcl16, Mmp12, S100a4, S100a6, Mgl2, Pblid1*) (Fig. S3 et données non-montrées) (Aran et al., 2019). Néanmoins, la contribution exacte des sous-populations de MIs dans ce phénomène reste inconnue. La mise en relation de la fonction des sous-populations de MIs chez l'humain dans le développement ou le contrôle de ces maladies constitue un fascinant domaine de recherche qui reste donc à investiguer.

Notre travail constitue une base intéressante dans l'étude extensive de la biologie des sous-populations de MIs. La caractérisation des programmes transcriptionnels et des signaux instructifs dérivés du tissu façonnant l'identité des sous-populations, ainsi que la fonction de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie et durant le développement de diverses maladies pulmonaires, restent à étudier. Le développement d'outils transgéniques permettant la détection, l'altération et/ou la déplétion spécifique de ces sous-populations peuvent constituer une aide précieuse afin de répondre à ces différentes questions. Ces données constituent potentiellement le point de départ dans le développement d'approches thérapeutiques ciblées à l'encontre des maladies inflammatoires pulmonaires, permettant d'affecter ou de potentialiser une sous-population particulière de MIs tout en épargnant les autres types cellulaires.

Bibliographie

- A-Gonzalez, N., Quintana, J.A., García-Silva, S., Mazariegos, M., González de la Aleja, A., Nicolás-Ávila, J.A., Walter, W., Adrover, J.M., Crainiciuc, G., Kuchroo, V.K., et al. (2017). Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. *J. Exp. Med.* *214*, 1281–1296.
- van oud Alblas, A.B., and van Furth, R. (1979). Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.* *149*, 1504–1518.
- Antoniou, K.M., Margaritopoulos, G.A., Tomassetti, S., Bonella, F., Costabel, U., and Poletti, V. (2014). Interstitial lung disease. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* *23*, 40–54.
- Aran, D., Looney, A.P., Liu, L., Wu, E., Fong, V., Hsu, A., Chak, S., Naikawadi, R.P., Wolters, P.J., Abate, A.R., et al. (2019). Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat. Immunol.* *20*, 163–172.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* *317*, 666–670.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* *15*, 929–937.
- Bain, C.C., Hawley, C.A., Garner, H., Scott, C.L., Schridde, A., Steers, N.J., Mack, M., Joshi, A., Williams, M., Mowat, A.M.I., et al. (2016). Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nat. Commun.* *7*, ncomms11852.
- Becher, B., Schlitzer, A., Chen, J., Mair, F., Sumatoh, H.R., Teng, K.W.W., Low, D., Ruedl, C., Riccardi-Castagnoli, P., Poidinger, M., et al. (2014). High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat. Immunol.* *15*, 1181–1189.
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., et al. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3723–3738.
- Beeh, K.-M., Kanniss, F., Wagner, F., Schilder, C., Naudts, I., Hammann-Haenni, A., Willers, J., Stocker, H., Mueller, P., Bachmann, M.F., et al. (2013). The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 866–874.
- Bertalanffy, F. (1964). Respiratory Tissue : Structure, Histophysiology, Cytodynamics Part I. Review and Basic Cytomorphy. *Int Rev Cytol* *16*, 233–328.
- Bharat, A., Bhorade, S.M., Morales-Nebreda, L., McQuattie-Pimentel, A.C., Soberanes, S., Ridge, K., DeCamp, M.M., Mestan, K.K., Perlman, H., Budinger, G.R.S., et al. (2016). Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *54*, 147–149.
- Bilyk, N., Mackenzie, J.S., Papadimitriou, J.M., and Holt, P.G. (1988). Functional studies on macrophage populations in the airways and the lung wall of SPF mice in the steady-state and during respiratory virus infection. *Immunology* *65*, 417–425.
- Blumenthal, R.L., Campbell, D.E., Hwang, P., DeKruyff, R.H., Frankel, L.R., and Umetsu, D.T. (2001). Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *107*, 258–264.

- Blussé van Oud Alblas, A., van der Linden-Schrever, B., and van Furth, R. (1981). Origin and kinetics of pulmonary macrophages during an inflammatory reaction induced by intravenous administration of heat-killed bacillus Calmette-Guérin. *J. Exp. Med.* *154*, 235–252.
- 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 IL-10 in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 3165–3176.
- Bowden, D.H., and Adamson, I.Y. (1972). The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage. *Am. J. Pathol.* *68*, 521–537.
- Braun-Fahrländer, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., et al. (2002). Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* *347*, 869–877.
- Brody, A.R., Bonner, J.C., Overby, L.H., Badgett, A., Kalter, V., Kumar, R.K., and Bennett, R.A. (1992). Interstitial pulmonary macrophages produce platelet-derived growth factor that stimulates rat lung fibroblast proliferation in vitro. *J. Leukoc. Biol.* *51*, 640–648.
- Broide, D., Schwarze, J., Tighe, H., Gifford, T., Nguyen, M.D., Malek, S., Van Uden, J., Martin-Orozco, E., Gelfand, E.W., and Raz, E. (1998). Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 7054–7062.
- Bruttger, J., Karram, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., Klein, M., Blank, T., Yona, S., Wolf, Y., et al. (2015). Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* *43*, 92–106.
- Buscher, K., Marcovecchio, P., Hedrick, C.C., and Ley, K. (2017). Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation. *Front. Cardiovasc. Med.* *4*, 80.
- Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E., and Satija, R. (2018). Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* *36*, 411–420.
- Byrne, A.J., Maher, T.M., and Lloyd, C.M. (2016). Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease? *Trends Mol. Med.* *22*, 303–316.
- Calderon, B., Carrero, J.A., Ferris, S.T., Sojka, D.K., Moore, L., Epelman, S., Murphy, K.M., Yokoyama, W.M., Randolph, G.J., and Unanue, E.R. (2015). The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. *J. Exp. Med.* *212*, 1497–1512.
- 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, S., Lim, H.Y., Tan, L., Lim, S.Y., See, P., Lum, J., Zhang, X.-M., Foo, S., Nakamizo, S., Duan, K., et al. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* *363*.
- Chandler, D.B., and Brannen, A.L. (1990). Interstitial macrophage subpopulations: responsiveness to chemotactic stimuli. *Tissue Cell* *22*, 427–434.
- Chandler, D.B., Kennedy, J.I., and Fulmer, J.D. (1986). Studies of membrane receptors, phagocytosis, and morphology of subpopulations of rat lung interstitial macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* *134*, 542–547.

- Chandler, D.B., Bayles, G., and Fuller, W.C. (1988). Prostaglandin synthesis and release by subpopulations of rat interstitial macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* *138*, 901–907.
- Cohen, M., Giladi, A., Gorki, A.-D., Solodkin, D.G., Zada, M., Hladik, A., Miklosi, A., Salame, T.-M., Halpern, K.B., David, E., et al. (2018). Lung Single-Cell Signaling Interaction Map Reveals Basophil Role in Macrophage Imprinting. *Cell* *175*, 1031-1044.e18.
- Coleman, M.M., Ruane, D., Moran, B., Dunne, P.J., Keane, J., and Mills, K.H.G. (2013). Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *48*, 773–780.
- Creticos, P.S., Schroeder, J.T., Hamilton, R.G., Balcer-Whaley, S.L., Khattignavong, A.P., Lindblad, R., Li, H., Coffman, R., Seyfert, V., Eiden, J.J., et al. (2006). Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* *355*, 1445–1455.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., et al. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* *33*, 375–386.
- Crowell, R.E., Heaphy, E., Valdez, Y.E., Mold, C., and Lehnert, B.E. (1992). Alveolar and interstitial macrophage populations in the murine lung. *Exp. Lung Res.* *18*, 435–446.
- 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.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* *14*, 986–995.
- De Schepper, S., Verheijden, S., Aguilera-Lizarraga, J., Viola, M.F., Boesmans, W., Stakenborg, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Boeckx, B., Dierckx de Casterlé, I., et al. (2018). Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell* *175*, 400-415.e13.
- Desch, A.N., Gibbings, S.L., Goyal, R., Kolde, R., Bednarek, J., Bruno, T., Slansky, J.E., Jacobelli, J., Mason, R., Ito, Y., et al. (2016). Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *193*, 614–626.
- Dewhurst, J.A., Lea, S., Hardaker, E., Dungwa, J.V., Ravi, A.K., and Singh, D. (2017). Characterisation of lung macrophage subpopulations in COPD patients and controls. *Sci. Rep.* *7*, 7143.
- Draijer, C., Boersma, C.E., Robbe, P., Timens, W., Hylkema, M.N., Ten Hacken, N.H., van den Berge, M., Postma, D.S., and Melgert, B.N. (2017). Human asthma is characterized by more IRF5⁺ M1 and CD206⁺ M2 macrophages and less IL-10⁺ M2-like macrophages around airways compared with healthy airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* *140*, 280-283.e3.
- Dranoff, G., Crawford, A.D., Sadelain, M., Ream, B., Rashid, A., Bronson, R.T., Dickersin, G.R., Bachurski, C.J., Mark, E.L., and Whitsett, J.A. (1994). Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* *264*, 713–716.
- Drath, D.B., Davies, P., Shorey, J.M., Gibran, N.S., Simpson, P.J., and Huber, G.L. (1982). Characterization of a postlavage, in situ pulmonary macrophage population. *J. Cell. Physiol.* *111*, 97–103.
- Dress, R.J., Dutertre, C.-A., Giladi, A., Schlitzer, A., Low, I., Shadan, N.B., Tay, A., Lum, J., Kairi, M.F.B.M., Hwang, Y.Y., et al. (2019). Plasmacytoid dendritic cells develop from Ly6D⁺ lymphoid progenitors distinct from the myeloid lineage. *Nat. Immunol.* *20*, 852–864.

- Eder, W., Ege, M.J., and von Mutius, E. (2006). The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* *355*, 2226–2235.
- Eisenbarth, S.C., Piggott, D.A., Huleatt, J.W., Visintin, I., Herrick, C.A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* *196*, 1645–1651.
- Ensan, S., Li, A., Besla, R., Degousee, N., Cosme, J., Roufaiel, M., Shikatani, E.A., El-Maklizi, M., Williams, J.W., Robins, L., et al. (2016). Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat. Immunol.* *17*, 159–168.
- 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. *Exp. Mol. Pathol.* *70*, 77–82.
- Ferrari-Lacraz, S., Nicod, L.P., Chicheportiche, R., Welgus, H.G., and Dayer, J.M. (2001). Human lung tissue macrophages, but not alveolar macrophages, express matrix metalloproteinases after direct contact with activated T lymphocytes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *24*, 442–451.
- Florentin, J., Coppin, E., Vasamsetti, S.B., Zhao, J., Tai, Y.-Y., Tang, Y., Zhang, Y., Watson, A., Sembrat, J., Rojas, M., et al. (2018). Inflammatory Macrophage Expansion in Pulmonary Hypertension Depends upon Mobilization of Blood-Borne Monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *200*, 3612–3625.
- Franke-Ullmann, G., Pfortner, C., Walter, P., Steinmüller, C., Lohmann-Matthes, M.L., and Kobzik, L. (1996). Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 3097–3104.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* *128*, 415–435.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* *46*, 845–852.
- Garbi, N., and Lambrecht, B.N. (2017). Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. *Pflugers Arch.* *469*, 561–572.
- Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., and Mantovani, A. (2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 337–366.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* *13*, 1118–1128.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71–82.

- Gentek, R., Molawi, K., and Sieweke, M.H. (2014). Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol. Rev.* 262, 56–73.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.
- Gibbings, S.L., Goyal, R., Desch, A.N., Leach, S.M., Prabagar, M., Atif, S.M., Bratton, D.L., Janssen, W., and Jakubzick, C.V. (2015). Transcriptome analysis highlights the conserved difference between embryonic and postnatal-derived alveolar macrophages. *Blood* 126, 1357–1366.
- Gibbings, 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., et al. (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 57, 66–76.
- Giladi, A., and Amit, I. (2017). Immunology, one cell at a time. *Nature* 547, 27–29.
- Gill, S.S., Suri, S.S., Janardhan, K.S., Caldwell, S., Duke, T., and Singh, B. (2008). Role of pulmonary intravascular macrophages in endotoxin-induced lung inflammation and mortality in a rat model. *Respir. Res.* 9, 69.
- Ginhoux, F., and Guillems, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.
- Ginhoux, F., Schultze, J.L., Murray, P.J., Ochando, J., and Biswas, S.K. (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat. Immunol.* 17, 34–40.
- Glass, C.K. (2015). Genetic and genomic approaches to understanding macrophage identity and function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 755–762.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463–475.
- Gosselin, D., Link, V.M., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., Stender, J.D., Chun, H.B., Garner, H., Geissmann, F., et al. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 159, 1327–1340.
- Guillems, M., and Scott, C.L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nat. Rev. Immunol.* 17, 451–460.
- Guillems, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013a). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* 210, 1977–1992.

- Guilliams, M., Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2013b). Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol.* *6*, 464–473.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013c). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* *210*, 1977–1992.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578.
- Guilliams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* *49*, 595–613.
- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M.A., Germain, R.N., and Lambrecht, B.N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* *15*, 410–416.
- Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat. Immunol.* *12*, 778–785.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* *38*, 792–804.
- 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.
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., et al. (2015). C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* *42*, 665–678.
- Hogg, J.C. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet Lond. Engl.* *364*, 709–721.
- Holt, P.G., Degebrodt, A., Venaille, T., O’Leary, C., Krska, K., Flexman, J., Farrell, H., Shellam, G., Young, P., and Penhale, J. (1985). Preparation of interstitial lung cells by enzymatic digestion of tissue slices: preliminary characterization by morphology and performance in functional assays. *Immunology* *54*, 139–147.
- Hopstädter, 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.
- Hume, D.A. (2008). Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 5829–5835.
- Hume, D.A., Ross, I.L., Himes, S.R., Sasmono, R.T., Wells, C.A., and Ravasi, T. (2002). The mononuclear phagocyte system revisited. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 621–627.
- Hussell, T., and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 81–93.

- Jakubzick, C., Tacke, F., Ginhoux, F., Wagers, A.J., van Rooijen, N., Mack, M., Merad, M., and Randolph, G.J. (2008). Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103⁺ and CD103⁻ pulmonary dendritic cell populations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 3019–3027.
- 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.
- von Jns, A. (1876). Experimentelle Untersuchungen über Kieselstaubinhalation. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* *5*, 169–194.
- 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.
- Kaplan, M.E., Coons, A.H., and Deane, H.W. (1950). Localization of antigen in tissue cells; cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse. *J. Exp. Med.* *91*, 15–30, 4 pl.
- Kawano, H., Kayama, H., Nakama, T., Hashimoto, T., Umemoto, E., and Takeda, K. (2016). IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *Int. Immunol.* *28*, 489–501.
- Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 290–301.
- Kim, K.-W., Williams, J.W., Wang, Y.-T., Ivanov, S., Gilfillan, S., Colonna, M., Virgin, H.W., Gautier, E.L., and Randolph, G.J. (2016). MHC II⁺ resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. *J. Exp. Med.* *213*, 1951–1959.
- Kim, M., Galan, C., Hill, A.A., Wu, W.-J., Fehlner-Peach, H., Song, H.W., Schady, D., Bettini, M.L., Simpson, K.W., Longman, R.S., et al. (2018). Critical Role for the Microbiota in CX3CR1⁺ Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses. *Immunity* *49*, 151-163.e5.
- Kline, J.N., Kitagaki, K., Businga, T.R., and Jain, V.V. (2002). Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *283*, L170-179.
- Kobzik, L., Godleski, J.J., Barry, B.E., and Brain, J.D. (1988). Isolation and antigenic identification of hamster lung interstitial macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* *138*, 908–914.
- Krieg, A.M. (2012). CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther.* *22*, 77–89.
- La Manno, G., Soldatov, R., Zeisel, A., Braun, E., Hochgerner, H., Petukhov, V., Lidschreiber, K., Kastrioti, M.E., Lönnerberg, P., Furlan, A., et al. (2018). RNA velocity of single cells. *Nature* *560*, 494–498.
- van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., et al. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* *44*, 755–768.
- Lagranderie, M., Nahori, M.-A., Balazuc, A.-M., Kiefer-Biasizzo, H., Lapa e Silva, J.-R., Milon, G., Marchal, G., and Vargaftig, B.B. (2003). Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. *Immunology* *108*, 352–364.

- Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2009). Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* *31*, 412–424.
- Lambrecht, B.N., De Veerman, M., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Thielemans, K., and Pauwels, R.A. (2000). Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* *106*, 551–559.
- Landsman, L., and Jung, S. (2007). Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 3488–3494.
- Landsman, L., Varol, C., and Jung, S. (2007). Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2000–2007.
- Landsman, L., Bar-On, L., Zerneck, A., Kim, K.-W., Krauthgamer, R., Shagdarsuren, E., Lira, S.A., Weissman, I.L., Weber, C., and Jung, S. (2009). CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* *113*, 963–972.
- Laskin, D.L., Weinberger, B., and Laskin, J.D. (2001). Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *70*, 163–170.
- Lauzon-Joset, J.-F., Marsolais, D., Langlois, A., and Bissonnette, E.Y. (2014). Dysregulation of alveolar macrophages unleashes dendritic cell-mediated mechanisms of allergic airway inflammation. *Mucosal Immunol.* *7*, 155–164.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* *159*, 1312–1326.
- 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.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 750–761.
- Leemans, J.C., Juffermans, N.P., Florquin, S., van Rooijen, N., Vervoordeldonk, M.J., Verbon, A., van Deventer, S.J., and van der Poll, T. (2001). Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 4604–4611.
- Lehnert, B.E., Valdez, Y.E., and Holland, L.M. (1985). Pulmonary macrophages: alveolar and interstitial populations. *Exp. Lung Res.* *9*, 177–190.
- 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.
- Locksley, R.M. (2010). Asthma and allergic inflammation. *Cell* *140*, 777–783.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.
- Machiels, B., Dourcy, M., Xiao, X., Javaux, J., Mesnil, C., Sabatel, C., Desmecht, D., Lallemand, F., Martinive, P., Hammad, H., et al. (2017). A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat. Immunol.* *18*, 1310–1320.

- MacLeod, M.K.L., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2010). Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. *Immunology* *130*, 10–15.
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., et al. (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell* *161*, 1202–1214.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., et al. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* *15*, 5647–5658.
- Mesnil, C., Sabatel, C.M., Marichal, T., Toussaint, M., Cataldo, D., Drion, P.-V., Lekeux, P., Bureau, F., and Desmet, C.J. (2012). Resident CD11b(+)Ly6C(-) lung dendritic cells are responsible for allergic airway sensitization to house dust mite in mice. *PloS One* *7*, e53242.
- Mesnil, C., Raulier, S., Paulissen, G., Xiao, X., Birrell, M.A., Pirotin, D., Janss, T., Starkl, P., Ramery, E., Henket, M., et al. (2016). Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J. Clin. Invest.* *126*, 3279–3295.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 6991–6995.
- 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.
- Mossadegh-Keller, N., Sarrazin, S., Kandalla, P.K., Espinosa, L., Stanley, E.R., Nutt, S.L., Moore, J., and Sieweke, M.H. (2013). M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature* *497*, 239–243.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., et al. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* *70*, 5728–5739.
- von Mutius, E. (2016). The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 680–689.
- Naito, M., Yamamura, F., Nishikawa, S., and Takahashi, K. (1989). Development, differentiation, and maturation of fetal mouse yolk sac macrophages in cultures. *J. Leukoc. Biol.* *46*, 1–10.
- Naito, M., Umeda, S., Yamamoto, T., Moriyama, H., Umezumi, 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.

- Neu, K.E., Tang, Q., Wilson, P.C., and Khan, A.A. (2017). Single-Cell Genomics: Approaches and Utility in Immunology. *Trends Immunol.* *38*, 140–149.
- Nie, H., Wang, A., He, Q., Yang, Q., Liu, L., Zhang, G., Huang, Y., Ding, X., Yu, H., and Hu, S. (2017). Phenotypic switch in lung interstitial macrophage polarization in an ovalbumin-induced mouse model of asthma. *Exp. Ther. Med.* *14*, 1284–1292.
- Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2014). Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* *157*, 832–844.
- Okabe, Y., and Medzhitov, R. (2016). Tissue biology perspective on macrophages. *Nat. Immunol.* *17*, 9–17.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 5073–5084.
- 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.
- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*, 2527–2534.
- Plantinga, M., Guilliams, M., Vanheerswyngheles, M., Deswarte, K., Branco-Madeira, F., Toussaint, W., Vanhoutte, L., Neyt, K., Killeen, N., Malissen, B., et al. (2013). Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* *38*, 322–335.
- 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.
- Reed, J.L., Brewah, Y.A., Delaney, T., Welliver, T., Burwell, T., Benjamin, E., Kuta, E., Kozhich, A., McKinney, L., Suzich, J., et al. (2008). Macrophage impairment underlies airway occlusion in primary respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* *198*, 1783–1793.
- Rodero, M.P., Poupel, L., Loyher, P.-L., Hamon, P., Licata, F., Pessel, C., Hume, D.A., Combadière, C., and Boissonnas, A. (2015). Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *ELife* *4*, e07847.
- Rouzer, C.A., Scott, W.A., Hamill, A.L., and Cohn, Z.A. (1982). Synthesis of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by mouse pulmonary macrophages. *J. Exp. Med.* *155*, 720–733.
- Roy, S.R., Schiltz, A.M., Marotta, A., Shen, Y., and Liu, A.H. (2003). Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J. Allergy Clin. Immunol.* *112*, 571–578.
- Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirottin, D., Xiao, X., et al. (2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* *46*, 457–473.
- Samokhvalov, I.M., Samokhvalova, N.I., and Nishikawa, S. (2007). Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* *446*, 1056–1061.
- Satpathy, A.T., Kc, W., Albring, J.C., Edelson, B.T., Kretzer, N.M., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2012). *Zbtb46* expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J. Exp. Med.* *209*, 1135–1152.

- 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.
- Schneider, C., Nobs, S.P., Kurrer, M., Rehrauer, H., Thiele, C., and Kopf, M. (2014). Induction of the nuclear receptor PPAR- γ by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat. Immunol.* *15*, 1026–1037.
- Schuijjs, M.J., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2019). Professional and “Amateur” Antigen-Presenting Cells In Type 2 Immunity. *Trends Immunol.* *40*, 22–34.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* *336*, 86–90.
- Schyns, J., Bureau, F., and Marichal, T. (2018). Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future. *J Immunol Res* *2018*, 5160794.
- Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., et al. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat. Commun.* *7*, 10321.
- Scott, C.L., T’Jonck, W., Martens, L., Todorov, H., Sichien, D., Soen, B., Bonnardel, J., De Prijck, S., Vandamme, N., Cannoodt, R., et al. (2018). The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity* *49*, 312-325.e5.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* *265*, 1573–1577.
- Sebring, R.J., and Lehnert, B.E. (1992). Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes. *Exp. Lung Res.* *18*, 479–496.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* *7*, 311–317.
- Sheng, J., Ruedl, C., and Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* *43*, 382–393.
- Sichien, D., Lambrecht, B.N., Williams, M., and Scott, C.L. (2017). Development of conventional dendritic cells: from common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal Immunol.* *10*, 831–844.
- Soroosh, P., Doherty, T.A., Duan, W., Mehta, A.K., Choi, H., Adams, Y.F., Mikulski, Z., Khorram, N., Rosenthal, P., Broide, D.H., et al. (2013). Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3⁺ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J. Exp. Med.* *210*, 775–788.
- Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., Williams, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev. Biol.* *1*, 4.
- Staub, N.C. (1994). Pulmonary intravascular macrophages. *Annu. Rev. Physiol.* *56*, 47–67.
- Steinmüller, C., Franke-Ullmann, G., Lohmann-Matthes, M.L., and Emmendorffer, A. (2000). Local activation of nonspecific defense against a respiratory model infection by application of interferon-gamma:

- comparison between rat alveolar and interstitial lung macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 481–490.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259–1260.
- Street, K., Risso, D., Fletcher, R.B., Das, D., Ngai, J., Yosef, N., Purdom, E., and Dudoit, S. (2018). Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. *BMC Genomics* 19, 477.
- Sunderkötter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J.M. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 4410–4417.
- Sur, S., Wild, J.S., Choudhury, B.K., Sur, N., Alam, R., and Klinman, D.M. (1999). Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 6284–6293.
- Suzuki, T., Arumugam, P., Sakagami, T., Lachmann, N., Chalk, C., Sallese, A., Abe, S., Trapnell, C., Carey, B., Moritz, T., et al. (2014). Pulmonary macrophage transplantation therapy. *Nature* 514, 450–454.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612–616.
- Tacke, F., Ginhoux, F., Jakubzick, C., van Rooijen, N., Merad, M., and Randolph, G.J. (2006). Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J. Exp. Med.* 203, 583–597.
- Takata, K., Kozaki, T., Lee, C.Z.W., Thion, M.S., Otsuka, M., Lim, S., Utami, K.H., Fidan, K., Park, D.S., Malleret, B., et al. (2017). Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. *Immunity* 47, 183–198.e6.
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938.
- Tan, S.Y.S., and Krasnow, M.A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Dev. Camb. Engl.* 143, 1318–1327.
- Toussaint, M., Fievez, L., Drion, P.-V., Cataldo, D., Bureau, F., Lekeux, P., and Desmet, C.J. (2013). Myeloid hypoxia-inducible factor 1 α prevents airway allergy in mice through macrophage-mediated immunoregulation. *Mucosal Immunol.* 6, 485–497.
- Trapnell, B.C., and Whitsett, J.A. (2002). Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 775–802.
- Tumpey, T.M., García-Sastre, A., Taubenberger, J.K., Palese, P., Swayne, D.E., Pantin-Jackwood, M.J., Schultz-Cherry, S., Solórzano, A., Van Rooijen, N., Katz, J.M., et al. (2005). Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J. Virol.* 79, 14933–14944.
- Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., and Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 171–180.

- Virchow, R. (1847). Die pathologischen Pigmente. *Virchows Arch. I*, 379–404.
- Yáñez, A., Coetzee, S.G., Olsson, A., Muench, D.E., Berman, B.P., Hazelett, D.J., Salomonis, N., Grimes, H.L., and Goodridge, H.S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity* 47, 890-902.e4.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- Yu, Y.-R.A., Hotten, D.F., Malakhau, Y., Volker, E., Ghio, A.J., Noble, P.W., Kraft, M., Hollingsworth, J.W., Gunn, M.D., and Tighe, R.M. (2016). Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 54, 13–24.
- Zasłona, Z., Przybranowski, S., Wilke, C., van Rooijen, N., Teitz-Tennenbaum, S., Osterholzer, J.J., Wilkinson, J.E., Moore, B.B., and Peters-Golden, M. (2014). Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 4245–4253.
- Zheng, G.X.Y., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., et al. (2017). Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.* 8, 14049.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège
4000 Liège (Belgique)

D/2019/0480/9
ISBN 978-2-87543-140-0

