



UNIVERSITÉ DE LIEGE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
INSTITUT GIGA  
LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Promoteur : Pr. Fabrice Bureau  
Co-Promoteur : Pr. Thomas Marichal

# Étude de la présentation antigénique par les macrophages interstitiels pulmonaires

Céline LEGRAND

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de  
Doctorat en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique 2023-2024

## *Remerciements*

---

## Abréviations

---

AGM	Aorta-gonad-mésonephros
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> ; Cellules présentatrice d'antigènes
BAL	<i>Broncho-alveolar lavage</i> ; Lavage broncho-alvéolaire
BAM	<i>Bronchus-associated macrophages</i> ; Macrophages associés aux bronches
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
BMDC	<i>Bone marrow-derived dendritic cells</i> ; Cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse
cDC1 ou 2	Cellules dendritiques conventionnelles de type 1 ou 2
CDP	<i>Common dendritic progenitor</i>
CIITA	<i>MHC class II transactivator</i>
CLIP	<i>Class II – associated invariant chain peptide</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CLR	<i>C-type lectin receptors</i>
cMo	Monocyte classique
cMoP	<i>Common monocyte progenitor</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
CpG-DNA	Extraits d'ADN bactériens, qui contient des motifs CpG non méthylés
CRC	<i>CXCL12-producing reticular cells</i>
CTY	<i>Cell Tracer Yellow</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	<i>Dendritic cell</i> ; Cellule dendritique
DCMo	<i>DC-like monocyte</i>
E	Jour(s) de développement embryonnaire
EMP	<i>Erythro-myeloid progenitors</i>
ER	<i>Estrogen récepteur</i> ; Récepteur à l'œstrogène
FDC	<i>Follicular dendritic cells</i>
FRC	<i>Fibroblastic reticular cells</i>
GC	<i>Germinal center</i> ; Centre germinatif
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	<i>granulocyte macrophage progenitor</i>
HDM	<i>House Dust Mite</i>
HEV	<i>High endothelium venules</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i> ; Cellules souches hématopoïétiques
iBALT	<i>induced bronchus-associated lymphoid tissue</i>
IL	Interleukine
LB	Lymphocyte B
LBD	<i>Ligand binding domain</i> ; Domaine de liaison du ligand
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocyte T
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor 1</i>
MA	Macrophage alvéolaire

MC	<i>Monocyte-derived cell</i>
MDP	<i>Macrophage and dendritic cell progenitor</i>
MHC-I	<i>Major histocompatibility complex type I ; Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I</i>
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex type II ; Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II</i>
MI	<i>Macrophage interstitiel</i>
MIIC	<i>MHC class II compartment</i>
MLR	<i>Mixed leukocyte reaction</i>
MMP	<i>Multipotent progenitor</i>
moDC	<i>Monocyte-derived dendritic cells ; Cellules dendritiques dérivées de monocytes</i>
MP	<i>Monocyte precursor</i>
MPS	<i>Mononuclear phagocyte system; système phagocytaire mononucléé</i>
MRC	<i>Marginal reticular cells</i>
NAM	<i>Nerve-associated macrophages</i>
NeuMo	<i>Neutrophil-like monocyte</i>
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cells ; Cellules dendritiques plasmacytoïdes</i>
PLC	<i>Peptide loading complex</i>
pMo	<i>Patrolling monocyte ; Monocyte patrouilleur</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
RLR	<i>Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG1)-like helicase receptors</i>
rTGFβ1	<i>TGFβ1 recombinant</i>
SAP	<i>SH2 domain-containing adaptator protein</i>
scRNAseq	<i>single cell RNA-sequencing ; séquençage de l'ARN par cellule individuelle</i>
TAM	<i>Tamoxifène</i>
TCM	<i>T central memory</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEM	<i>T effector memory</i>
TFH	<i>Lymphocyte T follicular helper</i>
TFR	<i>Lymphocyte T follicular regulatory cells</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
Th	<i>Lymphocytes T helper de type...</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Treg	<i>Lymphocytes T régulateurs</i>
TRM	<i>T resident memory</i>

# Table des matières

<b>RESUME</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>5</b>
1. LE SYSTEME PHAGOCYTAIRE MONONUCLEE .....	6
<b>1.1 Ontogénie et renouvellement</b> .....	7
<b>1.2 Classification et hétérogénéité</b> .....	15
<b>1.3 Fonctions</b> .....	16
2. INDUCTION DES REPONSES IMMUNITAIRES ADAPTATIVES .....	22
<b>2.1 Capture et présentation de l'antigène</b> .....	22
<b>2.2 Présentation aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup></b> .....	25
<b>2.3 Activation et différenciation du lymphocyte T CD4<sup>+</sup></b> .....	26
<b>2.4 Activation des lymphocytes B</b> .....	31
3. LES MACROPHAGES PULMONAIRES .....	33
<b>3.1 Ontogénie et renouvellement</b> .....	33
<b>3.2 Caractéristiques et hétérogénéité</b> .....	35
<b>3.3 Les fonctions régulatrices innées</b> .....	37
<b>3.4 Les macrophages et le système immunitaire adaptatif</b> .....	39
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>41</b>
<b>SECTION EXPERIMENTALE MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>43</b>
1. ANIMAUX EXPERIMENTAUX.....	44
2. REACTIFS ET ANTICORPS.....	44
3. ANALYSES SCRNASEQ .....	45
4. ISOLEMENT ET MARQUAGE DES CELLULES : CYTOMETRIE EN FLUX .....	47
5. EXPERIENCES DE COCULTURES .....	48
6. EXPERIENCES D'IMAGERIE TISSULAIRE .....	48
7. ADMINISTRATION D'ANTIGENE ET INDUCTION D'ASTHME EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .....	49
8. ANALYSES STATISTIQUES .....	50
<b>SECTION EXPERIMENTALE RESULTATS</b> .....	<b>51</b>
1. LES MACROPHAGES INTERSTITIELS EXPRIMENT LE MHC-II ET LA MACHINERIE MOLECULAIRE ASSOCIEE .....	53
2. LES MACROPHAGES INTERSTITIELS INDUISENT LA PROLIFERATION DE LYMPHOCYTES T NAÏFS CD4 <sup>+</sup> <i>EX VIVO</i> .....	55
3. LES MACROPHAGES INTERSTITIELS INDUISENT LA DIFFERENCIATION DE LYMPHOCYTES FOXP3 <sup>+</sup> <i>EX VIVO</i> .....	57
4. LES MACROPHAGES INTERSTITIELS CAPTURENT L'ANTIGENE <i>IN VIVO</i> ET INDUISENT LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T NAÏFS CD4 <sup>+</sup> <i>EX VIVO</i> .....	59
5. LES MACROPHAGES INTERSTITIELS SONT AU CONTACT DE LYMPHOCYTES T CD4 <sup>+</sup> <i>IN VIVO</i> .....	61
6. LES SOURIS CX3CR1 <sup>CREERT2</sup> H2AB1 <sup>LOX</sup> , EN ABSENCE DE TAMOXIFENE, ONT DES MI QUI EXPRIMENT MOINS DE MHC-II .....	63
7. LES SOURIS CX3CR1 <sup>CREERT2</sup> H2AB1 <sup>LOX</sup> MONTRENT DES REPONSES SIMILAIRES AUX CONTROLES DANS UN MODELE D'ASTHME EXPERIMENTAL .....	66
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>67</b>
<b>DISCUSSION – PERSPECTIVES</b> .....	<b>69</b>
<b>LISTE DE PUBLICATIONS</b> .....	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>78</b>



# Résumé

Les macrophages interstitiels (MI) sont des cellules immunitaires innées appartenant au système phagocytaire mononucléé pulmonaire et situées dans le parenchyme pulmonaire. Elles ont été caractérisées jusqu'à présent pour leurs fonctions régulatrices innées. Elles sont en effet capables de produire de l'interleukine (IL)-10, une cytokine immunosuppressive, et d'inhiber la maturation de cellules dendritiques (DC), empêchant ainsi l'établissement de réponses immunitaires aberrantes dans les voies respiratoires, telles qu'observées dans l'asthme. Récemment, deux sous-types distincts de MI ont été identifiés, discriminés grâce à leur expression différentielle de Lyve1 ou de CD206. Les MI ont la capacité de phagocyter des corps étrangers provenant de la circulation sanguine ou des voies aériennes. Contrairement aux macrophages alvéolaires (MA), les MI expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC-II), suggérant qu'ils ont des capacités de présentation antigénique. Cette hypothèse a été évaluée dans le présent travail.

Nous avons tout d'abord étudié l'expression du MHC-II et de la machinerie supportant la présentation d'antigènes par les MI en analysant des données de séquençage d'ARN messager. Ensuite, nous avons utilisé des systèmes de cocultures avec des lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> naïfs et avons évalué la capacité des MI à induire la prolifération de ces cellules et d'orienter leur différenciation vers un phénotype régulateur (Treg) caractérisé par l'expression de Foxp3. Dans ces systèmes, nous avons comparé les capacités des MI à celles des MA (réputés être incapables de présenter les antigènes) et des DC (connues pour être spécialisées dans la présentation antigénique) utilisés comme contrôles négatif et positif. Nous avons ensuite déterminé si des antigènes solubles inhalés pouvaient être capturés par les MI *in vivo* et si ceux-ci pouvaient migrer jusqu'au ganglion lymphatique drainant. Nous avons ensuite visualisé les interactions entre les MI et les LT *in vivo* dans un modèle d'asthme expérimental en utilisant des techniques de microscopie confocale. Pour pousser plus loin nos recherches, il nous est paru essentiel de générer une souris génétiquement modifiée dans laquelle la présentation antigénique par les MI était supprimée sans impacter celle réalisée par d'autres cellules présentatrices d'antigènes (APC). Nous avons enfin observé le comportement immunitaire de cette souche transgénique soumise à un modèle d'asthme expérimental, en étudiant les populations cellulaires récupérées par un lavage broncho-alvéolaire (BAL) et l'orientation des réponses T dans le poumon.

Ces expériences nous ont permis de démontrer que les MI expriment fortement le MHC-II, ainsi que la machinerie associée à la présentation d'antigène. Ils sont par ailleurs capables d'induire une prolifération de LT *ex vivo*, dépendante du MHC-II et spécifique de l'antigène. Lorsqu'ils sont cultivés avec des MI, les LT se différencient en Treg, de manière dépendante de l'IL-10 et du *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ . Les MI sont également capables de capturer l'antigène *in vivo* et ensuite d'induire une prolifération de LT *ex vivo*. Ils ne sont cependant pas capables de migrer vers les ganglions drainants. Les interactions entre les MI et les LT, visualisées par microscopie confocale, sont augmentées suite à l'induction d'asthme expérimental. Enfin, nous n'avons cependant observé aucun impact de la déplétion de MHC-II dans les MI sur les populations de cellules du BAL ou l'orientation des réponses T dans le modèle d'asthme expérimental utilisé.

Nos résultats mettent en évidence le rôle de cellule présentatrice d'antigène des MI, et leur capacité à induire des Treg. Ces propriétés pourraient avoir un rôle essentiel dans la modulation des réponses immunitaires pulmonaires, bien que nous n'ayons pas réussi à les mettre en évidence dans nos modèles *in vivo*.



# Abstract

Interstitial macrophages (IM) are innate immune cells belonging to the pulmonary mononuclear phagocytic system and located in the lung parenchyma. They have been characterized until now for their innate regulatory functions. They are indeed capable of producing interleukin (IL)-10, an immunosuppressive cytokine, and of inhibiting the maturation of dendritic cells (DC), thus preventing the establishment of aberrant immune responses, in the respiratory tract such as observed in asthma. Recently, two distinct subtypes of IM have been identified, discriminated by their differential expression of Lyve1 or CD206. IM have the ability to phagocytose foreign bodies coming from the bloodstream or the airways. Unlike alveolar macrophages (AM), IM express major histocompatibility complex class II (MHC-II), suggesting that they have antigen presenting capabilities. This hypothesis was evaluated in the present work.

We first studied the expression of MHC-II and the machinery supporting antigen presentation in the IM by analyzing messenger RNA-sequencing data. Then, we used coculture systems with naive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (LT) and evaluated the capacity of IM to induce the proliferation of these cells and direct their differentiation towards a regulatory phenotype (Treg) characterized by the expression of Foxp3. In these systems, we compared the capacities of IM to those of AM (known to be incapable to present antigens) and DC (known to be specialized in antigen presentation) used as negative and positive controls. We then determined whether inhaled soluble antigens could be captured by IM *in vivo* and whether these could migrate to the draining lymph node. We then visualized the interactions between IM and LT *in vivo* in an experimental asthma model using confocal microscopy techniques. Then, it seemed essential to generate a genetically engineered mouse in which antigen presentation by IM was suppressed without impacting the ones carried out by other antigen-presenting cells (APC). We finally observed the immune behavior of this transgenic strain in an experimental asthma model, by studying the cell populations recovered by bronchoalveolar lavage (BAL) and the orientation of T responses in the lung.

These experiments allowed us to demonstrate that IM strongly express MHC-II, as well as the machinery associated with antigen presentation. They are also capable of inducing MHC-II- and antigen-dependant proliferation of LT *ex vivo*. When cultured with IM, LT differentiate into Treg, in a manner dependent on IL-10 and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ . IM are also capable of capturing antigen *in vivo* and subsequently inducing LT proliferation *ex vivo*. However, they are not capable of migrating towards the draining lymph nodes. The interactions between IM and LT, visualized by confocal microscopy, are increased following the induction of experimental asthma. Finally, however, we did not observe any impact of MHC-II depletion in IM on BAL cell populations or the orientation of T responses in the experimental asthma model used.

Our results highlight the role of IM as an antigen-presenting cell, and their ability to induce Treg. These properties could have an essential role in moderating pulmonary immune responses, although we have not succeeded in highlighting them in our *in vivo* models.

# Introduction

# 1. Le système phagocytaire mononucléé

En 1892, Ilya Metchnikoff se base sur ses observations chez les amibes, les éponges et d'autres invertébrés, ainsi que sur des modèles de tuberculose hépatique chez le lapin, pour construire sa conception de la phagocytose. Il met en évidence sa conservation au cours de l'évolution, entre moyen d'apport nutritif pour les organismes unicellulaires jusqu'au mécanisme de défense immunitaire. Il nomme ces cellules phagocytaires les macrophages, qui ont un simple et grand noyau, et les microphages, qui sont plus petits et ont un noyau plurilobé. Ces derniers sont décrits comme des cellules défensives particulièrement importantes lors de phases d'infection aiguës. Aujourd'hui, les microphages sont identifiés comme des neutrophiles (Cavaillon, 2011; Metchnikoff, 1892). Plus tard, Karl Aschoff regroupe ces cellules, capables d'absorber des colorants dans la circulation depuis les tissus et se situant en bordure de l'endothélium vasculaire, dans un système qu'il nomme « système réticulo-endoplasmique ». Ces cellules sont également décrites comme formant un réseau grâce à leurs grands prolongements cytoplasmiques (Aschoff, 1924; Yona & Gordon, 2015).

Cette dénomination est controversée après les années 50, en raison de sa nomenclature erronée et du regroupement trop large de cellules aux rôles ou origines trop différents. C'est alors que la classification du « système phagocytaire mononucléé » (MPS), proposée par Ralph Van Furth, voit le jour en 1972. Les cellules le constituant sont décrites comme hautement phagocytaires et ayant une capacité d'adhésion aux surfaces vitrées. Le MPS inclut également les précurseurs des phagocytes. Grâce à des expériences chez la souris marquant les cellules prolifératives avec de la thymidine radioactive tritiée ( $^3\text{H}$ ), des splénectomies et des irradiations partielles, il est établi que les monocytes sanguins proviennent de promonocytes, hautement prolifératifs, situés dans la moelle osseuse. Lors d'une inflammation stérile induite par injection de sérum de veau, R. Van Furth et ses collègues observent un afflux de monocytes dans la cavité péritonéale, qui précède l'augmentation du nombre de macrophages péritonéaux, et en déduisent que les macrophages tissulaires proviennent de monocytes circulants (van Furth & Cohn, 1968). Sous cet ensemble de « système phagocytaire mononucléé » sont donc repris les précurseurs et promonocytes de la moelle osseuse, desquels dérivent les monocytes sanguins, se différenciant eux-mêmes en macrophages tissulaires en entrant dans les tissus (van Furth et al., 1972).

Les cellules dendritiques (DC) sont découvertes dans la rate en 1973 par Ralph Steinman et Zanvil Cohn. Elles sont décrites comme de grandes cellules aux prolongements cytoplasmiques longs, nombreux et très mobiles, à la différence des macrophages (Steinman & Cohn, 1973). Elles sont identifiées comme exprimant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC-II) et étant particulièrement efficaces pour déclencher la *primary mixed leukocyte reaction* (MLR), c'est à dire induire une vigoureuse prolifération de lymphocytes T allogéniques (Steinman & Witmer, 1978). Elles sont d'abord exclues de la classification du système phagocytaire mononucléé car elles ne partagent pas la même origine que les macrophages (van Furth et al., 1972). Plus tard, sur base de similitudes ontogéniques, phénotypiques et fonctionnelles, elles sont réintégrées dans cette classification (Guilliams et al., 2014; Hume et al., 2002).

Aujourd'hui, le MPS reprend donc les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages.

## 1.1 Ontogénie et renouvellement

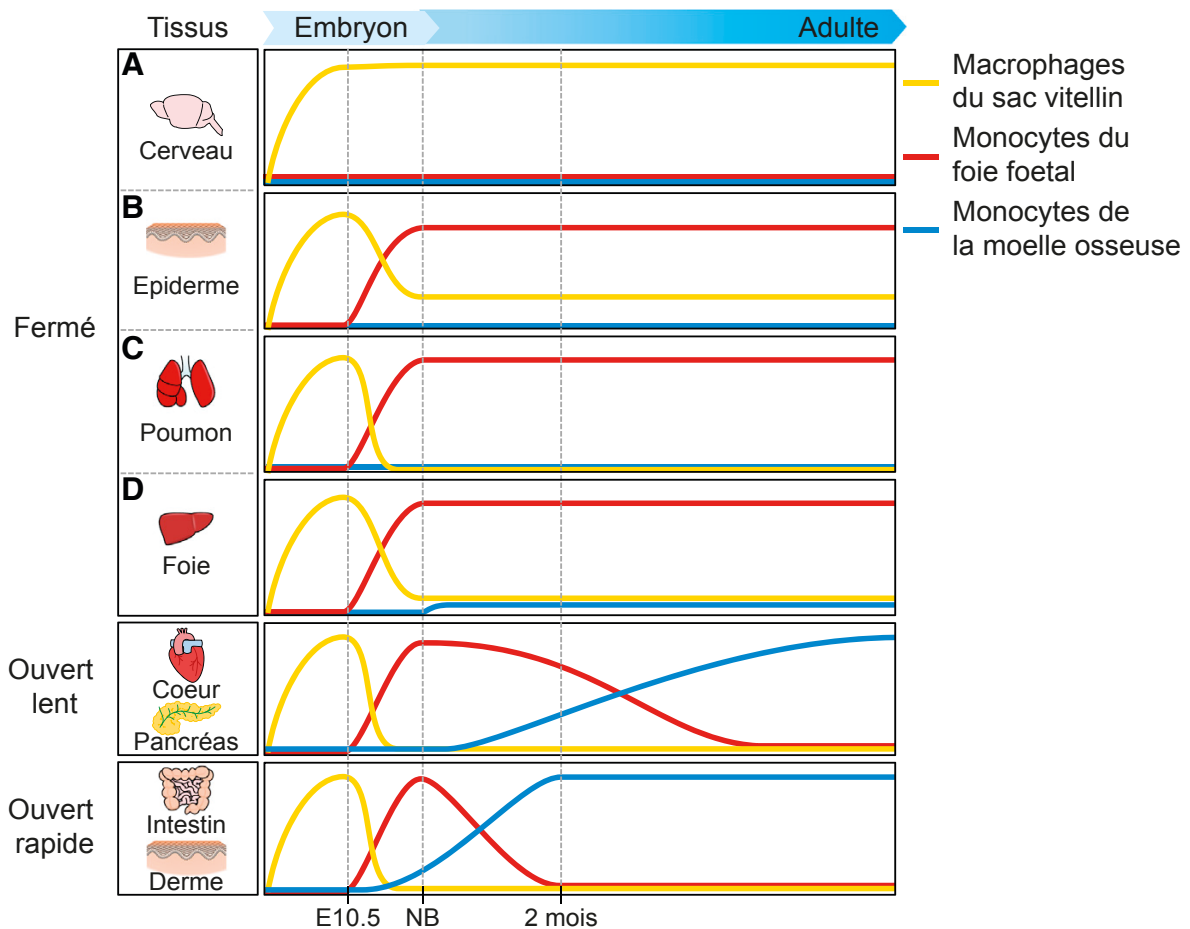
### Les macrophages

Une remise en question de la théorie du MPS s'opère assez rapidement. En effet, Widmann et Fahimi, dans les années 70, observent des macrophages tissulaires du foie (les cellules de Kupffer) proliférant chez le rat (Widmann & Fahimi, 1975) tandis que Naito *et al.*, dans les années 90, identifient des macrophages déjà présents aux premiers stades de l'embryogenèse, avant l'apparition des monocytes, dont certains sont encore présents chez l'adulte (M. Naito *et al.*, 1990; Makoto Naito *et al.*, 1996). Mais ce n'est qu'au cours des années 2010 que l'on assiste à une évolution rapide de la compréhension de l'origine des macrophages, et à une complexification des théories établies antérieurement (Davies *et al.*, 2013).

Les premières études de *fate-mapping* (littéralement « suivi de destin »), chez la souris, établissent que les macrophages tissulaires du système nerveux central, la microglie, et les cellules présentatrices d'antigène de la peau, les cellules de Langerhans, ont une origine prénatale (Ginhoux *et al.*, 2010; Hoeffel *et al.*, 2012). En utilisant des souris déficientes en facteur Myb, incapables d'hématopoïèse, Schultz *et al.* ont ensuite montré une dualité dans les macrophages présents à l'âge adulte : les macrophages F4/80<sup>high</sup> étant d'origine prénatale et indépendants de l'hématopoïèse, au contraire des macrophages F4/80<sup>low</sup> (Davies *et al.*, 2013; Schulz *et al.*, 2012). Ils établissent ainsi que les macrophages de la peau, du foie, du cerveau, du pancréas, du poumon, de la rate et du rein proviennent, du moins partiellement, du sac vitellin.

Vient ensuite l'hypothèse de deux vagues de colonisation successives : une première vague de macrophages primitifs, sans intermédiaire monocyttaire, provenant des îlots sanguins du sac vitellin envahit tout l'organisme dès la mise en place de la circulation sanguine. Cela se produit aux jours 9-10 du développement embryonnaire (E9-10) chez la souris. La seconde vague, appelée hématopoïèse définitive, est constituée de cellules souches hématopoïétiques (HSC), générées dans l'AGM (*aorta-gonado-mesonephros*) qui colonisent le foie fœtal. Là, à partir du E11.5-12.5, des monocytes sont formés et envahissent à leur tour les différents organes, où ils deviennent des macrophages. Cette seconde vague de cellules vient remplacer la première dans la majorité des organes, comme le poumon (macrophages alvéolaires) ou le cœur. Cependant, le cerveau reste lui constitué presque exclusivement de macrophages du sac vitellin. Les cellules de Langerhans de la peau semblent conserver une origine mixte (Ginhoux & Jung, 2014). On identifie ensuite la première vague, provenant du sac vitellin et donnant naissance aux macrophages F4/80<sup>high</sup>, comme indépendante du facteur de transcription Myb, au contraire de la deuxième vague, dépendante elle, de ce facteur (Ginhoux *et al.*, 2016; Hoeffel *et al.*, 2015; Lavin *et al.*, 2015).

La seconde vague est ensuite redéfinie en deux vagues distinctes, celle des EMP (*erythro-myeloid progenitors*), Myb-indépendante, et celles des HSC à proprement parler. Les EMP diffèrent des HSC notamment par leur incapacité à générer la lignée lymphoïde. Ils proviennent du sac vitellin et envahissent le foie fœtal à E9, où ils se multiplient et se différencient en érythrocytes, granulocytes et monocytes à durée de vie courte. Ils constituent également l'origine principale des macrophages tissulaires, et pourraient également être les cellules à l'origine de la microglie (Hoeffel *et al.*, 2015; Perdiguero & Geissmann, 2016).



**Figure 1. Hétérogénéité de l'ontogénie des populations de macrophages dans différents organes.** Les macrophages résidents dans les organes « fermés » ont une origine pré-natale, du sac vitellin (jaune) ou du foie fœtal (bleu). A : microglie ; B : cellules de Langerhans ; C : macrophages alvéolaires ; D : cellules de Kupffer. Dans les organes dits « ouverts », les monocytes proviennent de la moelle osseuse (rouge), et se différencient en macrophages à un rythme lent (cœur et pancréas) ou rapide (intestin et derme). (D'après Ginhoux et Guilliams, 2016).

Selon des études plus récentes (Ginhoux & Guilliams, 2016; Hoeffel & Ginhoux, 2018), les macrophages adultes proviennent de trois vagues successives de progéniteurs. La première vague, l'hématopoïèse primitive, prend place dans le sac vitellin à partir du E7, quand les progéniteurs, appelés « EMP précoces » se différencient en macrophages vitellins, qui se disséminent dans tous les organes dès le début de la circulation, à E9.5. Les EMP tardifs, provenant du sac vitellin, migrent jusqu'au foie fœtal, où ils se différencient en monocytes fœtaux qui, à leur tour aux environs du E14 .5, colonisent tout l'organisme, à l'exception du cerveau. Ils constituent la deuxième vague, appelée hématopoïèse définitive transitoire. Dans les AGM, les HSC fœtales se développent vers E10.5. Ceux-ci migrent vers le foie fœtal, où s'orchestre la troisième vague : l'hématopoïèse définitive. Des monocytes dits hépatiques sont produits aux alentours de la naissance. Ces cellules migrent également vers la moelle osseuse fœtale, où, plus tard chez l'adulte, l'hématopoïèse a lieu.

Chez l'humain, on identifie également l'hématopoïèse primitive dans le sac vitellin à partir de 16 jours de gestation. Les HSC se développent dans l'endothélium aortique à 27 jours de gestation. Il y a ensuite colonisation du foie fœtal avant que l'hématopoïèse définitive prenne place dans la moelle osseuse, à 10,5 semaines de gestation (Tavian & Péault, 2005).

Les origines des diverses populations de macrophage sont ainsi établies. On distingue ainsi trois scénarii majeurs (Figure 1) (Ginhoux & Guilliams, 2016; Ginhoux & Jung, 2014). Dans le premier cas, l'organe est dit « fermé » aux monocytes après la naissance, il est séparé de la circulation sanguine par un épithélium ou par une barrière. Les macrophages proviennent exclusivement de progéniteurs embryonnaires, ont de très longues durées de vie et sont capables de se renouveler indépendamment de monocytes circulants. C'est le cas de la microglie, originaire de macrophages du sac vitellin et qui, même en cas de stress, ne semble pas s'appuyer sur un apport de précurseurs circulants (Ajami et al., 2007; Ginhoux et al., 2010; Hoeffel et al., 2015; Sheng et al., 2015). Dans le poumon, les macrophages provenant du sac vitellin se font totalement remplacer par les macrophages dérivant de monocytes du foie fœtal, tandis que les cellules de Langerhans dans l'épiderme conservent une origine mixte (Ginhoux & Guilliams, 2016; Tamoutounour et al., 2013). Dans d'autres organes comme le péritoine, le foie ou la rate, les macrophages proviennent également de précurseurs embryonnaires, et se renouvellent de manière autonome. Cependant, en conditions pathologiques, cette population dépend de monocytes pour se régénérer (Guilliams et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Hoeffel et al., 2015; Yona et al., 2013).

Dans le deuxième cas, les organes sont dits « ouverts », ils ne sont pas séparés de la circulation sanguine, mais font état d'un recrutement de monocytes assez lent. On observe une origine mixte des cellules provenant de progéniteurs embryonnaires et de macrophages dérivés de monocytes de l'hématopoïèse définitive. C'est le cas dans le cœur (Molawi et al., 2014) ou le pancréas (Ginhoux & Guilliams, 2016).

L'intestin est l'exemple type du troisième scénario : les organes dits « ouverts » à recrutement rapide. Bien qu'également envahis par des macrophages provenant du sac vitellin, ceux-ci sont très rapidement remplacés par des cellules dérivées de monocytes. Tout au long de la vie de l'individu, les macrophages, à la durée de vie assez courte, vont être renouvelés par des monocytes se différenciant (Bain et al., 2014; Ginhoux & Guilliams, 2016; Sheng et al., 2015).

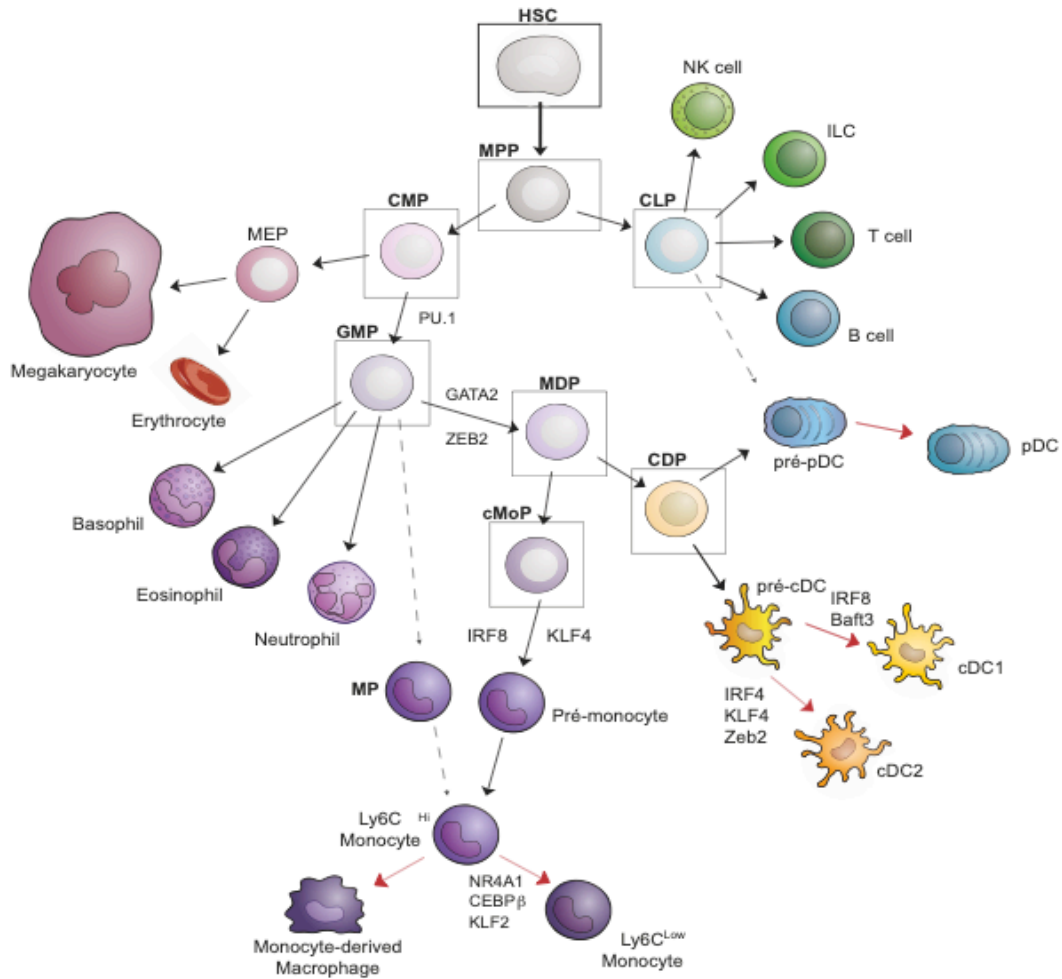
Dans des expériences de transfert adoptif, même des macrophages complètement différenciés du péritoine sont encore capables de s'adapter lorsqu'ils sont transférés dans le microenvironnement pulmonaire, au point de ressembler très fortement, au niveau transcriptomique, à des macrophages alvéolaires (MA) (Lavin et al., 2014). Il en va de même pour des cellules différenciées à partir de précurseurs de la moelle osseuse, qui, réinjectées, deviennent phénotypiquement semblables aux macrophages pulmonaires (T. Suzuki et al., 2014). Quand il y a déficience en MA, l'administration de précurseurs provenant de n'importe quelle vague permet de régénérer cette population (van de Laar et al., 2016). De ces expériences naît l'idée que l'origine du macrophage serait moins primordiale que les signaux de l'organe qui l'entoure. C'est ainsi que le concept de niche se met en place (Ginhoux & Guilliams, 2016; Hoeffel et al., 2015; Hoeffel & Ginhoux, 2018; Lavin et al., 2015; Wynn et al., 2013).

Martin Guilliams est l'un des militants les plus actifs pour cette théorie. Il a commencé, avec son équipe, par définir les principales lois qui déterminent si un précurseur peut s'installer dans une niche. La niche est régulée par son accessibilité (reprenant le concept d'organe ouvert ou fermé), sa disponibilité (la niche est-elle déjà occupée ?) et la plasticité du précurseur (est-il capable de se différencier en fonction des signaux de la niche ?). L'origine des macrophages tissulaires dépendrait donc surtout de l'opportunité qu'ont les différentes vagues de précurseurs de coloniser l'organe, en fonction de son « *timing* d'ouverture » et de sa croissance (Guilliams & Scott, 2017).

La niche d'un macrophage a pour rôle de donner un support physique à cette cellule, ainsi que des facteurs trophiques pour l'auto-maintenance du macrophage. C'est le concept récent de *nurturing scaffold* (littéralement « support nutritif »), qui fournit au macrophage accolé le facteur trophique dont il a besoin : de l'interleukine (IL)-34, du *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF ou CSF-1) ou du *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF ou CSF-2). Pour le CSF-1, il y a deux seuils critiques auxquels les macrophages réagissent différemment. Si la concentration de CSF-1 est basse, c'est le « seuil de survie », la concentration nécessaire au macrophage pour s'auto-renouveler et fonctionner normalement. Si par contre, la concentration de CSF-1 augmente, par manque de consommation de celui-ci par les macrophages absents ou morts, le seuil de prolifération est atteint, et ce sont alors les macrophages des niches adjacentes qui prolifèrent et dont les cellules filles colonisent les niches vides (Guilliams et al., 2020).

La niche donne aussi des signaux spécifiques qui orientent l'identité du macrophage selon l'organe dans lequel il se trouve (Guilliams et al., 2020). Ces signaux peuvent être des cytokines, des métabolites ou encore des contacts cellulaires, qui orientent le macrophage vers un programme de différenciation spécifique, avec l'activation de « gènes signatures », nécessaires pour la maturation, la survie et la fonction du macrophage dans son organe. Ce programme est appelé « raffiné », au contraire du programme de facteurs de transcription « fondamentaux », qui dirige les cellules vers leur devenir en macrophage, au sens large. Les facteurs de transcription et gènes impliqués dans le programme raffiné semblent être différents pour chaque organe, et sont encore peu connus, tandis que ceux du programme fondamental sont communs à tous les macrophages et sont déjà assez bien connus. On peut citer PU.1, régulé par Runx1, qui par la variation de sa concentration dans la cellule dirige le devenir en macrophage ou en lymphocyte B. Une de ces principales cibles est CSF1R, récepteur important des facteurs trophiques. MafB et c-maf régulent l'auto-renouvellement





**Figure 2. Représentation hiérarchique du développement hématopoïétique dans la moelle osseuse.**

Les cellules souches hématopoïétiques et les précurseurs multipotents se différencient en précurseurs intermédiaires aux potentiels de différenciation de plus en plus restreints, qui donnent tous les types de cellules sanguines. Les flèches pointillées indiquent de nouvelles voies de développement possibles récemment mises à jour. Les flèches rouges indiquent le passage dans la circulation sanguine ou les tissus, où la dernière étape de différenciation prend place. Les facteurs de transcription importants pour le développement des monocytes et cellules dendritiques sont indiqués. MEP, *megakaryocyte/erythrocyte progenitors*. (Adapté de Williams *et al.*, 2018).

des macrophages sous l'effet du M-CSF. Myb et Zeb2 sont également des facteurs principaux pour les macrophages (T'Jonck et al., 2018).

En retour, le phagocyte doit également apporter un avantage à la niche dans laquelle il se trouve, les cellules s'apportant un bénéfice mutuel, comme on peut le voir par exemple entre les cellules de Leydig et les macrophages interstitiels testiculaires, ou les cellules souches épithéliales des glandes et les macrophages mammaires (Guilliams et al., 2020).

En cas de rupture de l'homéostasie, les cytokines proinflammatoires (IL-6, IL-8), les signaux d'alarme comme l'IL-33, les *damage-associated and pathogen-associated molecular patterns* (DAMP et PAMP) sont produits par les cellules stromales en état de stress. Ces molécules stimulent la myélopoïèse et le recrutement de monocytes dans les tissus inflammatoires. Souvent, pendant les inflammations sévères, le dommage tissulaire impacte les cellules de la niche supportant la survie des macrophages résidents. Les monocytes de la moelle osseuse sont rapidement recrutés dans le tissu pour repeupler cette niche, où ils se différencient en macrophages inflammatoires, ceux-ci ayant un programme de transcription très différent des macrophages résidents. Ces nouvelles cellules peuvent influencer à long terme le comportement immunitaire du microenvironnement (Park et al., 2022).

#### Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques se développent dans la moelle osseuse. Elles proviennent de cellules souches hématopoïétiques qui, en se divisant, limitent progressivement leurs options développementales (Figure 2). Ces HSC se différencient en MMP (*multipotent progenitor*), qui se différencie à son tour en CLP (*common lymphoid progenitor*) ou CMP (*common myeloid progenitor*), marquant la bifurcation importante entre la lignée lymphoïde et myéloïde. Les CMP se différencient ensuite graduellement en GMP (*granulocyte macrophage progenitor*) puis en MDP (*macrophage and dendritic cell progenitor*). Ces MDP se distinguent ensuite en cMoP (*common monocyte progenitor*), qui donne les monocytes, et en CDP (*common dendritic progenitor*). Les CDP se distinguent en pré-cDC et en pré-pDC (Hettinger et al., 2013; Onai et al., 2007; Sichien et al., 2017). Ces cellules migrent vers le tissu, guidées par des signaux tissu-spécifiques, tels que ceux délivrés par la niche ou par un agent pathogène. Elles se différencient finalement en cellules dendritiques conventionnelles de type 1 ou 2 (cDC1 ou cDC2), et en cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sous l'influence de signaux locaux qui raffinent les facteurs de transcription exprimés et déterminent l'état d'activation de la DC (Bosteels & Scott, 2020).

Flt3L est la cytokine essentielle au bon développement des différentes populations de DC. En effet, la culture *in vitro* de cellules de moelle avec cette cytokine permet l'obtention de pDC, cDC1 et cDC2, et sa déficience *in vivo* conduit à un déficit important en DC. Pu.1 est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de Flt3 nécessaire au développement des DC. Le GM-CSF et la lymphotoxine  $\alpha 1\beta 2$  ont été décrites comme importantes pour la survie des DC (Sichien et al., 2017). Comme chez la souris, les DC se développent chez l'humain sous la direction de Flt3 (Cabeza-Cabrero et al., 2021).

Au niveau transcriptomique, plusieurs facteurs ont été identifiés comme nécessaires au bon développement de la lignée dendritique, comme Gfi1 ou PU.1. D'autres facteurs sont spécifiquement impliqués chez les cDC1 ou les cDC2. On peut citer respectivement Baft3, Nfil3, Id2 et IRF8 pour les cDC1, et Notch2, Klf4 et Zeb2 et IRF4 pour les cDC2. Aucun facteur

de transcription n'a été démontré comme essentiel chez toutes les cDC2, chacun de ceux cités ci-dessus étant nécessaires à une partie de la population des cDC2. Ceci souligne l'hétérogénéité des cDC2 et ouvre plusieurs questions : combien de sous-populations de cDC2 existent ? Existe-t-il différentes sous-populations dans différents tissus ? Est-ce que ces sous-populations proviennent de lignées développementales différentes ou sont-ce différents états d'activation ? (Bosteels & Scott, 2020; Sichien et al., 2017)

Récemment, grâce à l'avènement de la technique de séquençage de l'ARN par cellule individuelle (scRNAseq), on peut commencer à répondre à ces questions, et les modèles développementaux et les classifications classiques sont repensés. En 2017, Villani et al. proposent un nouveau système de classification pour les DC sanguines humaines. Celui-ci reprend 6 groupes de DC nommés DC1-6. Les DC1 correspondent aux cDC1, tandis que les DC2 et 3 représentent deux sous-populations de cDC2. Les DC4 sont identifiées comme CD11c<sup>+</sup>CD41<sup>-</sup>. Les DC5, aussi appelés « AS DC » ou « DC transitionnelles » sont une nouvelle population controversée de DC exprimant AXL, SIGLEC1 et SIGLEC6 et ont un transcriptome dont la signature se situe entre les cDC2 et les pDC, ce qui suggère un lien entre ces populations. Les DC6 sont les pDC. Les DC3 se développent directement à partir du GMP, via un progéniteur DC3 qui leur est propre, et donc via une voie totalement distincte des pDC ou cDC (Villani et al., 2017).

Ces études ont également démontré que la décision de destin entre les cDC1 et les cDC2 était plus précoce que ce que l'on pensait auparavant. En effet, les cellules sont déjà engagées vers l'un ou l'autre destin au stade CDP. Elles ont également soulevé une origine lymphoïde possible pour les pDC, en identifiant un progéniteur commun aux pDC et aux cellules B (B. Chen et al., 2021).

### Les monocytes

Les monocytes sont générés dans la moelle osseuse, à partir de cellules souches hématopoïétiques (Figure 2). Elles suivent la même lignée développementale myéloïde que les DC, jusqu'au MDP. Ensuite, leurs chemins se distinguent, pour les monocytes en cMoP, également identifiés chez l'homme, exprimant déjà le Ly6C, et en CDP pour les DC (Hettinger et al., 2013; Hoeffel & Ginhoux, 2018). Un intermédiaire pré-monocytaire prolifératif est dérivé des cMoP. Celui-ci se distingue par l'expression de CXCR4, ce qui détermine en partie le rythme d'égression circadienne des monocytes. Les monocytes sont enfin produits à partir de ces pré-monocytes, qui perdent l'expression de CXCR4 et gagnent celle du CCR2 (Guilliams et al., 2018). Ils quittent la moelle osseuse vers la circulation sanguine sous l'attraction des ligands du récepteur CCR2 : le CCL2 et CCL7 (Serbina & Pamer, 2006). Ce développement est dépendant de plusieurs facteurs de transcription, comme PU.1, IRF8, GATA2 et KLF4 (Guilliams et al., 2018).

Récemment, cette voie classique est remise en question vu l'accumulation d'indices indiquant que les monocytes peuvent également être générés à partir de GMP via un intermédiaire MP (*monocyte precursor*). L'une ou l'autre voie serait favorisée en fonction des stimuli (Guilliams et al., 2018; Trzebanski & Jung, 2020; Yáñez et al., 2017).

Chez la souris, les monocytes classiques Ly6C<sup>hi</sup> (cMo) peuvent également se différencier, majoritairement au sein de la circulation, en monocyte non classique Ly6C<sup>lo</sup>, appelés également monocyte patrouilleurs (pMo) (Yona et al., 2013). Ils sont considérés comme les macrophages résidents du système vasculaire. Comme les autres macrophages dérivés de monocytes, leur maturation est dirigée par les signaux environnementaux et des

facteurs de transcription. NR4A1 et C/EBP $\beta$  sont les facteurs de transcription nécessaires à leur différenciation depuis les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> (Hanna et al., 2011). Lors de celle-ci, ils diminuent l'expression de Ly6C, de CCR2 et augmentent celle de Cx3cr1, dont ils dépendent pour leur survie (Landsman et al., 2009; Trzebanski & Jung, 2020). De manière intéressante, la durée de vie des monocytes est co-régulée. En effet, lorsque les Ly6C<sup>hi</sup> sont impactés, dans une souris CCR2<sup>-/-</sup> ou via un traitement déplétant, la durée de vie des Ly6C<sup>lo</sup> augmente. Ceci est probablement dû à l'abondance induite de CSF-1, qui n'est plus consommé par les Ly6C<sup>hi</sup> (Yona et al., 2013).

Chez l'homme, on trouve également plusieurs types de monocytes dans le sang : les CD14<sup>+</sup>CD16<sup>lo</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> et les CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup>. Les CD14<sup>+</sup>CD16<sup>lo</sup> sont souvent assimilés aux cMo de la souris et les CD14<sup>lo</sup>CD16<sup>+</sup> au pMo, bien que des différences existent : les monocytes humains peuvent être caractérisés selon leur expression du HLA-DR, tant dis que l'expression du MHC-II par les monocytes murins est minime. Les monocytes humains semblent se différencier de manière semblable aux monocytes murins (Guilliams et al., 2018).

Une monopoïèse extramédullaire serait également possible, puisque des précurseurs MDP et cMoP ont été identifiés dans la rate. Cet organe sert de réservoir de monocytes Ly6C<sup>hi</sup> et Ly6C<sup>lo</sup>, permettant un afflux massif de monocytes en cas de besoin important, par exemple en cas d'infarctus du myocarde (Guilliams et al., 2018; Swirski et al., 2009). Ce mécanisme a également été identifié lors d'exposition pulmonaire à des extraits d'ADN bactériens, qui contient des motifs CpG non méthylés (CpG-DNA), qui induit un afflux de macrophages interstitiels (MI), en partie CCR2-indépendant et provenant de la rate (Sabatel et al., 2017).

## 1.2 Classification et hétérogénéité

### Les macrophages

Depuis leur découverte, les macrophages sont reconnus pour être hétérogènes. Ces cellules varient aussi bien du point de vue de leur rôle que de leur aspect phénotypique, car elles sont spécialisées pour les fonctions qu'elles accomplissent dans chaque tissu. Ces cellules ont une durée de vie variable : elle peut être très longue pour les cellules de la microglie, ou plutôt courte pour les macrophages de la *lamina propria* (Davies et al., 2013; Murray & Wynn, 2011).

Depuis les années 2000, sur base d'expériences de cultures *ex vivo* de macrophages péritonéaux provenant de différentes lignées murines, les macrophages ont été classés en deux catégories, sur le modèle de la classification des lymphocytes T (Mills et al., 2000). Les macrophages activés de manière classique, appelés « M1 », sont caractérisés comme répondant à l'IFN $\gamma$ , et leur rôle est prépondérant dans les mécanismes de défense à l'encontre des bactéries et des virus, ainsi que dans l'immunité anti-tumorale (Martinez & Gordon, 2014; Murray & Wynn, 2011). Les macrophages de type « M2 », quant à eux, sont activés « alternativement » par des médiateurs comme le M-CSF, le TGF $\beta$ , les glucocorticoïdes, ou l'IL-4/IL-13 et montrent une propension à être actifs et très importants dans des mécanismes comme le développement, le maintien de l'homéostasie et la résolution de l'inflammation (Davies et al., 2013; Murray & Wynn, 2011). Au fil du temps, avec la découverte de nouveaux stimuli, cette classification s'est complexifiée en différents sous-types, faisant état d'un continuum de phénotypes entre les deux pôles que sont les états M1 et M2. Cependant, cette vue a des limites : on ne tient pas compte du contexte et de la source du stimuli ; la théorie de l'activation par un stimulus unique paraît illusoire *in vivo* où les macrophages ne semblent pas se définir en ensembles d'activation clairs et indépendants (Martinez & Gordon, 2014).

De nos jours, cette classification paraît bien trop simpliste et rigide, si on considère l'immense diversité des macrophages résidents tissulaires, qui dépend majoritairement de leur microenvironnement. C'est pourquoi la vue que nous avons aujourd'hui est beaucoup plus dynamique, l'hétérogénéité des macrophages s'expliquant surtout par l'hétérogénéité des niches et des signaux qu'ils reçoivent (Davies et al., 2013; Martinez & Gordon, 2014).

### Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont très rapidement identifiées comme exprimant le MHC-II et étant particulièrement efficaces pour le déclenchement de la MLR (Steinman & Witmer, 1978). Elles sont souvent présentées comme au centre du système immunitaire, ayant un rôle pivot entre les pendants innés et adaptatifs.

Les DC sont distinguées en cDC, en pDC et en DC dérivées de monocytes (moDC). Les cDC ont une espérance de vie plus courte que les pDC. Lorsqu'activées, leur espérance de vie augmente, leur donnant de meilleures chances de trouver le bon lymphocyte T pour déclencher une réponse immunitaire adaptative (M. Chen et al., 2007). En cas d'inflammation, des moDC colonisent le poumon (Kawasaki et al., 2022).

On distingue deux types de cDC dans le poumon murin : les cDC1, qui sont CD103<sup>+</sup> XCR1<sup>+</sup> et dépendent des facteurs de transcription IRF8 et Batf3 et les cDC2, qui sont CD11b<sup>+</sup> CD172a<sup>+</sup> et qui dépendent de IRF4 (Kawasaki et al., 2022). Les cDC1 expriment le TLR3 et les cDC2 le TLR7, qui reconnaissent respectivement l'ARN double et simple brin (Desch et al., 2014).

Chez l'homme également, les cDC se distinguent en deux groupes, les cDC1 reconnues par leur expression de XCR1 et DNGR-1, tandis que les cDC2 sont identifiées par l'absence de ceux-ci et l'expression de CD1c et SIRP $\alpha$  (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021).

### Les monocytes

Chez l'humain comme chez la souris, on trouve plusieurs populations de monocytes dans la circulation sanguine. La première, les monocytes classiques, sont identifiés comme Ly6C<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>int</sup>CCR2<sup>+</sup> chez la souris et correspondent aux CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> chez l'homme. La deuxième, les monocytes patrouilleurs, sont eux identifiés comme Ly6C<sup>lo</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>CCR2<sup>lo</sup> chez la souris et correspondent aux CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> chez l'homme. Chez l'homme, est décrite une troisième population, intermédiaire, et identifiée comme CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. Chez l'homme ce sont les monocytes classiques qui sont majoritairement représentés dans le sang (environ 80-90%), alors que chez la souris, les deux populations monocytaires sont représentées en nombres plus ou moins équivalents (Geissmann et al., 2003; Guilliams et al., 2018).

Les cMo murins et humains restent dans la circulation sanguine pendant environ une journée, avant de pénétrer dans un tissu pour se différencier en macrophage ou en pMo. Les pMo ont une durée de vie légèrement plus longue, d'approximativement deux jours chez la souris et une semaine chez l'homme (Guilliams et al., 2018).

Récemment, une hétérogénéité a été identifiée au sein de la population de cMo. Celle-ci provient de la double origine observée pour leur génération lors de l'hématopoïèse : les NeuMo (*neutrophil-like monocyte*) proviennent du précurseur GMP alors que les DCMo (*DC-like monocyte*) proviennent des MDP (Yáñez et al., 2017). Ces cMo, qui seraient identifiés par CD177 pour les NeuMo et par CD319 pour les DCMo, partageraient des marqueurs cellulaires et des caractéristiques avec les neutrophiles ou les DC, respectivement, comme la capacité à générer des filets extracellulaires pour les NeuMo (Trzebanski et al., 2023).

## 1.3 Fonctions

### Les macrophages

Malgré leur diversité importante, on peut retenir 3 fonctions majeures des macrophages résidents, qu'on retrouve au travers de la plupart des organes : la maintenance de l'homéostasie, leur capacité d'immuno-surveillance et leur rôle dans la résolution de l'inflammation (Davies et al., 2013).

En conditions normales, les macrophages résidents ont démontré leur rôle prédominant pour le maintien de l'homéostasie : ils sont responsables de l'élimination des débris cellulaires et des corps étrangers, sans répondre de manière excessive aux signaux pro-inflammatoires rencontrés.

Dans les poumons, les MA sont essentiels pour l'élimination du surfactant et des corps étrangers qui parviennent jusque dans les alvéoles, tels que les allergènes (Davies et al., 2013; Lavin et al., 2015; Murray & Wynn, 2011). Chez l'homme, des mutations génétiques induisant une déficience en GM-CSF ou en son récepteur, le GM-CSFR, induit des MA dysfonctionnels, ce qui mène à l'accumulation de surfactant, une pathologie appelée protéinose alvéolaire pulmonaire (Park et al., 2022; T. Suzuki et al., 2014).

Les ostéoclastes, dans les niches osseuses, sont responsables de la résorption osseuse. Les patients atteints d'une mutations dans l'ATPase vacuolaire, ou les souris déficientes en M-

CSF ou son récepteur M-CSFR, ont des ostéoclastes défectueux, et souffrent d'une densité osseuse anormalement élevée, pathologie appelée ostéopétrose (Park et al., 2022).

Les macrophages résidents de plusieurs organes sont impliqués dans le cycle de vie des érythrocytes : les macrophages de la moelle osseuse phagocytent le noyau des érythrocytes en maturation, permettant l'entrée des globules rouges dans la circulation sanguine ; les macrophages du foie, les cellules de Kupffer et ceux de la rate sont impliqués dans le recyclage des érythrocytes sénescents et le recyclage du fer (Park et al., 2022).

Le métabolisme des macrophages dans les tissus adipeux est responsable de maintenir la fonction des adipocytes, la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, prévenant l'installation d'un diabète de type 2 (Murray & Wynn, 2011).

Les macrophages résidents sont essentiels au bon fonctionnement des systèmes nerveux central et périphérique. La microglie, macrophages du système nerveux central, a été identifiée comme régulatrice du flux sanguin et des apports en nutriments aux neurones, et essentielle pour la plasticité neuronale, et les facultés d'apprentissage et de mémoire. Le processus de réparation des nerfs périphériques dépend des macrophages associés aux nerfs (Park et al., 2022).

Les souris déficientes en M-CSF ont également une angiogenèse et lymphangiogenèse impactées due au défaut des macrophages péri-vasculaires (Park et al., 2022).

Les macrophages sont souvent positionnés idéalement pour capturer les antigènes voyageant dans le sang ou la lymphe, comme les cellules de Kupffer, les macrophages de la zone marginale de la rate, ou les macrophages sous-capsulaires des ganglions lymphatiques. Ils expriment une grande variété de récepteurs aux signaux de dangers, appelés *pattern recognition receptor* (PRR), comme par exemple les *toll-like receptor* (TLR), *C-type lectin receptors* (CLR), *scavenger receptors*, *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG1)-*like helicase receptors* (RLR) et les *NOD-like receptors* (NLR). Cela leur permet de les reconnaître dans le milieu extracellulaire ou dans le matériel phagocyté les signaux associés à des pathogènes, des substances étrangères ou des cellules mortes ou en souffrance : les PAMP et les DAMP. Ils expriment également des récepteurs de la fraction cristallisable et du complément, qui peuvent lier les opsonines, C3b et les anticorps, ce qui peut entraîner la cascade du complément et améliorer le processus de phagocytose. Lorsque leurs capacités de maintenance de l'homéostasie sont dépassées, les macrophages peuvent ainsi être à la base de l'initiation d'une réponse immunitaire : en cas d'infection, d'inflammation ou de blessure, ils dirigent le recrutement de cellules inflammatoires, comme les neutrophiles ou les monocytes (Davies et al., 2013; Lavin et al., 2015; Murray & Wynn, 2011; Park et al., 2022).

Suivant la phagocytose et la dégradation de l'antigène en peptides, les macrophages résidents sont capables de présenter le peptide antigénique à un lymphocyte T (LT) via leur MHC-II (voir plus bas) et d'initier une réponse immunitaire (Underhill et al., 1999), mais également d'orienter celle-ci.

Dans l'intestin, des macrophages de la *lamina propria* ont été mis en évidence comme régulateurs locaux des orientations des LT grâce aux cytokines qu'ils produisent. Dans une infection par *C. rodentium* ou *Listeria monocytogenes*, les macrophages produisent de l'IL-12 et induisent des lymphocytes T *helper* de type 1 (Th1) capables de produire de l'IFN $\gamma$  (Schreiber et al., 2013). En culture avec des LT naïfs et du TGF $\beta$ , ils induisent des lymphocytes T régulateurs (Treg) de manière dépendante de l'IL-10 et de l'acide rétinoïque (Denning et al., 2007). Ils sont responsables du maintien et de la prolifération des Treg retournant dans l'intestin après leur différenciation ganglionnaire (Farache et al., 2013). Dans des souris

déficientes en CX3CR1, les macrophages ne sont plus capables de produire autant d'IL-10 et le nombre de Treg proliférant dans la *lamina propria* chute, anéantissant l'établissement d'une tolérance orale (Hadis et al., 2011). Cette IL-10 provenant de cellules myéloïdes est également requise pour le maintien de Foxp3 dans les LT, qui parvient à prévenir l'induction d'une colite dans des modèles de colites induites par transfert de lymphocytes T dans des souris immunodéficientes (Murai et al., 2009). Les macrophages intestinaux CX3CR1<sup>+</sup> sont également capables de capturer des antigènes solubles luminaux et de les transférer aux DC CD103<sup>+</sup> dans un processus dépendant de la Connexin 43 des *gap junction*. Ce mécanisme dépendant également de CX3CR1 est nécessaire à l'établissement d'une tolérance orale (Mazzini et al., 2014).

Chez l'humain, des macrophages CD14<sup>+</sup> de la *lamina propria* sont capable d'induire la prolifération de lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs, et d'orienter leur différenciation vers un phénotype Th1 et Th17. L'induction de Th17 est augmentée si la signalisation de l'acide rétinoïque est impacté, comme cela pourrait être le cas chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Kamada et al., 2009).

Dans les tissus adipeux, les lymphocytes T influencent l'état d'inflammation et la sensibilité à l'insuline. Avec l'obésité, le nombre de Treg diminue et les Th1 s'accumulent, ce qui contribue aux signaux pro-inflammatoires et à la résistance à l'insuline. Ceci induit une boucle auto-amplificatrice d'obésité obésité-induite. Les lymphocytes et macrophages du tissu adipeux sont engagés dans des communications antigènes-dépendantes. La déficience en MHC-II, en particulier chez les macrophages adipeux, protège les souris de cette boucle de résistance à l'insuline et de l'obésité induite par un régime riche (Cho et al., 2014)

Il faut distinguer les fonctions des macrophages résidents des tissus, homéostasiques, avec celles des macrophages dérivés de monocytes qui sont recrutés en cas de rupture d'homéostasie, lors d'inflammation, d'infection ou de dommage tissulaire. Ceux-ci se différencient dans le tissu afin de remplir les niches vacantes des macrophages résidents, affectés par la pathologie ou peuvent se loger dans de nouvelles niches. Cependant, ils se développent dans un contexte inflammatoire, très différent du contexte homéostatique pendant lequel les macrophages résidents s'établissent ou se renouvellent. L'influence de ces signaux inflammatoires peut diriger leur fonctionnement, ce qui mène parfois à une accentuation de la maladie. Les macrophages inflammatoires jouent donc des rôles importants, bénéfiques ou délétères, dans la physiopathologie de nombreuses maladies (Park et al., 2022).

Dans des expériences d'encéphalite auto-immune, modèle pour la sclérose en plaque, de l'IL33 est libéré par les oligodendrocytes et la matière grise en souffrance. Cela stimule l'afflux de monocytes, dont la réponse inflammatoire est boostée par le GM-CSF local, menant à la progression de la maladie (Park et al., 2022).

Dans le poumon, lors de la fibrose pulmonaire, induite le plus probablement par des blessures répétées de l'épithélium alvéolaire, les MA résidents disparaissent. Ils sont remplacés par des macrophages dérivés de monocytes provenant de la moelle osseuse, appelés MA inflammatoires, et ont un rôle dans l'établissement de la fibrose : ils sont la source majeure de PDGF-aa, un facteur de croissance qui stimule la prolifération des fibroblastes. Ils ont une longue durée de vie, puisqu'on peut les retrouver dans le poumon 10 mois après la résolution de la fibrose. Le retour vers l'homéostasie estompe peu à peu les différences



transcriptomiques des MA inflammatoires, qui se convertissent en MA résidents (Guilliams & Svedberg, 2021).

En cas d'infection par l'herpesvirus murin 4, les MA peuvent également être déplétés et remplacés par des MA inflammatoires dérivés de monocytes, qui s'établissent dans le tissu pour remplacer les MA résidents. Ceux-ci diffèrent fonctionnellement des macrophages résidents présents avant l'infection, puisqu'ils permettent la protection de la souris à un asthme allergique expérimental subséquent (Machiels et al., 2017).

La déplétion des MA est corrélée avec la sévérité de l'infection, chez les patients atteints de COVID-19, et les macrophages inflammatoires les remplaçant n'ont pas les mêmes propriétés réparatrices que leurs prédécesseurs. L'inhalation de GM-CSF améliore l'oxygénation des patients, ce qui souligne le potentiel thérapeutique de soutenir les macrophages résidents au dépend des macrophages inflammatoires (Park et al., 2022).

Grâce à leur activité phagocytaire, les macrophages contribuent à la réparation tissulaire en se chargeant notamment d'enlever les cellules apoptotiques et les débris cellulaires des lésions. Ils ont été mis en évidence dans tous les stades de ce processus : ils joueraient un rôle dans la formation du tissu granulaire vascularisé, dans la diminution de la cicatrice et la reformation de l'épithélium ainsi que dans la fermeture de la blessure (Davies et al., 2013). Ils produisent des facteurs de croissance (TGF $\beta$ 1, PDGF) qui agissent sur les cellules épithéliales et les fibroblastes, ils sécrètent des chimiokines attirant des Tregs, comme CCL22, et des fibroblastes. De plus, une fois le pathogène éliminé, ils sont capables de produire des facteurs immuno-régulateurs comme l'IL-10, RELM $\alpha$  et ARG1 qui diminuent l'intensité et la durée de l'inflammation, promouvant la guérison sans générer de fibrose trop importante (Murray & Wynn, 2011).

### Les cellules dendritiques

Les pDC sont connues pour produire de grandes quantités d'interféron de type 1 suite à une stimulation appropriée, par exemple lors d'une exposition au champignon *Aspergillus Fumigatus*. Au repos, elles sont de mauvaises présentatrices d'antigène, mais peuvent se spécialiser pour la capture et la présentation d'antigène suite à des stimuli particuliers, par exemple lors d'une infection virale (Kawasaki et al., 2022).

Les DC patrouillent les tissus et échantillonnent le milieu extracellulaire. Lors d'infection, les cDC sont capables de migrer jusqu'au ganglion lymphatique et d'y présenter les antigènes internalisés à des LT. Les cDC1 ont une meilleure capacité de présentation croisée : ce mécanisme permet aux APC de présenter via leur MHC classe I des antigènes capturés dans le milieu extracellulaire afin de les présenter à des LT CD8<sup>+</sup> (voir plus loin). Les cDC1 sont donc plus à même de présenter des antigènes à des LT CD8<sup>+</sup> lors d'infections virales. Les cDC2 quant à elles, restent meilleures pour présenter aux LT CD4<sup>+</sup> ou aux lymphocytes T *follicular helper* (TFH) (Kawasaki et al., 2022). Pour induire une prolifération ainsi qu'une différenciation des LT, les DC doivent avoir été proprement activées au préalable. Cette activation est médiée par la liaison de récepteurs PRR sur les DC avec leur ligand approprié (Desch et al., 2014).

Lors d'inflammation ou d'infection virale, la distinction entre les DC devient plus ardue. Ci-après (Fig. 6), nous utiliserons la stratégie d'identification proposée par Bosteels et al. Celle-ci permet d'identifier, en conditions basales, les cDC1 comme CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> CD26<sup>+</sup> XCR1<sup>+</sup>, les cDC2 comme CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> CD26<sup>+</sup> CD172a<sup>+</sup> et les MC (*monocyte derived cells*) comme CD11c<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> CD64<sup>+</sup> CD172a<sup>+</sup>. En conditions inflammatoires, on peut identifier également les inf-cDC2 qui sont MAR-1<sup>+</sup> (Bosteels et al., 2020).

### Les monocytes

Les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> voyagent dans la circulation sanguine et peuvent extravaser du vaisseau sanguin vers le tissu. Durant ce processus, ils gagnent l'expression du MHC-II, et peuvent transporter l'antigène du tissu vers le ganglion drainant sans se différencier (Jakubzick et al., 2013). Lors d'une inflammation, ils peuvent jouer une multitude de rôles, contribuant à la réponse inflammatoire, au processus de réparation, comme dans l'infarctus du myocarde, ou se différenciant en macrophages- ou DC- dérivés de monocytes, ou en macrophage tissulaire (Epelman, Lavine, Beaudin, et al., 2014; Hilgendorf et al., 2014; Trzebanski & Jung, 2020).

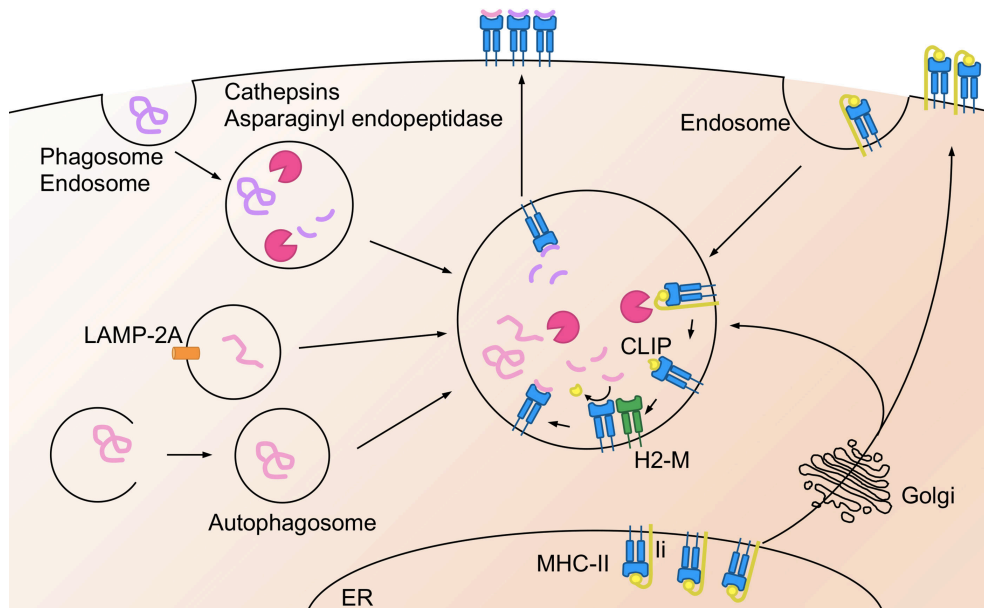
En conditions homéostatiques, ils remplacent également progressivement les macrophages résidents dans des tissus tels que la peau (Tamoutounour et al., 2013), le péritoine (Bain et al., 2016; Kim et al., 2016) ou les intestins (Bain et al., 2015). Ce faisant, ils perdent progressivement le Ly6C et gagnent l'expression du MHC-II, puis ensuite de CD64, CD11c et CX3CR1. Cette différenciation est appelée la « cascade monocyttaire ». Les propriétés des macrophages qui en résultent sont grandement impactées par les facteurs environnementaux rencontrés par le monocyte au préalable (Trzebanski & Jung, 2020).

La capacité des NeuMo et DCMo à se différencier en macrophage tissulaire, dans des expériences de transfert adoptif lorsque les macrophages sont déplétés, semble varier selon les tissus. Ils seraient tous deux capables de se différencier en macrophages intestinaux, alors que les NeuMo sont préférés pour les macrophages de la dure-mère et les DCMo pour se différencier en macrophage interstitiel pulmonaire (Trzebanski et al., 2023).

Les monocytes patrouilleurs Ly6C<sup>lo</sup> adhèrent et inspectent l'endothélium vasculaire grâce notamment à leurs intégrines LFA-1 et Mac-1 (Auffray et al., 2007). Ils sont importants pour le maintien de l'homéostasie vasculaire en éliminant les cellules apoptotiques, déchets et potentiels pathogènes (Thomas et al., 2015).

En l'absence d'inflammation, l'extravasation est rare. Néanmoins, notre laboratoire a identifié une population monocyttaire CD64<sup>+</sup> CD16.2<sup>+</sup>, dépendante de Nr4a1 et provenant des monocytes Ly6C<sup>lo</sup>, résidente au niveau du tissu pulmonaire (Schyns et al., 2019)

Ils sont idéalement situés pour la surveillance immunitaire, et réagissent rapidement à un dommage tissulaire. En effet, après une exposition à des irritants, une blessure stérile ou une infection, ils extravasent en moins d'une heure et initient une réponse inflammatoire, puis peuvent se différencier en macrophages (Auffray et al., 2007, 2009). Dans un modèle d'arthrite rhumatoïde, les monocytes patrouilleurs sont recrutés dans l'articulation et s'y différencient en macrophages qui d'abord orchestrent la réponse inflammatoire, puis qui dans un second temps dirigent la phase de réparation (Misharin et al., 2014). Ils ont également un rôle réparateur dans l'infarctus du myocarde (Hilgendorf et al., 2014), et préviennent l'établissement de métastases cancéreuses pulmonaires (Hanna et al., 2015)



**Figure 3. Présentation d'antigène sur le MHC-II.**

Les antigènes extracellulaires sont phagocytés et les antigènes intracellulaires sont acheminés via le processus d'autophagie. Ils sont dégradés par des cathepsines et des endopeptidases. Le MHC-II est synthétisé dans le réticulum endoplasmique (ER) et associé à la chaîne Ii. Dans le compartiment acide, la chaîne Ii est dégradée en un fragment CLIP et échangé avec un fragment peptidique grâce à H2-M. Le complexe peptide - MHC-II est acheminé à la membrane cellulaire. (D'après Kawasaki et al., 2022).

## 2. Induction des réponses immunitaires adaptatives

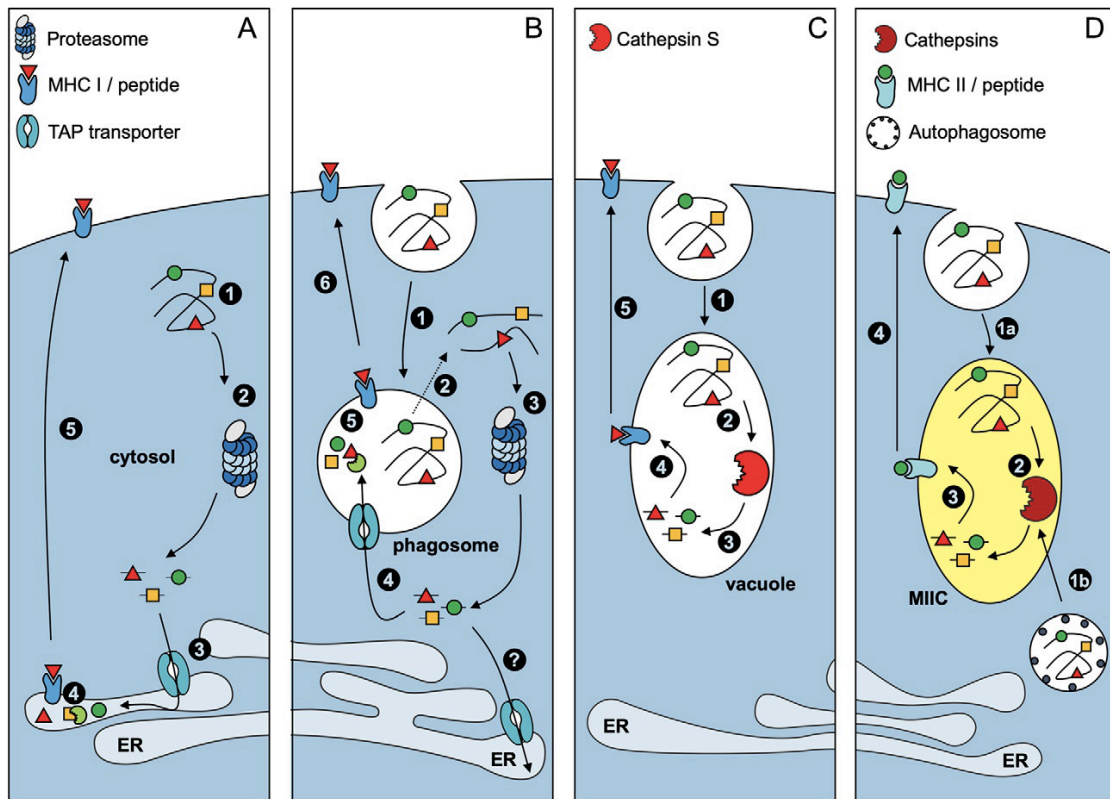
Le système immunitaire adaptatif permet la mise en place d'une réponse spécifique dirigée contre l'agent pathogène rencontré, et l'établissement d'une mémoire immunitaire à son encontre. Bien qu'elle puisse mettre plusieurs jours à se mettre en place, elle permet une réponse beaucoup plus rapide face à une rencontre ultérieure du même pathogène. Le système immunitaire adaptatif se compose de lymphocytes B, qui produisent des anticorps et sont responsables de l'immunité à médiation humorale, et de lymphocytes T, qui sont responsables de l'immunité cellulaire. Parmi ces LT, on distingue les LT CD8<sup>+</sup>, dit cytotoxiques, qui induisent la mort d'une cellule cible et les LT CD4<sup>+</sup>, dit auxiliaires ou *helper*, qui orchestrent les réponses immunitaires (Abbas et al., 2018).

### 2.1 Capture et présentation de l'antigène

La plupart des cellules nucléées ont la capacité d'exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I) et de présenter des antigènes intracellulaires via cette voie (Figure 4A). Les virus, les bactéries intracellulaires et certains auto-antigènes (dans le cadre de processus tumoraux) sont la cible de ce mécanisme (Kotsias et al., 2019). Le MHC-I est un gène polymorphique codé par trois gènes chez l'humain (HLA-A, HLA-B, HLA-C) et chez la souris (H2-K, H2-D, H2-L). En plus de ces formes classiques, il existe également des formes non classiques du MHC-I, qui sont principalement monomorphiques : la famille CD1 présente des antigènes lipidiques et MR1 présente des métabolites de la vitamine B (Rossjohn et al., 2015). Le MHC-I est composé d'une chaîne lourde  $\alpha$ , qui ancre la protéine à la membrane, et d'une protéine soluble, la  $\beta$ 2-microglobuline. Les variations dans la séquence d'acides aminés permettant d'accommoder de multiples peptides sont restreintes à une région précise de la chaîne lourde. Les peptides présentés par le MHC-I sont classiquement de 8 à 11 acides aminés de long (Kotsias et al., 2019).

Les pathogènes extracellulaires, eux, sont la cible de cellules présentatrices d'antigènes spécialisées, qui sont capables d'échantillonner le milieu extracellulaire et de présenter des antigènes via le MHC-II (Figure 3). Ces cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (APC) sont les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. En cas d'inflammation, d'autres cellules peuvent acquérir l'expression du MHC-II, comme les cellules endothéliales ou épithéliales (Kawasaki et al., 2022; Kotsias et al., 2019). Chez l'homme, le MHC-II est codé par trois gènes polymorphiques : HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, et chez la souris, par deux : H2-A et H2-E. Leur transcription est régulée par le *MHC class II transactivator* (CIITA), dont l'activité est elle-même régulée par des modifications post-traductionnelles et les interactions avec des protéines liant l'ADN spécifiques des APC (Kotsias et al., 2019).

Le MHC-II est composé de deux chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$ , possédant toutes les deux un domaine transmembranaire. Après la traduction, les deux chaînes s'associent au niveau du réticulum endoplasmique. Ce complexe est stabilisé par la chaîne protéique invariable Ii. Une fois dans le MIIC (*MHC class II compartment*), Ii est dégradé par des cathepsines. Il reste un fragment appelé CLIP (*Class II – associated invariant chain peptide*). Après fusion du MIIC avec un endosome chargé de protéines extracellulaires, ces dernières sont dégradées par des protéases endo-lysosomales. CLIP est ensuite échangé avec un peptide antigénique. Les peptides portés par le MHC-II sont plus longs que ceux du MHC-I : ils sont typiquement entre 10 et 30 résidus de long. Cet échange est catalysé par le facteur HLA-DM (H2-M chez la souris),



**Figure 4. Représentation des différentes voies de présentation des antigènes. A. Présentation classique via le MHC-I.** Les antigènes sont synthétisés dans le cytosol (1), dégradés par le protéasome (2), et acheminés dans le réticulum endoplasmique (ER) où ils sont clivés et chargés sur le MHC-I (4). Ce complexe peptide-MHC-I est ensuite amené à la surface cellulaire (5). **B. Présentation croisée cytosolique.** Les antigènes sont internalisés (1) puis exportés dans le cytosol (2) où ils sont dégradés par le protéasome (3). Ils sont ensuite transportés au ER ou retournent directement dans le phagosome (4), où ils sont chargés sur le MHC-I (5) avant que ce complexe peptide-MHC-I ne soit transporté à la membrane (6). **C. Présentation croisée vacuolaire.** Les antigènes sont internalisés (1) et dégradés dans le phagosome par des cathepsines et autres protéases (2-3) et chargés sur le MHC-I (4), avant que ce complexe peptide-MHC-I ne soit transporté à la membrane (5). **D. Présentation classique via le MHC-II,** comme en figure 3. (D'après Kotsias *et al.*, 2019)

lui-même régulé par HLA-O (ou H2-O). Le complexe peptide antigénique / MHC-II est ensuite transporté à la membrane cellulaire pour rencontre avec un *T cell receptor* (TCR) (Figure 3 et 4D) (Kawasaki et al., 2022; Kotsias et al., 2019)

Les APC peuvent capturer les antigènes extracellulaires par différents procédés (Kotsias et al., 2019):

- L'endocytose médiée par les clathrines, qui grâce à la formation de clusters de protéines du manteau, de protéines clathrines-adaptatrices et de protéines d'échafaudage, induit une invagination de la membrane cellulaire et conduit à la formation d'endosomes précoces contenant du matériel extracellulaire soluble, même en faible concentration. C'est un procédé hautement spécifique et efficace.
- La macropinocytose est un processus dépendant de l'actine, par lequel les APC capturent des antigènes exogènes présents en haute concentration, de manière non spécifique.
- La phagocytose : l'APC reconnaît le pathogène via divers récepteurs (FC $\gamma$  récepteurs, récepteurs au complément, récepteurs au mannose, *scavenger receptors* et récepteurs apoptotiques...), qui activent une cascade de signalisation menant à la formation de pseudopodes entourant la particule pour l'internaliser.

#### Les mécanismes de présentation non-classiques

##### *L'autophagie*

Grâce à l'autophagie, une voie non classique, les APC peuvent présenter des antigènes endogènes sur le MHC-II. Des phagophores contenant du matériel nucléaire ou cytoplasmique destiné à la dégradation devient un autophagosome à double membrane. Celui-ci peut fusionner directement avec un lysosome ou d'abord avec un endosome et devenir un autolysosome. Le matériel est ensuite dégradé par des enzymes comme les cathepsines ou les hydrolases avant d'être chargé sur le MHC-II et acheminé à la membrane, pour éventuellement rencontrer un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> portant un TCR reconnaissant le peptide antigénique (Kotsias et al., 2019).

##### *La présentation croisée*

La présentation croisée est un mécanisme de présentation non-classique qui a été soupçonné peu après la découverte des DC. Il permet aux APC de présenter via leur MHC classe I des antigènes capturés dans le milieu extracellulaire afin de les présenter à des LT CD8<sup>+</sup>. Ce mécanisme a deux voies connues. Premièrement, la voie cytosolique, par laquelle les antigènes endocytés ou phagocytés sont libérés dans le cytoplasme via Sec61, et dégradés par le protéasome. Ils sont ensuite acheminés via le réticulum endoplasmique ou directement dans un endosome pour être chargés par le complexe PLC (*peptide loading complex*) sur le MHC-I (Figure 4B). Deuxièmement, la voie vacuolaire, par laquelle les antigènes endocytés sont dégradés par des protéases (notamment la cathepsine S) dans les endosomes, et y sont chargés sur le MHC-I. Cette vacuole fusionne ensuite avec la membrane cellulaire pour exposer le complexe peptide/MHC-I aux LT CD8<sup>+</sup> (Figure 4C). La capacité des APC à réaliser cette cross-présentation varie en fonction des types et sous-types de cellules et n'est pas restreinte aux DC : les macrophages sont capables de faire de la cross-présentation en utilisant majoritairement la voie vacuolaire. L'utilisation de ce mécanisme est très prometteur pour les thérapies anti-tumorales et antivirales (Kawasaki et al., 2022; Muntjewerff et al., 2020).

Les antigènes internalisés fusionnent avec une vésicule lysosomale acide contenant des protéases lysosomales telles que les cathepsines S, L et K... et les asparagine endopeptidase). Les macrophages contiennent plus de protéases que les DC ou les lymphocytes B (LB). Ils sont capables de dégrader plus vite les antigènes internalisés. Les DC digèrent donc lentement les antigènes, ce qui leur donne plus d'opportunités d'assemblage de complexes peptide/MHC-II, avec des peptides plus longs ; plus de chances de sortie de la vacuole et d'une cross-présentation par MHC-I subséquente ; plus de temps de migrer et de disséminer les antigènes pour une meilleure présentation au système immunitaire (Delamarre et al., 2005). Les DC couplent la digestion des antigènes internalisés avec le début de leur maturation. Cela explique également comment ils peuvent présenter des antigènes prélevés dans les organes périphériques aux ganglions drainants, souvent quelques jours après. Ce mécanisme promeut la surveillance immunitaire (Turley et al., 2000).

## 2.2 Présentation aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les APC, et en particulier les DC immatures, visitent les tissus périphériques et échantillonnent leur environnement. Lorsqu'elles perçoivent un stimulus inflammatoire, via la liaison de leurs PRR, et qu'elles phagocytent un pathogène, elles entament leur maturation. Elles diminuent l'expression des récepteurs aux signaux de danger mais augmentent celle des récepteurs aux chimiokines, notamment CCR7, ce qui leur permet d'entrer dans le réseau lymphatique et de migrer jusqu'au ganglion drainant. Lors de leur transit, elles mettent en place toute la machinerie pour présenter l'antigène et stimuler les lymphocytes. Les DC matures ont la capacité de présenter correctement un antigène mais ne phagocytent plus de nouvelles particules. Dans le ganglion, elles voyagent en suivant le sinus sous-capsulaire et le sinus cortical jusqu'au parenchyme ganglionnaire, en suivant un gradient chimiokinique de CCL21 (ligand du CCR7).

Les LT arrivent de la circulation sanguine et pénètrent dans le ganglion par diapédèse au niveau des HEV (*high endothelium venules*). Ce processus en quatre étapes est régulé par la liaison d'intégrines sur les cellules endothéliales et l'attraction par des chimiokines. Les lymphocytes se marginalisent dans le vaisseau et roulent le long de l'endothélium. Cette étape est médiée par l'interaction du CD62L des lymphocytes avec PNAD des cellules endothéliales. Les lymphocytes détectent les chimiokines CCL21 et CCL19, produites par les cellules des HEV et les cellules paracorticales, via leur récepteur CCR7. Cette liaison entraîne l'expression de l'intégrine LFA1, qui se lie avec ICAM1 des cellules endothéliales et conduit à l'arrêt de la cellule circulante, qui migre ensuite à travers la paroi du vaisseau (Qi et al., 2014; Von Andrian & Mempel, 2003).

Les DC migratrices et les LT arrivent donc tous deux dans la zone paracorticale, où ils sont guidés dans leurs déplacements par un réseau de FRC (*fibroblastic reticular cells*). Ce réseau aide les lymphocyte à scanner de nombreux DC à la recherche d'une interaction spécifique (Qi et al., 2014; Stebegg et al., 2018). Les DC étendent de nombreux prolongements dendritiques mobiles, ce qui augmente leur surface cellulaire et la probabilité de contact avec un LT. Les DC peuvent ainsi interagir avec environ 5000 LT par heure, avec 250 LT simultanément, chaque interaction non spécifique durant environ 3 minutes. L'efficacité de scan entre les DC et les LT assure une rencontre dans les 6h avec une probabilité de 95% (M. J. Miller et al., 2004).

Le TCR des lymphocytes T classiques est composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . Il possède un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Il est obtenu lors de leur maturation thymique par réarrangement des gènes V, D et J pour la chaîne  $\beta$  et V et J pour la chaîne  $\alpha$ . Le TCR contient 6 régions hypervariables (CDR) au site de liaison. Ces variations produisent un répertoire d'environ  $2 \times 10^7$  TCR chez l'humain (Rossjohn et al., 2015). Il peut reconnaître des fragments peptidiques lorsque présentés par un MHC. Ces corécepteurs CD4 ou CD8 se lient respectivement avec un MHC-II ou MHC-I. Le CD3 et les chaînes  $\zeta$ , dont les domaines cytoplasmiques contiennent des séquences ITAM, complètent le complexe du TCR (Courtney et al., 2018).

### 2.3 Activation et différenciation du lymphocyte T CD4<sup>+</sup>

Les LTh ont un rôle central de chef d'orchestre dans les réponses immunitaires. Ils ont la capacité d'aider à la maturation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps, de développer une mémoire afin de répondre plus efficacement à une rencontre ultérieure avec le même pathogène, et grâce à leur production de cytokines et chimiokines, ils peuvent également communiquer avec le pendant inné de la réponse immunitaire. Ils stimulent les macrophages et recrutent les neutrophiles, basophiles et éosinophiles au site de l'inflammation (Ruterbusch et al., 2020; Zhu & Paul, 2008).

Les lymphocytes T CD4 naïfs arrivent dans les ganglions lymphatiques par voie sanguine. Dans la zone paracorticale, ils scannent les DC qui présentent des peptides antigéniques via leur MHC-II à la recherche d'une correspondance pour leur TCR. Pour qu'il y ait une activation, prolifération et différenciation du lymphocyte naïf, ceux-ci ont besoin de plusieurs signaux : d'une reconnaissance de leur TCR et de signaux de co-stimulation via leur récepteur CD28, mais aussi de signaux cytokiniques qui dirigent leur polarisation (Curtsinger & Mescher, 2010; Yamane & Paul, 2013). Lorsque le TCR engage une liaison avec un complexe peptide-MHC-II relevant, la colocalisation avec CD4 recrute la kinase Lck, qui phosphoryle les domaines ITAM. Ces phosphorylations créent des sites de liaison pour la kinase Zap70, qui, activée, propage les signaux du TCR en activant les voies Ras-MAPK. La liaison du CD28 du LT par le CD80 ou CD86 de l'APC constitue un deuxième signal, qui permet l'activation de la voie des inositol phosphates, qui aboutit au relargage de calcium depuis les réserves du réticulum endoplasmique. Ces différentes cascades d'activations aboutissent au déclenchement de la voie des MAP kinases, qui permet l'activation de différents régulateurs de la transcription et ultimement l'activation du LT (Courtney et al., 2018).

Quatre sous-types de Th activés ont été majoritairement décrits : les Th1, les Th2, les Th17 et les Treg. La différenciation du LT naïf en l'un ou l'autre de ces sous-types dépend de la force du signal TCR et de l'environnement cytokinique dans lequel la cellule se trouve. Ils sont caractérisés par les facteurs de transcription qu'ils expriment : chacun par un *master regulatory transcription factor* et un *signal transducer and activator of transcription* (STAT), ainsi que par les cytokines qu'ils produisent et leur action subséquente dans les tissus périphériques (Yamane & Paul, 2013).



## Les autres lymphocytes T helper

### *Les TFH.*

Les TFH ont été identifiés et caractérisés d'abord par leur localisation dans le centre germinatif. Ils se distinguent également par leur expression forte de PD-1, ICOS, PAS (nécessaire pour les interactions lymphocytaires), et Bcl-6, dont ils dépendent pour leur différenciation. Ils produisent l'IL-21. Cependant, ils peuvent également exprimer des facteurs de transcription et des cytokines caractéristiques d'autres sous-types de LT activés, ce qui est cohérent avec leur rôle pour l'orientation des LB et leur commutation de classe (Cannons et al., 2013).

L'origine et la séquence de différenciation précise des TFH est toujours débattue. Ils pourraient se différencier directement à partir de LT naïfs, comme les autres sous-types de T activés, ou se différencier à partir de l'un de ces sous-types (Yamane & Paul, 2013).

*In vitro*, on peut obtenir une expression de Bcl-6 en présence de IL-21 et d'IL-6, qui activent la voie STAT3. *In vivo*, cette « recette » est remise en question. Un modèle distingue deux niveaux de diversification. Le premier est une diversification dans l'état d'activation, dépendante de la force du signal TCR, des signaux de costimulation et de leurs voies de signalisation, qui distingue les T effecteurs producteurs de cytokines et les TFH. Le deuxième est une diversification entre les différents sous-types en fonction des cytokines présentes dans l'environnement de la cellule. Par exemple, un LT naïf bénéficiant d'un signal TCR fort en présence de IFN $\gamma$  et d'IL-12 deviendra un T effecteur de type Th1 exprimant fortement T-bet, STAT5 et Blimp-1 et qui pourra produire de l'IFN $\gamma$  après restimulation. Dans le même environnement, un LT qui n'obtient pas un signal TCR fort va exprimer CXCR5 et se déplacer vers la bordure T-B et deviendra un TFH sécrétant de l'IFN $\gamma$  (Ruterbusch et al., 2020).

Bcl-6 est un répresseur transcriptionnel. Il peut bloquer les autres *master transcriptional factors* T-bet, GATA3 et ROR $\gamma$ t et les programmes de différenciation subséquents. Blimp-1 est un activateur transcriptionnel qui antagonise Bcl-6 (Ruterbusch et al., 2020).

Les futurs TFH augmentent l'expression de Bcl6, qui est leur *master regulator*, et de CXCR5, et diminuent celle de CCR7, ce qui permet leur migration vers la bordure T-B. L'interaction avec une cellule B activée permet l'augmentation de l'expression de CXCR5 et la migration vers le centre germinatif, menant à une différenciation totale en TFH (Ruterbusch et al., 2020; Stebegg et al., 2018).

### *Les Th9*

Les Th9 se différencient à partir de LT naïfs sous l'influence de TGF $\beta$  et d'IL-4. Ils expriment les facteurs de transcription PU.1 et IRF4. Ils produisent de l'IL-9, qui a été initialement identifié comme facteur de croissance pour les cellules T et les mastocytes, promouvant la production de mucus et l'activation des mastocytes et des éosinophiles. C'est donc une cellule déterminante dans l'immunopathologie de l'asthme. Les Th9 ont également été identifiés comme délétères dans des maladies auto-immunes telles que l'encéphalomyélite auto-immune. Elle pourrait également avoir des effets immunorégulateurs, car les Th9 sont également capables de produire de l'IL-10 (Raphael et al., 2015) .

### *Les Th22*

Les Th22 sont obtenus à partir de la différenciation de LT naïfs dans un environnement contenant de l'IL-6 et du TNF. Ils expriment AHR et produisent de l'IL-22. Cette cytokine semble réguler la production d'auto-anticorps et avoir un rôle dans des maladies auto-immunes et inflammatoires, telles que le psoriasis, la sclérose en plaques ou des maladies allergiques. Dans l'arthrite rhumatoïde, la fréquence des Th22 est corrélée avec la sévérité de la maladie (Raphael et al., 2015).

Les Th1 sont induits par un signal fort du TCR. L'activation forte et durable de ERK qui en résulte bloque la production de GATA3, et donc d'IL-4, et la phosphorylation de STAT5, rendant la cellule insensible à la liaison d'IL-2. Les cytokines IL-12 et IFN $\gamma$  induisent les facteurs STAT 4 et STAT1, respectivement. Le *master regulator* des Th1 est Tbet (Szabo et al., 2000; Yamane & Paul, 2013).

Les Th1 sont ensuite capables de produire de l'IFN $\gamma$ , qui augmente le pouvoir microbicide des macrophages, du LT $\alpha$  et de l'IL-2, importante pour former des cellules CD8 mémoires. Ils sont impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire, pour les virus ou bactéries intracellulaires et, en cas d'activation inappropriée, dans des processus d'auto-immunité (Meitei & Lal, 2023; Zhu & Paul, 2008).

Les Th2 sont induits par un signal au TCR faible, qui induit une activation réduite et transitoire de ERK, qui permet l'induction de GATA3. Ce facteur de transcription permet la production d'IL-2. La liaison d'IL-2 active STAT5, qui, avec GATA3, induit la production d'IL-4. Celle-ci, via l'expression de STAT6, renforce l'expression de GATA3 et forme ainsi une boucle de rétrocontrôle positif (Yamane & Paul, 2013; Zheng & Flavell, 1997).

Les Th2 sont impliqués dans la lutte contre des pathogènes extracellulaires comme les helminthes. Les réponses Th2 et la génération d'IgE subséquente sont également nécessaires à l'établissement d'une protection contre des venins et autres toxines environnementales (Marichal et al., 2013). Les Th2 sont responsables de processus allergiques et asthmatiques. Ils sont capables de produire plusieurs cytokines : de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 et de l'amphiréguline. L'IL-4 induit un feedback positif pour la différenciation en Th2 et induit la commutation de classe en IgE chez les cellules B. Ces IgE sont ensuite impliquées dans la dégranulation des basophiles et mastocytes. L'IL-5 est la cytokine responsable du recrutement des éosinophiles. L'IL-9, en conditions asthmatiques, induit la production de mucus chez les cellules épithéliales. L'IL-10 peut bloquer la différenciation en Th1. L'IL-13 joue son rôle dans l'expulsion des helminthes et dans l'hyperréactivité bronchique. L'IL-25 induit la production de chimiokines comme RANTES CCL5 et l'éotaxine CCL11, qui recrutent les éosinophiles. L'amphiréguline, membre de la famille des facteurs de croissance, induit la prolifération des cellules épithéliales (Meitei & Lal, 2023; Zhu & Paul, 2008).

Les Th17 se différencient à partir de LT naïfs lorsqu'ils sont exposés probablement à un signal TCR fort, à du TGF $\beta$  et de l'IL-6. Il y a alors induction de ROR $\gamma$ t (Ivanov et al., 2006). Cela mène à l'expression de l'IL-23R et à la production de IL-17A, IL-17F et IL-21. La liaison d'IL-21, avec l'exposition au TGF $\beta$ , active STAT3, qui à son tour renforce l'expression de l'IL-23R et la production d'IL-21 (Yamane & Paul, 2013).

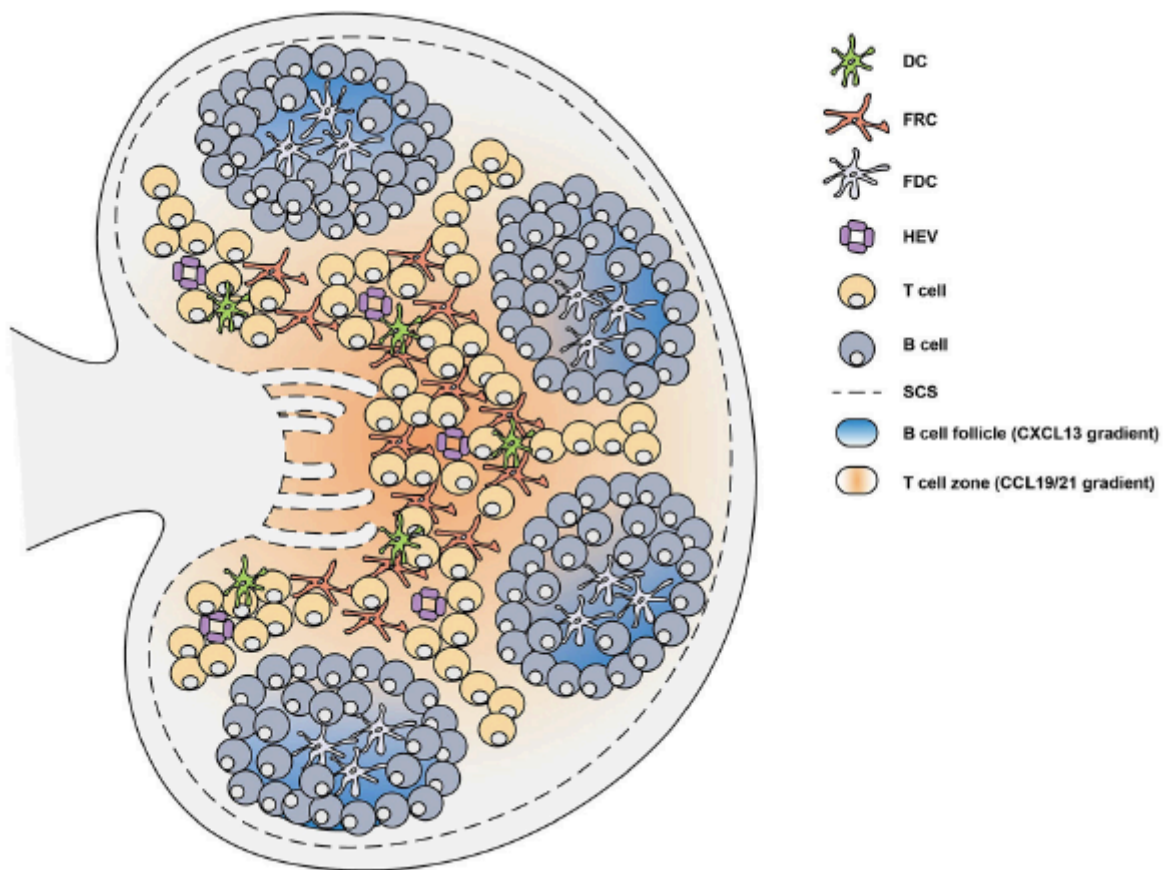
Les Th17 produisent de IL-17A , IL-17F, IL-21 et IL-22 et sont connus pour leur implication dans les infections bactériennes et fongiques et dans l'autoimmunité (Meitei & Lal, 2023; Zhu & Paul, 2008).

Les Treg se différencient suite à l'expression de Foxp3, qui est induite suite à un signal TCR faible et à la présence de TGF $\beta$  et d'IL-2 (Yamane & Paul, 2013).

Les Treg sont indispensables au maintien de la tolérance du soi et à la régulation des réponses immunitaires, grâce à la production d'IL-10, de TGF $\beta$  et d'IL-35. Ils expriment CTLA-4 et peuvent donc également procéder via contact cellulaire. Ils expriment fortement le CD25, récepteur à l'IL-2, ce qui souligne l'importance de cette cytokine pour ces cellules (Meitei & Lal, 2023; Zhu & Paul, 2008).

Ces divers processus de différenciation impliquent souvent une boucle de feedback positif, mais également une inhibition des autres voies de différenciation. Ces mécanismes de cross-régulation sont nombreux. Par exemple, les voies de signalisation de l'IL-4 et du TGF $\beta$  s'inhibent mutuellement. TGF $\beta$  bloque les programmes Th1 et Th2 tandis que la présence d'IL-2, d'IL-4 ou d'IFN $\gamma$  dans le milieu bloque le programme de différenciation en Th17. Un signal TCR fort inhibe la voie IL-2/STAT5 et donc la différenciation en Th2 ou Treg (Yamane & Paul, 2013; Zhu & Paul, 2008).

Après activation et expansion d'un clone, 90% des cellules meurent par apoptose. Les autres deviennent des cellules mémoires. On distingue trois types de cellules mémoires : les TCM (*central memory*), les TEM (*effector memory*) et les TRM (*resident memory*) (Ruterbusch et al., 2020).



**Figure 5. La structure ganglionnaire est supportée par les cellules stromales et des gradients chimiokines.** Les gradients de chimiokines permettent la circulation des lymphocytes au sein du ganglion. CCL19 /CCL21 (orange) produit par les FRC dans la zone T facilitent la migration des  $L_T$  et des DC. Dans les follicules B, les FDC produisent CXCL13 (bleu) qui agit sur la localisation des lymphocytes B. Les lymphocytes entrent via les *high endothelial venules* (HEV) tant dis que, en cas d'infection, les antigènes entrent via le sinus sous-capsulaire (SCS) ou sont amenés par les DC. (D'après Stebbeg et al., 2018).

## 2.4 Activation des lymphocytes B

D'autres cellules stromales structurent le follicule B primaire (Fig. 5). Les FDC (*follicular dendritic cells*) sont au centre du follicule, et les CRC (*CXCL12-producing reticular cells*) sont attenantes à la zone T (Qi et al., 2014). Ces cellules sont chacune spécialisées dans la production d'un ou de plusieurs facteurs chimiotactiques, ce qui permet l'attraction et la circulation optimale des cellules immunitaires. Les FRC sont la source de CCL19 et de CCL21, les FDC de CXCL13, et, comme leur nom l'indique, les CRC produisent CXCL12 (Qi et al., 2014; Stebegg et al., 2018). Les MRC (*marginal reticular cells*) sont situées à proximité du sinus sous-capsulaire et produisent des cytokines suite à l'activation de TNF (TRANCE) et CXCL13. Elles sont suspectées d'organiser le développement de l'organe lymphoïde secondaire lors de l'embryogenèse, et certains pensent que ce sont les cellules précurseuses des FDC (Katakai et al., 2008; Stebegg et al., 2018).

Les lymphocytes B arrivent de la même manière que les lymphocytes T, en suivant un gradient de CCL19 et CCL21, car ils expriment CCR7. Ils expriment également CXCR5, dont le ligand est CXCL13. Ils se regroupent donc en follicules B dans le cortex ganglionnaire. Ils expriment également le récepteur EBI2, dont les ligands sont des oxysterols produits en périphérie du follicule. Ces gradients chimiokines donnent la possibilité aux lymphocytes B de circuler au sein des follicules B en fonction du niveau d'expression de leurs différents récepteurs.

De cette manière, les lymphocytes B naïfs entrant et se dirigeant vers le follicule traversent la zone interfolliculaire, riche en DC, et ont la possibilité de rencontrer une DC chargée de l'antigène d'intérêt, et les lymphocytes B déjà dans le follicule ont la possibilité de circuler jusqu'à la bordure T-B pour y être activés (Qi et al., 2014).

Les macrophages du sinus sous-capsulaire CD169<sup>+</sup> sont une des quatre populations de macrophages résidents du ganglion lymphatique. Ils sont idéalement situés en bordure intérieure du sinus sous-capsulaire, et ils échantillonnent la lymphe afférente qui transporte microbes et autres particules. Ils sont ensuite capables de présenter directement les antigènes sur leurs prolongements qui entrent dans les follicules B ou de transmettre les complexes immuns aux FDC par l'intermédiaire de cellules B.

Les lymphocytes B naïfs peuvent donc également rencontrer l'antigène d'intérêt via leur BCR lorsque celui-ci est soluble dans le milieu, ou lorsqu'il est présenté par des DC migratrices dans la zone paracorticale, par des macrophages sous-capsulaires ou des FDC directement au sein du follicule B (Qi et al., 2014; Stebegg et al., 2018; K. Suzuki et al., 2009).

### Le centre germinatif

Suite à la capture de leur antigène, les lymphocytes B augmentent leur expression de CCR7 et de EBI2, leur permettant de se positionner à la bordure T-B (Okada et al., 2005). Ils internalisent leur complexe antigène/BCR et présentent un peptide antigénique via leur MHC-II (Avalos & Ploegh, 2014; Stebegg et al., 2018). Les lymphocytes T CD4 activés diminuent l'expression de CCR7 et augmentent celle de CXCR5, ce qui leur permet de se positionner idéalement à la bordure T-B, en face des lymphocytes B. Les lymphocytes B peuvent former des interactions mobiles mais durables avec plusieurs LT à la fois. La stabilité de ces synapses immunologiques dépend de la protéine SAP (*SH2 domain-containing adaptor protein*). Le LT délivre des facteurs de survie et de co-stimulation, tels que CD40L (Qi et al., 2014). Les lymphocytes B vont se diviser en cellules-filles qui vont soit initier la formation du centre

germinatif (GC), soit devenir des plasmocytes extrafolliculaires à courte durée de vie ou des cellules B mémoires. Ces plasmocytes extrafolliculaires sont essentiels à la production d'une première vague d'anticorps, qui permet de lutter contre l'infection le temps que la réponse du centre germinatif se mette en place (Stebegg et al., 2018).

Les cellules B activées et les LT activés diminuent leur expression de CCR7 et d'EBI2 et augmentent celle de CXCR5. Ils migrent ainsi vers le centre du follicule B pour initier la formation d'un GC : les cellules B se divisent rapidement et sont alors appelées centroblastes, et les LT se différencient totalement en TFH. Ces deux types cellulaires expriment également S1PR2, qui en se liant au ligand S1P, produit au centre du follicule, stabilise leur positionnement en diminuant la réponse des cellules aux autres chimioattractants (Stebegg et al., 2018). Le GC est structuré en une zone claire et une zone sombre, et s'oriente en fonction des cellules stromales qui supportent chaque partie.

La zone sombre est supportée par les CRC qui produisent du CXCL12. Les centroblastes expriment le récepteur CXCR4 et se regroupent dans la zone sombre où ils subissent des hypermutations somatiques dans les gènes du BCR.

Une fois ce processus terminé, les centroblastes diminuent leur expression de CXCR4 et augmentent leur expression de CXCR5. Ils sont ainsi dirigés vers la zone claire, qui est supportée par les FDC productrices de CXCL13, et nouvellement appelés centrocytes. Cette zone claire est également peuplée de TFH et de *T follicular regulatory cells* (TFR), qui, avec les FDC, sont responsables de la sélection positive et de la régulation des lymphocytes B. Les FDC sont capables de présenter des antigènes durablement, permettant aux centrocytes de capturer ces antigènes via leurs immunoglobulines nouvellement mutées, de les internaliser et de les présenter aux TFH pour sélection positive des clones ayant une haute affinité pour leur antigène. Les clones portant un BCR non fonctionnel ou moins efficace entrent en apoptose. Les centrocytes peuvent ensuite retourner dans la zone sombre pour proliférer, recommencer un processus d'hypermutations somatiques et ensuite de sélection par les TFH. La répétition de cette boucle permet l'amplification des centrocytes ainsi que l'augmentation de l'affinité du BCR pour l'antigène (Stebegg et al., 2018; Victora et al., 2010).

L'hypermutation somatique étant un processus aléatoire, le risque de produire des clones ayant une cross-spécificité est important et pourrait conduire à des maladies auto-immunes. Les TFR sont des lymphocytes exprimant à la fois les marqueurs des TFH et des Treg (Foxp3<sup>+</sup>). Ils ont une fonction suppressive par l'expression de CTLA-4, qui se lie et inhibe les molécules de co-stimulation CD80/86, la production d'IL-10, de TGFβ et de granzyme B. Ils régulent l'interaction entre les centrocytes et les TFH, ayant ainsi un impact sur la taille du GC, sur la sélection des clones antigène spécifique des B et des TFH et sur la commutation de classe et la maturation de l'affinité des anticorps.

Ce processus aboutit à la production de plasmocytes à longue durée de vie et de cellules B mémoires qui ont un BCR à haute affinité pour l'antigène (Qi et al., 2014; Stebegg et al., 2018).

### 3. Les macrophages pulmonaires

Dans le poumon, on distingue deux types de macrophages. Les macrophages alvéolaires, situés dans la lumière des alvéoles, éliminent le surfactant en excès ainsi que les corps étrangers inspirés parvenant jusque-là. Les macrophages interstitiels sont quant à eux positionnés dans le parenchyme pulmonaire, dans les zones péri-bronchiques et péri-vasculaires. Historiquement, les MA ont été beaucoup plus étudiés que les MI, notamment grâce à leur facilité d'accès. En effet, un simple lavage broncho-alvéolaire (BAL), chez la souris comme chez l'homme, permet de récupérer une grande partie des MA du poumon, tandis qu'une digestion enzymatique du tissu pulmonaire est nécessaire pour extraire les MI. La caractérisation de ces populations est donc délicate, et il faut prêter attention au fait que le lavage ne permet pas de récupérer la totalité des MA, et que bien souvent les MA résiduels contaminent la population de « MI » isolée de l'organe lavé (Crowell et al., 1992; van Oud Alblas et al., 1981). Ces difficultés techniques ont donc mené à une grande diversité de résultats, notamment dans la quantification de ces macrophages (Lehnert et al., 1985). Récemment, nous avons pu déterminer grâce à la cytométrie en flux que les MI sont environ 10 fois moins nombreux que les MA (Sabatel et al., 2017).

Les MA sont des cellules sphéroïdes de grande taille, aux microvillosités abondantes. Leur cytoplasme est volumineux et contient beaucoup d'organelles assez hétérogènes (mitochondries, lysosomes, phagosomes, vacuoles...). Les MI sont de plus petite taille, et ont des caractéristiques moins marquées : leur surface est plus lisse, ils ont moins de lysosomes (Sebring & Lehnert, 1992). Cependant, de plus récentes études observent néanmoins que les MI possèdent de longs prolongements dendritiques mobiles (Tang et al., 2022; Ural et al., 2020). Ils semblent être à mi-chemin phénotypiquement entre les monocytes et les MA (Sebring & Lehnert, 1992). Ces observations ont conduit beaucoup d'équipes à penser que les MI, idéalement placés, pourraient être un stade de maturation intermédiaire entre le monocytes circulants et les MA (Bowden & Adamson, 1972; Landsman & Jung, 2007).

#### 3.1 Ontogénie et renouvellement

La théorie que les MI serviraient de stade intermédiaire entre les monocytes et les MA est dans le sillage de la théorie du MPS. Celle-ci établit que les monocytes circulants, provenant de précurseurs médullaires, entrent dans les tissus et s'y différencient, remplaçant continuellement les macrophages tissulaires (van Furth et al., 1972). En 2013, avec l'avancée des études d'ontogénie, cette théorie est réfutée pour le poumon : les macrophages pulmonaires ne proviennent pas de monocytes (Hashimoto et al., 2013). La niche des MA étant séparée de la circulation sanguine par l'épithélium pulmonaire, elle est inaccessible aux précurseurs sanguins. L'organe est dit « fermé » et les macrophages proviennent de précurseurs prénataux (Ginhoux & Guilliams, 2016).

Avec des expériences de souris chimériques, de parabioses et de transferts adoptifs, Guilliams et son équipe ont identifié plusieurs vagues de progéniteurs colonisant le poumon. Les macrophages vitellins sont les premiers, à E12. Ils sont ensuite remplacés par les monocytes provenant du foie fœtal à E14. Ceux-ci deviennent des « preAMs » qui, sous l'influence d'un boost de GM-CSF au moment de la naissance, vont vers les alvéoles où ils deviennent des MA (Guilliams et al., 2013). Le GM-CSF induit PPAR $\gamma$ , hautement exprimé chez les MA et important dans la régulation du développement et de la fonction de ceux-ci. En

effet, il induit un programme transcriptomique comprenant des gènes impliqués dans la dégradation des lipides et l'oxydation des acides gras, nécessaires pour la métabolisation du surfactant. Le GM-CSF est nécessaire à long terme, pour maintenir les macrophages et l'homéostasie pulmonaire (Lavin et al., 2015). La déficience en GM-CSF conduit à une pathologie appelée la protéinose alvéolaire pulmonaire caractérisée par l'accumulation de surfactant dans les bronches et alvéoles (Lavin et al., 2015; T. Suzuki et al., 2014).

Les MA sont des cellules à longue durée de vie. En l'absence d'infection, d'inflammation ou de blessure, plusieurs possibilités ont été avancées pour leur maintien à long terme. Avec des expériences de parabioses, plusieurs équipes ont montré une faible arrivée de progéniteurs circulants, mais la jugent négligeable (Guilliams et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Tan & Krasnow, 2016). Avec des expériences de marquage de Ki-67, ils identifient une prolifération à bas bruit des MA (<5%). Cette hypothèse de prolifération locale est celle préférée aujourd'hui pour expliquer leur renouvellement lors d'homéostasie (Aegerter et al., 2022; Guilliams et al., 2013). Quand cette homéostasie est perturbée, en cas de déplétion importante des MA, les mécanismes mis en place pour combler leur absence dépendent de l'importance de la déplétion et de la cause de celle-ci. Le système DTR-toxine diphtérique, qui consiste en l'utilisation d'une souris génétiquement modifiée pour exprimer le récepteur à la toxine diphtérique sous la dépendance d'un promoteur exprimé spécifiquement, ici CD169 dans les MA, et d'administration de toxine diphtérique qui tue les cellules exprimant le récepteur au moment voulu, est fréquemment utilisé pour étudier les APC. Suite à l'ablation des MA avec ce système, ils prolifèrent localement de manière soutenue pour se régénérer. Le GM-CSF se montre crucial pour cette prolifération (Hashimoto et al., 2013). Lors d'une déplétion induite par irradiation, les monocytes circulants se différencient en MA sous la dépendance du GM-CSF également (Epelman, Lavine, & Randolph, 2014; Landsman & Jung, 2007). Une infection par l'herpèsvirus murin 4, utilisé comme modèle pour le virus d'Epstein-Barr, induit une déplétion importante des MA, qui sont remplacés par des monocytes qui montrent des fonctions régulatrices puisqu'ils confèrent une protection à un asthme allergique induit par la suite (Machiels et al., 2017).

Les études d'ontogénie pulmonaire font rarement la distinction entre les MA et les MI. Comme les MA sont les plus représentés, les résultats portent principalement sur eux. Toutefois, en 2016, quelques précisions sont apportées à l'ontogénie pulmonaire des MI par deux scientifiques de Stanford. En effet, ils établissent que les MA et MI proviennent de vagues de précurseurs indépendantes. Les macrophages vitellins colonisent l'interstitium pulmonaire et y restent pendant tout le développement. Ils sont appelés MI « primitifs ». Après la naissance, ils sont uniquement retrouvés dans les zones sub-mésothéliales et péri-vasculaires. Dans la première semaine suivant la naissance, les progéniteurs circulants provenant de la moelle osseuse s'établissent dans l'interstitium pulmonaire : ils constituent les MI « définitifs ». Ceux-ci sont maintenus au long de la vie grâce à ces progéniteurs circulants (Tan & Krasnow, 2016).

Les études de Chakarov et Gibbins ont confirmé l'origine monocytaire des MI (Chakarov et al., 2019; Gibbins et al., 2017). Avec des expériences de trajectoires par scRNAseq, une population de monocytes extravasés, CD16.2<sup>+</sup> CD64<sup>+</sup>, originaires de monocytes patrouilleurs (Nr4a1 dépendants) a montré sa contribution probable à la population des MI Lyve1<sup>low</sup> MHCII<sup>high</sup> CD206<sup>low</sup> (Schyns et al., 2019). La longévité des MI est variable en fonction des sous-types, les CD206<sup>-</sup> étant plus rapidement remplacés par des monocytes que les



CD206<sup>+</sup> ; ils ont en moyenne une demi-vie d'environ 1 an. Les MI CD206<sup>+</sup> ont également un potentiel d'auto-maintenance plus élevé, puisqu'ils expriment plus fortement le marqueur de prolifération Ki-67 (Schyns et al., 2019).

Plus récemment, nous avons mis au point un modèle murin permettant la déplétion ponctuelle des MI : les souris *Tmem119<sup>Cre</sup>Cx3cr1<sup>LSL-DTR</sup>*, qui 24h après injection de toxine diphtérique, perdent totalement et spécifiquement les deux sous-populations de MI, laissant intacts les autres macrophages, monocytes et DC. La niche des MI se repeuple progressivement à partir du troisième jour, pour revenir à un niveau normal une semaine après injection. Ce modèle nous a permis d'étudier l'origine des MI, et grâce à des expériences impliquant des chimères et du scRNA-seq, nous avons pu déterminer que les MI provenaient d'un afflux de monocytes classiques *Ccr2*-dépendants et *Nr4a1*-indépendants. Ces monocytes classiques, appelées Tr-Mo lorsqu'en transition vers un phénotype de MI, sont capables de proliférer de manière dépendante du CSF-1, un processus qui est contrôlé par *MafB* (Vanneste et al., 2023).

En cas d'inflammation ou de rupture de l'homéostasie, les nombres de MI augmentent dans le poumon murin. C'est le cas après dommage aigu du poumon suite à l'administration de bléomycine (Misharin et al., 2013), après diminution de l'oxygénation (Pugliese et al., 2017), après stimulation avec du *House Dust Mite* (HDM) (Kawano et al., 2016), des lipopolysaccharides (LPS) (Brazee et al., 2017) ou en cas de stimulation avec des CpG-DNA (Sabatel et al., 2017). Dans la plupart des cas, ces nouvelles cellules se différencient à partir de monocytes, et surexpriment des marqueurs d'activation (CD40, CD80, CD86) par rapport aux MI résidents (J et al., 2018; Misharin et al., 2013). Dans le cas d'une administration de CpG-DNA, nous avons démontré que ces nouvelles cellules ne sont pas originaires d'une prolifération des MI résidents, ni de monocytes médullaires *CCR2* dépendants, mais bien de monocytes *CCR2* indépendants situés dans le poumon lui-même et dans un réservoir distant : la rate. Encore une fois, ces origines dépendent de la stimulation appliquée : elles ne sont pas les mêmes dans le cas d'une injection de LPS (Sabatel et al., 2017).

### 3.2 Caractéristiques et hétérogénéité

Les deux types de macrophages pulmonaires partagent l'expression de beaucoup de marqueurs, comme F4 /80, MerTK, et CD64. Cependant, on peut les distinguer, en cytométrie en flux, sur base d'autres paramètres : Les MA expriment le SiglecF, CD11c et CD169. Ils sont FSC<sup>high</sup> et hautement auto-fluorescents, ce qui est aussi utile pour les identifier, surtout en conditions basales. Les MI expriment le CD11b et le MHCII. Ils expriment des niveaux variables de CD11c et CD169. On les distingue des monocytes classiques par leur absence de marquage pour Ly6C (Tableau 1) (Gibbins et al., 2017; Misharin et al., 2013; Sabatel et al., 2017).

Chez l'homme, alors que les MA sont facilement récupérés par un lavage broncho-alvéolaire comme chez la souris, l'étude des MI est plus ardue à cause de la difficulté d'accès au tissu. Néanmoins, ils ont été décrits chez l'homme comme HLA-DR<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> CD169<sup>-</sup> (Bharat et al., 2016; Yu et al., 2016) et chez les primates comme HLA-DR<sup>high</sup> CD11b<sup>high</sup> CD163<sup>+</sup> (Cai et al., 2014). Les MA sont quant à eux HLA-DR<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> CD206<sup>high</sup> CD169<sup>+</sup> chez l'homme (Bharat et al., 2016; Yu et al., 2016) et HLA-DR<sup>high</sup> CD11b<sup>int</sup> CD163<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> chez le primate (Cai et al., 2014).

Marqueur	MA	MI	cMo	pMo	DC	Références
CD11b	-	+	+	+	-/+	(Gibbings et al., 2017; Johansson et al., 1997; Misharin et al., 2013; Roy et al., 2003; Sabatel et al., 2017; Schyns et al., 2019; Zaynagetdinov et al., 2013)
CD11c	+	- /low	-	- /low	+	(Bedoret et al., 2009; Bosteels et al., 2020; Johansson et al., 1997; Roy et al., 2003; Sabatel et al., 2017; Zaynagetdinov et al., 2013)
CD169	+	Low	-	-	-	(Gibbings et al., 2017; Sabatel et al., 2017)
CD206	+	Low/+	-/low	-	-/+	(Gibbings et al., 2017; Johansson et al., 1997; Schyns et al., 2019)
CD45	+	+	+	+	+	(Johansson et al., 1997; Sabatel et al., 2017; Zaynagetdinov et al., 2013)
CD64	+	+	-	-	-	(Bosteels et al., 2020; Gibbings et al., 2017; Johansson et al., 1997; Sabatel et al., 2017)
CD86	+	+	low	low	-	(Kawano et al., 2016; Roy et al., 2003; Sabatel et al., 2017)
CX3CR1	-	+	+	+	-/+	(Gibbings et al., 2017; Sabatel et al., 2017; Schyns et al., 2019)
F4/80	+	+	Low/+	+	-/low	(Bedoret et al., 2009; Gibbings et al., 2017; Johansson et al., 1997; Roy et al., 2003; Sabatel et al., 2017)
Ly6C	-	Low	+	Low	-/+	(Johansson et al., 1997; Misharin et al., 2013; Roy et al., 2003; Sabatel et al., 2017)
Lyve-1	-	Low/+	-	-	-	(Chakarov et al., 2019; Gibbings et al., 2017)
MertK	+	+	-	-	-	(Gibbings et al., 2017; Sabatel et al., 2017; Schyns et al., 2019)
MHC-II	Low	Low/+	-	-	+	(Bosteels et al., 2020; Franke-Ullmann et al., 1996; Johansson et al., 1997; Sabatel et al., 2017)
SiglecF	+	-	-	-	-	(Gibbings et al., 2017; Johansson et al., 1997; Misharin et al., 2013; Sabatel et al., 2017)

**Tableau 1. Les marqueurs murins des différentes populations du système phagocytaire mononucléé pulmonaire à l'état basal. Adapté de Liégeois et al., 2018.**

Grâce à l'avènement de nouvelles techniques telles que le *bulk RNA-sequencing* ou le *single cell RNA-sequencing*, plusieurs équipes ont mis en évidence l'hétérogénéité des MI, identifiant deux (Chakarov et al., 2019; Schyns et al., 2019) ou trois (Gibbins et al., 2017) sous-populations. Selon les plus récents papiers, les macrophages CD64<sup>+</sup> du poumon seraient composés de deux sous-populations, distinguables, selon leur expression de différents marqueurs de surface : l'une Lyve1<sup>low</sup> MHCII<sup>high</sup> CD206<sup>low</sup>, l'autre Lyve1<sup>high</sup> MHCII<sup>low</sup> CD206<sup>high</sup>. Ces populations sont non seulement distinguables par leur aspect phénotypique, mais également par leur localisation dans le poumon et par leur fonction. Les Lyve1<sup>low</sup> MHCII<sup>high</sup> CD206<sup>low</sup>, associés aux nerfs et situés dans l'interstitium alvéolaire, joueraient un rôle dans des processus de présentation d'antigène et de régulation des réponses immunitaires. Les MI Lyve1<sup>high</sup> MHCII<sup>low</sup> CD206<sup>high</sup> sont quant à eux décrits comme situés dans l'interstitium péri-bronchique, associés aux vaisseaux sanguins et ont démontré leur importance dans la réparation tissulaire. Ces derniers sont également ceux qui produisent le plus de cytokines, notamment l'IL-10 (Fig. 6) (Chakarov et al., 2019; Schyns et al., 2019).

D'autres équipes, en utilisant principalement des techniques d'imagerie, ont également nommé d'autres sous-populations en se basant sur leur localisation : les NAM (*nerve-associated macrophages*) (Ural et al., 2020) et les BAM (*bronchus-associated macrophages*) (Tang et al., 2022).

Avec la microscopie confocale et un marquage pour CD169 et CD11c, deux populations de macrophages CD169<sup>+</sup> sont identifiées. L'une est CD11c<sup>+</sup>, il s'agit des MA, et l'autre est CD11c<sup>-</sup>, les MI. Cette population est située autour des voies aériennes à proximité des cellules épithéliales. Les auteurs la nomment NAM. Les NAM expriment également F4/80, MerTK et CD64, produisent de l'IL-10, et sont distincts d'une autre population de MI CD11c<sup>+</sup> CD169<sup>-</sup>. Les NAM sont nécessaires pour réguler l'inflammation liée à une infection virale (Ural et al., 2020). Les NAM sont également Lyve1<sup>low</sup> et MHC-II<sup>high</sup>, ce qui indique un recoupement au moins partiel avec la population de MI Lyve1<sup>low</sup> MHCII<sup>high</sup> CD206<sup>low</sup> identifiée par Chakarov *et al.* (Chakarov et al., 2019) et Schyns *et al.* (Schyns et al., 2019).

Les BAM sont situés dans des régions péribronchiques, riches en collagène, aux bifurcations bronchiques et proches de gros vaisseaux sanguins. Ces régions contiennent des MI et des DC à l'état basal. Les auteurs ont pour cela utilisé des techniques de microscopie bi-photonique et des souris transgéniques rapportrices : Cx3cr1-GFP pour les MI, qu'ils identifient comme CX3CR1-GFP<sup>bright</sup>, les CD11c-YFP pour les DC qu'ils identifient comme CD11c-YFP<sup>bright</sup> et d'autres pour les cellules épithéliales. Ils ont ainsi pu montrer la capture d'antigène inhalé (OVA-FITC) préférentiellement par les MI. Ces MI sont plus efficaces pour capturer les particules solubles de faible taille. Cette identification précaire en microscopie a ensuite été confirmée en cytométrie en flux, en démontrant que les cellules Cx3cr1-GFP<sup>bright</sup> OVA<sup>bright</sup> étaient également majoritairement MHC-II<sup>hi</sup> CD11c<sup>mid</sup> CD64<sup>+</sup> MerTK<sup>+</sup> CD24<sup>-</sup>, et représentent les MI qu'ils dénomment BAM. Les cellules CD11c-YFP<sup>bright</sup> étaient CD11c<sup>mid-hi</sup> MHC-II<sup>hi</sup> CD24<sup>+</sup> CD64<sup>-</sup> MerTK<sup>-</sup> et sont assimilées aux cDC2 (Tang et al., 2022).

### 3.3 Les fonctions régulatrices innées

La plupart des études portant sur l'immunorégulation des MA utilisent des systèmes de déplétion qui sont transitoires et non spécifiques avec des liposomes contenant du chlodronate, qui, phagocytés par les MA, induisent l'apoptose de la cellule. Dans ces expériences, après déplétion, on observe une inflammation pulmonaire plus importante. Les

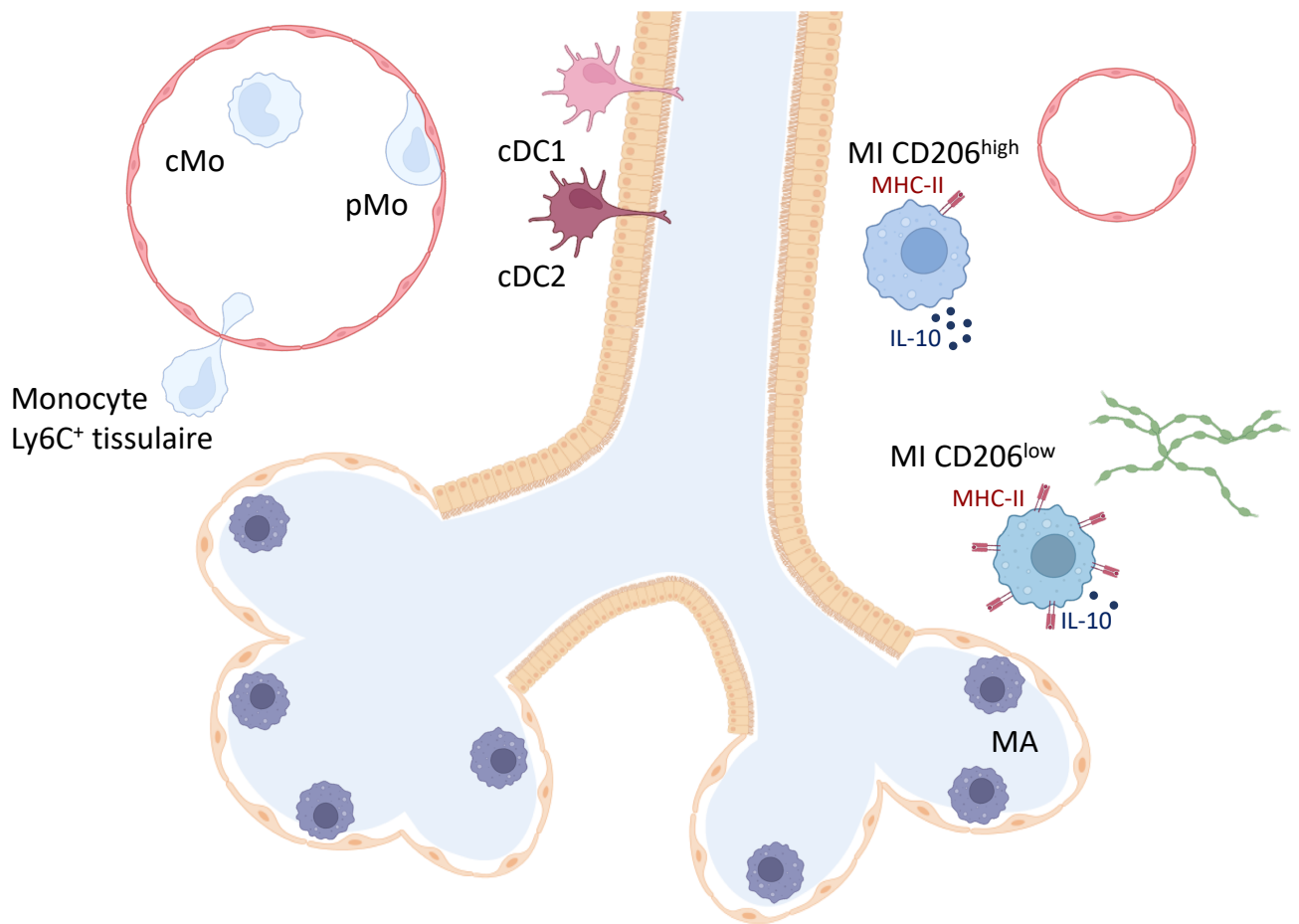


Figure 6. Résumé graphique des différentes populations du système phagocytaire mononucléé pulmonaire et de leur hétérogénéité à l'état basal.

MA sont capables de prévenir des réponses immunes aberrantes dans de nombreux modèles de sensibilisation allergique (Bang et al., 2011; Mathie et al., 2015; Thepen et al., 1989; Valstar et al., 2006; Zastona et al., 2014), et leur transfert, si ils ne sont pas sensibilisés, permet la réduction de cette inflammation (Bang et al., 2011).

Les MA, isolés par lavage broncho-alvéolaires, ont été identifiés chez des rats comme immunosuppresseurs. En effet, leur coculture avec des DC ralentit la maturation de celles-ci, réduisant leur expression de MHC-II et leur capacités à induire une MLR. Cette inhibition des MA sur les DC est médiée via une molécule soluble, car les cultures sont réalisées avec une membrane semi-perméable (Holt et al., 1993). Cette inhibition est potentialisée par l'ajout de TNF- $\alpha$  (Holt et al., 1993), et abolie par le blocage de la voie de synthèse de l'oxyde nitrique ou par la stimulation des macrophages au LPS ou au GM-CSF (Bilyk & Holt, 1993; Holt et al., 1993).

Depuis leur caractérisation en 2009, les MI sont décrits comme immunosuppresseurs. En effet, produisant de grandes quantités d'IL-10, ils sont capables d'empêcher les BMDC (*bone marrow-derived dendritic cells*) de mûrir, de migrer vers le ganglion lymphatique lorsque transférées dans des souris receveuses, et d'y induire une immunité de type 2 (Bedoret et al., 2009). Ils sont également capables de réduire la réponse Th17, car leur transplantation parvient à diminuer l'inflammation neutrophilique induite dans un modèle d'asthme neutrophilique au HDM (Kawano et al., 2016).

La production d'IL-10 par les MI est potentialisée lors d'une exposition au HDM, LPS, CpG-DNA, à la flagellin et au FSL1 (Kawano et al., 2016; Sabatel et al., 2017). Le CpG-DNA est l'agent le plus efficace, et il induit également l'augmentation importante du nombre de MI, ceux-ci étant capables d'induire une protection lors d'un modèle d'asthme expérimental aux hautes doses de HDM (Sabatel et al., 2017). Cette augmentation de la production d'IL-10 fait intervenir la voie Myd88/Hif1 $\alpha$  et le récepteur plexinD1 (Aktar et al., 2022; Toussaint et al., 2013).

### 3.4 Les macrophages et le système immunitaire adaptatif

Après la découverte des DC en 1973 par Steinman et Cohn, l'étude de leurs capacités motrices et de leur capacité à induire une prolifération de cellules de rate, les DC sont considérées comme les APC majeures et la capacité des macrophages à induire une réponse immunitaire est déconsidérée (Steinman & Cohn, 1973; Steinman & Witmer, 1978).

Cependant, les MA peuvent avoir un impact direct sur le système immunitaire adaptatif, via la sécrétion de facteurs solubles. Ils peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T chez la souris, le rat et l'homme, en induisant une anergie des cellules T : ceux-ci sont incapables de répondre au stimuli par l'IL-2. Cette anergie peut être bloquée par l'ajout d'un inhibiteur de la voie de synthèse de l'oxyde nitrique (Strickland et al., 1996; Upham et al., 1995).

En 2013, Pejman Soorosh et collègues caractérisent des macrophages « tissulaires résidents du poumon » comme ayant la capacité à stimuler la différenciation des LT naïfs en Treg Foxp3<sup>+</sup> lorsque co-cultivés. Cette induction est dépendante de la présence de l'acide rétinoïque et de TGF $\beta$ . Lorsque ces macrophages sont réinjectés après avoir été exposés à l'antigène, ils sont capables d'établir une tolérance, via l'induction de Treg, et d'empêcher l'inflammation induite par des administrations successives de cet antigène (Soorosh et al., 2013). Il est à noter que ces macrophages tissulaires sont identifiés comme CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, hautement auto-fluorescents, MHC-II<sup>low</sup>, F4/80<sup>+</sup> et SiglecF<sup>+</sup>. Malgré les lavages extensifs

décrits afin d'éliminer les MA, il semblerait qu'une partie non-négligeable des macrophages tissulaires décrits soient, en fait, des MA résiduels, contaminés probablement par des MI CD11c<sup>+</sup>.

Ceci est cohérent avec l'étude de Coleman *et al.*, qui remarque que les MA ont la capacité d'induire Foxp3 chez des lymphocytes T naïfs. Cette induction n'est pas dépendante d'une présentation d'antigène puisque le surnageant de culture des MA suffit à également induire Foxp3. Cette induction peut être inhibée grâce à l'ajout d'un inhibiteur de l'acide rétinoïque, de son récepteur ou d'un inhibiteur de la voie de TFG-β1 (Coleman *et al.*, 2013).

Les MI, eux, expriment le MHC-II et sont capables de phagocyter des corps étrangers provenant de la circulation ou des voies aériennes (Bedoret *et al.*, 2009; Chakarov *et al.*, 2019; Gibbings *et al.*, 2017; Sabatel *et al.*, 2017; Schyns *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2022). Ils pourraient donc être capables d'effectuer une présentation d'antigène au même titre que les DC. L'analyse transcriptomique des sous-populations de MI a d'ailleurs mis en évidence l'implication probable des MI Lyve1<sup>low</sup> MHC-II<sup>high</sup> CD206<sup>low</sup> dans des processus de présentation d'antigène (Chakarov *et al.*, 2019; Schyns *et al.*, 2019).

Les BAM, décrits par Tang *et al.*, sont capables de phagocyter et de présenter un antigène, et expriment également les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86. Comme montré dans des expériences de co-cultures, ils sont capables d'activer la prolifération de LT, certes dans une moindre mesure que les cDC2. *In vivo*, ils montrent l'interaction entre ces BAM et des LT OTII transférés après stimulation et restimulés à l'ovalbumine. Les BAM sont en contact rapprochés avec les DC, via le CD169, et l'hypothèse est avancée qu'ils pourraient leur transmettre l'antigène ou le complexe peptide-MHC-II. Les BAM n'expriment pas le CCR7 et ne migrent pas, même après stimuli, au contraire des cDC2 (Tang *et al.*, 2022).

Bien que ces études suggèrent que les MI seraient capables d'effectuer une présentation d'antigène, aucune ne s'est, à notre connaissance, focalisée sur l'examen systématique de ce potentiel.

# Objectifs

Les cellules présentatrices d'antigènes ont la capacité de capturer les antigènes présents dans le milieu extracellulaire, de les dégrader afin de présenter un peptide antigénique sur leur MHC-II à la surface cellulaire. Elles peuvent ensuite rencontrer un lymphocyte T dont le TCR est spécifique de ce peptide antigénique et ainsi déclencher une réponse immunitaire adaptative.

Dans le poumon, les cellules dendritiques ont longtemps été considérées comme les cellules présentatrices d'antigène par excellence. Cependant, récemment, certaines études ont révélé un potentiel des macrophages interstitiels pour la présentation d'antigène. En effet, ils expriment le MHC-II et sont capables de phagocyter des antigènes provenant de la circulation sanguine ou des voies aériennes. Certaines analyses transcriptomiques ont identifié des sets de gènes impliqués dans la présentation d'antigène chez les MI. Une étude majoritairement basée sur des techniques d'imagerie, met en évidence la communication de cellules apparentées aux MI, les BAM, avec des lymphocytes T transférés.

Cependant, à ce jour, aucune étude ne s'est focalisée sur la capacité de présentation d'antigène par les MI.

L'objectif de ce travail est d'investiguer systématiquement la capacité de présentation d'antigène par les MI, en les comparant aux DC (connues pour être spécialisées dans la présentation antigénique) et aux MA (réputées être incapables de présenter les antigènes).

Pour cela, nous commencerons par comparer dans ces cellules l'expression de MHC-II ainsi que de la machinerie associée à la présentation d'antigène. Ensuite, dans des systèmes de coculture, nous évaluerons la capacité des DC et macrophages pulmonaires à induire la prolifération de lymphocytes T naïfs. Nous quantifierons l'induction de Treg Foxp3<sup>+</sup> suite à l'interaction avec les MI, MA ou DC avant d'évaluer leur potentiel à capturer un antigène *in vivo* pour induire une prolifération de LT *ex vivo*. Nous examinerons le potentiel migratoire des MI. Nous visualiserons les interactions entre MI et LT *in vivo*. Finalement, nous générerons un modèle transgénique murin nous permettant d'étudier les conséquences d'une délétion partielle en MHC-II sur les MI dans un modèle d'asthme expérimental.



# Section expérimentale

## Matériel et Méthodes

## 1. Animaux expérimentaux

Les souris sauvages C57BL/6J ont été achetées chez Charles River. Les souris *IL-10<sup>-/-</sup>* (B6.129P2-IL-10tm1Cgn/J), OTII (B6.Cg Tg(TcraTcrb)425Cbn/J), *Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup>* (B6.129P-Cx3cr1tm1Litt/J), *Cx3cr1<sup>CreERT2</sup>* (B6.129P2(C)-Cx3cr1tm2.1(cre/ERT2)Jung/J) et *MHC-II<sup>lox</sup>* (B6.129X1-H2-Ab1b-tm1Koni/J) ont été achetées chez Jackson Laboratory. Les souris *Cx3cr1<sup>CreERT2</sup>* et *MHC-II<sup>lox</sup>* ont été croisées par nos soins afin d'obtenir des souris *Cx3cr1<sup>CreERT2/+</sup>* *MHC-II<sup>lox/lox</sup>* et des contrôles *Cx3cr1<sup>+/+</sup>* *MHC-II<sup>lox/lox</sup>* au sein des mêmes portées.

Les souris ont été hébergées et reproduites dans les locaux SPF du GIGA (Université de Liège, Belgique), maintenues dans un cycle de 12h jour/nuite avec de la nourriture et de l'eau accessibles à volonté. Les souris mâles et femelles ont été utilisées entre 7 et 11 semaines de vie. Les animaux et les procédures expérimentales ont été revues et validées par le Comité d'Éthique de l'Université de Liège.

## 2. Réactifs et anticorps

L'ovalbumine et les LPS viennent de Sigma. L'OVA-FITC de Davids biotechnologies. Les anticorps et autres réactifs sont présentés dans la table ci-dessous :

<b>Anticorps de cytométrie en flux</b>		
PE-Cy7 rat anti-CD11b, clone M1/70	BD Pharmingen	561098
APC-Cy7 Hamster anti-mouse CD11c, clone HL3	BD Pharmingen	561241
BUV395 Hamster anti-mouse CD11c, cloneHL3	BD Horizon	564080
APC anti-mouse CD172a, clone P84	Biologend	144013
PE rat anti-mouse CD19, clone 1D3	BD Pharmingen	553786
BV786 rat anti-mouse CD26, clone H194-112	BD Optibuild	740868
PE Hamster anti-mouse CD3, clone 145-2C11	BD Pharmingen	553064
PerCP-Cy5.5 rat anti-mouse CD4, clone RM4-5	BD Pharmingen	550954
V500 Mouse anti-mouse CD45.2, clone 104	BD Horizon	562130
BV421 anti-mouse CD64, clone X54-5/7.1	Biologend	139309
CellTrace Yellow Cell proliferation kit	Invitrogen	C34573
BV605 anti-mouse F4/80, clone BM8	Biologend	123133
PE anti-mouse F4/80, clone BM8	eBioscience	12-4801-82
PE rat anti-Foxp3, clone FJK-16s	eBioscience	12-5773-82
APC rat anti-mouse Ly6C, clone AL21	BD Pharmingen	560595
FITC rat anti-mouse Ly6C, clone AL21	BD Pharmingen	553104
PE-CF594 Ra t anti-mouse Ly6C, clone AL21	BD Horizon	562728
PE Rat anti-Mouse Ly6G, clone 1A8	BD Pharmingen	551461
PE-Cy7 anti-mouse FcεR1a, clone MAR-1	Biologend	134317
APC Mouse anti-mouse I-A(b), clone AF6-120.1	BD Pharmingen	562823
FITC anti-mouse I-A(b), clone AF6-120.1	BD Pharmingen	562011
PerCP-Cy5.5 anti-mouse I-A/I-E, clone M5/114.15.2	Biologend	107626

PE Mouse anti-mouse NK1.1, clone PK136	BD Pharmingen	553165
PE rat anti-mouse Siglec-F, clone E50-2440	BD Pharmingen	552126
Fixable viability dye ef660	eBioscience	65-0864-14
APC-Cy7 anti mouse/rat XCR1, clone ZET	Biologend	148223
<b>Anticorps pour la microscopie confocale</b>		
rat anti-mouse MHC-II	Invitrogen	14-5321-85
rabbit anti-mouse CD4	Sino biological	50134-R711
Goat anti rabbit IgG AF555	invitrogen	A21429
Goat anti rat IgG AF647	Invitrogen	A21247
anti-GFP rabbit AF488	Invitrogen	A21311
<b>Anticorps utilisés en culture</b>		
purified monoclonal IgG anti-TGF-B(1,2,3), clone 1D1	RandD systems	MAB 1835
anti-mouse CD3e purified, clone 145-2C11	ebioscience	14-0031-85
anti-mouse CD28 purified, clone 37.51	eBioscience	14-0281-85
Purified NA/LE rat anti-mouse IL-10	BD Bioscience	554463
LEAF purified anti-mouse I-A / I-E, clone M5/114.15.2	Biologend	107610
<b>Anticorps isotypes contrôles</b>		
IgG2a-FITC, isotype control	Sigma	F6522
IgG1 isotype control, clone 11711	RandD systems	MAB002
Purified NA:LE Rat IgG2b,k isotype control	BDbioscience	556968
LEAF Purified Rat IgG2b,k isotype cntrol, clone RTK4530	Biologend	400622

**Tableau 2 .** Tableau recensant les anticorps utilisés en cytométrie en flux, en microscopie confocale, en culture et leurs isotypes contrôles.

### 3. Analyses scRNAseq

Les données de séquençage ARN unicellulaire (scRNAseq) sur les macrophages interstitiels ont été précédemment publiées (Schyns et al., 2019). Les données du scRNAseq sur les cellules dendritiques ont été précédemment publiées (Bosteels et al., 2020) et téléchargées en utilisant un outil fourni par les auteurs (<http://bioit2.irc.ugent.be/cdc2/>). Les matrices filtrées contenant les identifiants et les annotations ont été utilisées pour construire un objet Seurat. Le contrôle qualité a été réalisé en filtrant les cellules avec moins de 200 gènes détectés, les gènes détectés dans moins de trois cellules et les cellules avec plus de 5% de gènes mitochondriaux. Les comptes pour chaque gène ont été normalisés avec la fonction NormalizeData (Seurat) avec un facteur d'échelle de 10 000 et une transformation logarithmique. Deux mille gènes hautement variables ont été identifiés avec la méthode 'VST'. La réduction linéaire dimensionnelle a été réalisée par une analyse du composant principal (PCA) sur les données à l'échelle en utilisant la fonction RunPCA (Seurat). Les cellules ont été distribuées en clusters avec la fonction FindClusters (Seurat) avec une résolution de 0.5. Pour visualiser les données, une réduction dimensionnelle non-linéaire a été utilisée, et une UMAP a été créée en utilisant la fonction RunUMAP (Seurat), avec le nombre de dimensions à utiliser

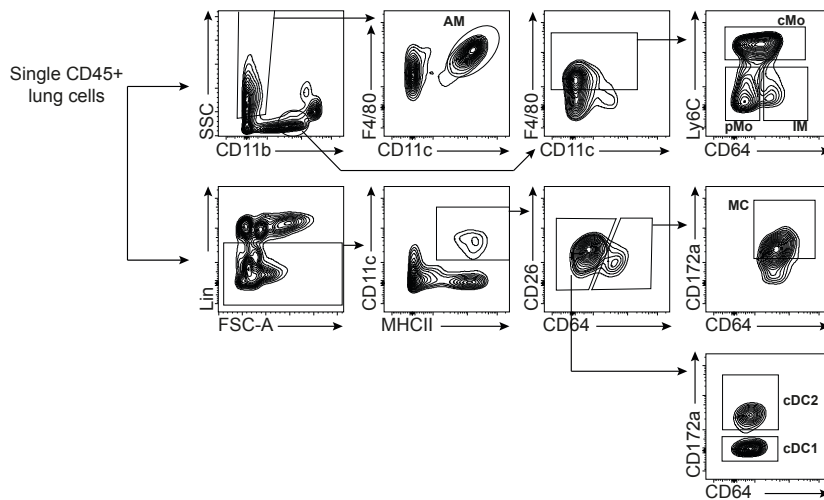


Figure 7. Stratégie de sélection pour identifier les MA, cMo, pMo, MI, cDC1 et cDC2 en cytométrie en flux.

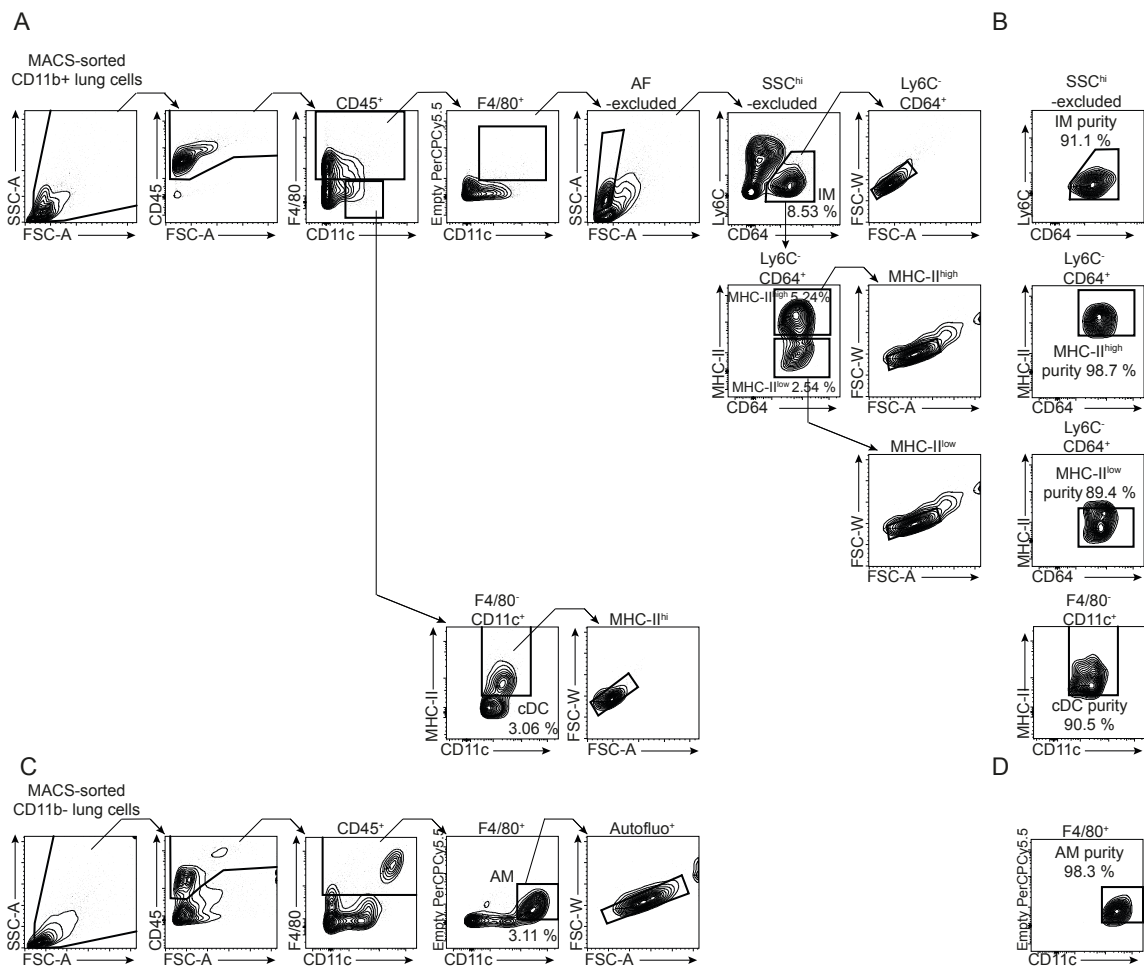


Figure 8. Stratégie de sélection pour identifier et trier les MI, MI MHC-II<sup>high</sup>, MI MHC-II<sup>low</sup>, cDC (A) et les MA (C). Pureté du tri pour les populations précédemment citées (B et D)

fixé sur les 10 premiers composants principaux. Les clusters ont été annotés sur base de leur expression de gènes marqueurs décrits par Bosteels *et al.*

La signature génique spécifique des MI a été établie en utilisant les données de scRNAseq publiées précédemment (Schyns *et al.*, 2019), en comparant les MI à tous les autres types cellulaires en utilisant la fonction FindMarker (Seurat). Les gènes avec  $|\log \text{fold change}| > 1$  et positivement régulés ont été inclus dans la signature MI. Les signatures ont été ensuite utilisées pour calculer le score pour chaque cellule avec la fonction AddModuleScore (Seurat). Les scores ont été incorporés dans l'objet Seurat et visualisés avec le package Seurat.

Les gènes différentiellement exprimés ont été calculés avec la fonction FindAllMarkers (Seurat).

#### 4. Isolement et marquage des cellules : cytométrie en flux

Pour pouvoir étudier les différentes cellules du système phagocytaire mononucléé pulmonaire, nous avons traité les poumons ou ganglions murins afin d'obtenir une suspension unicellulaire, que nous avons analysé ou trié ensuite grâce à la cytométrie en flux.

Brièvement, les poumons ont été rincés extensivement avec du PBS via le ventricule droit. Les poumons ont ensuite été hachés et digérés pendant 1h à 37°C dans du HBSS contenant 5% v/v of FBS (Gibco), 1 mg/ml collagenase A (Sigma) and 0.05 mg/ml DNase I (Roche). La digestion a été stoppée avec du PBS froid contenant 10mM d'EDTA. La suspension a ensuite été enrichie en cellules mononucléées grâce à un gradient de densité (Percoll de Cytiva) : les cellules de l'interface 1.080:1.038 g/ml ont été récupérées. Les ganglions ont été digérés dans 1ml du même milieu de digestion pendant 15min à 37°C. Ils ont ensuite été écrasés et la digestion a été arrêtée avec du PBS-EDTA. Les marquages ont été réalisés à 4°C dans du milieu FACS (PBS avec 2.5 mg/ml de BSA). Les phénotypages ont été réalisés sur le FACSLSRFortessa (BD Biosciences).

Nous avons identifié les macrophages et cellules dendritiques pulmonaires sur base de la stratégie présentée en figure 7. Celle-ci a été élaborée sur base des stratégies de Sabatel *et al* et Bosteels *et al* (Bosteels *et al.*, 2020; Sabatel *et al.*, 2017). Les cellules CD45<sup>+</sup> qui ne sont pas en doublet ont été différenciées sur base de leur granulosité et de leur expression du CD11b. Les cellules CD11b négatives et fortement granuleuses, qui sont aussi F4/80 et CD11c positives, ont été identifiées comme macrophages alvéolaires. Les cellules CD11b positives faiblement granuleuses ont été sélectionnées. Parmi celles-ci, les cellules F4/80 positives pouvaient être discriminées avec le Ly6C et le CD64 en monocytes classiques (Ly6C<sup>+</sup> CD64<sup>-int</sup>) monocytes patrouilleurs (Ly6C<sup>-</sup> CD64<sup>-</sup>) et macrophage interstitiels (Ly6C<sup>-</sup> CD64<sup>+</sup>). Pour mettre en évidence les DC, après sélection des cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> seules, les cellules négatives pour des marqueurs de lignées ont été sélectionnées : on éliminait ainsi les macrophages alvéolaires (SiglecF<sup>+</sup>), les lymphocytes T (CD3<sup>+</sup>), les lymphocytes B (CD19<sup>+</sup>), les neutrophiles (Ly6G<sup>+</sup>) et les cellules NK (NK1.1<sup>+</sup>). Ensuite, les cellules CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> étaient différenciées selon le CD26 et CD64 : les CD26<sup>-</sup> CD64<sup>+</sup> étaient également CD172a<sup>+</sup> en grande majorité et ont été identifiées comme MC (monocyte-derived cell). Ils contiennent la fraction CD11c<sup>+</sup> des MI. Les CD26<sup>int/+</sup> CD64<sup>-</sup> se distinguent avec le CD172a en cDC1 CD172a<sup>-</sup> et cDC2 CD172a<sup>+</sup>.

Pour le tri cellulaire, la suspension a été enrichie avec un tri magnétique (MACS) sélectionnant les cellules CD11b positives grâce à des microbilles anti-souris CD11b (Miltenyi Biotec), et ce à la place du gradient de densité. La fraction négative du tri magnétique est

également récupérée et marquée pour trier les MA. Les tris ont été réalisés sur des FACSAriaIII (BD Biosciences) avec le nozzle 85.

En figure 8, la stratégie de tri est représentée : les MI ont été triés comme CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> AF<sup>-</sup> SSC<sup>low</sup> Ly6C<sup>-</sup> CD64<sup>+</sup>, distingués ou non selon leur expression du MHCII. Les DC étaient CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> et les macrophages alvéolaires CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> AF<sup>+</sup>.

Les résultats ont été analysés avec FlowJo V10 (Tree Star Inc.)

## 5. Expériences de cocultures

Les MA, MI et DC ont été triés de poumons de souris sauvages ou *IL-10*<sup>-/-</sup>, comme décrit ci-dessus.

Pour obtenir les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, les ganglions et rates de souris OT-II ont été écrasés avec le piston d'une seringue dans 1mL de PBS-EDTA. Les cellules d'intérêt ont été isolées par tri magnétique sur colonne LS, après marquage avec le *naïve CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit* (Miltenyi Biotec).

Pour les expériences de prolifération, les cellules T enrichies ont ensuite été marquées avec le *Cell Tracer Yellow* (CTY – Invitrogen) comme précédemment décrit (Quah et al., 2007). Les cellules ont été cultivées dans des plaques 96 puits à fond rond avec du milieu RPMI avec L-Glutamine (Lonza) complété avec 10 % FBS (Gibco), 50 U/mL pénicilline/streptomycine (Gibco), 1 % MEM non-essentielle amino acids (Gibco), 1 mM sodium pyruvate (GE Healthcare) et 0.05 mM 2-mercaptoéthanol (Gibco) ; et ce à un ratio de 1 APC pour 2 LT et pendant trois jours.

Pour les expériences analysant l'orientation des LT, les APC ont été mises en culture avec l'ovalbumine et les lymphocytes ont été ajoutés le jour suivant. L'expression de Foxp3 a été analysée après 5 jours avec le Foxp3/Transcription factor staining buffer set (Invitrogen). Dans certaines expériences, nous avons ajouté de l'OVA (125 µg/mL), des anticorps MHC-II Ab ou son isotype contrôle (20µg/mL), Tgfβ Ab ou son isotype contrôle (1 µg/mL), IL-10 Ab ou son isotype contrôle (1 µg/mL) ou du TGFβ1 recombinant (rTGFβ1) (1ng/mL).

## 6. Expériences d'imagerie tissulaire

### *Traitement et marquage*

Les poumons de souris *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> ont été perfusés avec 10ml de PBS et infusés *via* la trachée avec de la PAF 4%. Les poumons récoltés ont ensuite été incubés dans de la PAF 4% pendant 4h à 4°C et puis dans une solution de sucrose à 30% pendant 12h. Ils ont été inclus et congelés dans de l'*OCT compound* (Q Path Freeze gel, VWR) et coupés en cryosections de 7µm, avant d'être stockés à -80°C.

Les lames ont été dégelées et fixées 10min dans de la PAF 4% à température ambiante, puis perméabilisées avec du Triton-X100 0.5% v/v (Acros Organics) pendant 2 min, puis bloquées avec du PBS contenant 12% de BSA (Sigma), 0.5% de Triton-X100, 4% de goat serum (Sigma) and 4% de donkey serum (Sigma) pendant 1 h.

Premièrement, les lames ont été marquées avec un rat anti-mouse MHC-II de Invitrogen (dilution 1:500) et un rabbit anti-mouse CD4 de Sino Biological (dilution 1:100) pendant 12h à 4 °C. Deuxièmement, elles ont été marquées avec un goat anti-rat AF647 (Invitrogen) (dilution 1:500) et un goat anti-rabbit AF555 (Invitrogen, dilution 1:250) pendant

1h à température ambiante. Troisièmement, elles ont été marquées avec un anti-GFP rabbit AF488 de Invitrogen (dilution 1:200) et les noyaux ont été marqués avec du 4,6- diamidino-2-phenylindole (DAPI, Biolegend) pendant 1h à température ambiante. Les lames ont été montées avec du Prolong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher) et stockées pendant au moins 5h à température ambiante. Les échantillons ont été rincés trois fois avec du PBS entre chacune des étapes mentionnées ci-dessus. Les marquages ont été réalisés dans une solution contenant du PBS-BSA 1%, du Triton-X100 0.4%, et du goat et donkey serum à 3,5% chacun.

### *Acquisition et analyse d'image*

Les images ont été acquises sur un microscope confocal inversé Leica Stellaris 8, en mode confocal, équipé avec un objectif à huile Plan-Apochromat 40x/1.3. Les paramètres d'acquisition ont été réglés comme tel : DAPI a été imagé avec un laser 405 nm à puissance 10.8%, l'AOBS (*Acousto-Optical Beam Splitter*) réglé à 425 nm - 487 nm, et le gain à 52; le CX3CR1 AF488 a été imagé avec un laser 499 nm laser à puissance 2.7%, l'AOBS réglé à 504 nm - 556 nm, et le gain à 34.2; le CD4 AF555 a été imagé avec un laser 553 nm à puissance 2.94%, l'AOBS réglé à 565 nm - 635 nm; et le MHCII AF647 a été imagé avec un laser 653 nm à puissance 2.87%, l'AOBS réglé à 658 nm - 834 nm, et le gain à 3.7. Chaque tuile a été acquise sur 512 x 512 pixels, ce qui correspond à 184.52  $\mu\text{m}$  x 184.52  $\mu\text{m}$ , à une vitesse de 400 Hz. Nous avons réalisé de la 3D, avec des images tous les 1  $\mu\text{m}$ , et scanné une grande zone du tissu pour couvrir un plus grand volume tissulaire. Les images acquises sont collées ensemble et sauvées au format .lif.

Après importation des images dans Imaris 9.5, nous avons réalisé une segmentation cellulaire en utilisant les outils surface et spot du logiciel. En utilisant les marqueurs spécifiques exprimés par les cellules, nous avons pu les identifier et les classifier. Nous avons alors utilisé la fonction de mesure de distance d'Imaris pour calculer la distance intercellulaire minimum entre deux cellules de type cellulaire différents. Nous avons ainsi obtenu la distance en  $\mu\text{m}$  pour chaque paire de cellule. Toutes les analyses faites avec Imaris ont été faites en groupe, en utilisant le même algorithme pour chaque image.

## 7. Administration d'antigène et induction d'asthme expérimental *in vivo*

Les souris légèrement anesthésiées à l'isoflurane ont reçu par voie intratrachéale de l'OVA, de l'OVA-FITC et éventuellement du LPS, ou du HDM, dans un volume de 50  $\mu\text{L}$ .

Pour l'induction d'asthme expérimental, des injections répétées d'OVA, d'HDM ou de PBS ont été administrées telles que dans les chronologies présentées.

Pour recenser les cellules présentes dans la lumière pulmonaire, nous avons procédé à un lavage broncho-alvéolaire. Un millilitre, puis successivement deux fois 0,5 mL de PBS ont été injectés dans les poumons via un cathéter placé dans la trachée. Les cellules ont ensuite été comptées à la lame de Thoma et étalées sur lame grâce à un cytopspin. Ces cellules ont ensuite été colorées avec une coloration hématoxiline-éosine (Merck) avant d'être dénombrées.

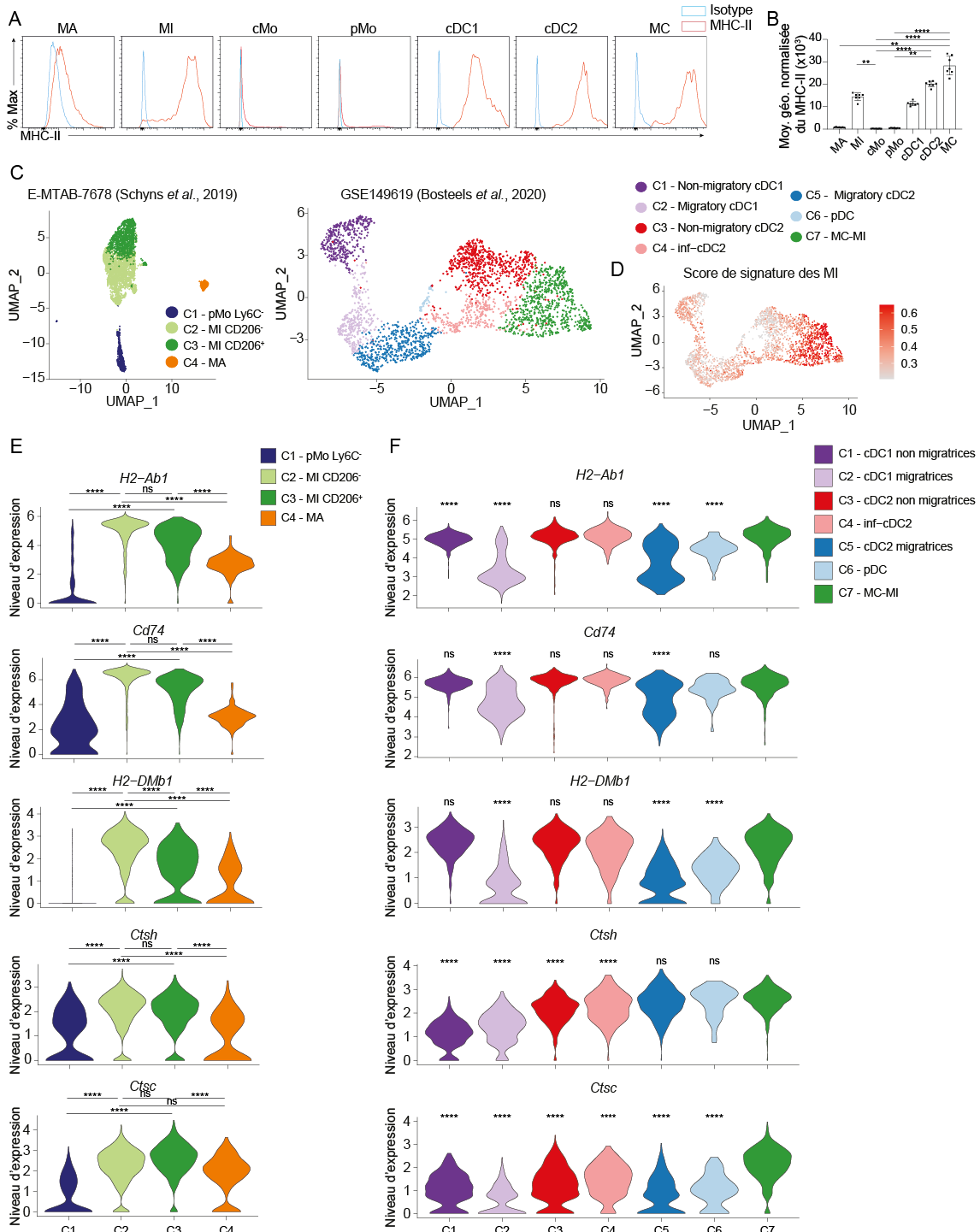
## 8. Analyses statistiques

Les données des expériences indépendantes ont été compilées pour être analysées, sauf contrairement indiqué. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 7 (GraphPad). Les données sont présentées comme la moyenne  $\pm$  S.D., ainsi que les données individuelles, sauf contrairement indiqué. Nous avons considéré une valeur P plus basse que 0.05 comme significative. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns, non significative. Les détails des tests statistiques utilisés sont décrits dans la légende de chaque figure.



# Section expérimentale

## Résultats



**Figure 9. Les MI expriment MHC-II et les gènes qui lui sont associés.** **A.** Histogrammes représentatifs du phénotypage par cytométrie en flux du MHC-II (rouge) ou de son isotype contrôle (bleu) dans les macrophages alvéolaires (MA), macrophages interstitiels (MI), monocytes classiques et patrouilleurs (cMo et pMo), les cellules dendritiques classiques de type 1 et 2 (cDC1 et cDC2) et les *monocyte-derived cells* (MC). **B.** Quantification de la moyenne géométrique, normalisée avec l'isotype, dans les cellules myéloïdes pulmonaires analysées en A. **C.** Graphes UMAP des données de scRNA-seq analysées à partir de E-MTAB-7678 (gauche) et de GSE149619 (droite). **D.** Score de signature transcriptomique des MI dans les sous-types de DC analysés dans le scRNAseq de Bosteels *et al.* **E.** Expression des gènes indiqués dans les monocytes CD16.2<sup>+</sup>, les MI CD206<sup>+</sup> et CD206<sup>-</sup> et les MA, représenté par les violin plot (la hauteur représente le niveau d'expression et la largeur le nombre de cellules). **F.** Expression des gènes indiqués dans les sous-types de cDC pulmonaires, les DC plasmacytoides (pDC) et les MC.

## 1. Les macrophages interstitiels expriment le MHC-II et la machinerie moléculaire associée

Nous avons analysé l'expression de MHC-II par les cellules du système phagocytaire mononucléé pulmonaire par cytométrie en flux. Nous avons utilisé la stratégie de sélection décrite en figure 7 pour identifier les macrophages alvéolaires, macrophages interstitiels, monocytes classiques et patrouilleurs, les cellules dendritiques classiques type 1 et 2 et les *monocyte-derived cells*. Nous avons normalisé cette expression en utilisant un marquage avec un isotype contrôle. Nous avons soustrait la moyenne géométrique de l'isotype contrôle à la moyenne géométrique du marquage MHC-II. Ceci nous a permis une quantification robuste qui prend en compte le caractère autofluorescent des macrophages pulmonaires. Grâce à cette quantification, nous avons pu observer que les MI exprimaient hautement le MHC-II, comme attendu (Bedoret et al., 2009; Chakarov et al., 2019; Gibbings et al., 2017; Sabatel et al., 2017; Schyngs et al., 2019; Tang et al., 2022), en quantités comparables aux DC, et à des niveaux plus élevés que les MA et les monocytes (Fig. 9A,B)

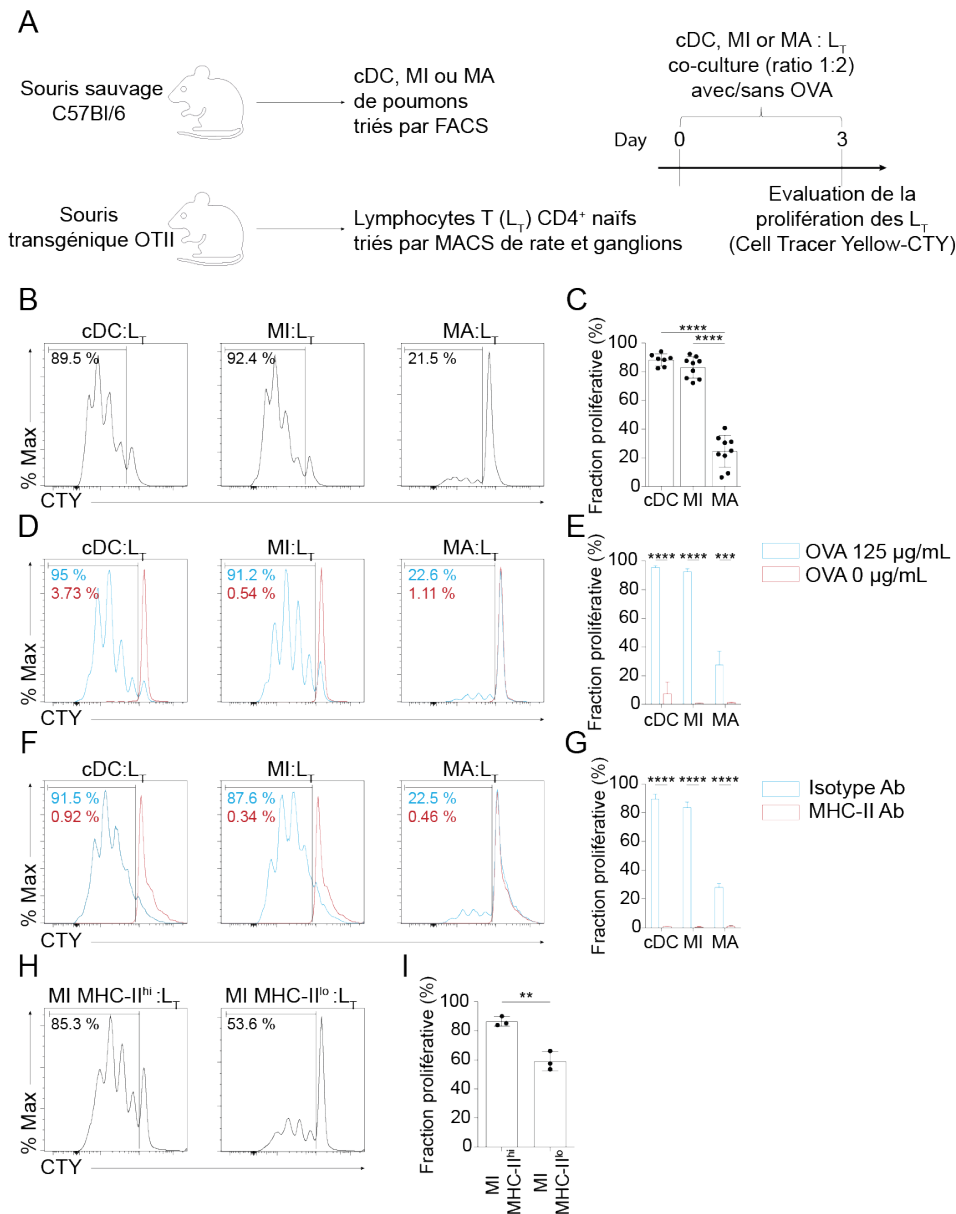
Pour mieux investiguer la capacité de présentation d'antigène des MI, nous avons examiné l'expression de gènes codant pour plusieurs protéines associées à la machinerie du MHC-II : le H-2 class II histocompatibility antigen (*H2-Ab1*), la chaîne g de la molécule chaperonne de MHC-II (*Cd74*), le CLIP *exchanger* H2-DMb1 (*H2-DMb1*) et les cathepsines associées au MHC-II (*Ctsh*, *Ctsc*). Nous avons analysé deux bases de données de scRNAseq, l'une sur les monocytes/macrophages pulmonaires, l'autre sur les DC, dont les données ont été précédemment publiées (Bosteels et al., 2020; Schyngs et al., 2019). Les UMAP et les clusters sont représentés en Figure 9C. Pour vérifier que les cellules identifiées comme MC englobaient bien les MI, nous avons établi une signature transcriptomique pour les MI, et nous l'avons appliquée au données de (Bosteels et al., 2020). Nous avons ainsi pu montrer que le cluster 7, correspondant aux MC, montrait le plus grand score pour cette signature, et nous l'avons donc renommé MC-IM (Fig. 9D).

Les deux sous-types de MI, CD206<sup>+</sup> et CD206<sup>-</sup>, exprimaient de plus hauts niveaux d'ARN pour les gènes *H2-Ab1*, *Cd74*, *H2-DMb1*, *Ctsh* et *Ctsc* que les MA ou les monocytes (Fig. 9E). C'était le cas également pour les MC-MI, en comparaison avec les différents types de DC (Fig. 9F).

Ces résultats nous indiquent que les macrophages interstitiels expriment fortement le MHC-II et possèdent la machinerie adéquate pour présenter des antigènes via le MHC-II.

---

IM, représenté par les violin plot (la hauteur représente le niveau d'expression et la largeur le nombre de cellules). **(B)** Les données représentent la moyenne +/- SD et la mise en commun de deux expériences indépendantes, chaque symbole représente une souris individuelle (n=7). Les valeurs de P sont calculées avec un test de Kruskal-Wallis non paramétrique avec des comparaisons multiples. **(E-F)** Pour comparer les clusters C2-MI CD206<sup>+</sup>, C3- MI CD206<sup>-</sup> et C7 -MC-MI avec les autres groupes, les p-values sont calculées avec un test de Wilcoxon. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; \*\*\*\*, P < 0.0001; ns, non significatif.



**Figure 10. Les MI induisent la prolifération des LT OVA-spécifiques de manière dépendante du MHC-II.** **A.** Plan expérimental. **B.** Histogrammes de cytométrie en flux représentatifs, montrant les signaux CTY des lymphocytes T dans les cocultures avec les cDC, les MI et les MA en présence d'OVA. **C.** Quantification de la fraction proliférative des LT en coculture avec les cDC, MI et MA. **D.** Histogrammes de cytométrie en flux représentatifs, montrant les signaux CTY des lymphocytes T dans les cocultures avec les cDC, les MI et les MA en présence (bleu) ou absence (rouge) d'OVA. **E.** Quantification de la fraction proliférative des LT en coculture avec les cDC, MI et MA en présence (bleu) ou absence (rouge) d'OVA. **F.** Histogrammes de cytométrie en flux représentatifs, montrant les signaux CTY des lymphocytes T dans les cocultures avec les cDC, les MI et les MA en présence d'anticorps anti-MHC-II (rouge) ou de son isotype contrôle (bleu). **G.** Quantification de la fraction proliférative des LT en coculture avec les cDC, MI et MA en présence d'anticorps anti-MHC-II (rouge) ou de son isotype contrôle (bleu). **H.** Histogrammes de cytométrie en flux représentatifs, montrant les signaux CTY des lymphocytes T dans les cocultures avec les MI MHC-II<sup>high</sup> ou les MI MHC-II<sup>low</sup> en présence d'OVA. **I.** Quantification de la fraction proliférative des LT en coculture avec les les MI MHC-II<sup>high</sup> ou les MI MHC-II<sup>low</sup>. **(C-E-G-I)** Les données représentent la moyenne +/- SD et la mise en commun d'au moins trois expériences indépendantes. Chaque valeur individuelle correspond à un réplicat biologique indépendant (n = 7-9 (C) ; n = 3 (E, G, I)). Les valeurs de P ont été calculées avec (C) une analyse de variance à une entrée ou (E,G) une analyse de variance à deux entrées avec un test de Sidak pour les comparaisons multiples ou (I) un test T de student non païré bilatéral. \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; ns, non significatif.

## 2. Les macrophages interstitiels induisent la prolifération de lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> ex vivo

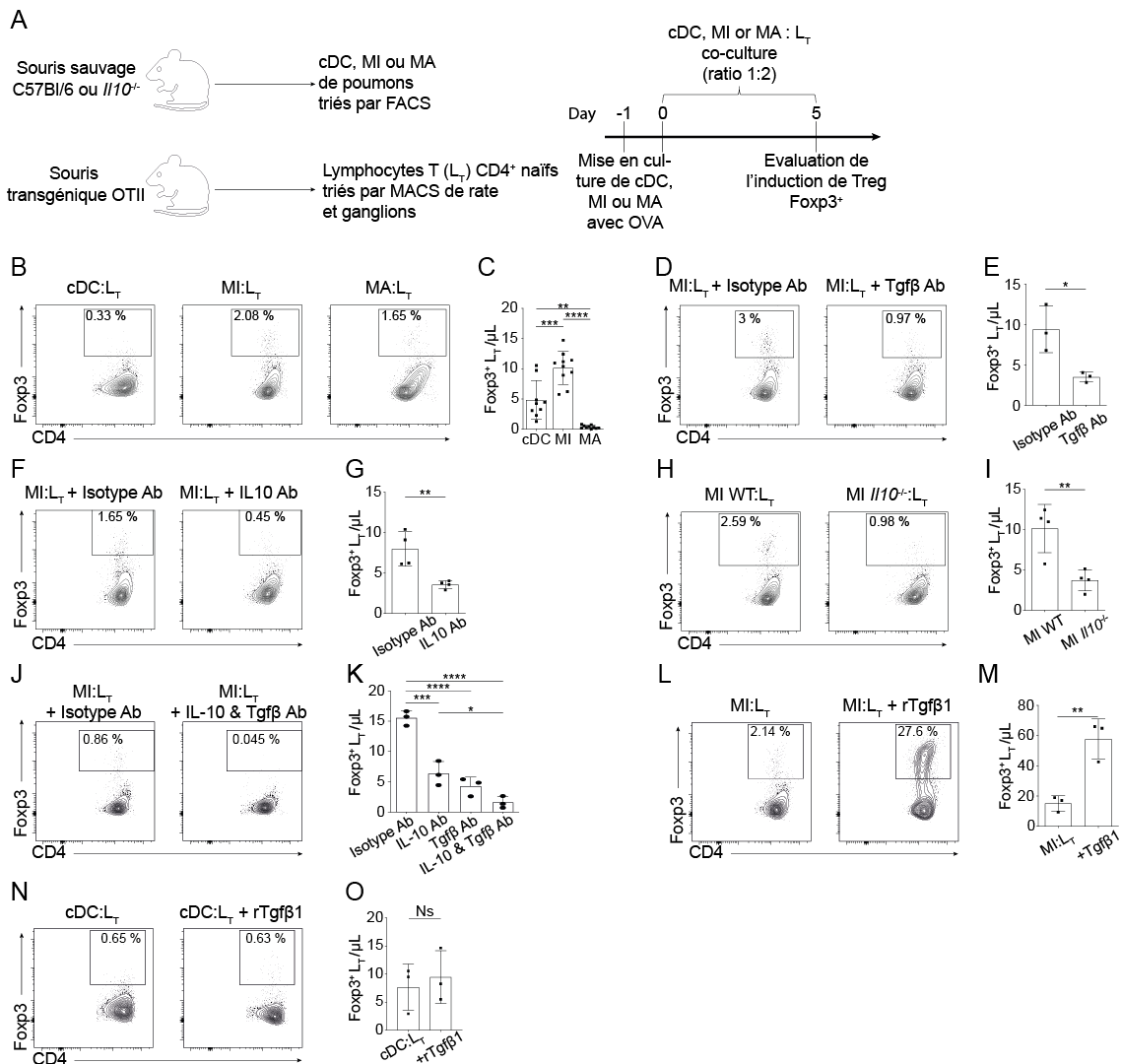
Pour évaluer la capacité des MI à présenter un antigène et à stimuler la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, nous avons mené des expériences de cocultures *ex vivo*. Nous avons trié les cDC, MI et MA de poumons murins, et les avons cultivés avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs provenant de souris transgéniques dites « OTII ». Ces souris sont génétiquement modifiées de telle sorte que tous les lymphocytes possèdent un TCR reconnaissant le peptide de l'ovalbumine présenté dans le contexte du MHCII. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs sont extraits des rates et ganglions et marqués avec un traceur cellulaire, le CTY. Ce fluorochrome se lie de manière covalente aux fonctions amines intracellulaires, et l'intensité de fluorescence d'une cellule marquée diminue par deux lors de sa division. Les APC et les LT sont cocultivées pendant trois jours en présence d'ovalbumine, à la suite de quoi la prolifération des lymphocytes est analysée en observant par cytométrie en flux la dilution du tracer cellulaire (Fig. 10A).

Nous avons pu observer une prolifération des lymphocytes à hauteur de 88, 83 et 25%, lorsque cocultivés respectivement avec les cDC, les MI et les MA. Les MI étaient donc capables d'induire une prolifération aussi efficacement que les cDC, au contraire des MA (Fig. 10B et C).

Pour vérifier que cette induction de prolifération était bien dépendante de la présentation d'un antigène, nous avons réalisé la même expérience de coculture sans ajouter d'ovalbumine. En l'absence d'ovalbumine, l'induction de prolifération était totalement abolie (Fig. 10D et E). Nous avons également ajouté un anticorps se liant au, et bloquant le, MHC-II. Avec cet anticorps, la prolifération était totalement abolie, au contraire de ce qui a été observé dans la culture avec l'isotype contrôle (Fig. 10F et G). Grâce à ces deux expériences, nous avons pu affirmer que les MI et cDC sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs OTII de manière dépendante de la présentation d'antigène.

Nous avons également évalué la capacité de présentation d'antigène des MI MHC-II<sup>high</sup> et MI MHC-II<sup>low</sup>. Les MI MHC-II<sup>high</sup> étaient capables d'induire une prolifération plus importante que les MI MHC-II<sup>low</sup>, bien que ces derniers soient tout de même capables d'induire une prolifération (Fig. 10 H et I).

De ces expériences, nous pouvons conclure que les MI sont capables d'induire une prolifération de LT, avec la même efficacité que les cDC, et que celle-ci est dépendante d'une présentation d'antigène. Cette capacité est plus élevée chez les MI MHC-II<sup>high</sup> par rapport aux MI MHC-II<sup>low</sup>.



### 3. Les macrophages interstitiels induisent la différenciation de lymphocytes Foxp3<sup>+</sup> ex vivo

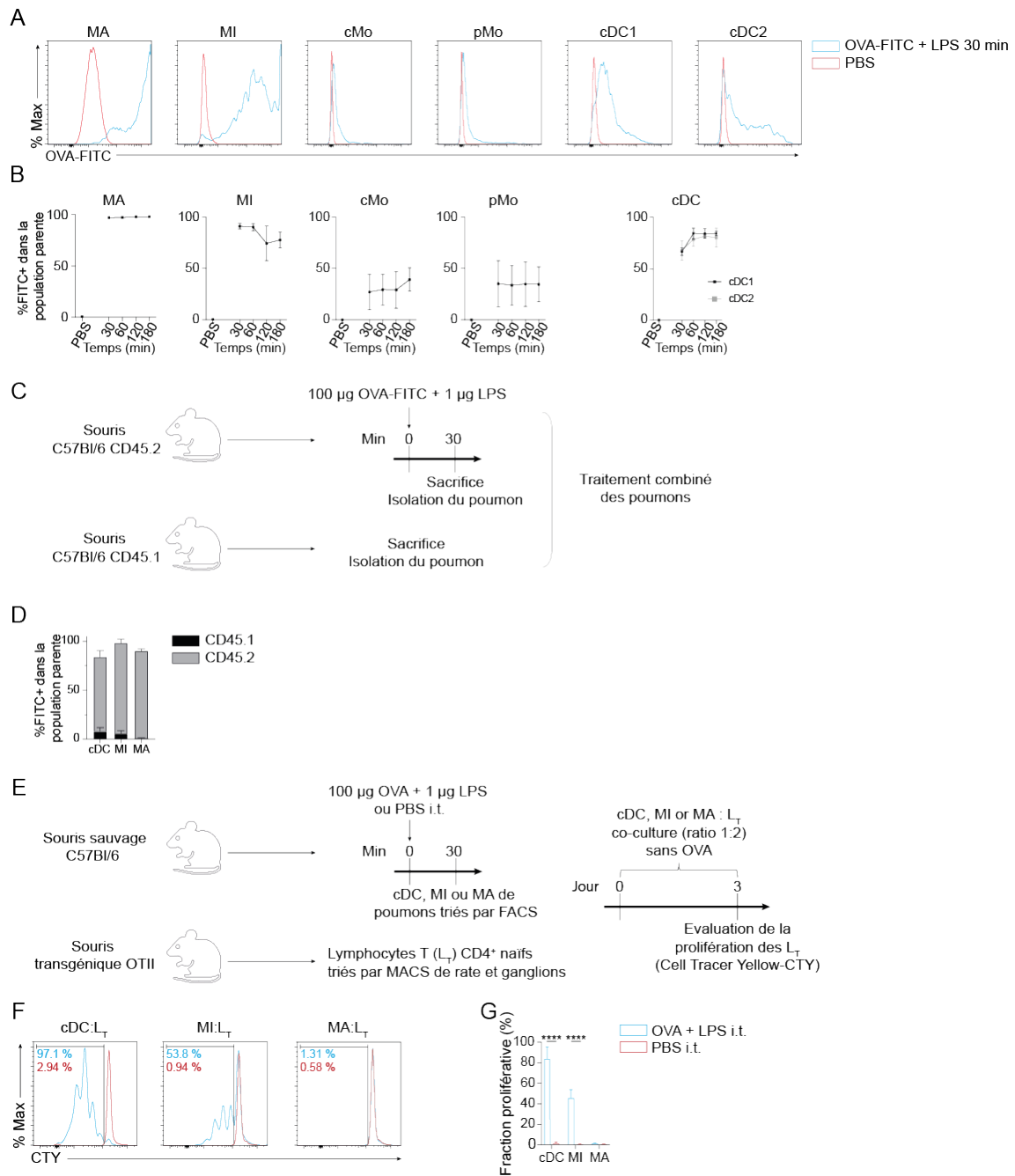
Les MI étant connus pour leurs capacités immunorégulatrices, nous avons voulu déterminer s'ils étaient capables d'induire des lymphocytes T régulateurs Foxp3<sup>+</sup>. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de cocultures dans lesquelles les APC ont été mises en culture et les lymphocytes T ajoutés le lendemain. L'expression de Foxp3 a été analysée cinq jours plus tard (Fig. 11A). Nous avons utilisé une quantification pour représenter les résultats de ces cocultures, afin de de tenir compte de la prolifération induite des LT (Fig. 11).

Nous avons observé que les MI étaient capables d'induire un plus grand nombre de LT Foxp3<sup>+</sup> que les cDC ou les MA (Fig. 11B et C).

Au vu de l'importance du TGFβ et de l'IL-10 dans la génération des Treg (Chaudhry et al., 2011; Huber & Schramm, 2006; Murai et al., 2009), nous avons voulu déterminer l'implication de ces cytokines dans la génération des Treg par les MI. Avec l'ajout d'un anticorps bloquant le TGFβ, le nombre de lymphocytes T Foxp3<sup>+</sup> a diminué significativement (Fig. 11D et E). Avec l'ajout d'un anticorps bloquant l'IL-10, le nombre de Treg induits chutait également de manière significative (Fig. 11F et G). Pour confirmer cette dernière expérience, nous avons également mis en coculture des MI triés de souris *IL-10*<sup>-/-</sup>. Lorsque les MI étaient déficients pour la production d'IL-10, le nombre de Treg obtenu après coculture diminuait significativement (Fig. 11H et I). Cela souligne l'importance de la production intrinsèque d'IL-10 par les MI pour la génération de Treg. Lorsque nous avons ajouté à la fois l'anticorps bloquant l'IL-10 et celui bloquant le TGFβ, nous avons observé une réduction supplémentaire du nombre de Treg induits par rapport aux anticorps bloquants isolés (Fig. 11J et K).

Nous avons également ajouté du TGFβ recombinant (rTGFβ1) dans la coculture, et avons constaté que cela potentialisait la capacité des macrophages à induire des Treg, alors que cela n'avait pas d'effet dans les cocultures avec les cDC (Fig. 11L-O).

Ces résultats démontrent que les macrophages interstitiels ont la capacité d'orienter la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T régulateurs Foxp3<sup>+</sup>, et ce via des mécanismes dépendants du TGFβ et de l'IL-10.



**Figure 12. Les MI capturent l'OVA *in vivo* et déclenchent ensuite la prolifération de LT *ex vivo*.** **A.** Histogrammes représentatifs de cytométrie en flux montrant le signal FITC dans les MA, MI, cMO, pMO, cDC1 et cDC2 de souris sauvages exposées avec 100µg d'OVA-FITC et 1µg de LPS (bleu) ou du PBS (rouge) par voie intra-trachéale 30min avant le sacrifice. **B.** Quantification du pourcentage de cellules FITC<sup>+</sup> dans les MA, MI, cMO, pMO, cDC1 et cDC2 de souris exposées par voie intra-trachéale avec du PBS ou 100µg d'OVA-FITC et 1µg de LPS 30, 60, 120 et 180 minutes avant analyse. **C.** Plan expérimental pour déterminer la proportion des cellules capturant l'OVA-FITC pendant le traitement des échantillons. **D.** Quantification du pourcentage de cDC, MI et MA FITC<sup>+</sup> d'origine CD45.2 ou CD45.1. **E.** Plan expérimental pour les figures F et G. **F.** Histogrammes représentatifs de cytométrie en flux montrant les signaux CTY dans les LT en coculture avec les cDC, MI ou MA isolés de souris WT exposées par voie intra-trachéale a de l'OVA et LPS (bleu) ou du PBS (rouge) 30min avant le sacrifice. **G.** Quantification de la fraction proliférative des LT en coculture avec les cDC, MI ou MA en D. **(B,D,G)** Les données représentent la moyenne +/- SD et la mise en commun d'au moins deux (B,D) ou trois (G) expériences indépendantes. Chaque valeur individuelle correspond à un réplicat biologique indépendant (n=6 (B) ; n= 5 (D) ; n= 3 (G)). Les valeurs P ont été calculées avec une analyse de variance à deux entrées avec un test de Sidak pour les comparaisons multiples. \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; \*\*\*\*, P<0.0001 ; ns, non significatif



#### 4. Les macrophages interstitiels capturent l'antigène *in vivo* et induisent la prolifération des lymphocytes T naïfs CD4<sup>+</sup> *ex vivo*

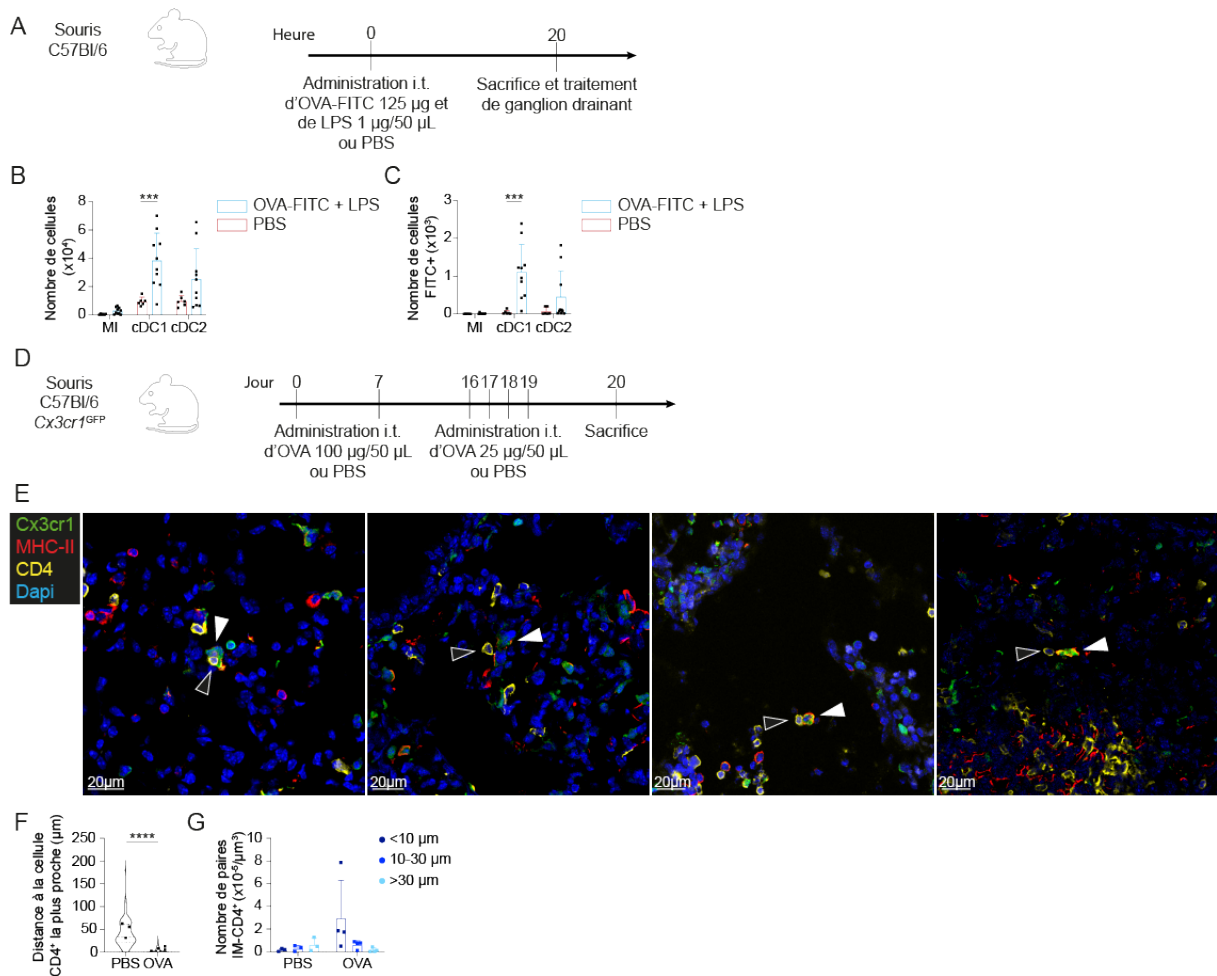
Jusqu'à présent, nous avons déterminé que les MI étaient capables de capturer un antigène *ex vivo* pour le présenter à des lymphocytes T et induire leur prolifération. Nous avons ensuite évalué leur capacité à capturer cet antigène *in vivo*.

Pour cela, nous avons mené une expérience de cinétique, pendant laquelle nous avons injecté par voie intra-trachéale de l'ovalbumine couplée au fluorochrome FITC (OVA-FITC) à des souris. Nous avons observé par cytométrie en flux la fluorescence FITC des différentes populations au cours du temps. Nous avons pu constater que les macrophages et DC sont capables de capturer l'OVA-FITC très rapidement et très efficacement, comme le montre le pourcentage de cellules FITC<sup>+</sup> dans ces populations (Fig. 12A et B).

Pour vérifier que la capture de l'OVA-FITC se passait bien *in vivo* et non pas pendant le processus de digestion, nous avons procédé à une expérience contrôle, dans laquelle les poumons de souris CD45.2, injectés avec l'OVA-FITC, ont été hachés avec des poumons de souris CD45.1, n'ayant rien reçu. Le broyat provenant de ces deux poumons mixés a été ensuite traité normalement. Grâce à cette expérience, nous avons pu ensuite regarder en cytométrie en flux si les cellules FITC<sup>+</sup> provenaient du poumon CD45.2 injecté ou du poumon CD45.1 non injecté (Fig. 12C). Nous avons pu constater que les cellules FITC<sup>+</sup> provenaient presque exclusivement des poumons CD45.2 qui ont reçu l'OVA-FITC, et donc que la capture de l'antigène pendant le traitement des poumons était très minime (Fig. 12D).

Nous avons ensuite voulu déterminer si cette capture d'antigène *in vivo* par les MI était suffisante pour induire la prolifération de lymphocytes T *ex vivo*. Pour tester cela, nous avons injecté des souris à l'ovalbumine, récolté les poumons 30 min plus tard pour en trier les cDC, MI et MA, et les mettre en culture avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs OTII comme précédemment, sans ajouter d'ovalbumine dans la culture. Nous avons ensuite évalué la prolifération des LT (Fig. 12E). Nous avons pu constater que les cDC et les MI ayant capturé l'OVA *in vivo* étaient capables de la présenter aux LT pour induire leur prolifération *ex vivo*, au contraire des MA qui ne présentaient pas l'antigène et au contraire des cDC et des MI provenant de souris qui n'ont pas reçu l'antigène (Fig. 12F et G).

Les MI sont capables de capturer un antigène administré par les voies respiratoires, et ce très rapidement et efficacement. Lorsque triés, ils peuvent ensuite induire une prolifération de LT *ex vivo*.



**Figure 13. Étude des capacités migratrices des MI et des interactions MI-LT CD4<sup>+</sup> *in vivo*.** **A.** Plan expérimental pour les panels B et C. **B.** Nombres absolus de MI, cDC1 et cDC2 dans les ganglions bronchiques 20h après injection intra-nasale de 125µg d'OVA-FITC et 1µg de LPS. **C.** Nombres absolus de MI, cDC1 et cDC2 FITC<sup>+</sup> dans les ganglions bronchiques 20h après injection intra-nasale de 125µg d'OVA-FITC et 1µg de LPS. **D.** Plan expérimental pour les panels E, F et G. **E.** Images représentatives de Cx3cr1<sup>GFP</sup>/MHC-II<sup>+</sup> MI et des LT CD4<sup>+</sup> dans les poumons de souris exposées chroniquement à l'OVA. Les têtes de flèches pleines et vides indiquent les MI Cx3cr1<sup>GFP</sup>/MHC-II<sup>+</sup> et les LT CD4<sup>+</sup>, respectivement. **F.** Quantification des distances séparant les MI du LT le plus proche dans les poumons de souris contrôles (PBS) ou asthmatiques (OVA). **G.** Nombres de paires MI-LT par volume en fonction de la distance séparant les MI et les LT. **(B, C, F, G)** Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD et la mise en commun d'au moins trois (B, C) expériences indépendantes. Chaque valeur individuelle correspond à un réplicat biologique indépendant ( $n=6-10$  (B, C) ;  $n= 3-4$  (F, G)). Les valeurs de P ont été calculées avec (F) un test de Mann-Whitney ou (B, C, G) une analyse de variance à deux entrées avec un test de Sidak pour les comparaisons multiples. \*\*\*,  $P<0.001$ ; \*\*\*\*,  $P<0.0001$

## 5. Les macrophages interstitiels sont au contact de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> *in vivo*

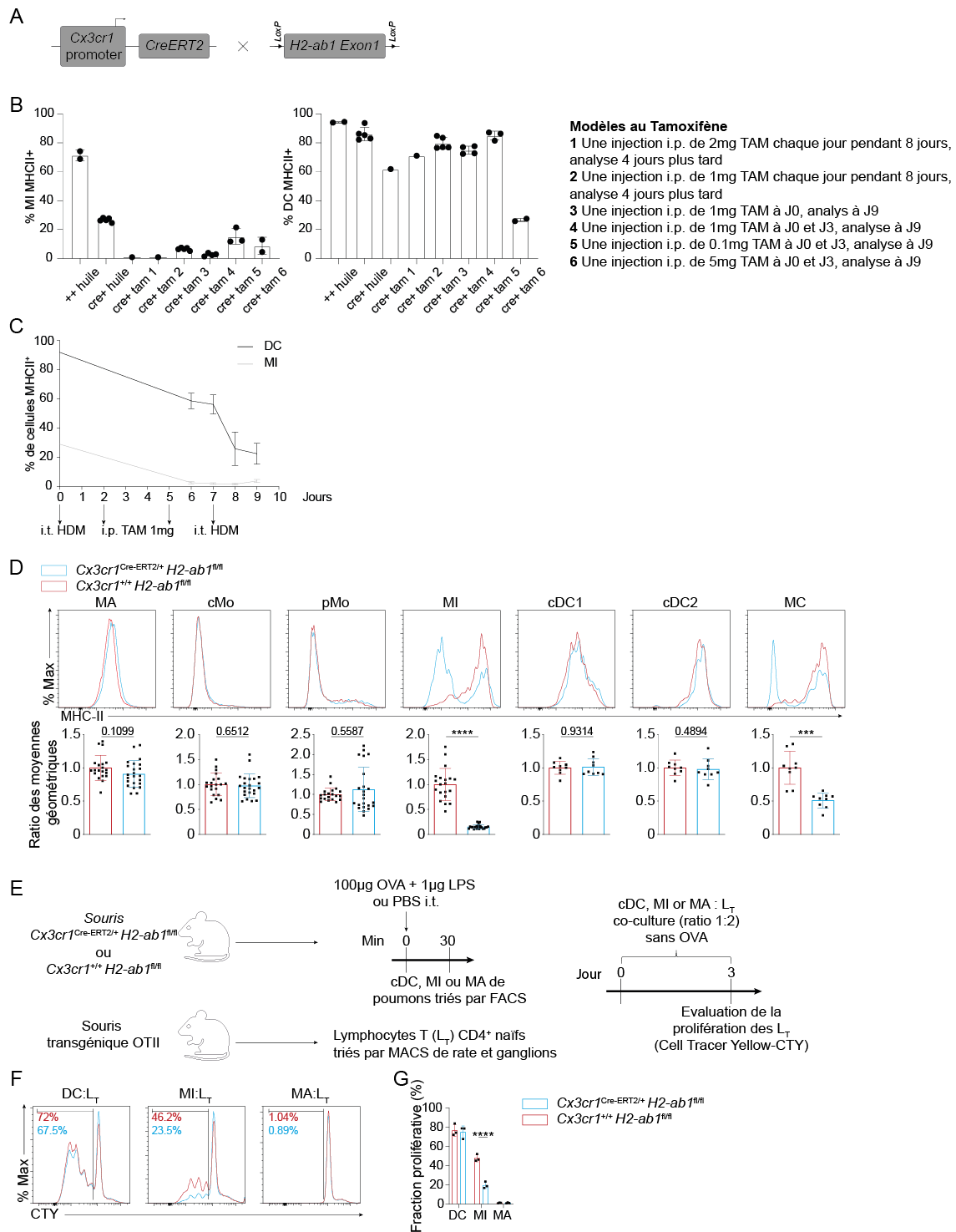
Nous avons ensuite tenté de savoir si les MI pouvaient rencontrer les lymphocytes *in vivo* et où cette interaction pourrait prendre place.

Nous avons d'abord effectué des expériences pour évaluer la capacité de migration des MI. Nous avons administré de l'OVA-FITC et du LPS par voie intra-trachéale et analysé les ganglions bronchiques 20 heures plus tard (Fig. 13A). Nous avons observé une augmentation du nombre de DC, certaines étant FITC<sup>+</sup>, dans le ganglion. Nous n'avons pas observé d'augmentation du nombre de MI (Fig. 13B et C). Cette expérience suggère que les MI n'ont pas la capacité de migrer, en accord avec ce qui a été proposé auparavant (Tang et al., 2022).

Nous avons ensuite réalisé des immunomarquages dans des souris *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> mettant en évidence les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, grâce à un anticorps anti-CD4, ainsi que les MI, qui sont doublement marqués par un anticorps anti-MHC-II et par un anticorps reconnaissant la GFP. Ces souris ont été soumises au préalable à un modèle d'asthme expérimental, consistant en l'administration répétée d'OVA par voie intra-trachéale tel que décrit dans la figure 13D. Les souris contrôles ont reçu du PBS.

Nous avons pu observer des cellules CD4<sup>+</sup> à proximité des MI dans les poumons de souris contrôles et asthmatiques (Fig. 13E). Grâce à un algorithme, nous avons pu mesurer la distance entre chaque MI et la cellule CD4<sup>+</sup> la plus proche. Nous avons constaté que cette distance était diminuée lorsque les souris ont été soumises au modèle d'asthme expérimental (Fig. 13F). En particulier, le nombre de paires de cellules CD4<sup>+</sup>/MI qui étaient en contact direct (<10µm) augmentait fortement chez les souris asthmatiques en comparaison aux souris contrôles (Fig. 13G).

Ces expériences nous suggèrent que les interactions entre les macrophages interstitiels et les lymphocytes CD4<sup>+</sup> se passent *in vivo* dans le poumon et qu'elles sont accentuées dans un modèle d'asthme expérimental.



**Figure 14. L'expression du MHC-II par les souris  $Cx3cr1^{CreERT2/+} H2ab1^{lox}$  avec et sans exposition au tamoxifène, et implications dans l'induction de prolifération *ex vivo* de LT. A.** Schéma représentant les modifications génétiques dans les souris  $Cx3cr1^{CreERT2/+} H2ab1^{lox}$ . **B.** Quantification du pourcentage de MI (gauche) et DC (droite) MHC-II positives après différents modèles d'administration du tamoxifène. **C.** Quantification du pourcentage de MI et DC MHC-II positives au cours d'un modèle d'asthme expérimental avec deux injections de 100µg de HDM à une semaine d'intervalle, avec administration de tamoxifène aux jours 2 et 5. **D.** Histogrammes représentatifs du phénotypage par cytométrie en flux du MHC-II dans les MA, MI, cMo, pMo, cDC1, cDC2 et MC dans les souris  $Cx3cr1^{CreERT2/+} H2ab1^{lox}$  (bleu) ou contrôles  $Cx3cr1^{+/+} H2ab1^{lox}$  (rouge) et quantification de la moyenne géométrique. **E.** Plan expérimental pour les panels F et G. **F.** Histogrammes représentatifs de cytométrie en flux montrant les signaux CTY dans les LT en coculture avec les cDC, MI ou MA isolés de souris  $Cx3cr1^{CreERT2/+} H2ab1^{lox}$

## 6. Les souris $Cx3cr1^{creERT2} H2ab1^{lox}$ , en absence de tamoxifène, ont des MI qui expriment moins de MHC-II

Afin de déterminer l'importance de la présentation antigénique par les MI dans divers modèles de maladies *in vivo*, nous nous sommes attelés à générer une souris génétiquement modifiée dont les MI n'exprimaient pas le MHC-II. Pour pouvoir tirer les bonnes conclusions de nos expériences, il était indispensable que le MHC-II des DC reste, lui, intact.

Le système Cre/lox est fréquemment utilisé pour cibler un type cellulaire spécifique. Les souris sont génétiquement modifiées de telle sorte que le gène de la Cre-recombinase (Cre) soit sous la régulation d'un promoteur spécifique de la cellule cible afin d'assurer une spécificité. Le gène que l'on veut déléter, ou une portion codante de ce gène, est lui encadré de sites loxP. Lorsqu'elle est exprimée, la Cre reconnaît les deux sites loxP et excise toute la portion entre ces deux sites. Parfois, la Cre est fusionnée à un domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur humain à l'œstrogène (ER). Ce type de Cre est appelée Cre inducible (CreER) car elle n'est active et ne se transloque au niveau du noyau que lors d'une injection de tamoxifène (TAM), un ligand du LBD (Metzger et al., 1995).

Dans la lignée de souris transgénique que nous avons générée, nous avons utilisé la CreER sous la dépendance du promoteur *Cx3cr1*, tandis que l'exon 1 du gène *H2-ab1* a été encadré de sites loxP (Fig. 14A). De cette manière, les cellules exprimant *Cx3cr1* expriment une Cre qui est séquestrée dans le cytoplasme de la cellule. Après injection de TAM, elle peut entrer dans le noyau et y exercer son action : elle élimine l'exon 1 du gène *H2-ab1* compris entre les sites loxP (Kristianto et al., 2017). *Cx3cr1* est un gène exprimé par les macrophages pulmonaires et du cerveau, ainsi que minoritairement par les lymphocytes T et une petite population de DC (Lee et al., 2018). Ce système doit donc permettre théoriquement de supprimer l'expression du MHC-II par les MI pulmonaire de manière relativement spécifique.

Nous avons testé plusieurs protocoles d'administration de TAM, à doses et fréquences variables et avons évalué l'expression de MHC-II par les MI et par les DC. Nous avons utilisé des injections d'huile (le solvant dans lequel est dissout le TAM) comme contrôle. Nous avons constaté que tous les régimes de traitement de tamoxifène parvenaient à éliminer presque totalement l'expression de MHC-II par les MI. Cependant, avec les régimes aux doses les plus fortes, comme le traitement n°6 (deux doses de 5mg), ou avec les régimes aux doses fréquentes, comme le traitement n°2 (1mg tous les jours pendant 8 jours), l'expression du MHC-II sur les DC était fortement impacté. Nous avons donc sélectionné un traitement léger, le n°4, qui consistait en l'injection par voie intra péritonéale de 1mg de TAM aux jours 1 et 3. Celui-ci semblait être efficace pour éliminer l'expression du MHC-II sur les MI tout en laissant son expression par les DC intacte (Fig. 14B).

Nous avons suivi l'expression du MHC-II sur les DC et les MI pendant ce traitement au TAM au cours d'un modèle d'asthme expérimental court. Celui-ci consistait en l'administration par

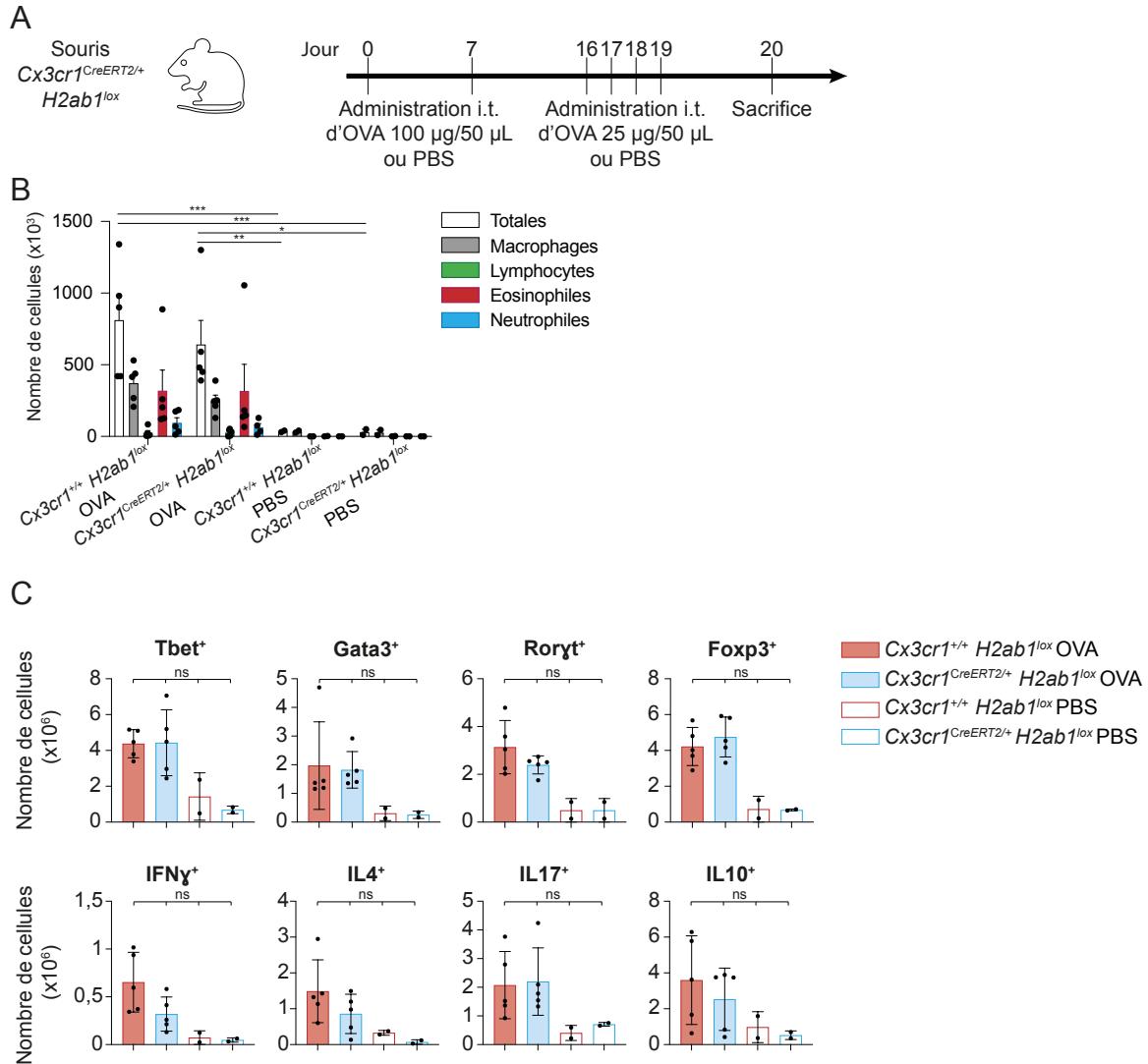
---

(bleu) ou contrôles (rouge) exposées par voie intra-trachéale à de l'OVA et du LPS 30min avant le sacrifice. **G.** Quantification de la fraction proliférative des LT en coculture avec les cDC, MI ou MA en D. **(B)** Chaque valeur individuelle correspond à un réplicat biologique indépendant (n=2-5) **(D,G)** Les données représentent la moyenne +/- SD et la mise en commun de trois expériences indépendantes. Chaque valeur individuelle correspond à un réplicat biologique indépendant (n= 9-21 (D) ; n= 3 (G)). Les valeurs P ont été calculées avec un test de Mann-Withney (D) ou une analyse de variance à deux entrées avec un test de Sidak pour les comparaisons multiples (G). \*\*\*\*, P<0.0001 ; ns, non significatif

voie intra-trachéale de 100 µg d'HDM aux jours 0 et 7, auquel nous avons ajouté l'administration de TAM aux jours 2 et 5. Nous avons phénotypé les MI et DC pour l'expression du MHC-II au jours 0, 6, 7, 8 et 9, et nous avons constaté que bien que l'expression du MHC-II sur les DC restait stable après ce protocole de TAM sans autre stimulation, lorsque les souris ont été soumises à un modèle d'asthme, les DC ont perdu l'expression du MHC-II (Fig. 14C).

Au cours de ces expériences, nous avons remarqué que les MI de souris  $Cx3cr1^{CreERT2/+}H2ab1^{lox}$ , mais pas les DC, exprimaient de faibles niveaux de MHC-II, même sans traitement tamoxifène. En effet, à l'état basal, environ 60% des MI n'exprimaient plus de MHC-II, et la moyenne géométrique pour le MHC-II de la population globale de MI chutait considérablement (Fig. 14D). Nous avons donc décidé d'utiliser ces souris sans leur administrer de traitement TAM, préférant un système moins sensible mais plus spécifique, dans lequel les DC n'étaient pas impactées.

Nous avons ensuite trié les DC, MI et MA de souris  $Cx3cr1^{CreERT2/+}H2ab1^{lox}$ , ou de contrôles  $Cx3cr1^{+/+}H2ab1^{lox}$  et nous les avons utilisées dans nos systèmes de coculture décrits plus haut (Fig. 14E). Nous avons observé que les MI provenant de souris  $Cx3cr1^{CreERT2/+}H2ab1^{lox}$ , et donc partiellement déficients en MHC-II, induisaient significativement moins de prolifération chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs que les MI provenant de souris contrôles (Fig. 14F-G).



**Figure 15. Modèle d'asthme expérimental à l'ovalbumine chez les souris  $Cx3cr1^{CreERT2} H2ab1^{lox}$ .** **A.** Plan expérimental. **B.** Nombre de cellules totales, macrophages, lymphocytes, éosinophiles et neutrophiles dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de souris  $Cx3cr1^{CreERT2} H2ab1^{lox}$  ou contrôles ayant subi un modèle d'asthme expérimental à l'OVA ou du PBS. **C.** Nombre de cellules Tbet, Gata3, Rorgt, Foxp3, IFN $\gamma$ , IL4, IL-17 ou IL-10 positives dans les poumons de souris  $Cx3cr1^{CreERT2} H2ab1^{lox}$  ou contrôles ayant subi un modèle d'asthme expérimental à l'OVA ou du PBS. **(B,C)** Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD. Chaque valeur individuelle correspond à un réplicat biologique indépendant ( $n=2-5$ ). Les valeurs P ont été calculées avec (B) une analyse de variance à deux entrées avec un test de Sidak pour les comparaisons multiples ou un test de Mann-Withney (C). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns, non significatif

## 7. Les souris Cx3cr1<sup>creERT2</sup> H2ab1<sup>lox</sup> montrent des réponses similaires aux contrôles dans un modèle d'asthme expérimental

Afin de déterminer l'importance de la délétion du MHC-II sur une partie des MI, nous avons soumis les souris Cx3cr1<sup>creERT2</sup> H2ab1<sup>lox</sup> à un modèle d'asthme expérimental. Celui-ci consistait en l'injection de deux doses de 100g d'ovalbumine séparées d'une semaine, puis, 9 jours plus tard, de l'injection de 25µg pendant quatre jours consécutifs. Les administrations se faisaient par voie intra-trachéale et les souris étaient sacrifiées le lendemain de la dernière injection. Nous avons utilisé des souris Cx3cr1<sup>creERT2/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup> ou des contrôles Cx3cr1<sup>+/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup> issus de la même portée, ainsi que des injections de PBS plutôt que d'ovalbumine à titre de contrôle (Fig. 15A).

Nous avons réalisé un lavage broncho-alvéolaire sur ces souris afin de quantifier les différentes populations cellulaires présentes dans la lumière des voies aériennes : les macrophages, lymphocytes, éosinophiles, et neutrophiles. Nous avons observé qu'après injection d'ovalbumine, le nombre total de cellules dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire augmentait, et en particulier le nombre de macrophages et d'éosinophiles. Ces derniers sont la signature d'un asthme éosinophilique. Cependant, bien que la différence soit bien marquée entre les souris injectées avec de l'ovalbumine ou du PBS, il ne semblait pas y avoir de différence majeure entre les souris Cx3cr1<sup>creERT2/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup> et Cx3cr1<sup>+/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup> (Fig. 15B).

Afin de voir si cette délétion a eu un impact sur la différenciation des lymphocytes T dans ce modèle, nous avons phénotypé les différentes populations de lymphocytes T CD4+ dans le poumon en utilisant un marquage en cytométrie en flux. Les Th1 sont identifiés par l'expression de Tbet et d'IFN $\gamma$ , les Th2 par l'expression de Gata3 et d'IL4, les Th17 par l'expression de Ror $\gamma$ t et d'IL-17 et les Treg par l'expression de Foxp3 et d'IL-10. Nous n'avons pas observé de différence dans le nombre de sous-types de lymphocytes T induits entre les souris Cx3cr1<sup>creERT2/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup> et Cx3cr1<sup>+/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup> (Fig. 15C).

Dans le modèle d'asthme expérimental induit ici, nous n'avons pas observé de différences entre les souris Cx3cr1<sup>creERT2/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup> et Cx3cr1<sup>+/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup>, que ce soit au niveau de l'éosinophilie dans le BAL ou dans l'orientation des réponses T pulmonaires.



# Conclusion

Dans cette étude, nous avons procédé à l'étude systématique des capacités de présentations d'antigène par les MI.

Les analyses de données de scRNAseq précédemment obtenues nous indiquent que les macrophages interstitiels possèdent la machinerie adéquate pour présenter des antigènes via le MHC-II, et nous avons confirmé cette forte expression du MHC-II par cytométrie en flux.

Dans des expériences de coculture de MI, MA ou DC avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, nous avons observé que les MI sont capables d'induire une prolifération de LT dépendante d'une présentation d'antigène. Cette capacité est semblable à celle des cDC et plus élevée chez les MI MHC-II<sup>high</sup> par rapport aux MI MHC-II<sup>low</sup>.

Dans ces cocultures, les MI ont la capacité d'orienter la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T régulateurs Foxp3<sup>+</sup>. Ceci implique des mécanismes dépendants du TGFβ et de l'IL-10.

Nous avons ensuite établi *in vivo* que les MI sont capables de capturer un antigène administré par les voies respiratoires, de manière très rapide et efficace. Lorsque triés, ils peuvent ensuite induire une prolifération de LT *ex vivo*.

Grâce à des techniques d'imagerie confocale, nous avons pu visualiser les interactions entre les macrophages interstitiels et les lymphocytes CD4<sup>+</sup> *in vivo* dans le poumon et nous avons remarqué que celles-ci sont accentuées dans un modèle d'asthme expérimental.

Nous avons généré les souris génétiquement modifiées Cx3cr1<sup>CreERT2/+</sup>H2ab1<sup>lox</sup> afin de déterminer *in vivo* l'importance de la présentation d'antigène par les MI. Nous avons décidé d'utiliser ces souris sans le traitement au tamoxifène initialement prévu, car celui-ci affecte non seulement l'expression du MHC-II par les MI mais également par les DC.

Lorsqu'utilisées dans les expériences de cocultures, les MI provenant de souris Cx3cr1<sup>CreERT2/+</sup>H2ab1<sup>lox</sup> induisaient significativement moins de prolifération chez des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs que les MI provenant de souris contrôles.

Après un modèle d'asthme expérimental, nous n'avons pas relevé de différences au niveau de l'éosinophilie dans le BAL ou dans l'orientation des réponses T pulmonaires entre les souris Cx3cr1<sup>CreERT2/+</sup>H2ab1<sup>lox</sup> et Cx3cr1<sup>+/+</sup>H2ab1<sup>lox</sup>.

Ces expériences démontrent que les MI sont capables de capturer un antigène *in vivo*, et d'induire une prolifération de lymphocyte T subséquente *in vitro*. La différenciation de ces lymphocytes T est orientée vers un phénotype de Treg.

Bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'impact de la délétion du MHC-II sur les MI dans le modèle testé ici, cette étude souligne une capacité des MI jusque-là inconnue, et qui pourrait se révéler importante dans d'autres contextes de maladies.

Ce travail remet également au jour le questionnement sur l'impact de la présentation d'antigène par les macrophages, souvent sous-estimée au regard de l'importance de la présentation d'antigène par les cellules dendritiques.

# Discussion – Perspectives

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une fonctionnalité propre des macrophages interstitiels, qu'ils ne partagent pas avec les autres APC pulmonaires. En effet, ils sont capables de capturer et de présenter un antigène soluble à un LT et d'induire sa prolifération et son orientation vers un phénotype de Treg. Cette fonction est dépendante du TGF $\beta$  et de l'IL-10. Nous avons pu mettre en évidence que des interactions entre MI et LT CD4<sup>+</sup> existent *in vivo* et qu'elles sont potentialisées dans la phase effectrice d'un modèle d'asthme allergique. Nous avons généré des souris Cx3cr1<sup>creERT2</sup> H2ab1<sup>lox</sup>, qui permettent l'étude de l'impact d'une déficience de cette présentation d'antigène par les MI, et les avons validées *ex vivo* : les MI triés de ces souris Cx3cr1<sup>cre/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup> n'induisent pas une prolifération aussi forte que les MI triés de souris contrôles Cx3cr1<sup>+/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup>. Nous n'avons par contre pas observé d'impact de cette déficience dans les modèles d'asthme expérimentaux réalisés *in vivo*, ni sur les populations présentes dans le BAL, ni dans les populations de LT induites.

L'étude de la fonction des MI s'est historiquement concentrée sur leurs fonctions innées. Ils sont capables d'inhiber l'activation et la migration des DC, grâce à leur production d'IL-10, et d'empêcher des réponses immunes aberrantes de type Th2 (Bedoret et al., 2009; Gong et al., 1994). Par la suite, grâce à des analyses transcriptomiques, des études ont suggéré que les MI sont potentiellement capables de présenter des antigènes (Chakarov et al., 2019; Schyns et al., 2019), ce que nous avons démontré dans ce travail. Les MI n'ayant pas de capacité migratoire, notre travail suggère une dichotomie dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. Les DC capturent l'antigène dans le tissu et migrent jusqu'au ganglion drainant pour y déclencher une réponse (Bosteels et al., 2020), tandis que les MI capturent et présentent l'antigène sur place, pouvant ainsi servir de régulateurs locaux de la réponse immunitaire adaptative, comme suggéré pour les DC et les macrophages dans l'intestin (Denning et al., 2007; Farache et al., 2013; Hadis et al., 2011; Murai et al., 2009).

Cependant, la probabilité pour qu'un MI ayant capturé un antigène, lors d'une première stimulation antigénique, rencontre un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf spécifique dans le tissu-même est faible. Nous avançons donc plusieurs hypothèses. La première est que le rôle des MI et de leur présentation d'antigène pourrait être prédominante dans le cadre d'une seconde rencontre avec l'antigène, pour restimuler l'immunité adaptative localement. Dans ce cadre, ils pourraient rencontrer des LT mémoires présents au sein du tissu, à savoir les TRM (Hondowicz et al., 2016; Schenkel & Masopust, 2014). Deuxièmement, ces rencontres pourraient se passer dans des structures spécialisées au sein du tissu, les *induced bronchus-associated lymphoid tissue* (iBALT), par exemple, qui sont des structures lymphoïdes secondaires pouvant s'organiser en centre germinatif comme dans le ganglion (Hwang et al., 2020). La présence des MI dans ces structures reste cependant à démontrer.

Bien que les capacités de phagocytose des macrophages soient établies depuis longtemps (Underhill et al., 1999), celles des MI n'ont été que récemment investiguées. Ils sont capables de phagocyter un corps étranger provenant de la circulation ou des voies aériennes, les MI CD206<sup>-</sup> étant plus efficaces que les CD206<sup>+</sup> dans ce contexte (Gibbins et al., 2017; Schyns et al., 2019). Une étude a même montré que les MI sont plus efficaces dans ce rôle que les DC (Hoffmann et al., 2016). Dernièrement, Tang *et al* ont étudié des MI CD11c<sup>+</sup>Cx3cr1<sup>high</sup>MHC-II<sup>hi</sup>, qu'ils appellent BAM, du point de vue de leur localisation, de leur capacité de phagocytose et de migration mais également de leur capacité à stimuler la prolifération de lymphocytes T. Au vu de la convergence de nos résultats avec les

caractéristiques avancées par ce papier, nous pouvons émettre l'hypothèse que les BAM représentent une sous-population de MI, identifiés par leur localisation (Tang et al., 2022).

Lors de nos expériences sur l'orientation des LT après coculture avec des APC, nous y avons ajouté du rTGFβ1, afin de déterminer si cela aidait à la différenciation des LT en Treg (Fig. 11 L-0). Bien que ce soit le cas dans les cocultures avec les MI, la différenciation en Treg n'est pas augmentée dans les cocultures avec les DC supplémentées en rTGFβ1. Cela laisse supposer que les MI possèdent un facteur propre qui est nécessaire à la différenciation des LT en Treg. Les expériences avec des anticorps neutralisant l'IL-10 et le TGFβ montrent que ces deux cytokines ont un effet potentialisateur : le nombre de Treg induit est plus faible lorsque les deux anticorps neutralisants sont combinés que lorsqu'ils sont utilisés séparément (Fig. 11 J et K). Cette expérience nous amène à penser que le facteur nécessaire que possèdent les MI et pas les DC pour l'augmentation considérable de la différenciation en Treg suite à la supplémentation en rTGFβ1 est la production d'IL-10. Cette hypothèse est supportée par plusieurs données de la littérature, qui montrent que l'IL-10 est nécessaire pour la fonction et la persistance des Treg chez la souris (Chaudhry et al., 2011; Murai et al., 2009) et leur expansion chez l'homme (Hsu et al., 2015). Pour tester cette hypothèse, nous pourrions compléter les cocultures DC : LT + rTGFβ1 en IL-10 et évaluer la génération de LT Foxp3<sup>+</sup>, pour voir si la quantité générée est comparable aux cocultures MI : LT + rTGFβ1.

Nous nous sommes concentrés ici sur la présentation d'antigène par les MI en conditions normales. Lorsque l'homéostasie est rompue et qu'une inflammation prend place, des monocytes sont recrutés dans le poumon. Ceux-ci se différencient en macrophages et ces macrophages dérivés de monocytes expriment également le MHC-II (Aegerter et al., 2022; Sabatel et al., 2017; Schyns et al., 2019). A l'heure actuelle, nous manquons d'outils nous permettant de différencier les macrophages dérivés de monocytes lors d'une inflammation des MI résidents en contexte homéostatique. Dans le futur, un tel outil serait primordial afin de discriminer *in vivo* l'impact de la présentation d'antigène par ces deux types cellulaires sur l'immunité adaptative établie lors de l'inflammation.

Nous avons construit les souris Cx3cr1<sup>creERT2</sup> H2ab1<sup>lox</sup> dans le but de bénéficier d'un système inductible, dans lequel nous pouvions supprimer l'expression du MHC-II par les MI au moment voulu grâce à l'administration de tamoxifène. Cependant, nous avons observé que les DC perdaient également l'expression du MHC-II. Nous avons essayé plusieurs régimes de traitement, mais même aux doses où le niveau de MHC-II restait stable sur les DC après traitement à l'état basal, l'expression chutaient lorsque l'asthme était induit expérimentalement. Nous avons également essayé d'appliquer une période de sevrage après le traitement au tamoxifène (McCubbrey et al., 2017), mais bien que cela suffise pour que les DC récupèrent le niveau d'expression du MHC-II, celui-ci revenait également à un niveau basal sur les MI (données non présentées). Durant ces expériences, nous avons également remarqué que, sans tamoxifène, environ 60% des MI perdaient l'expression du MHC-II (Fig. 14 A-D).

Ces problématiques sont probablement au moins partiellement expliquées par l'hypersensibilité à la recombinaison du locus du gène I-Ab, qui est connu pour être délété, dans certains cas, également dans les cellules n'exprimant pas la Cre (Becher et al., 2019). Un phénomène de *leakage* (littéralement « fuite ») de la Cre pourrait également contribuer aux problématiques observées : si la Cre exprimée dans les MI n'est pas totalement restreinte au

cytoplasme en l'absence de tamoxifène, celle-ci pourrait pénétrer dans le noyau et y délétér le locus du gène *H2ab-1* compris entre les sites lox.

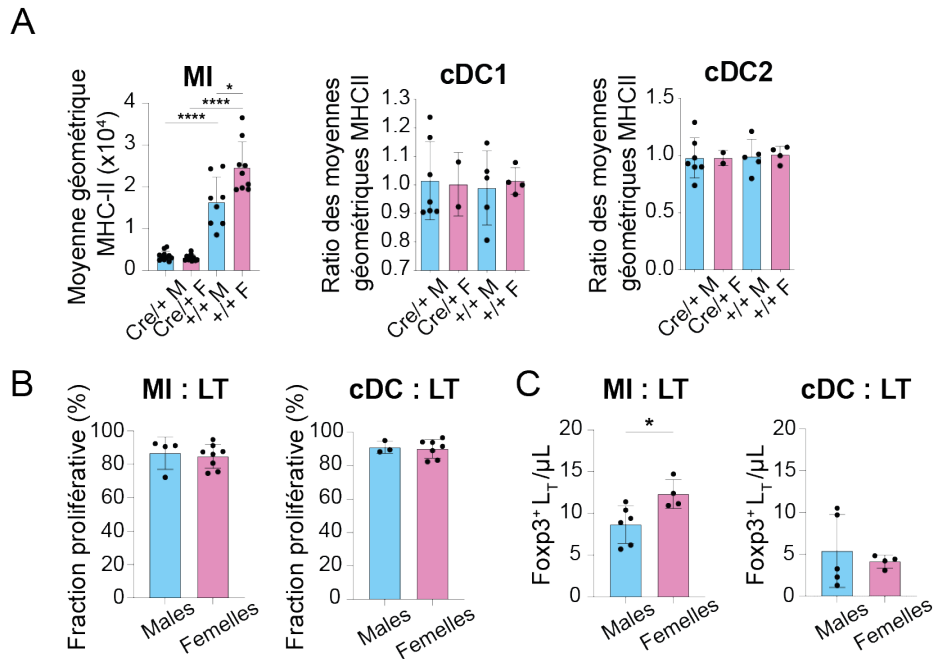
Nous avons donc décidé d'utiliser ces souris sans induction au tamoxifène, préférant un système moins sensible mais plus spécifique. La validité de notre modèle murin a été vérifiée en analysant l'induction de prolifération *ex vivo* de LT avec des MI triés de souris *Cx3cr1<sup>cre/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup>* ou de souris contrôles *Cx3cr1<sup>+/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup>*. Les MI partiellement délétés en MHC-II étaient moins capables d'induire la prolifération de LT (Fig. 14F,G).

Nous avons ensuite soumis ces souris *Cx3cr1<sup>creERT2</sup> H2ab1<sup>lox</sup>* à des modèles d'asthme expérimentaux à l'ovalbumine (Fig. 15) ou au HDM (non présentés). Ces modèles n'ont pas montré d'effet de la délétion du MHC-II sur les MI : nous n'observons pas de différence dans les différentes populations de LT induites ni dans la sévérité de l'asthme engendrée (éosinophilie dans le BAL). La première hypothèse pour expliquer ces résultats est que la délétion du MHC-II sur une partie des MI ne serait pas suffisante pour induire un effet ; la présentation de l'antigène par les MI fonctionnels restants suffirait à maintenir la fonction de cette population. Pour résoudre ce problème, il faudrait générer une autre souris génétiquement modifiée, qui cible spécifiquement tous les MI.

La lignée de souris *Tmem119<sup>Cre</sup> Cx3cr1<sup>-LSL-DTR</sup>* a montré son efficacité pour dépléter spécifiquement les MI (Vanneste et al., 2023). Nous pourrions utiliser la même combinaison de gènes pour cibler les MI dans nos propres expériences. Plutôt que cibler spécifiquement le gène MHC-II, ce qui n'est pas très fiable au vu de son hypersensibilité à la recombinaison, nous pourrions cibler une autre protéine essentielle à la machinerie du MHC-II. Par exemple, la protéine H2-M, qui catalyse l'échange du fragment CLIP avec le peptide antigénique sur le MHC-II. Ainsi, il serait envisageable de construire une souris *Tmem119<sup>Cre</sup> Cx3cr1<sup>-LSL-FLP</sup> H2-M<sup>FRT</sup>*. Le système FLP/FRT est comparable au système Cre-lox : la flippase FLP reconnaît des sites FRT. Ce système doublement conditionnel nous permettrait d'éliminer le chargement du peptide antigénique sur les MHC-II dans les MI.

Nous pourrions également imaginer un autre système, plus simple : une souris *Cx3cr1<sup>creERT2</sup> NFAT5<sup>lox</sup>*. NFAT5 est un facteur de transcription qui, dans les macrophages, régule l'expression de *Ciita*, co-activateur de la transcription du MHC-II. Les macrophages déficients en NFAT5 ont moins de MHC-II, et ne parviennent pas à induire une stimulation des LT aussi efficace, ce qui améliore la survie dans un modèle de greffe de peau. Cependant, ce modèle semble également peu sensible, car le MHC-II n'est pas éliminé totalement de tous les macrophages. Il conviendrait également de vérifier que NFAT5 n'est pas essentiel à la régulation d'autres gènes, potentiellement nécessaires au développement normal de la souris (Buxadé et al., 2018).

La deuxième hypothèse est que le modèle d'asthme utilisé n'est pas optimal pour révéler la fonction de présentation des MI *in vivo*. Il serait envisageable d'essayer d'autres modèles. Comme suggéré plus haut, si le rôle de présentation des MI est primordial lors d'une seconde rencontre avec le même pathogène, nous pourrions réaliser des modèles plus longs, pour voir l'importance des MI lors de la seconde vague d'exposition. Cependant, pour que ce plan expérimental soit optimal, il serait idéal d'avoir un système inductible pour pouvoir induire la déplétion des MI en MHC-II entre les deux expositions.



**Figure 16. L'expression du MHC-II selon le sexe dans les souris Cx3cr1<sup>creERT2</sup> H2ab1<sup>lox</sup> et implication dans les cocultures. A.** Phénotypage du MHC-II dans les souris Cx3cr1<sup>CreERT2</sup> H2ab1<sup>lox</sup>. Mâles (M), Femelles (F) **B.** Quantification de la fraction proliférative des LT en coculture avec les MI et cDC, réparties selon le sexe. **C.** Quantification du nombre de LT Foxp3<sup>+</sup> dans la coculture avec les MI ou cDC, réparties selon le sexe. **(A-C)** Les données représentent la moyenne +/- SD et la mise en commun d'au moins deux expériences indépendantes. Chaque valeur individuelle correspond à un réplicat biologique indépendant (n= 2-9 (A) ; n= 4-8 (B) ; n= 4-6 (C)). Les valeurs P ont été calculées avec un test de Mann-Whitney. \*, P<0.05; \*\*\*\*, P<0.0001

La troisième hypothèse serait que la présentation d'antigène par les MI n'a que peu d'impact sur l'orientation de la réponse immunitaire *in vivo*.

Il est intéressant de rapporter que lors de la réalisation de ces modèles d'asthme expérimentaux, nous avons été confrontés à des problèmes de variabilité élevée dans nos modèles. Nous avons observé que cette variabilité provenait en partie du sexe des souris utilisées, les mâles ne se comportant pas de la même manière que les femelles, malheureusement de manière peu consistante et reproductible. Nous avons néanmoins poussé notre analyse plus loin, et avons remarqué une différence d'expression du MHC-II sur les MI, mais pas sur les DC, entre les sexes des souris contrôles Cx3cr1<sup>+/+</sup> H2ab1<sup>lox</sup>. En effet, les MI de femelles portent plus de molécules de MHC-II que les MI de mâles (Fig. 16A). En ré-analysant les cocultures avec une dichotomisation entre les sexes, nous avons également remarqué que cette différence d'expression avait un impact sur l'induction de Treg (Fig. 16C) mais pas sur l'induction de la prolifération (Fig. 16B).

Les différences immunitaires inter-sexes sont connues chez l'humain : les femmes ont une immunité innée et adaptative plus forte. Elles répondent mieux aux vaccins et ont moins d'infections, mais font également plus de maladies auto-immunes (Klein & Flanagan, 2016). Les hormones sexuelles ont un impact sur plusieurs volets de l'immunité. Le nombre et la fonction des macrophages sont impactés par ces hormones. Chez la souris, les œstrogènes augmentent les capacités phagocytaires des macrophages, et les macrophages des femelles expriment plus fortement le TLR2, TLR3 et TLR4 ; bien que les macrophages mâles répondent mieux aux ligands du TLR4. Les APC des femelles sont plus efficaces car elles expriment de plus hautes quantités de MHC-II et de molécules de co-stimulation (Jaillon et al., 2019; L. Miller & Hunt, 1996).

Ces propriétés contribuent à la différence de sévérité de l'asthme observée entre les individus de sexe masculin et féminin. En effet, chez l'humain, la prévalence et la sévérité de l'asthme sont plus importantes chez la femme (Delmas et al., 2021). Chez ces dernières, les œstrogènes polarisent les macrophages vers un type « M2 » (Becerra-Díaz et al., 2018; Keselman et al., 2017). Le nombre de M2 corrèle avec la sévérité de l'asthme. Un traitement aux androgènes, mis en évidence pour leurs qualités immunosuppressives, a été testé expérimentalement et fonctionne chez 88% des femmes (Becerra-Díaz et al., 2018). Chez la souris, dans un modèle d'asthme expérimental, les femelles ont des plus hauts taux d'IgE et plus d'éosinophiles, ainsi que de plus grands nombres de LT effecteurs dans le poumon. L'administration de macrophages « M2 » dans le poumon de mâles avant induction de l'asthme récapitule les effets observés chez les femelles (Melgert et al., 2010).

Ces observations sur la différence de comportement des cellules immunitaires selon le sexe sont à prendre en compte lors du design d'expériences. En effet, les expériences réalisées sur souris le sont souvent sur des femelles. Il faut donc être prudent quant à l'extrapolation de ces résultats sur les deux sexes.

Ces études portées sur l'influence des hormones sexuelles sur les macrophages et leur implication dans l'asthme ne font généralement pas la distinction entre les MA et les MI, et utilisent la dichotomisation M1/M2. Afin d'évaluer l'impact des hormones sexuelles sur les MI et leur présentation d'antigène, et l'implication de ces mécanismes dans des modèles d'asthme expérimentaux, plusieurs expériences seraient envisageables.

Premièrement, nous pourrions phénotyper les récepteurs aux hormones sexuelles sur les MI. Ensuite, nous pourrions quantifier l'expression du MHC-II sur les MI dans des souris



mâles castrés ou des femelles ovariectomisées, afin de déterminer l'importance des hormones androgéniques ou œstrogéniques dans l'expression du MHC-II.

Pour évaluer l'influence des hormones sexuelles sur les MI et sur leur comportement dans un modèle d'asthme expérimental, nous pourrions utiliser des souris génétiquement modifiées dans lesquelles l'expression des récepteurs aux hormones sexuelles ER et AR (récepteur aux androgènes) est supprimée spécifiquement sur les MI.

Le travail présenté ici révèle une fonction nouvelle des MI dans leur communication avec les LT. La signification biologique de cette interaction reste à démontrer *in vivo*. Le développement de nouveaux outils transgéniques permettant la suppression de la présentation antigénique chez les MI spécifiquement, ou la mise en place d'autres modèles de maladies serait idéal pour continuer notre investigation. Ces études permettraient de mieux comprendre la mise en place de la réponse immunitaire, et spécifiquement la communication entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs, dans différentes maladies pulmonaires.

# Liste de publications

Une majeure partie des résultats présentés dans ce travail font l'objet d'une publication, actuellement en révision dans le journal *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité et la chance d'être impliquée dans d'autres projets de recherches. Ceux-ci ont fait l'objet de publications dont voici la liste :

- Vanneste, D., Bai, Q., Hasan, S., Peng, W., Pirottin, D., Schyns, J., Maréchal, P., Ruscitti, C., Meunier, M., Liu, Z., Legrand, C., Fievez, L., Ginhoux, F., Radermecker, C., Bureau, F., & Marichal, T. (March 2023). MafB-restricted local monocyte proliferation precedes lung interstitial macrophage differentiation. *Nature Immunology*, 24 (5), 827 - 840. doi:10.1038/s41590-023-01468-3
- Liégeois, M., Bai, Q., Fievez, L., Pirottin, D., Legrand, C., Guiot, J., Schleich, F., Corhay, J.-L., Louis, R., Marichal, T., & Bureau, F. (2022). Airway Macrophages Encompass Transcriptionally and Functionally Distinct Subsets Altered by Smoking. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 67 (2), 241 - 252. doi:10.1165/rcmb.2021-0563OC
- Desmecht, S.\* , Tashkeev, A.\* , El Moussaoui, M., MARECHAL, N., Perée, H., Tokunaga, Y., Fombellida-Lopez, C., Polese, B., Legrand, C., Wéry, M., Mni, M., Fouillien, N., TOUSSAINT, F., Gillet, L., Bureau, F., LUTTERI, L., HAYETTE, M.-P., MOUTSCHEN, M., MEURIS, C., ... DARCIS, G.\*. (2022). Kinetics and persistence of the cellular and humoral immune responses to BNT162b2 mRNA vaccine in SARS-CoV-2-naive and -experienced subjects: impact of booster dose and breakthrough infections. *Frontiers in Immunology*, 13, 863554. doi:10.3389/fimmu.2022.863554
- Lemaitre, P.\* , Bai, Q.\* , Legrand, C.\* , Chariot, A., Close, P., Bureau, F., & Desmet, C. (2021). Loss of the Transfer RNA Wobble Uridine-Modifying Enzyme Elp3 Delays T Cell Cycle Entry and Impairs T Follicular Helper Cell Responses through Deregulation of Atf4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. doi:10.4049/jimmunol.2000521
- Liégeois, M.\* , Legrand, C.\* , Desmet, C.\* , Marichal, T.\* , & Bureau, F.\*. (2018). The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cellular Immunology*, 330, 91-96. doi:10.1016/j.cellimm.2018.02.001

\* Les auteurs ont contribué de manière équivalente à ce travail.

# Bibliographie

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology* (Elsevier (ed.); ninth).
- Aegerter, H., Lambrecht, B. N., & Jakubzick, C. V. (2022). Biology of lung macrophages in health and disease. *Immunity*, *55*(9), 1564–1580. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.08.010>
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, *10*(12), 1538–1543. <https://doi.org/10.1038/nn2014>
- Aktar, A., Shan, L., Koussih, L., Almiski, M. S., Basu, S., Halayko, A., Okwor, I., Uzonna, J., Gounni, & S., A. (2022). PlexinD1 Deficiency in Lung Interstitial Macrophages Exacerbates House Dust Mite–Induced Allergic Asthma. *The Journal of Immunology*, *208*(5), 1272–1279.
- Aschoff, L. (1924). Das reticulo-endotheliale system. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd*, *28*, 1–118.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., & Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, *317*(5838), 666–670. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, *27*, 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Avalos, A. M., & Ploegh, H. L. (2014). Early BCR events and antigen capture, processing, and loading on MHC class II on B cells. *Frontiers in Immunology*, *5*(MAR), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00092>
- Bain, C. C., Bravo-Blas, A., Scott, C. L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L. C., Artis, D., & Mowat, A. M. I. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature Immunology*, *15*(10), 929–937. <https://doi.org/10.1038/ni.2967>
- Bain, C. C., Bravo-blas, A., Scott, C. L., & Perdiguero, E. G. (2015). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in adult intestine. *Europe PMC Funders*, *15*(10), 929–937. <https://doi.org/10.1038/ni.2967>. Constant
- Bain, C. C., Hawley, C. A., Garner, H., Scott, C. L., Schridde, A., Steers, N. J., Mack, M., Joshi, A., Guilliams, M., Mowat, A. M. I., Geissmann, F., & Jenkins, S. J. (2016). Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nature Communications*, *7*(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms11852>
- Bang, B. R., Chun, E., Shim, E. J., Lee, H. S., Lee, S. Y., Cho, S. H., Min, K. U., Kim, Y. Y., & Park, H. W. (2011). Alveolar macrophages modulate allergic inflammation in a murine model of asthma. *Experimental and Molecular Medicine*, *43*(5), 275–280. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.5.028>
- Becerra-Díaz, M., Strickland, A. B., Keselman, A., & Heller, N. M. (2018). Androgen and Androgen Receptor as Enhancers of M2 Macrophage Polarization in Allergic Lung Inflammation. *The Journal of Immunology*, *201*(10), 2923–2933. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800352>
- Becher, B., Waisman, A., & Lu, L. F. (2019). Cre-lox: Target Sensitivity Matters. *Immunity*, *51*(4), 595. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.012>
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset,

- R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., de Leval, L., Van Rooijen, N., Le Moine, A., Vanderplasschen, A., Cataldo, D., Drion, P.-V. V, Moser, M., Lekeux, P., & Bureau, F. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(12), 3723–3738. <https://doi.org/10.1172/JCI39717>
- 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., & Misharin, A. V. (2016). Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *54*(1), 147–149. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0147LE>
- Bilyk, N., & Holt, P. G. (1993). Inhibition of the immunosuppressive activity of resident pulmonary alveolar macrophages by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine*, *177*(6), 1773–1777. <https://doi.org/10.1084/jem.177.6.1773>
- Bosteels, Neyt, K., Vanheerswynghels, M., van Helden, M. J., Sichien, D., Debeuf, N., De Prijck, S., Bosteels, V., Vandamme, N., Martens, L., Saeys, Y., Louagie, E., Lesage, M., Williams, D. L., Tang, S. C., Mayer, J. U., Ronchese, F., Scott, C. L., Hammad, H., ... Lambrecht, B. N. (2020). Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity*, *52*(6), 1039-1056.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.005>
- Bosteels, & Scott, C. L. (2020). Transcriptional regulation of DC fate specification. *Molecular Immunology*, *121*(March), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.02.021>
- Bowden, D. H., & Adamson, I. Y. R. (1972). The Pulmonary Interstitial Cell as Immediate Precursor of the Alveolar Macrophage. *American Journal of Pathology*, *68*(3), 521–528.
- Brazeo, P. L., Soni, P. N., Tokhtaeva, E., Magnani, N., Yemelyanov, A., Perlman, H. R., Ridge, K. M., Sznajder, J. I., Vagin, O., & Dada, L. A. (2017). FXYD5 is an essential mediator of the inflammatory response during lung injury. *Frontiers in Immunology*, *8*(JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00623>
- Buxadé, M., Encabo, H. H., Riera-Borrull, M., Quintana-Gallardo, L., López-Cotarelo, P., Tellechea, M., Martínez-Martínez, S., Redondo, J. M., Martín-Caballero, J., Flores, J. M., Bosch, E., Rodríguez-Fernández, J. L., Aramburu, J., & López-Rodríguez, C. (2018). Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(11), 2901–2918. <https://doi.org/10.1084/jem.20180314>
- Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C. M., Pereira Da Costa, M., & Reis E Sousa, C. (2021). Dendritic Cells Revisited. *Annual Review of Immunology*, *39*, 131–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053707>
- Cai, Y., Sugimoto, C., Arainga, M., Alvarez, X., Didier, E. S., & Kuroda, M. J. (2014). In vivo characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *192*(6), 2821–2829. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302269>
- Cannons, J. L., Lu, K. T., & Schwartzberg, P. L. (2013). T follicular helper cell diversity and plasticity. *Trends in Immunology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.01.001>
- Cavaillon, J.-M. (2011). The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *Journal of Leukocyte Biology*, *90*(3), 413–424. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211094>
- Chakarov, S., Lim, H. Y., Tan, L., Lim, S. Y., See, P., Lum, J., Zhang, X. M., Foo, S., Nakamizo, S.,

- Duan, K., Kong, W. T., Gentek, R., Balachander, A., Carbajo, D., Bleriot, C., Malleret, B., Tam, J. K. C., Baig, S., Shabeer, M., ... Ginhoux, F. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science*, *363*(6432), 1–18. <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J. M., Jack, R. S., Wunderlich, F. T., Brüning, J. C., Müller, W., & Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, *34*(4), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>
- Chen, B., Zhu, L., Yang, S., & Su, W. (2021). Unraveling the Heterogeneity and Ontogeny of Dendritic Cells Using Single-Cell RNA Sequencing. *Frontiers in Immunology*, *12*(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.711329>
- Chen, M., Huang, L., Shabier, Z., & Wang, J. (2007). Regulation of the Lifespan in Dendritic Cell Subsets. *Mol Immunol*, *44*(10), 2558–2565. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.12.020>
- Cho, K. W., Morris, D. L., delProposto, J. L., Geletka, L., Zamarron, B., Martinez-Santibanez, G., Meyer, K. A., Singer, K., O'Rourke, R. W., & Lumeng, C. N. (2014). An MHC II-dependent activation loop between adipose tissue macrophages and CD4+ T cells controls obesity-induced inflammation. *Cell Reports*, *9*(2), 605–617. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.004>
- Coleman, M. M., Ruane, D., Moran, B., Dunne, P. J., Keane, J., & Mills, K. H. G. (2013). Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *48*(6), 773–780. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0263OC>
- Courtney, A. H., Lo, W. L., & Weiss, A. (2018). TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends in Biochemical Sciences*, *43*(2), 108–123. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.008>
- Crowell, R. E., Heaphy, E., Valdez, Y. E., Mold, C., & Lehnert, B. E. (1992). Alveolar and interstitial macrophage populations in the murine lung. *Experimental Lung Research*, *18*(4), 435–446.
- Curtsinger, J. M., & Mescher, M. F. (2010). Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation. *Curr Opin Immunol*, *22*(3), 333–340. <https://doi.org/doi:10.1016/j.coi.2010.02.013>
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, *14*(10), 986–995. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., & Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*, *307*(5715), 1630–1634. <https://doi.org/10.1126/science.1108003>
- Delmas, M.-C., Bénézet, L., Ribet, C., Iwatsubo, Y., Provost, D., Varraso, R., Zins, M., Leynaert, B., Nadif, R., & Roche, N. (2021). Prévalence de l'asthme chez l'adulte en France, données de la cohorte Constances. *Revue Des Maladies Respiratoires*, *38*(8), 797–806. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rmr.2021.05.007>
- Denning, T. L., Wang, Y. C., Patel, S. R., Williams, I. R., & Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology*, *8*(10), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/ni1511>
- Desch, A. N., Gibbings, S. L., Clambey, E. T., Janssen, W. J., Slansky, J. E., Kedl, R. M., Henson,

- P. M., & Jakubzick, C. (2014). Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5674>
- 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., Schilling, J. D., Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., Forsberg, E. C., Yokoyama, W. M., Unanue, E. R., Colonna, M., Randolph, G. J., & Mann, D. L. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*, 40(1), 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.019>
- Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41(1), 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Farache, J., Zigmond, E., Shakhar, G., & Jung, S. (2013). Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunology and Cell Biology*, 91(3), 232–239. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.79>
- Franke-Ullmann, G., Pfortner, C., Walter, P., Steinmüller, C., Lohmann-Matthes, M. L., Kobzik, L., Pfortner, C., Walter, P., Steinmüller, C., Lohmann-Matthes, M. L., Kobzik, L., Pfortner, C., Walter, P., Steinmüller, C., Lohmann-Matthes, M. L., & Kobzik, L. (1996). Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages in vitro. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(7), 3097–3104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816420>
- Geissmann, F., Jung, S., & Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19(1), 71–82. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Gibbins, S. L., Thomas, S. M., Atif, S. M., McCubbrey, A. L., Desch, A. N., Danhorn, T., Leach, S. M., Bratton, D. L., Henson, P. M., Janssen, W. J., & Jakubzick, C. V. (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 57(1), 66–76. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0361OC>
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Ginhoux, F., & Williams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J., & Biswas, S. K. (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nature Immunology*, 17(1), 34–40. <https://doi.org/10.1038/ni.3324>
- Gong, J. L., McCarthy, K. M., Rogers, R. A., & Schneeberger, E. E. (1994). Interstitial lung macrophages interact with dendritic cells to present antigenic peptides derived from particulate antigens to T cells. *Immunology*, 81(3), 343–351.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 1977–1992. <https://doi.org/10.1084/jem.20131199>



- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R., & Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*, *14*(8), 571–578. <https://doi.org/10.1038/nri3712>
- Guilliams, M., Mildner, A., & Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*, *49*(4), 595–613. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
- Guilliams, M., & Scott, C. L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 7, pp. 451–460). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.42>
- Guilliams, M., & Svedberg, F. R. (2021). Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Nature Immunology*, *22*(2), 118–127. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00849-2>
- Guilliams, M., Thierry, G. R., Bonnardel, J., & Bajenoff, M. (2020). Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. In *Immunity* (Vol. 52, Issue 3, pp. 434–451). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.015>
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., & Pabst, O. (2011). Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity*, *34*(2), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.016>
- Hanna, R. N., Carlin, L. M., Hubbeling, H. G., Nackiewicz, D., Green, A. M., Punt, J. A., Geissmann, F., & Hedrick, C. C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C– monocytes. *Nature Immunology*, *12*(8), 778–785. <https://doi.org/10.1038/ni.2063>
- Hanna, R. N., Cekic, C., Sag, D., Tacke, R., Thomas, G. D., Nowyhed, H., Herrley, E., Rasquinha, N., Mcardle, S., Wu, R., Peluso, E., Metzger, D., Ichinose, H., Shaked, I., Chodaczek, G., Biswas, S. K., & Hedrick, C. C. (2015). Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science*, *350*(6263), 985–990. <http://www.sciencemag.org/content/350/6263/985.full.pdf>
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C. †Camilla, Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E. R. †Richard, Ginhoux, F., ... Merad, M. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity*, *38*(4), 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>
- Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A. C., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, *14*(8), 821–830. <https://doi.org/10.1038/ni.2638>
- Hilgendorf, I., Gerhardt, L. M. S., Tan, T. C., Winter, C., Holderried, T. A. W., Chousterman, B. G., Iwamoto, Y., Liao, R., Zirlik, A., Scherer-Crosbie, M., Hedrick, C. C., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R., & Swirski, F. K. (2014). Ly-6c high monocytes depend on nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circulation Research*, *114*(10), 1611–1622. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303204>
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F. F., See, P., Beaudin, A. E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E. C., Poidinger, M., Zolezzi, F., Larbi, A., Ng, L. G., Chan, J. K. Y., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I. M., Merad, M., & Ginhoux, F. (2015). C-Myb+ Erythro-

- Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, 42(4), 665–678.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>
- Hoeffel, G., & Ginhoux, F. (2018). Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cellular Immunology*, 330, 5–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.001>
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S. H. Y., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S. J., Stanley, E. R., Chan, J. K. Y., Ng, L. G., Samokhvalov, I. M., Merad, M., & Ginhoux, F. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1167–1181. <https://doi.org/10.1084/jem.20120340>
- Hoffmann, F., Ender, F., Schudde, I., Lewkowich, I. P., Köhl, J., König, P., & Laumonnier, Y. (2016). Origin, localization, and immunoregulatory properties of pulmonary phagocytes in allergic asthma. *Frontiers in Immunology*, 7(MAR), 1–16.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00107>
- Holt, P. G., Oliver, J., Bilyk, N., McMenemy, C., McMenemy, P. G., Kraal, G., & Thepen, T. (1993). Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 177(2), 397–407. <https://doi.org/10.1084/jem.177.2.397>
- Hondowicz, B. D., An, D., Schenkel, J. M., Kim, K. S., Steach, H. R., Krishnamurthy, A. T., Keitany, G. J., Garza, E. N., Fraser, K. A., Moon, J. J., Altemeier, W. A., Masopust, D., & Pepper, M. (2016). Interleukin-2-Dependent Allergen-Specific Tissue-Resident Memory Cells Drive Asthma. *Immunity*, 44(1), 155–166.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.004>
- Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C. H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S. J., & Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *The Journal of Immunology*, 195(8), 3665–3674.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402898>
- Huber, S., & Schramm, C. (2006). TGF-beta and CD4+CD25+ Regulatory T cells. *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 1014–1023.
- Hume, D. A., Ross, I. L., Himes, S. R., Sasmono, R. T., Wells, C. A., & Ravasi, T. (2002). The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(4), 621–627.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.72.4.621>
- Hwang, J. Y., Silva-Sanchez, A., Carragher, D. M., Garcia-Hernandez, M. de la L., Rangel-Moreno, J., & Randall, T. D. (2020). Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (iBALT) Attenuates Pulmonary Pathology in a Mouse Model of Allergic Airway Disease. *Frontiers in Immunology*, 11(September), 1–16.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.570661>
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Laflamme, J. J., Cua, D. J., & Littman, D. R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*, 126(6), 1121–1133.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.035>
- J, S., F, B., T, M., Schyns, J., Bureau, F., & Marichal, T. (2018). Lung interstitial macrophages: Past, present, and future. *Journal of Immunology Research*, 2018.  
<https://doi.org/10.1155/2018/5160794>
- Jaillon, S., Berthenet, K., & Garlanda, C. (2019). Sexual Dimorphism in Innate Immunity.

- Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 56(3), 308–321.  
<https://doi.org/10.1007/s12016-017-8648-x>
- Jakubzick, C., Gautier, E., Gibbings, S., Sojka, D., Schlitzer, A., Johnson, T., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., van Rooijen, N., Grainger, J., Belkaid, Y., Maayan, A., Riches, D. H., Yokoyama, W., Ginhoux, F., Henson, P., & Randolph, G. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, 39(3), 599–610.
- Johansson, A., Lundborg, M., Sköld, C. M., Lundahl, J., Tornling, G., Eklund, A., & Camner, P. (1997). Functional, morphological, and phenotypical differences between rat alveolar and interstitial macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 16(5), 582–588. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.16.5.9160840>
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Honda, H., Kobayashi, T., Chinen, H., Kitazume, M. T., Takayama, T., Okamoto, S., Koganei, K., Sugita, A., Kanai, T., & Hibi, T. (2009). Human CD14<sup>+</sup> Macrophages in Intestinal Lamina Propria Exhibit Potent Antigen-Presenting Ability. *The Journal of Immunology*, 183(3), 1724–1731. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804369>
- Katakai, T., Suto, H., Sugai, M., Gonda, H., Togawa, A., Suematsu, S., Ebisuno, Y., Katagiri, K., Kinashi, T., & Shimizu, A. (2008). Organizer-Like Reticular Stromal Cell Layer Common to Adult Secondary Lymphoid Organs. *The Journal of Immunology*, 181(9), 6189–6200. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6189>
- Kawano, H., Kayama, H., Nakama, T., Hashimoto, T., Umemoto, E., & Takeda, K. (2016). IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *International Immunology*, 28(10), 489–501. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw012>
- Kawasaki, T., Ikegawa, M., & Kawai, T. (2022). Antigen Presentation in the Lung. *Frontiers in Immunology*, 13(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.860915>
- Keselman, A., Fang, X., White, P. B., & Heller, N. M. (2017). Estrogen Signaling Contributes to Sex Differences in Macrophage Polarization during Asthma. *The Journal of Immunology*, 199(5), 1573–1583. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601975>
- Kim, K. W., Williams, J. W., Wang, Y. T., Ivanov, S., Gilfillan, S., Colonna, M., Virgin, H. W., Gautier, E. L., & Randolph, G. J. (2016). MHC II<sup>+</sup> resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 213(10), 1951–1959. <https://doi.org/10.1084/jem.20160486>
- Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Kotsias, F., Cebrian, I., & Alloati, A. (2019). Antigen processing and presentation. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 348, 69–121. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.005>
- Kristianto, J., Johnson, M. G., Zastrow, R. K., Radcliff, A. B., & Blank, R. D. (2017). Spontaneous recombinase activity of Cre-ERT2 in vivo. *Transgenic Research*, 26(3), 411–417. <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0018-1>
- Landsman, L., & Jung, S. (2007). Lung Macrophages Serve as Obligatory Intermediate between Blood Monocytes and Alveolar Macrophages. *The Journal of Immunology*, 179(6), 3488–3494. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3488>
- Landsman, L., Liat, B. O., Zerneck, A., Kim, K. W., Krauthgamer, R., Shagdarsuren, E., Lira, S. A., Weissman, I. L., Weber, C., & Jung, S. (2009). CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*, 113(4), 963–972. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170787>
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., & Merad, M. (2015). Regulation of macrophage

- development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 731–744. <https://doi.org/10.1038/nri3920>
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., & Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*, 159(6), 1312–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>
- Lee, M., Lee, Y., Song, J., Lee, J., & Chang, S.-Y. (2018). Chemokine (C-X3-C Motif) Ligand 1 (Cx3CL1) and Chemokine (C-X3-C Motif) Receptor 1 (Cx3CR1). *Immune Network*, 18(1), 1–19.
- Lehnert, B. E., Valdez, Y. E., & Holland, L. M. (1985). Pulmonary macrophages: alveolar and interstitial populations. *Experimental Lung Research*, 9(3–4), 177–190.
- Machiels, B., Dourcy, M., Xiao, X., Javaux, J., Mesnil, C., Sabatel, C., Desmecht, D., Lallemand, F., Martinive, P., Hammad, H., Guillemins, M., Dewals, B., Vanderplasschen, A., Lambrecht, B. N., Bureau, F., & Gillet, L. (2017). A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nature Immunology*, 18(12), 1310–1320. <https://doi.org/10.1038/ni.3857>
- Marichal, T., Starkl, P., Reber, L. L., Kalesnikoff, J., Oettgen, H. C., Tsai, M., Metz, M., & Galli, S. J. (2013). A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. *Immunity*, 39(5), 963–975. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.005>
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Mathie, S. A., Dixon, K. L., Walker, S. A., Tyrrell, V., Mondhe, M., O'Donnell, V. B., Gregory, L. G., & Lloyd, C. M. (2015). Alveolar macrophages are sentinels of murine pulmonary homeostasis following inhaled antigen challenge. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(1), 80–89. <https://doi.org/10.1111/all.12536>
- Mazzini, E., Massimiliano, L., Penna, G., & Rescigno, M. (2014). Oral Tolerance Can Be Established via Gap Junction Transfer of Fed Antigens from CX3CR1+ Macrophages to CD103+ Dendritic Cells. *Immunity*, 40(2), 248–261. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.012>
- McCubbrey, A. L., Allison, K. C., Lee-Sherick, A. B., Jakubzick, C. V., & Janssen, W. J. (2017). Promoter specificity and efficacy in conditional and inducible transgenic targeting of lung macrophages. *Frontiers in Immunology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01618>
- Meitei, H. T., & Lal, G. (2023). T cell receptor signaling in the differentiation and plasticity of CD4+ T cells. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 69(August 2022), 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.08.001>
- Melgert, B. N., Oriss, T. B., Qi, Z., Dixon-McCarthy, B., Geerlings, M., Hylkema, M. N., & Ray, A. (2010). Macrophages: Regulators of sex differences in asthma? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(5), 595–603. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0016OC>
- Metchnikoff, E. (1892). Leçons sur la Pathologie Comparée de l'inflammation faites à l'Institut Pasteur en Avril et mai 1891. *G. Masson Libraire de l'académie de Médecine*.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., & Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), 6991–6995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6991>

- Miller, L., & Hunt, J. S. (1996). Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sciences*, 59(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00122-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00122-1)
- Miller, M. J., Hejazi, A. S., Wei, S. H., Cahalan, M. D., & Parker, I. (2004). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(4), 998–1003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306407101>
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Misharin, A. V., Cuda, C. M., Saber, R., Turner, J. D., Gierut, A. K., Kenneth Haines, G. K., Berdnikovs, S., Filer, A., Clark, A. R., Buckley, C. D., Mutlu, G. M., Scott Budinger, G. R., & Perlman, H. (2014). Nonclassical Ly6C<sup>+</sup> monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell Reports*, 9(2), 591–604. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.032>
- Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S. S., & Perlman, H. (2013). Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(4), 503–510. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0086MA>
- Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P. K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A. R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., Rodewald, H.-R. R., Rosenthal, N. A., Bajenoff, M., Prinz, M., Jung, S., & Sieweke, M. H. (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(11), 2151–2158. <https://doi.org/10.1084/jem.20140639>
- Muntjewerff, E. M., Meesters, L. D., & van den Bogaart, G. (2020). Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 11(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01276>
- Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C. L., & Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nature Immunology*, 10(11), 1178–1184. <https://doi.org/10.1038/ni.1791>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Naito, M., Takahashi, K., & Nishikawa, S. I. (1990). Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. *Journal of Leukocyte Biology*, 48(1), 27–37. <https://doi.org/10.1002/jlb.48.1.27>
- Naito, Makoto, Umeda, S., Yamamoto, T., Moriyama, H., Umezu, H., Hasegawa, G., Usuda, H., Shultz, L. D., & Takahashi, K. (1996). Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(2), 133–138. <https://doi.org/10.1002/jlb.59.2.133>
- Okada, T., Miller, M. J., Parker, I., Krummel, M. F., Neighbors, M., Hartley, S. B., O’Garra, A., Cahalan, M. D., & Cyster, J. G. (2005). Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biology*, 3(6), 1047–1061. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030150>
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M. A., Ohteki, T., Jarrossay, D., & Manz, M. G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nature Immunology*, 8(11), 1207–

1216. <https://doi.org/10.1038/ni1518>
- Park, M. D., Silvin, A., Ginhoux, F., & Merad, M. (2022). Macrophages in health and disease. *Cell*, *185*(23), 4259–4279. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.10.007>
- Perdiguerro, E. G., & Geissmann, F. (2016). The development and maintenance of resident macrophages. In *Nature Immunology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 2–8). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni.3341>
- Pugliese, S. C., Kumar, S., Janssen, W. J., Graham, B. B., Frid, M. G., Riddle, S. R., El Kasmi, K. C., & Stenmark, K. R. (2017). A Time- and Compartment-Specific Activation of Lung Macrophages in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *198*(12), 4802–4812. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601692>
- Qi, H., Kastenmüller, W., & Germain, R. N. (2014). Spatiotemporal basis of innate and adaptive immunity in secondary lymphoid tissue. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *30*(1), 141–167. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013254>
- Quah, B. J. C., Warren, H. S., & Parish, C. R. (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*, *2*(9), 2049–2056. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.296>
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N., & Forsthuber, T. G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, *74*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
- Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., Turner, S. J., Godfrey, D. I., & McCluskey, J. (2015). T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual Review of Immunology*, *33*(December), 169–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112334>
- Roy, S. R., Schiltz, A. M., Marotta, A., Shen, Y., & Liu, A. H. (2003). Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J Allergy Clin Immunol*, *112*(3), 571–578.
- Ruterbusch, M., Pruner, K. B., Shehata, L., & Pepper, M. (2020). In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annual Review of Immunology*, *38*, 705–725. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-103019-085803>
- Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirottin, D., Xiao, X., Quatresooz, P., Sirard, J.-C. C., Cataldo, D., Gillet, L., Bouabe, H., Desmet, C. J., Ginhoux, F., Marichal, T., & Bureau, F. (2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity*, *46*(3), 457–473. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.016>
- Schenkel, J. M., & Masopust, D. (2014). Tissue-resident memory T cells. *Immunity*, *41*(6), 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.007>
- Schreiber, H. A., Loschko, J., Karssemeijer, R. A., Escolano, A., Meredith, M. M., Mucida, D., Guermontprez, P., & Nussenzweig, M. C. (2013). Intestinal monocytes and macrophages are required for T cell polarization in response to *Citrobacter rodentium*. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(10), 2025–2039. <https://doi.org/10.1084/jem.20130903>
- Schulz, C., Perdiguerro, E. G., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E. W., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., & Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science*, *335*(6077), 86–90. <https://doi.org/10.1126/science.1219179>
- Schyns, J., Bai, Q., Ruscitti, C., Radermecker, C., De Schepper, S., Chakarov, S., Farnir, F.,

- Pirottin, D., Ginhoux, F., Boeckxstaens, G., Bureau, F., & Marichal, T. (2019). Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11843-0>
- Sebring, R. J., & Lehnert, B. E. (1992). Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes. *Experimental Lung Research*, *18*(4), 479–496.
- Serbina, N. V., & Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, *7*(3), 311–317. <https://doi.org/10.1038/ni1309>
- Sheng, J., Ruedl, C., & Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*, *43*(2), 382–393. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.016>
- Sichien, D., Lambrecht, B. N., Williams, M., & Scott, C. L. (2017). Development of conventional dendritic cells: From common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal Immunology*, *10*(4), 831–844. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.8>
- Soroosh, P., Doherty, T. A., Duan, W., Mehta, A. K., Choi, H., Adams, Y. F., Mikulski, Z., Khorram, N., Rosenthal, P., Broide, D. H., & Croft, M. (2013). Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(4), 775–788. <https://doi.org/10.1084/jem.20121849>
- Stebegg, M., Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., & Graca, L. (2018). Regulation of the germinal center response. *Frontiers in Immunology*, *9*(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, *137*(5), 1142–1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- Steinman, & Witmer. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *75*(10), 5132–5136. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.10.5132>
- Strickland, D., Kees, U. R., & Holt, P. G. (1996). Regulation of T-cell activation in the lung: Alveolar macrophages induce reversible T-cell anergy in vitro associated with inhibition of interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunology*, *87*(2), 250–258. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1996.459542.x>
- Suzuki, K., Grigorova, I., Phan, T. G., Kelly, L. M., & Cyster, J. G. (2009). Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(7), 1485–1493. <https://doi.org/10.1084/jem.20090209>
- Suzuki, T., Arumugam, P., Sakagami, T., Lachmann, N., Chalk, C., Sallase, A., Abe, S., Trapnell, C., Carey, B., Moritz, T., Malik, P., Lutzko, C., Wood, R. E., & Trapnell, B. C. (2014). Pulmonary macrophage transplantation therapy. *Nature*, *514*(7253), 450–454. <https://doi.org/10.1038/nature13807>
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R. H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T. R., Libby, P., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, *325*(5940), 612–616. <https://doi.org/10.1126/science.1175202>

- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, *100*(6), 655–669. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80702-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80702-3)
- T'Jonck, W., Guilliams, M., & Bonnardel, J. (2018). Niche signals and transcription factors involved in tissue-resident macrophage development. *Cellular Immunology*, *330*(February), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.005>
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., MontananaSanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B., Henri, S., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., ... Henri, S. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, *39*(5), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>
- Tan, S. Y. S. S., & Krasnow, M. A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development*, *143*(8), 1318–1327. <https://doi.org/10.1242/dev.129122>
- Tang, X. Z., Kreuk, L. S. M., Cho, C., Metzger, R. J., & Allen, C. D. C. (2022). Bronchus-associated macrophages efficiently capture and present soluble inhaled antigens and are capable of local Th2 cell activation. *ELife*, *11*, 1–36. <https://doi.org/10.7554/eLife.63296>
- Tavian, M., & Péault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *International Journal of Developmental Biology*, *49*(2-3 SPEC. ISS.), 243–250. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041957mt>
- Thepen, B. T., Rooijen, N. V. A. N., & Kraal, G. (1989). *Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice*. *170*(August).
- Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C. C., & Hanna, R. N. (2015). Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*(6), 1306–1316. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304650>
- Toussaint, M., Fievez, L., Drion, P.-V. V., Cataldo, D., Bureau, F., Lekeux, P., & Desmet, C. J. (2013). Myeloid hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  prevents airway allergy in mice through macrophage-mediated immunoregulation. *Mucosal Immunology*, *6*(3), 485–497. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.88>
- Trzebanski, S., & Jung, S. (2020). Plasticity of monocyte development and monocyte fates. *Immunology Letters*, *227*(July), 66–78. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.07.007>
- Trzebanski, S., Kim, J., Larossi, N., & Kancheva, D. (2023). Murine classical monocyte subsets display distinct functions and fates. *BioRxiv*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2023.07.29.551083>
- Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R. M., & Mellman, I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, *288*(5465), 522–527. <https://doi.org/10.1126/science.288.5465.522>
- Underhill, D. M., Bassetti, M., Rudensky, A., & Aderem, A. (1999). Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *Journal of Experimental Medicine*, *190*(12), 1909–1914. <https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1909>
- Upham, J. W., Strickland, D. H., Bilyk, N., Robinson, B. W., & Holt, P. G. (1995). Alveolar macrophages from humans and rodents selectively inhibit T-cell proliferation but permit T-cell activation and cytokine secretion. *Immunology*, *84*(1), 142–147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534261>
- Ural, B. B., Yeung, S. T., Damani-Yokota, P., Devlin, J. C., de Vries, M., Vera-Licona, P., Samji, T., Sawai, C. M., Jang, G., Perez, O. A., Pham, Q., Maher, L., Loke, P., Dittmann, M.,



- Reizis, B., & Khanna, K. M. (2020). Identification of a nerve-associated, lung-resident interstitial macrophage subset with distinct localization and immunoregulatory properties. *Science Immunology*, 5(45). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aax8756>
- Valstar, D. L., Schijf, M. A., Nijkamp, F. P., Storm, G., Arts, J. H. E., Kuper, C. F., Bloksma, N., & Henricks, P. A. J. (2006). Alveolar macrophages have a dual role in a rat model for trimellitic anhydride-induced occupational asthma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 211(1), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.012>
- 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., & Guilliams, M. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, 44(4), 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.017>
- van Furth, R., & 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., & Langevoort, H. L. (1972). Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line. *Bulletin of the World Health Organization*, 47(5), 651–658.
- van Oud Alblas, A., van der Linden-Schrever, B., & van Furth, R. (1981). Origin and kinetics of pulmonary macrophages during an inflammatory reaction induced by intravenous administration of heat-killed bacillus Calmette-Guérin. *The Journal of Experimental Medicine*, 154(2), 235–252.
- Vanneste, D., Bai, Q., Hasan, S., Peng, W., Pirottin, D., Schyns, J., Maréchal, P., Ruscitti, C., Meunier, M., Liu, Z., Legrand, C., Fievez, L., Ginhoux, F., Radermecker, C., Bureau, F., & Marichal, T. (2023). MafB-restricted local monocyte proliferation precedes lung interstitial macrophage differentiation. *Nature Immunology*, 24(5), 827–840. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01468-3>
- Victoria, G. D., Schwickert, T. A., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M. L., & Nussenzweig, M. C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, 143(4), 592–605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.032>
- Villani, A., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Lazo, S., Jardine, L., Dixon, D., Stephenson, E., & Nilsson, E. (2017). *Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes and progenitors*. 356(6335), 1–31. <https://doi.org/10.1126/science.aah4573>. Single-cell
- Von Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature Reviews Immunology*, 3(11), 867–878. <https://doi.org/10.1038/nri1222>
- Widmann, J., & Fahimi, H. D. (1975). Proliferation of mononuclear phagocyte (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. *The American Journal of Pathology*, 80(2), 349–360.
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. In *Nature* (Vol. 496, Issue 7446, pp. 445–455). Nature. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Yamane, H., & Paul, W. E. (2013). Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4+ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunological Reviews*, 252(1), 12–23. <https://doi.org/10.1111/imr.12032>
- Yáñez, A., Coetzee, S. G., Olsson, A., Muench, D. E., Berman, B. P., Hazelett, D. J., Salomonis, N., Grimes, H. L., & Goodridge, H. S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and

- Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity*, 47(5), 890-902.e4.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.021>
- Yona, S., & Gordon, S. (2015). From the Reticuloendothelial to Mononuclear Phagocyte System - The Unaccounted Years. *Frontiers in Immunology*, 6(JUL), 328.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00328>
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Williams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Yu, Y.-R. R. A., Hotten, D. F., Malakhau, Y., Volker, E., Ghio, A. J., Noble, P. W., Kraft, M., Hollingsworth, J. W., Gunn, M. D., & Tighe, R. M. (2016). Flow cytometric analysis of myeloid cells in human blood, bronchoalveolar lavage, and lung tissues. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(1), 13–24.  
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0146OC>
- Zastona, Z., Przybranowski, S., Wilke, C., van Rooijen, N., Teitz-Tennenbaum, S., Osterholzer, J. J., Wilkinson, J. E., Moore, B. B., & Peters-Golden, M. (2014). Resident Alveolar Macrophages Suppress, whereas Recruited Monocytes Promote, Allergic Lung Inflammation in Murine Models of Asthma. *The Journal of Immunology*, 193(8), 4245–4253. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400580>
- Zaynagetdinov, R., Sherrill, T. P., Kendall, P. L., Segal, B. H., Weller, K. P., Tighe, R. M., & Blackwell, T. S. (2013). Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(2), 180–189.  
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0366MA>
- Zheng, W., & Flavell, R. A. (1997). The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell*, 89(1), 587–596.  
[https://doi.org/doi:10.1016/s0092-8674\(00\)80240-8](https://doi.org/doi:10.1016/s0092-8674(00)80240-8)
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells : fates , functions , and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154.BLOOD>