

Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale HOB ED561 « Hématologie, Oncologie et Biothérapies »
INSERM UMRS 1160 « Alloimmunité – Autoimmunité – Transplantation »

Identification et caractérisation de sous-populations monocytaires circulantes chez l'homme

Par Shannon Cohen

Thèse de doctorat d'Immunologie et d'Hématologie

Dirigée par Alain Haziot

Présentée et soutenue publiquement à l'hôpital Saint-Louis à Paris, le 19 Octobre 2018

Présidente du jury :	Pr Marie-Reine Losser	Université de Lorraine
Rapporteurs :	Dr Géraldine Schlecht-Louf	Université Paris-Sud
	Dr Elise Chiffolleau	Université de Nantes
Examinatrice :	Dr Stephane Potteaux	Université Paris Descartes - Paris 5
Membre invité :	Pr Dominique Charron	Université Paris Diderot - Paris 7
Directeur de thèse :	Dr Alain Haziot	Université Paris Diderot - Paris 7

RESUME

Identification et caractérisation de sous-populations monocytaires circulantes chez l'homme

Les monocytes sont des leucocytes circulants, précurseurs de cellules dendritiques et de macrophages, dont le phénotype est hétérogène. L'association entre les sous-populations de monocytes humains décrites dans la littérature et les fonctions dans la réponse immunitaire reste difficile.

Les différentes populations de monocytes humains sont classées en fonction de l'expression de molécules de surface CD14 et CD16. Trois populations ont ainsi été identifiées : les monocytes classiques CD14⁺ CD16^{neg}, les monocytes non-classiques CD14^{dim} CD16⁺ et les monocytes intermédiaires CD14⁺ CD16⁺. Les fonctions attribuées à ces populations sont diverses et enchevêtrées. En particulier, les propriétés pro- et anti-inflammatoires associées à ces populations de cellules sont redondantes et conflictuelles suivant les auteurs. En situation inflammatoire, l'augmentation de la fraction de monocytes CD16⁺ suggère leur implication dans le développement et/ou dans l'amplification de l'inflammation.

L'objectif de cette thèse porte sur une meilleure définition des populations monocytaires afin de pouvoir les subdiviser en sous-populations dont les fonctions seraient mieux définies. Ce travail s'est inscrit dans un projet à long terme du laboratoire visant à l'analyse phénotypique aussi exhaustive que possible des monocytes, utilisant les outils d'analyses biologiques et informatiques actuels. Cela a permis de mettre en évidence l'existence d'une population de monocytes de plus grande taille. Ces « large » monocytes se subdivisent en populations CD16^{neg} et CD16⁺ (respectivement nommées la14⁺16^{neg} et la14⁺16⁺). Les monocytes communément analysés, de taille plus petite ou « small », se subdivisent comme attendu en trois sous-populations identifiées ici comme monocytes sm14⁺16^{neg} largement majoritaire, sm14^{dim}16⁺ et sm14⁺16⁺.

Dans ce cadre, j'ai initialement effectué une analyse transcriptomique sur les cinq populations de monocytes nouvellement identifiées, purifiées à partir de PBMC de trois donneurs sains. Les résultats obtenus permettent d'associer l'expression de certains facteurs de transcriptions aux

sous-populations de monocytes, facilitant l'identification de ces cellules quand l'analyse des molécules de surface n'est pas possible.

Afin d'identifier des populations fonctionnelles, les monocytes des cinq sous-populations de monocytes ont été purifiées et différenciées en cellules dendritiques MoDC, puis leur capacité à polariser des lymphocytes T allogéniques a été étudiée. Au sein du laboratoire, une étude corrélative entre les niveaux de cytokines produites par les lymphocytes T activés et le phénotype des monocytes à l'origine des MoDC a indiqué que l'expression de CD43 et CD49d au sein des $sm14^+16^+$ était fortement corrélée à la production d'IL-4. Par purifications et analyses itératives des corrélations entre l'expression de CD43 et CD49d et la production d'IL-4, j'ai identifié et purifié à quasi-homogénéité une population de monocytes circulants induisant exclusivement et fortement une polarisation des lymphocytes T vers la voie Th2. Ces résultats valident l'approche visant à une meilleure définition des sous-populations de monocytes et montrent l'existence de monocytes aux fonctions immunes prédéfinies dès le stade circulant.

Dans le but de caractériser les différences morphologiques entre les différentes populations de monocytes identifiées, j'ai effectué des analyses par cytométrie en image, mettant en évidence des associations spontanées entre certaines sous-populations de monocytes et les plaquettes à l'état basal. Ainsi, alors que les monocytes $sm14^+16^+$ et $sm14^{dim}16^+$ ne sont que rarement associés aux plaquettes, une moitié des $sm14^+16^{neg}$ est associée à 1-2 plaquettes, alors que les $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^+$ sont liés à 2-4 plaquettes en moyenne. Les différences morphologiques observées en cytométrie en flux classique pourraient s'expliquer par ces interactions préférentielles avec des plaquettes, modifiant ainsi leur taille apparente observée via cette technique. Un modèle d'étude a été mis au point, permettant d'étudier les fonctions d'adhérence à l'endothélium d'une même population de monocytes avec ou sans association avec les plaquettes. Les résultats ont permis de démontrer que l'association à des plaquettes permettait aux monocytes $sm14^+16^{neg}$ d'adhérer plus efficacement à l'endothélium. L'association des « large » monocytes avec des plaquettes ne modifie pas leur capacité d'adhérence aux cellules endothéliales. Ainsi, ces interactions préférentielles avec les plaquettes semblent intervenir de manière diverse dans les fonctions d'adhésion des sous-populations de monocytes mettant en lumière les différences fonctionnelles des nouvelles populations définies.

Enfin, l'analyse des phénotypes de monocytes circulants en situation pathologique a été effectuée chez des grands brûlés. Ces patients ont une susceptibilité accrue à l'infection due, entre autres, à des réponses immunitaires innées déficientes. Les résultats obtenus chez 18 patients prélevés à l'admission et à 7 et 28 jours plus tard permettent d'identifier différents profils de modifications phénotypiques des monocytes et leur évolution en fonction de l'état clinique. Cette étude a également permis de mettre en évidence l'existence d'une population de cellules à forte granulosité, amplifiée de façon importante chez les patients et dont les fonctions sont en cours d'analyse.

Mots clefs : monocytes, sous-populations, dérivé de monocytes, cellules dendritiques, polarisation T, agrégat monocyte-plaquette, grands brûlés.

Identification and characterization of circulating monocytes subsets in human

Monocytes are circulating leucocytes, precursors of dendritic cells and macrophages, whose phenotype is heterogeneous. The association between human monocyte subsets described in the literature and the functions in the immune response remains difficult.

The different populations of human monocytes are classified according to the expression of surface markers CD14 and CD16. Three populations have thus been identified: the classical monocytes CD14⁺ CD16^{neg}, the non-classical monocytes CD14^{dim} CD16⁺ and the intermediate monocytes CD14⁺ CD16⁺. The functions assigned to these populations are diverse and entangled. In particular, the pro- and anti-inflammatory properties associated with these populations are redundant and conflicting depending on the authors. In an inflammatory situation, the increase of the CD16⁺ monocyte fraction suggests their involvement in the development and/or the amplification of inflammation.

The aim of this thesis is to improve the definition of monocytes populations so that they can be subdivided into subpopulations whose functions are better defined. This work was part of a long-term laboratory project which has the goal to the most comprehensive phenotypic analysis of monocytes, using current biological and computer analysis tools. This highlighted to demonstrate the existence of a larger monocyte population. These "large" monocytes are subdivided into CD16^{neg} and CD16⁺ populations (respectively named la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺). Monocytes commonly analyzed, of smaller size or "small", are subdivided as expected in three subpopulations identified here as monocytes sm14⁺16^{neg} largely in the majority, sm14^{dim}16⁺ and sm14⁺16⁺.

In this context, I initially performed a transcriptomic analysis on the five populations of newly identified monocytes, purified from PBMCs from three healthy donors. The results obtained have led to the association of the expression of transcription factors with subsets of monocytes, facilitating the identification of these cells when the analysis of the surface markers is not possible.

In order to identify functional populations, the monocytes of the five monocyte subsets were purified and differentiated into MoDC dendritic cells, and their ability to polarize allogeneic T cells was analyzed. In the laboratory, a correlative study between cytokine levels produced by activated T cells and the phenotype of monocytes whose MoDCs are derived highlighted that the expression

of CD43 and CD49d in sm14⁺16⁺ was highly correlated to the production of IL-4. By iterative isolations and analyzes of the correlations between the expression of CD43 and CD49d and the production of IL-4, I identified and purified with an almost homogeneous population of circulating monocytes inducing exclusively and strongly a polarization of the T lymphocytes to Th2. These results validate the approach for a better definition of monocyte subpopulations and show the existence of monocytes with pre-defined immune functions as early as the circulating stage.

In order to characterize the morphological differences between the different monocyte subsets identified, I performed image cytometry analyzes, highlighting spontaneous associations between certain monocyte subpopulations and platelets in the basal state. Thus, while sm14⁺16⁺ and sm14^{dim}16⁺ monocytes are hardly associated with platelets, a half of sm14⁺16^{neg} is associated with 1-2 platelets, whereas la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺ are associated with 2-4 platelets on average. The morphological differences observed in conventional flow cytometry could be explained by these preferential interactions with platelets, modifying their apparent size observed via this technique. A model was developed to study the adhesion of a monocyte population with or without platelet association to the endothelium. These results demonstrated that association with platelets allowed sm14⁺16^{neg} monocytes to adhere more efficiently to the endothelium. The association of "large" monocytes with platelets does not alter their ability to adhere to endothelial cells. Thus, these preferential interactions with platelets seem to be involved in various ways in the adhesion functions of monocyte subsets, highlighting the functional differences of the new defined populations.

Finally, the analysis of the phenotypes of circulating monocytes in pathological situation was conducted in burn victims. These patients have an increased susceptibility to infection due, among other things, to deficient innate immune responses. These results obtained in 18 patients taken at admission and at 7 and 28 days later permitted to identify different phenotypic modification profiles of monocytes and their evolution depending on the clinical state. This study has also highlighted the existence of a population of cells with high granularity, greatly amplified in patients and whose functions are being analyzed.

Keywords: monocytes, subsets, monocytes-derived, dendritic cells, T cells polarization, monocyte-platelet aggregates, burns.

*A mes parents, mes frères, mes belles-sœurs, mes neveux
et nièces, ma famille et mes amis, qui m'ont soutenu et
ont montré à maintes reprises leur fierté à mon égard,
je vous dédie ce travail.*

Loi de Hofstadter

« Il faut toujours plus de temps que prévu, même en tenant compte de la Loi de Hofstadter »

REMERCIEMENTS

Un grand moment de soulagement au jour où j'écris ces remerciements, puisque cela signifie que je viens de mettre le point final à ce manuscrit. C'est également la partie la plus compliquée à écrire de ma thèse, car je risque beaucoup si j'oublie une personne.

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Dominique Charron qui me fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de soutenance de thèse. Mes remerciements s'adressent également au Dr Géraldine Schlecht-Louf et au Dr Elise Chiffolleau qui ont accepté la lourde tâche d'être rapporteurs, ainsi qu'au Pr Marie-Reine Lossier et au Dr Stéphane Potteaux d'avoir accepté d'être examinatrices de ma thèse. Je vous exprime toute ma gratitude pour tout l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail.

Je remercie également le Pr Antoine Toubert de m'avoir accueilli au sein du laboratoire, et ce depuis mon Master 1. Cette opportunité m'a permis aujourd'hui de présenter cette thèse et je vous en suis très reconnaissant.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux au Dr Alain Haziot, qui a été mon directeur de thèse. Vous avez toujours été présent et extrêmement impliqué dans ce travail, vous avez su m'épauler à la fois au niveau expérimental et rédactionnel dans le cadre de la thèse, mais aussi personnellement, que ce soit au sujet de mon avenir ou simplement en me donnant d'innombrables conseils pour mieux aborder toutes les facettes de mon travail, et aussi pour l'après-thèse. Vous m'avez permis de repérer les choses que je pouvais améliorer et vous m'avez fait grandir durant toutes ces années. Je vous suis très reconnaissant pour tout ce que vous m'avez apporté, votre présence, votre gentillesse et votre esprit.

Un très grand merci au Dr Nuala Mooney, de m'avoir également apporté son soutien au cours de ma thèse et pour sa bonne humeur. Nos interactions étaient toujours très agréables et ton aide a été extrêmement précieuse durant ces années. C'est également un grand plaisir de continuer à travailler avec toi en espérant arriver à de beaux résultats lors de ce nouveau projet.

Merci beaucoup à tous les membres de l'unité 1160 avec qui j'ai pu interagir, qui ont (quasi) toujours été bienveillant à mon égard et n'ont pas hésité à m'apporter leur aide, quand cela était nécessaire (et même quand cela ne l'était pas). Ils ont su créer un environnement convivial, chaleureux et épanouissant auquel j'ai eu la chance d'appartenir durant ces 6 années maintenant, si l'on compte le M1 et le M2. Je remercie donc Emmanuel, Guylaine, Catherine, Meriem, Isabelle, Tristan, Dina, Valérie, Marie, Maria, Itawa, Pierre, Louise, Célia, Alexandra, Anne, Hugo, Wahid, Ryad, Marie-Christine, Salima et Patricia pour leur amitié. Merci à Saoussen d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse. Un remerciement particulier à Corinne, entre autres pour son excellente formation à la qRT-PCR, qui m'a permis d'obtenir mes résultats dès le premier essai (assez rare en science pour le noter). Je remercie aussi Alain Savennay pour ses conseils et son aide

précieuse quant à la réalisation de mes ELISA et vers qui je me tournais au moindre souci, comme lorsque ma gamme ne voulait pas virer au bleu. Merci également à Nicolas qui m'a formé en cytométrie durant mon master et qui m'a apporté les bases (et plus encore) me permettant aujourd'hui d'avoir la rigueur suffisante pour analyser des expériences 8-couleurs sans problème. Je remercie Hélène et Laurence pour leur aide sur toute la partie des grands brûlés, me permettant d'obtenir mes échantillons à temps ainsi que toutes les données cliniques sur les patients. Des remerciements tout particuliers à Zohra, dont les discussions sont toujours très intéressantes et ta maîtrise de l'histoire reste exemplaire. Merci pour ton soutien constant, ta bonne humeur qui égaye tout l'institut et pour toute l'aide que tu as pu m'apporter. Je tiens à remercier également les membres de la plateforme de l'IUH, Nicolas, Christelle et Sophie pour leur aide et leur soutien continue qui m'ont permis de mener à bien mes expériences et dans les meilleures conditions possibles.

Un immense merci à toute la team Nuala ! Pour leur aide immense que chacun d'entre eux a su m'apporter à sa manière, que ce soit pour des questions ponctuelles, de la préparation de cellules endothéliales pour mes cocultures, de l'aide quand j'avais besoin de me dédoubler pour certaines manips et aussi pour toutes nos discussions sur des sujets très diverses, allant du goût potentiel du RPMI jusqu'aux tentatives de spoil des films Marvel et de Game of Thrones. A Julien, qui côtoie l'unité depuis autant de temps voir plus que moi-même et qui visiblement devrait changer de stratégie s'il souhaite vraiment démotiver les M2 à poursuivre en thèse. A Karine qui m'a beaucoup aidé sur le traitement des échantillons des brûlés, mais aussi pour les commandes de l'équipe et sa bonne humeur. A marine A., qui s'approche de plus en plus d'IW. A Manel, merci encore d'avoir réussi à me trouver de la carboglace un jour férié. A Lara, Stéphanie et Maureen qui partagent mon bureau et participent à cette ambiance de travail agréable, sans oublier Maud et Marine. Un très grand merci à Amy pour tous ces bons moments partagés, dans le cadre du travail mais aussi hors du laboratoire, que ce soit pour les moments passés à Meisia et ailleurs, pour le nouveau pallier que tu as pu atteindre et bien sûr je te souhaite bon courage pour ta thèse également, où l'on pourra s'appeler « docteur » mutuellement (et je pense à chaque fois que l'on se croisera). Je remercie enfin Fadila, qui a partagé avec moi (et d'autres) sa passion de la science et qui m'a appris beaucoup, toujours disponible pour toutes mes interrogations et surtout pour avoir réalisé ta thèse juste avant moi, ce qui m'aide beaucoup également.

Je remercie aussi tous ceux qui n'ont été que de passage à l'institut mais qui ont participé directement ou indirectement à l'élaboration de cette thèse. A Mathias, le premier étudiant que j'ai encadré, je n'ai que de bons souvenirs de ton M1 à l'IUH et j'espère que toi également. Bon courage pour la fin de ta thèse. A Vincent, qui n'arrive pas à abandonner le laboratoire malgré la distance, je te souhaite une grande réussite dans tes études et merci pour ton aide lors mes nombreux questionnements (on se souviendra de mon fameux tri où j'ai utilisé différents anticorps du même fluorochrome). J'espère également tu arriveras à jongler entre tes révisions et tes nombreux autres hobbies. A Margaux, je te souhaite de t'épanouir dans ton nouveau travail et merci

pour les pauses café. A Safa, qui a partagé pendant 6 mois mon amour des monocytes, je te souhaite de vivre ta thèse sereinement et avec beaucoup de réussite.

Je remercie tous ceux qui me sont chers, sans qui cette thèse aurait pu se terminer un an plus tôt. A Mickaël et Noémie, ainsi qu'un 3^{ème} nouveau membre de votre famille en bonne santé lorsque je soutiendrais. Je sais qu'il sera entre de bonnes mains, entre autres car son père aura toujours un œil sur lui, même pendant la nuit. Aux vues de vos hobbies, il fera sûrement des gateaux en forme de dinosaures. A Yoann, qui nous accueille souvent dans son récent appartement qu'il a gaiement décoré de manière « cosy ». A Adrien, qui m'a beaucoup aidé, notamment en relisant ma thèse. Merci pour les souvenirs que tu nous rapportes de Piffonds/Troie et je te souhaite de me rattraper sur DBL. Nous avons passé de très bon moment ensemble, ce qui a aidé au fait que ces 4 années soient aussi agréables que possible. Un grand merci à Coraline, qui a accepté de relire ma thèse, et qui a toujours été présente. Nos discussions peuvent parfois dériver de beaucoup, mais c'est ce que j'apprécie également. A Liilo, même si on ne se parle pas souvent, je sais que l'on restera ami pour encore de nombreuses années. On ressassera nos nombreux souvenirs, parfois délirants, dans les années qui suivent, notamment devant KFP. A Tram, j'espère que tu t'épanouiras et te plairas en suisse pour la suite. A Emilie, qui apparemment pourrait ressembler à une parfaite épouse. A Niels, le plus gentil des « meujeu ». A Hugo, je n'oublie pas ta drôle d'addiction aux fruits rouges. A Jessica, malgré le temps que sépare chacune de nos rencontres. Merci de m'avoir soutenu, chacun à votre manière, et je remercie également tout ceux que je n'ai pas pu citer mais que je n'oublie pas.

Je tiens bien évidemment à remercier toute ma famille, mon grand-père, mes oncles, mes tantes et mes cousins (que je ne peux citer afin de limiter un peu la taille de ces remerciements), mes belles-sœurs Florence, Ilanit, Cécile et Rachel, mes frères Mike, David, Lyor et Elliot, mes neveux Chelsea, Colleen, Terry, Yaron, Niv, Nily, Liam, Lily et Mila et bien sûr à mes parents qui m'ont toujours soutenu moralement et physiquement, qui m'ont accompagné tout au long de cette aventure, qui sont fiers et qui m'ont apporté énormément de joie et de bonheur pendant toutes ces années. Merci d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir poussé à atteindre mon but.

L'accomplissement de cette thèse a donc été le fruit de beaucoup de travail mais également de beaucoup de rencontre et du soutien de tout mon entourage, et je vous remercie tous très sincèrement pour tout.

TABLE DES MATIERES

Résumé-----	2
Remerciements-----	8
Table des illustrations-----	13
Liste des abréviations-----	14
A. Introduction-----	17
1. Les monocytes humains-----	17
1.1. Généralités-----	17
1.2. Hématopoïèse-----	18
1.3. Définitions actuelles des populations de monocytes-----	24
1.4. Fonctions associées aux sous-populations de monocytes-----	28
1.4.1. Monocytes classiques-----	28
1.4.2. Monocytes non-classiques-----	33
1.4.3. Monocytes intermédiaires-----	37
1.5. Les monocytes murins-----	41
1.5.1. Définitions actuelles des populations de monocytes murins-----	42
1.5.2. Fonctions associées aux sous-populations-----	42
1.5.3. Comparaison avec les monocytes humains-----	44
2. Différenciation des monocytes en cellules effectrices : cellules dendritiques, macrophages et monocytes activés-----	46
2.1. Les cellules dendritiques-----	46
2.1.1. Généralités-----	46
2.1.2. Les différentes populations de cellules dendritiques-----	47
2.1.3. Les cellules dendritiques issues de monocytes-----	53
2.1.4. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques-----	54
2.2. Macrophages-----	59
2.3. Monocytes activés-----	63
3. Les monocytes en situation inflammatoire : les grands brûlés-----	65
3.1. Définition et atteinte systémique-----	65
3.2. Réponse inflammatoire-----	67
3.3. Autres pathologies-----	70

4. Monocytes et plaquettes -----	72
4.1. Plaquettes-----	72
4.2. Complexes monocytes-plaquettes -----	76
4.2.1. Complexes physiologiques -----	76
4.2.2. Complexes inflammatoires -----	77
B. Projet scientifique-----	79
C. Résultats -----	82
Article 1 -----	82
Article 2 -----	141
Article 3 -----	169
Résultats – Les Grands Brûlés-----	201
D. Discussion et perspectives -----	222
E. Bibliographie -----	228
F. Annexe-----	255

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Principaux facteurs de transcription régulant la différenciation hématopoïétique. -----	21
Figure 2. Les différentes étapes de l'hématopoïèse permettant la production de monocytes. -----	23
Figure 3. Profil d'expression CD14/CD16 des sous-populations monocytaires humaines selon Passlick et coll. -----	26
Figure 4. Les sous-populations monocytaires en fonction de l'expression du CD14 et du CD16. -----	27
Figure 5. Les différentes stratégies de sélection des monocytes intermédiaires et non-classiques -----	41
Figure 6. Comparaison des sous-populations monocytaires chez la souris et chez l'homme. -----	45
Figure 7. Molécules de surface exprimées par différentes sous-populations de cellules dendritiques chez l'homme et chez la souris. -----	51
Figure 8. Les interactions entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigènes ou la synapse immunologique. -----	56
Figure 9. Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ après activation par une cellule dendritique. -----	59
Figure 10. Phénotype des sous-populations de macrophages M1 et M2. -----	62
Figure 11. Illustration des zones observables suite à une brûlure. -----	65
Figure 12. Rôle des plaquettes dans le recrutement de leucocytes. -----	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

18S	ARN ribosomal 18S
ACTB	Actine bêta
APC/APC-H7	Allophycocyanin/Allophycocyanin-Hilite 7
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BSA	Bovine Serum Albumine
BTLA	B- and T-Lymphocyte Attenuator
CCL	C-C Chemokine Ligand
CCR	C-C Chemokine Receptor
CD	Cluster de Différenciation
CLEC9A	C-type LECTin domain family 9 member A
CLR	C-type Lectin Receptor
cMoP	Common Monocyte Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CREB5	cAMP Responsive Element Binding protein 5
CRTAM	Cytotoxic and Regulatory T cell-Associated Molecule
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
Ct	Cycle Threshold
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
CX3CR1	CX3 chemokine receptor 1
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns
DC/DCi ou m	Dendritic Cell/Dendritic Cell immature ou mature
DC-SIGN	DC-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EGR1	Early Growth Response 1
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays
ENG	Endogline
Fc	Fragment Constant
FITC	Fluorescéine Isothiocyanate
FLT3	Fms-Like Tyrosine kinase 3
Flt3L	FMS-Like Tyrosine kinase 3 Ligand
FoxP3	Forkhead box P3
Gata1 / Gata3	GATA-Binding Protein 1 / GATA-Binding Protein 3
GITR/GITRL	Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein / Ligand
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP	Granulocyte Monocyte Progenitor

GP1b	GlycoProtéine 1b
HES4	Hairy and Enhancer of Split 4
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSP	Heat-Shock Protein
HSV-1	Herpes Simplex Virus 1
HVEM	Herpes Virus Entry Mediator
ICAM	IntraCellular Adhesion Molecule
ICOS	Inducible T-cell COStimulator
IDO	Indoleamine 2,3-DiOxygénase
IFN- α / γ / λ	Interféron- α / γ / λ
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LAG3	Lymphocyte-Activation Gene 3
LFA1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LGM	Large Granular Monocyte
LIF	Leukocyte Inhibitory Factor
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6C	Lymphocyte Antigen 6C
MCP1	Monocyte Chimoattractant Protein 1
MDP	Macrophage Dendritic cell Progenitor
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cell
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
MMR	Macrophage Mannose Receptor
MoDC	Cellules Dendritiques Dérivées de Monocytes
MPA	Monocyte-Platelet Aggregate
Nect2	NECtine-Like protein 2
NF- κ B	Nuclear Factor-Kappa B
NKT	Natural Killer T
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1/PDL-1	Programmed cell Death 1 / Programmed cell Death-Ligand 1
PE/PE-Cy5 ou 7	Phycoérythrine/Phycoérythrine - Cyanine 5 ou 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll Protein - Cyanin-5.5
PFA	Paraformaldehyde
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PRR	Pattern Recognition Receptor

PSGL-1	P Selectin Glycoprotein Ligand 1
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RoRyt	RAR-related Orphan Receptor Gamma 2
ROS	Reactive Oxygen Species
SAB	Sérum AB humain
SGC	Small Granular Cell
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SPI1	Spleen Focus Forming Virus Proviral Integration Oncogene
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T-bet	T cell-specific T-Box transcription factor
TAM	Tumor-Associated Macrophage
TCF4	Transcription Factor 4
TCR	T-Cell Receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TIGIT	T cell Immunoreceptor with IG and ITIM domains
TIM3	T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3
TLR	Toll-Like Receptor
Th	T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
vWF	von Willebrand Factor
XCR1	X-C motif chemokine Receptor 1
ZBTB46	Zinc finger and BTB domain containing 46

A. INTRODUCTION

1. Les monocytes humains

1.1. Généralités

Les monocytes représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes de grandes tailles (15 à 20 μm) originaires de la moelle osseuse et ont une demi-vie de 1 à 3 jours (Gordon and Taylor, 2005). Ils représentent 2 à 10% des leucocytes totaux du sang périphérique chez l'homme. Ces cellules dérivent de cellules souches hématopoïétiques CD34+ et migrent de la moelle osseuse dans le sang puis infiltrent éventuellement les tissus périphériques où elles exercent l'essentiel de leurs fonctions. Cette infiltration nécessite l'activation de récepteurs aux chimiokines ainsi que des récepteurs à l'adhésion endothéliale. Pour devenir fonctionnels, les monocytes se différencient en de multiples formes de cellules dendritiques (Dendritic Cell, ou DC) ou de macrophages en fonction des stimuli rencontrés, mais peuvent également agir sous forme de monocytes activés (Chow et al., 2017; Ginhoux and Jung, 2014; Jakubzick et al., 2013). Les monocytes sont ainsi des réservoirs de précurseurs myéloïdes impliqués dans le renouvellement de ces cellules essentielles à la réponse immunitaire.

Ces cellules précurseurs sont impliquées dans les réponses immunes innées et jouent un rôle de défense, de réparation tissulaire et dans l'homéostasie. Elles participent aux réponses contre les bactéries, les virus et les infections fongiques, et forment un lien essentiel entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Cros et al., 2010). Les monocytes possèdent différentes fonctions telles que la phagocytose, la présentation d'antigènes, la production de cytokines et de chimiokines ; ils exercent également une surveillance du lit vasculaire (monocytes patrouilleurs) à l'état basal comme dans l'inflammation (Tacke et al., 2006). Après différenciation, certaines de ces fonctions sont conservées ou amplifiées, d'autres sont perdues, et de nouvelles fonctions sont acquises suivant le type cellulaire produit. Les fonctions des monocytes ont principalement été analysées *in vitro* chez l'homme. *In vivo*, si les fonctions de surveillance vasculaire s'exercent dans la circulation sanguine (Collison et al., 2015; Thomas et al., 2015), l'essentiel des fonctions monocytaires est mis en œuvre après migration au niveau des tissus, notamment en situation inflammatoire où ils peuvent, par exemple, exercer leur rôle dans la clairance des pathogènes après

différentiation en macrophage, ou présenter des antigènes une fois différenciés en cellules dendritiques.

Malgré l'accès aisé à ces cellules circulantes, une classification phénotypique et fonctionnelle précise des monocytes n'est pas encore disponible. Ceci est dû au statut de précurseurs de ces cellules, à la multiplicité fonctionnelle des cellules différenciées, à leur réactivité aux méthodes de purification et à l'absence de standardisation entre laboratoires, et aux variations interindividuelles dans les populations humaines comme indiqué par Wong et coll. ainsi que Segura et coll. (Segura et al., 2018; Wong et al., 2011), et plus précisément formalisé dans le travail présenté.

Chez l'adulte, l'ensemble des monocytes est produit dans la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse.

1.2. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui permettent d'aboutir à la production et au remplacement continu et finement régulé des cellules sanguines telles que les érythrocytes, les leucocytes d'origine lymphoïdes et myéloïdes, et les thrombocytes. Durant la vie intra-utérine, ce phénomène physiologique prend place au niveau du tissu conjonctif, du foie fœtal, de la rate et de la moelle osseuse. Après la naissance, l'hématopoïèse est localisée dans la moelle osseuse.

Le modèle communément accepté considère l'existence d'une véritable hiérarchie cellulaire où toutes les cellules dérivent d'un même précurseur, la cellule souche hématopoïétique (CSH) (Huang et al., 2007). Ce sont des cellules multipotentes, présentes en faible nombre, pour la plupart quiescentes et capable d'auto-renouvellement.

La différenciation des CSH dans les différentes lignées hématopoïétiques est tributaire de l'engagement des cellules souches dans le cycle cellulaire et fait appel à un modèle de division symétrique/asymétrique. En effet, l'auto-renouvellement peut intégrer les deux types de division, une division symétrique où les deux cellules filles possèdent les mêmes caractéristiques que la cellule mère ou une division asymétrique qui engendrera une cellule fille capable d'auto-renouvellement et une cellule fille engagée dans un processus de différenciation.

Ces phénomènes permettent de maintenir le pool de CSH dans la moelle osseuse. Ces cellules ont donc également la capacité de se différencier en progéniteurs qui, suite à des différenciations

successives, se spécialisent de plus en plus vers une voie donnée pour aboutir à l'une des cellules sanguines. Trois compartiments ont ainsi été établis :

- les CSH, cellules multipotentes,
- les progéniteurs/précurseurs, cellules pour la plupart engagées dans une lignée hématopoïétique, capables de prolifération et de différenciation mais sans possibilité de s'auto-renouveler,
- les cellules matures, différenciées et pour certaines fonctionnelles.

La régénération continue du système hématopoïétique nécessite un engagement qui détermine la destinée des CSH : quiescence ou prolifération, auto-renouvellement ou différenciation, au niveau de quelle lignée cellulaire, survie ou mort cellulaire. Ce processus de régénération, et donc cet engagement vers une voie donnée, est régulé de manière très fine et dépend de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques, y compris l'environnement immédiat dans lequel les CSH évoluent appelé niche cellulaire.

Les facteurs intrinsèques permettant l'auto-renouvellement de ces cellules sont de natures variées :

- des récepteurs membranaires, notamment le récepteur Notch qui, une fois lié à son ligand, permet l'activation de gènes tels que HES-1, ce qui favoriserait l'auto-renouvellement des CSH (Chiba, 2006),
- des facteurs de transcription tels que Ikaros (Yoshida et al., 2006), Gfi1 (Zeng et al., 2004), Evi1 (Kataoka et al., 2011) et des membres de la famille Hox tels que HoxB4 (Antonchuk et al., 2002),
- des modificateurs épigénétiques tels que Dnmt1 ou Dnmt3a/b (Liao et al., 2015) qui sont des ADN méthyltransférases, et Bmi1 qui peut également influencer différentes voies de signalisations, notamment STAT5 (Kato et al., 2005),

- des régulateurs du cycle cellulaire tels que les protéines p18 et p21 impliquées dans la quiescence des CSH (Yuan et al., 2004), p21 étant sous le contrôle de Gfi1 (Hock et al., 2004).

Concernant la régulation extrinsèque, elle comprend de nombreux facteurs environnementaux assurant la liaison aux récepteurs présents à la surface des CSH : des facteurs de croissance, des cytokines mais également des interactions avec la matrice extracellulaire et les contacts cellule/cellule avec des ostéoblastes, des cellules mésenchymateuses ou des cellules endothéliales. Cet ensemble de facteurs va créer une niche qui sera favorable à la régulation des fonctions des CSH.

La première étape de différenciation consiste en la production d'un progéniteur multipotent (multipotent progenitor ou MPP), progéniteur commun à toutes les cellules myéloïdes et lymphoïdes qui a perdu sa capacité d'auto-renouvellement (Huber et al., 2014). Ce MPP peut ensuite se différencier en un progéniteur commun lymphoïde (common lymphoid progenitor ou CLP) qui aboutira à la formation de lymphocytes B, T et NK (Serwold et al., 2009). Le MPP peut également se différencier en un progéniteur commun aux cellules dendritiques (common dendritic cell progenitor ou CDP) pouvant former certains types de cellules dendritiques, tels que les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) (Figure 1) (Manz et al., 2001). Le MPP est aussi capable de se différencier en un progéniteur myéloïde commun (common myeloid progenitor ou CMP) qui permettra la génération de l'ensemble des cellules myéloïdes (Akashi et al., 2000). Le CMP peut ainsi se différencier soit en progéniteur érythro-mégacaryocytaire (megakaryocyte-erythroid progenitor ou MEP) à l'origine des globules rouges et des plaquettes, soit en progéniteur granulo-macrophagique (granulocyte-macrophage progenitor ou GMP) pouvant aboutir à la génération des granulocytes neutrophiles, basophiles et éosinophiles, mais également à la formation du précurseur des cellules dendritiques et macrophages (macrophage and dendritic cell precursor ou MDP) (Akashi et al., 2000; Pronk et al., 2007). Le MDP peut ainsi se différencier en un progéniteur monocytaire commun (common monocyte progenitor ou cMoP) (Kawamura et al., 2017), ce qui représente l'une des dernières étapes avant la production des monocytes (Figure 2).

De nombreux facteurs sont impliqués dans les différentes étapes de différenciations aboutissant à la lignée monocyttaire. C'est l'équilibre entre les différents facteurs de transcription qui permet d'orienter cette différenciation, certains étant à la fois des régulateurs positifs pour leur lignage hématopoïétique et des régulateurs négatifs de la différenciation vers d'autres lignages.

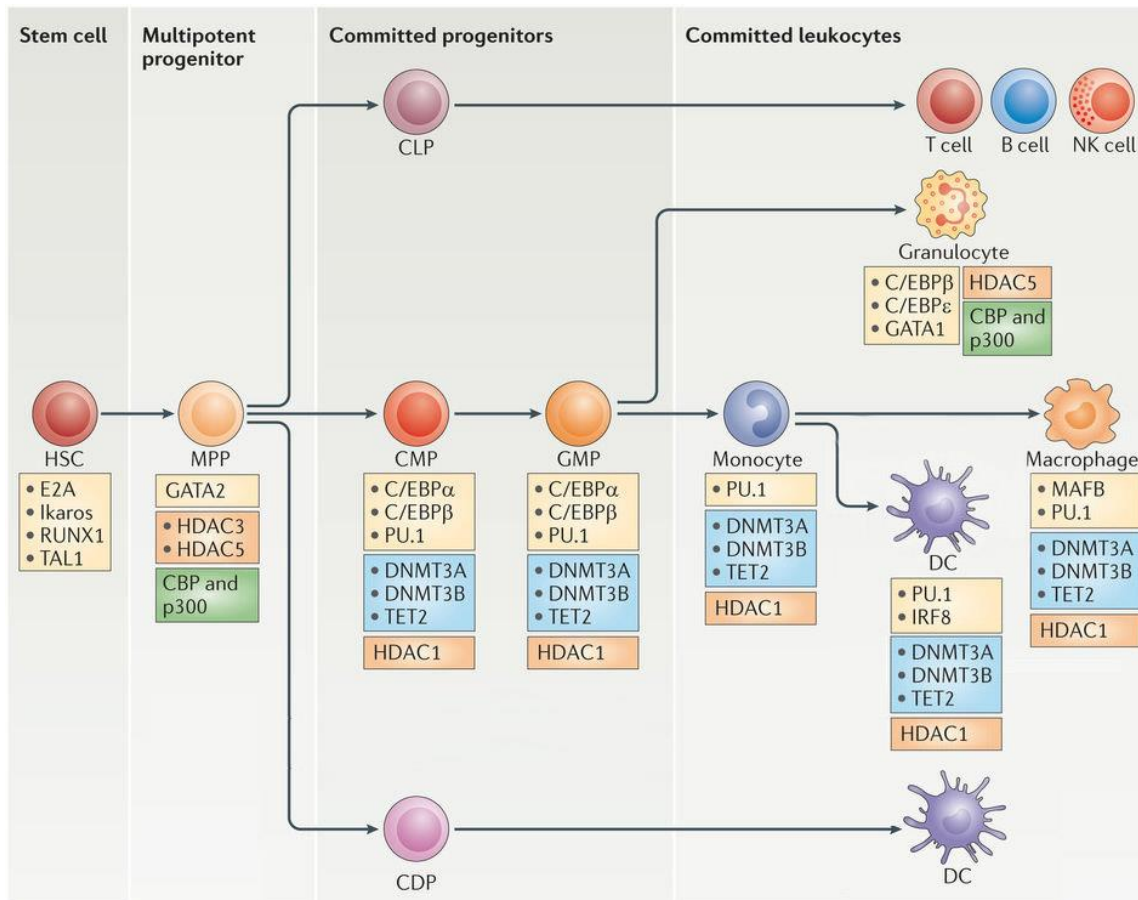


Figure 1. Principaux facteurs de transcription régulant la différenciation hématopoïétique (adapté de Álvarez-Errico et al., 2015). Les principaux facteurs génétiques et épigénétiques impliqués dans la différenciation myéloïde, notamment monocyttaire (axe central horizontal) décrite ici sont : les facteurs de transcription (en jaune), les enzymes participant à la déméthylation de l'ADN (en bleu), les histones désacétylases (en orange) et les histones acétyltransférases (en vert). Les progéniteurs impliqués et présentés dans cette figure sont les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les progéniteurs multipotents (MPP), les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), les progéniteurs communs aux cellules dendritiques (CDP), les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et les progéniteurs granulo-macrophagiques (GMP).

L'auto-renouvellement des CSH est contrôlé par Ikaros et E2A, et leur différenciation vers la voie myéloïde et monocyttaire est notamment dépendante de la quantité de PU.1 exprimée (présent dès le stade CMP).

Parmi ces facteurs, une augmentation de l'expression du facteur de transcription GATA-binding protein 1 (Gata1) permet une orientation de la différenciation des CMP vers la lignée érythro-mégacaryocytaire (Wada et al., 2009). Néanmoins, une expression faible de Gata1 mais forte du facteur de transcription purine-rich box 1 (PU.1) dans le CMP va plutôt favoriser la lignée granulocytaire, au détriment de la lignée érythro-mégacaryocytaire. De plus, l'expression de l'histone désacétylase 1 (HDAC1) est réduite par le facteur de transcription CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP), ce qui favorise l'orientation des CMP vers la voie myéloïde, en particulier vers les lignées granulocytaires (Wada et al., 2009).

Ce type de dualité promoteur activateur/inhibiteur au niveau de l'expression des facteurs de transcription peut se retrouver à chaque étape d'engagement des cellules et permettra donc d'orienter la différenciation vers les différentes voies : entre EKLF et Fli-1 pour le choix érythrocyte ou mégacaryocyte (Starck et al., 2003), entre Gfi-1 et PU.1 pour le choix neutrophile ou monocyte (Dahl et al., 2007), et entre Id2 et E2-2 pour le choix cDC et pDC (Li et al., 2012), par exemple.

Les monocytes sont aussi capables de se différencier en certains types de macrophages à l'aide du facteur de transcription MafB et de cellules dendritiques via notamment l'expression du facteur de transcription interferon regulatory factor 8 (IRF8) (Yáñez and Goodridge, 2016). Ce dernier facteur favoriserait également la différenciation vers la voie monocyttaire, au détriment de la voie granulocytaire.

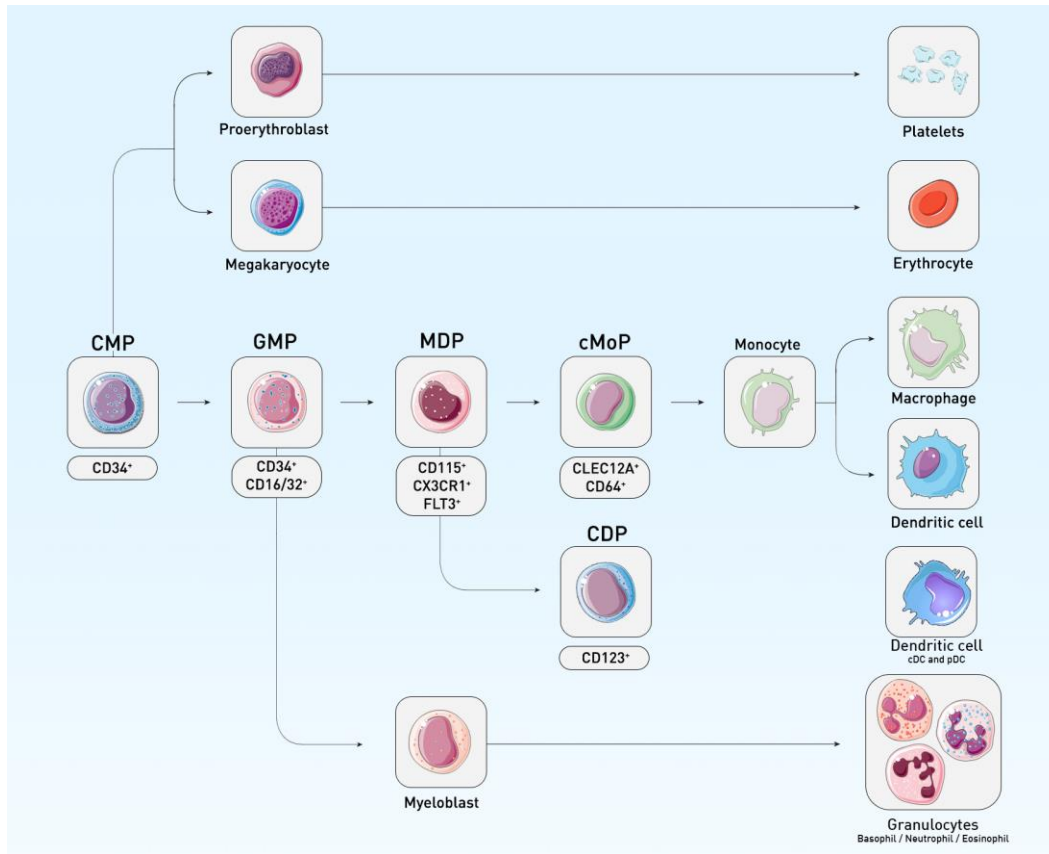


Figure 2. Les différentes étapes de l'hématopoïèse permettant la production de monocytes. Les progéniteurs impliqués et présentés dans cette figure sont notamment les progéniteurs myéloïdes communs (CMP), les progéniteurs granulocyte-macrophage (GMP), les progéniteurs des macrophages et des cellules dendritiques (MDP), les progéniteurs communs des monocytes (cMoP) et les progéniteurs communs des cellules dendritiques (CDP). Dans cette figure est présentée l'autre origine possible des CDP, qui pourraient alors être issues des MDP selon certains auteurs (Helft et al., 2017). Certains des principaux récepteurs exprimés par les progéniteurs sont détaillés dans les cadres sous les cellules (Kawamura et al., 2017; Lee et al., 2015).

De nombreux facteurs extrinsèques jouent également un rôle important dans l'orientation de l'hématopoïèse. Parmi les cytokines régulant positivement les étapes de l'hématopoïèse (Metcalf, 1989) :

- l'érythropoïétine est nécessaire à la différenciation terminale des MEP en hématies,
- la thrombopoïétine permet la production des plaquettes,

- l'IL-2 intervient au niveau des lymphocytes T,
- l'IL-4 est un facteur de croissance des lymphocytes B et est également nécessaire pour la différenciation des monocytes en cellules dendritiques,
- le granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) est impliqué dans la différenciation des CSH vers la lignée myéloïde et est présent du stade CMP jusqu'au stade monocyte ainsi qu'au niveau des cellules dendritiques dérivées de monocytes,
- le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) régule la différenciation terminale des monocytes et est sous la dépendance des facteurs de transcription IRF8 et Krüppel-like factor-4 (KLF4) (Kurotaki et al., 2013),
- le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) dirige l'hématopoïèse vers la lignée granuleuse.

Ces facteurs sont rarement exclusifs à certains stades de l'hématopoïèse. Ainsi, la thrombopoïétine permet également la survie et la prolifération des CSH et des MPP (Yoshihara et al., 2007).

1.3. Définitions actuelles des populations de monocytes

Initialement, les monocytes ont été définis par leur morphologie ainsi que par leur capacité à adhérer, et ont été caractérisés par leurs fonctions principales telles que la phagocytose et la production de cytokines (van Furth and Cohn, 1968). Parmi les différentes méthodes de purification des monocytes développées, l'utilisation d'un gradient de densité permettant d'obtenir une fraction contenant les cellules mononuclées du sang (Peripheral blood mononuclear cell ou PBMC) constituées principalement de lymphocytes, monocytes et de cellules plus rares comme les cellules dendritiques (Boyum, 1974; Nair et al., 2012) s'est imposée comme la première étape de séparation

la plus commune. Historiquement, les monocytes étaient alors purifiés par gradient de densité mais aussi de par leur capacité à adhérer aux surfaces comme le verre ou le polystyrène des récipients de culture. Ces méthodes de purification ne permettaient pas d'obtenir une population de monocytes sans contaminant, et l'absence de consensus et de standardisation des méthodes ne permettaient pas une reproductibilité suffisamment fiable entre les laboratoires. La classification fonctionnelle des sous-populations monocytaires était donc difficile, en raison des difficultés d'obtenir des fractions semblables de monocytes d'une étude à une autre, et de la faible résolution de la technique employée.

L'essor de la cytométrie en flux et des anticorps monoclonaux pour le marquage des cellules a rendu possible une meilleure définition des monocytes. Ainsi, une étude de Todd et coll. a permis de mettre en évidence l'existence d'un marqueur commun à la fraction adhérente décrite précédemment (Todd et al., 1981). Cette molécule de surface est le CD14, un co-récepteur du lipopolysaccharide bactérien, mais n'est pas exclusif à cette population, et peut être également exprimé par certains lymphocytes B (Ziegler-Heitbrock et al., 1994). Passlick et coll. ont par la suite montré l'hétérogénéité des monocytes (Passlick et al., 1989), avec près de 5% à 10% des monocytes qui expriment la molécule de surface CD16, un récepteur au fragment Fc des immunoglobulines G (IgG). Une expression variable du CD14 chez les monocytes CD16⁺ a également été retenue.

Deux populations de monocytes ont donc été décrites : les monocytes CD14⁺⁺ CD16^{neg} ou monocytes « classiques », et les monocytes CD14⁺ CD16⁺ ou monocytes « non-classiques » (figure 3).

Dans cette même étude, les monocytes CD14⁺ CD16⁺ sont définis comme étant des cellules de plus petite taille (selon des analyses effectuées en cytométrie en flux et également en microscopie) (Passlick et al., 1989). Ces cellules expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) deux fois plus intensément que les monocytes CD14⁺⁺ CD16^{neg} et expriment moins l'intégrine CD11b. Fonctionnellement, l'adhérence des deux populations de monocytes a également été analysée. Les monocytes CD14⁺ CD16⁺ sont moins adhérents à une surface en plastique et présentent des capacités moindres de phagocytose, comparés aux monocytes CD14⁺⁺ CD16^{neg}.

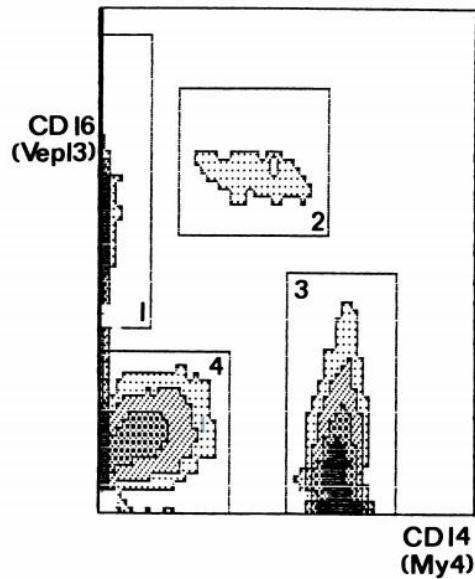


Figure 3. Profil d'expression CD14/CD16 des sous-populations monocytaires humaines selon Passlick et coll. (Passlick et al., 1989). Expression des marqueurs CD14 et CD16 sur les PBMC où deux populations ont été mises en évidence : les *monocytes « classiques »* $CD14^{++} CD16^{neg}$ (cadre 3) et les *monocytes « non-classiques »* (cadre 2).

Plus récemment, l'hétérogénéité des monocytes $CD16^{+}$ a été montrée avec une troisième population mise en évidence selon l'expression du CD14. Les monocytes $CD16^{+}$ comprennent alors une population de monocytes $CD14^{low} CD16^{+}$ qui garde l'appellation de monocytes non-classiques, et une population $CD14^{+} CD16^{+}$ nommée monocytes intermédiaires (figure 4) (Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013).

Une étude de Schäkel et coll. portant sur une glycosylation de P selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1 ou CD162) a permis de mettre en évidence une différence fonctionnelle entre les monocytes $CD14^{+} CD16^{+}$ et les monocytes $CD14^{low} CD16^{+}$ (Schäkel et al., 2002). Les anticorps monoclonaux M-DC8 reconnaissent le motif 6-sulfo N-acetyllactosamine (6-sulfo LacNAc ou slan), correspondant à une glycosylation de PSGL-1. Dans cette étude, une population de leucocytes exprimant slan, nommés M-DC8⁺, a été décrite comme étant pro-inflammatoire, induisant une forte production de tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Cette population M-DC8⁺ (ou slan⁺) représente les monocytes non-classiques $CD14^{low} CD16^{+}$ et aurait également une

capacité de présentation des antigènes supérieure aux monocytes intermédiaires (de Baey et al., 2001; Hofer et al., 2015; Siedlar et al., 2000).

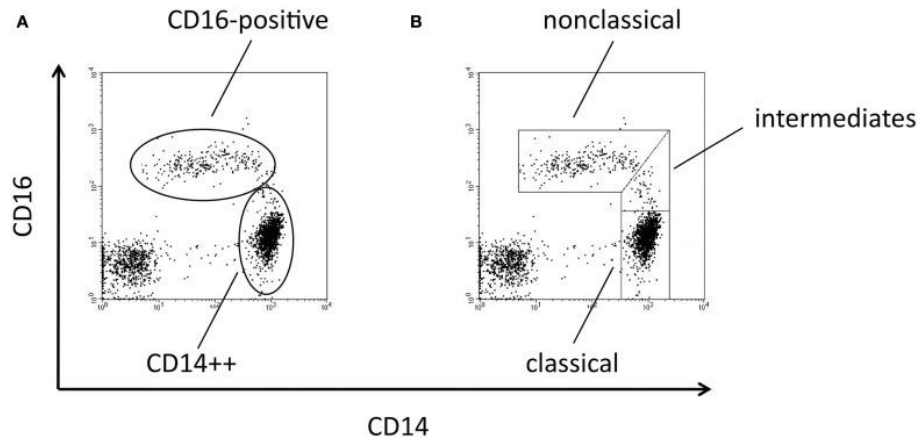


Figure 4. Les sous-populations monocytaires en fonction de l'expression du CD14 et du CD16 (Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013). Sélection conventionnelle des monocytes CD16⁺ représentant la population de monocytes classiques CD14⁺⁺ et la population de monocytes CD16⁺ (A) et sélection affinée des monocytes CD16⁺ représentant la population de monocytes classiques CD14⁺⁺ CD16^{neg}, la population de monocytes intermédiaires CD14⁺ CD16⁺ et la population de monocytes non-classiques CD14^{low} CD16⁺ (B).

Différentes études ont tenté d'affiner cette classification des monocytes afin de décrire plus précisément l'hétérogénéité des cellules.

Ainsi, Grage-Griebenow et coll. ont proposé une classification des sous-populations monocytaires selon l'expression du CD64, un récepteur au fragment Fc des IgG (Grage-Griebenow et al., 2001). Deux populations ont alors été décrites : les monocytes CD64⁺ et les monocytes CD64^{neg}. Ces monocytes peuvent également être subdivisés en fonction de l'expression du CD16. Les monocytes CD64^{neg} CD16⁺ ont une forte capacité de présentation des antigènes et un phénotype macrophagique. Les monocytes CD64^{neg} CD16^{neg} ont une activité moindre de présentation des antigènes mais stimulent plus efficacement les lymphocytes et sont productrices d'interféron α (IFN- α). La majorité des monocytes CD64⁺ n'expriment pas le CD16, et les cellules CD64⁺ CD16⁺ sont des cellules productrices d'IL-12, et ont une forte capacité à présenter les antigènes et à stimuler les lymphocytes.

L'expression des récepteurs aux chimiokines peut aussi permettre de définir différentes populations monocytaires. L'expression relative des molécules de surface C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) et CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) permet de distinguer une population de monocytes CX3CR1^{low} CCR2⁺ rapidement recrutée dans les tissus en situation inflammatoire et une population de monocytes CX3CR1^{high} CCR2^{neg} migrant dans les tissus en l'absence d'inflammation et sous la dépendance de CX3CR1 (Geissmann et al., 2003).

Néanmoins, la classification des monocytes présents dans les PBMC humains selon le profil CD14/CD16 permet d'exclure les cellules dendritiques qui n'expriment pas le CD14. Dans les études fonctionnelles où sont purifiés des PBMC sur la base de l'expression du CD64 (Grage-Griebenow et al., 2001) ou des récepteurs aux chimiokines (Geissmann et al., 2003), il est donc possible que des cellules dendritiques contaminent les échantillons et faussent donc l'interprétation des analyses fonctionnelles des sous-populations de monocytes.

1.4. Fonctions associées aux sous-populations de monocytes

Les monocytes possèdent des rôles très diversifiés et présentent une apparente plasticité notamment en matière de fonctions. Ainsi, le phénotype et les fonctions des monocytes semblent dépendants des stimuli rencontrés dans leur environnement. Des études *in vitro* et *in vivo* chez l'humain et chez la souris ont cherché à associer des fonctions diverses à certaines sous-populations de monocytes, mettant en évidence de nombreuses redondances fonctionnelles vis-à-vis de la classification actuelle des monocytes.

1.4.1. Monocytes classiques

Les monocytes classiques représentent environ 85% des monocytes totaux circulants (Cros et al., 2010). Leur phénotype est défini comme étant CD14⁺, CD16^{neg}, HLA-DR⁺ (human leukocyte antigen D related), CCR2^{bright}, CXCR1^{dim} et CD62L^{bright} chez l'homme. Dans la littérature, certains auteurs ont associé des fonctions pro-inflammatoires avec une forte capacité de phagocytose à cette population, et ont montré qu'elle présente également un haut niveau de production de dérivés

réactifs de l’oxygène (reactive oxygen species ou ROS) et exprime la myéloperoxydase et le lysozyme. Cette population de monocyte peut être fortement activée via le récepteur Toll-like Receptor 4 (TLR4) par du lipopolysaccharide (LPS), ce qui peut entraîner la production d’interleukine (IL) -10, IL-8, IL-6, chemokine C-C motif (CCL) 5, CCL2, CCL3 et de manière modérée de TNF- α (Cros et al., 2010; Wong et al., 2011).

❖ Données transcriptomiques

L’analyse du profil transcriptomique des monocytes classiques met en évidence une expression accrue de certains gènes par rapport aux autres populations de monocytes. Les gènes préférentiellement exprimés au sein des monocytes classiques sont impliqués dans les fonctions d’angiogenèse, de réparation tissulaire, de coagulation, de cicatrisation, et de réponses aux stimuli divers tels que les toxines, médicaments, hormones, et à l’hypoxie. Des médiateurs pro-inflammatoires (notamment S100A12, S100A9 et S100A8) font partie des gènes les plus exprimés dans cette population (Schmidl et al., 2014; Wong et al., 2011). Ces données confirment d’une part les propriétés plutôt pro-inflammatoires de cette population, et d’autre part permettent de définir cette population comme étant extrêmement versatile, capable de répondre à de nombreux signaux afin d’initier et de réguler la réparation tissulaire et différentes fonctions immunitaires.

D’autres études transcriptomiques effectuées par utilisation de puces à ADN (microarrays) mettent en évidence une expression préférentielle du CD14, du CCR2 et du récepteur au GM-CSF ainsi qu’une surexpression d’un ensemble de gènes impliqués dans les réponses anti-microbiennes au niveau des monocytes classiques par rapport aux autres populations de monocytes (Mobley et al., 2007; Zhao et al., 2009). Ce type d’étude, effectuée sur des centaines de gènes différents, peut permettre de caractériser les populations de monocytes et mettre en évidence une proximité suivant l’expression génique. Cros et coll. ont ainsi pu montrer que les populations de monocytes classiques et intermédiaires étaient plus proches entre elles qu’elles ne l’étaient de la population non-classique (Cros et al., 2010).

Schmidl et coll. ont effectués des analyses transcriptomique en RNA-seq sur les 3 sous-populations de monocytes (Schmidl et al., 2014). Cette étude a permis de mettre en évidence

une expression préférentielle de certains gènes associés au lysosome et aux voies de signalisation du TLR.

Des analyses effectuées en RNA-seq sur cellule unique ont également permis d’approfondir les particularités transcriptomiques des trois populations de monocytes. Villani et coll. ont ainsi identifié 4 populations de monocytes en se basant sur l’analyse de 102 gènes signatures sur 372 monocytes sanguins, ainsi que 6 groupes de cellules dendritiques (Villani et al., 2017). La population de monocytes nommée Mono1 regroupe les monocytes classiques. Cette population exprime notamment des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et dans le chimiotactisme. De manière intéressante, les groupes identifiés correspondant aux cellules dendritiques par cette technique ne se chevauchent pas, malgré l’expression de certains gènes en commun tels que CD14.

De nombreuses variations génétiques ont été associées à différentes caractéristiques des monocytes. Le nombre de monocytes chez un individu est associé au gène ITGA4 codant pour la molécule d’adhésion CD49d (Nalls et al., 2011). Un polymorphisme nucléotidique (single-nucleotide polymorphism ou SNP) au niveau du gène IRF5 est associé à une sécrétion augmentée des cytokines suite à l’activation de leurs TLR par différents agonistes (Hedl and Abraham, 2012). De même, des variations au sein d’un locus du gène CELF1 est associé à une plus faible expression du gène SPI1 codant le facteur de transcription PU.1, nécessaire au développement et à la fonction des cellules myéloïdes (Huang et al., 2017).

❖ Données épigénétiques

Des profils épigénétiques des sous-populations de monocytes ont été décrits. Ainsi, l’analyse des méthylations de l’ADN à des loci spécifiques des monocytes classiques a permis de mettre en évidence des sites de méthylations CpG variables selon les individus, qui seraient associés à une susceptibilité accrue à certaines maladies (tels que le diabète de type 2, l’arthrite rhumatoïde, le cancer du poumon et la schizophrénie) ainsi qu’à l’exposition au tabac (Hachiya et al., 2017). Une autre étude a également permis d’associer des variations en termes de méthylation de l’ADN entre individus et certains SNP (Schröder et al., 2017). De plus, certaines modifications épigénétiques peuvent être associées à des profils spécifiques d’expression de molécules de signalisation jouant

un rôle dans les fonctions immunitaires tels que la Tec Kinase, NF- κ B, CXCL8 et l'IL-10 (Chen et al., 2016a). Finalement, il existe peu d'études qui permettrait de mieux caractériser les différentes populations de monocytes ou d'associer des fonctions à l'une des populations. De plus, les variabilités des monocytes causés par des phénomènes épigénétiques (méthylation de l'ADN et modifications des histones) est 4 à 7 fois inférieures que les variabilités des monocytes causés par les différences génétiques (Chen et al., 2016a).

Des études récentes tendent néanmoins à mettre en évidence la capacité des monocytes à présenter une certaine mémoire immunitaire. Suite à une infection, les monocytes seraient capables de répondre de manière plus efficace à une réinfection (Netea et al., 2016). Kleinnijenhuis et coll. ont étudié ce phénomène dans le contexte du vaccin Bacille de Calmette et Guérin (BCG) chez 20 individus sains (Kleinnijenhuis et al., 2012). Ils ont été prélevés avant vaccination, deux semaines et trois mois après vaccination. Leurs PBMC ont ensuite été stimulés par *Mycobacterium tuberculosis*, la bactérie responsable de la tuberculose que le vaccin BCG est censé prévenir. La production d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-1 β est de 2 à 7 fois plus importante à 2 semaines et à 3 mois après vaccination, qu'avant l'administration du vaccin BCG. De manière intéressante, lorsque les PBMC sont stimulés par *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*, les cellules produisent également des quantités plus importantes de ces cytokines après vaccination, ce qui rejoint l'hypothèse que la mémoire immunitaire innée permettrait d'induire une réponse accrue aux réinfections, y compris contre des pathogènes différents de celui responsable de la primo-infection (Jensen et al., 2015; Kleinnijenhuis et al., 2012; Netea et al., 2016; Villumsen et al., 2009).

Ce phénomène de mémoire de l'immunité innée se mettrait en place grâce à des modifications épigénétiques (Netea et al., 2016). De nombreux loci correspondant à des gènes inflammatoires sont dans une configuration qui réprime leur transcription. Après une première stimulation des cellules, la chromatine subit un remodelage permettant une meilleure accessibilité aux loci des gènes inflammatoires, une augmentation de l'acétylation des histones et un meilleur recrutement de l'ARN polymérase II (Smale et al., 2014). Ces modifications épigénétiques causées par une stimulation initiale permettraient donc une meilleure induction des gènes inflammatoires lors d'une stimulation secondaire. De plus, cette mémoire au sein des monocytes est maintenue plusieurs mois. Les monocytes ayant une demi-vie de quelques jours, les modifications épigénétiques

permettant cette mémoire de l'immunité innée devraient se situer également au niveau des progéniteurs de monocytes dans la moelle osseuse.

❖ Données fonctionnelles

La capacité des monocytes à favoriser la prolifération des lymphocytes allogéniques a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée, dans des expériences de réaction lymphocytaire mixte (Mixed Lymphocyte Reaction ou MLR) allogénique (Cros et al., 2010). Les monocytes classiques induisent peu la prolifération des lymphocytes, au contraire des cellules dendritiques dérivées de monocytes (Monocyte Derived Dendritic Cells ou MoDC). Afin de déterminer la capacité de ces cellules à présenter des antigènes aux lymphocytes T, Cros et coll. ont purifié les 3 différentes sous-populations de monocytes ainsi que des lymphocytes T autologues provenant de donneurs vaccinés pour le tétanos, afin de les mettre en coculture en présence de toxine du tétanos. Aucune des populations de monocytes étudiées n'induit de prolifération des lymphocytes T, contrairement aux cellules dendritiques utilisées comme contrôle positif (Cros et al., 2010). Une autre étude a été réalisée par Liaskou et coll. où des populations de monocytes purifiées à partir du foie chez des patients tuberculeux ainsi que des lymphocytes T CD4⁺ autologues ont été mis en coculture en présence de peptides antigéniques de *mycobacterium tuberculosis* afin d'analyser la capacité des monocytes à présenter ces peptides aux lymphocytes T. Les monocytes classiques induisirent très faiblement la prolifération des lymphocytes T, alors que les monocytes intermédiaires et non-classiques le faisaient de manière plus importante. L'induction de la prolifération par ces 2 sous-populations est similaire à celle des cellules dendritiques issues du foie de ces mêmes patients (Liaskou et al., 2013). Enfin, Zawada et coll. ont effectué une expérience similaire en cultivant les différentes populations de monocytes pré-incubées avec de l'entérotoxine B staphylococcique avec des lymphocytes T CD4⁺ (Zawada et al., 2011). Dans cette expérience, les monocytes intermédiaires possédaient une meilleure capacité à induire la prolifération des lymphocytes T, suivi par les monocytes classiques et non-classiques (respectivement 52,4% ± 10,8%, 45,4% ± 7,9% et 42,2% ± 16,1%). L'une des limites de cette étude vient de l'absence de contrôle négatif afin de déterminer la prolifération des lymphocytes T basale, en l'absence de monocytes ainsi que l'absence de contrôle positif, comme l'utilisation de cellules dendritiques connues comme cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles.

L'ensemble de ces études tendent cependant à montrer que les monocytes classiques ont une faible capacité à présenter les antigènes, comparativement aux autres populations de monocytes.

1.4.2. *Monocytes non-classiques*

Les monocytes non-classiques représentent 5 à 10% des monocytes totaux circulants (Cros et al., 2010). Chez l'homme, leur phénotype est défini comme étant CD14^{dim}, CD16⁺, CCR2^{dim}, CXCR1^{bright}, HLA-DR^{int} et CD62L^{dim}. Cette population analysée conjointement avec la population intermédiaire est amplifiée en situation infectieuse et inflammatoire (Nockher and Scherberich, 1998; Nockher et al., 1994; Saionji and Ohsaka, 2001), et en particulier lors de sepsis (Blumenstein et al., 1997; Fingerle et al., 1993). Une étude récente de Mukherjee et coll. confirme le phénotype globalement inflammatoire de ces cellules analysées en sang total ainsi que leur amplification dans le sepsis (Mukherjee et al., 2015). Les monocytes non-classiques sont considérés comme les principaux producteurs de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et IL-1 β en réponse aux LPS bactériens, et produisent peu ou pas d'IL-10 (Belge et al., 2002; Mukherjee et al., 2015). De plus, des travaux effectués par Serbina et coll. montraient des réponses différentes entre les différentes populations de monocytes (CD16^{neg} et CD16⁺) en présence de *Aspergillus fumigatus* conidia. Bien que les deux populations étudiées phagocytassent efficacement ce champignon, la population CD14⁺ CD16^{neg} inhibait la germination des conidies en sécrétant de faibles niveaux de TNF- α alors que la population CD14⁺ CD16⁺ ne permettait pas cette inhibition mais produisait une grande quantité de TNF- α (Serbina et al., 2009).

❖ Données transcriptomiques

Les analyses transcriptomiques de cette population révèlent un enrichissement de l'expression de certains gènes impliqués dans le réarrangement du cytosquelette ainsi que des gènes jouant un rôle dans le mouvement cellulaire dont des Rho GTPases comme RhoC et RhoF qui coordonnent les réarrangements du cytosquelette d'actine (Wong et al., 2011). Des activateurs ainsi que des inhibiteurs de ces RhoGTPases sont également hautement exprimés chez les monocytes non-classiques. Enfin, des gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette qui interviennent dans la phagocytose ainsi que des composants du complément sont également hautement exprimés.

Des gènes jouant un rôle dans la migration des leucocytes et dans de nombreux processus impliqués dans la réponse immunitaire sont également exprimés dans cette population (Villani et al., 2017). Dans cette étude, les monocytes non-classiques identifiés partagent de nombreux gènes avec une population de cellules dendritiques mais forment néanmoins deux groupes bien distincts.

Dans l'étude de Schmidl et coll. effectuée en RNA-seq, les gènes surexprimés par les monocytes non-classiques par rapport aux autres populations sont impliqués dans la phosphorylation oxydative et le métabolisme protéique (Schmidl et al., 2014). Un grand nombre de gènes codant des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale sont également surexprimés, ce qui concorde avec le fait que les monocytes non-classiques présentent une plus grande activité mitochondriale que les monocytes classiques (Zhao et al., 2010).

❖ Données fonctionnelles

- *Adhésion des monocytes*

L'une des fonctions de cette population particulièrement étudiée est celle de patrouilleur de l'endothélium. Chez la souris, cette fonction est médiée par des interactions entre l'intégrine lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1 ou CD11a/CD18) et le récepteur intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (Thomas et al., 2015). Les intégrines sont généralement conservées entre les espèces (Vidovic et al., 2003). Cros et coll. ont purifié des monocytes non-classiques humains qui ont été marqués à l'aide d'un traceur fluorescent puis injectés chez des souris immunodéficientes (Cros et al., 2010). Les monocytes non-classiques humains adhéraient rapidement à l'endothélium et « rampaient » le long de cet endothélium. La capacité de ces cellules à ramper était similaire à celle observée chez les cellules NKT qui surveillent les capillaires sinusoides hépatiques (Geissmann et al., 2005). Pour les monocytes non-classiques, cette capacité était prolongée, indépendante de la direction du flux sanguin avec un déplacement beaucoup plus lent que celui des cellules immunitaires qui « roulent » à la surface de l'endothélium en situation inflammatoire. L'utilisation d'anticorps bloquants anti-LFA-1 neutralisait la capacité de ces cellules à se déplacer sur l'endothélium (Cros et al., 2010). Cette fonction de patrouille a également été démontré *in vitro* en perfusant des monocytes non-classiques humains sur de l'endothélium d'origine micro- et macro-vasculaire. En effet, ces cellules ont une forte capacité à ramper le long

de l'endothélium, et de manière plus importante sur l'endothélium micro-vasculaire (Collison et al., 2015). A l'inverse, les monocytes classiques présentent également cette capacité à ramper sur l'endothélium, mais uniquement sur l'endothélium macro-vasculaire. De plus, le pourcentage de monocytes classiques rampants sur l'endothélium est 3 à 4 fois inférieur à celui des monocytes non-classiques. Cette fonction est dépendante de la molécule ICAM-1 exprimée par l'endothélium. Enfin, les monocytes intermédiaires peuvent adhérer à l'endothélium micro-vasculaire mais restent statiques et ne semblent pas posséder la capacité de ramper, dans cette étude (Collison et al., 2015).

Dans une autre étude menée par Liaskou et coll., les différentes populations de monocytes ont été mises en coculture avec des cellules endothéliales hépatiques sinusoidales *in vitro*. Les monocytes non-classiques et intermédiaires ont roulé, adhéré et transmigré contrairement aux monocytes classiques qui ont principalement adhéré sans transmigrer (Liaskou et al., 2013).

Ces résultats suggèrent d'une part que les différentes populations de monocytes décrites en fonction de l'expression du CD14 et du CD16 ne présentent pas les mêmes fonctions d'interaction avec l'endothélium. Cependant, ces fonctions divergent substantiellement selon le laboratoire qui les étudie, ce qui laisse supposer une certaine hétérogénéité au sein de ces populations. Ces divergences pourraient de plus résulter des spécificités tissulaires des cellules endothéliales analysées, ceci s'ajoutant aux différences méthodologiques dans la définition et la purification des sous-populations de monocytes entre différents laboratoires, comme discuté plus haut.

- Réponse immunitaire innée

Concernant les réponses immunitaires innées des monocytes, il existe de nombreuses divergences selon les études concernant les monocytes non-classiques. Ainsi, elles peuvent être orientées vers un profil anti-inflammatoire avec une forte production d'Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) (Cros et al., 2010). Cette population répond faiblement aux agonistes du TLR4 et du TLR2, induisant peu, voir pas de médiateurs pro-inflammatoires.

Les monocytes non-classiques peuvent également produire fortement des cytokines pro-inflammatoires suite à une activation du TLR7 et du TLR8 par des agonistes viraux. Par exemple, lorsque ces cellules sont exposées au virus de la rougeole et au virus herpes simplex type 1 (herpes simplex virus type 1 ou HSV-1), elles produisent de grande quantité de CCL3 et de

cytokines pro-inflammatoires dont TNF- α et IL-1 β . Cette population est considérée comme la principale productrice de TNF- α et d'IL-1 β (Belge et al., 2002; Wong et al., 2011) alors que pour Cros et coll., ces cytokines sont principalement produites par les monocytes intermédiaires (Cros et al., 2010). Enfin, selon Boyette et coll., ce sont les monocytes classiques qui produisent principalement ces cytokines (Boyette et al., 2017). Ces études convergent vers l'idée que ces populations de monocytes restent encore hétérogènes et mal définies.

En comparaison, les monocytes classiques également exposés à ces virus produisent de forte quantité d'IL-6 et d'IL-8 ainsi que de CXCL10 et de CCL5 (des chimiokines ciblant les granulocytes et les lymphocytes B et T helper). Concernant les monocytes intermédiaires, ils produisent les mêmes cytokines que les monocytes classiques et que les monocytes non-classiques à un niveau intermédiaire, en réponse à ces mêmes virus (Cros et al., 2010).

Afin de mieux comprendre le rôle physiologique des monocytes non-classiques lors de l'activation du TLR7 par des acides nucléiques, Carlin et coll. ont effectué des expériences chez des souris en se focalisant sur la population Ly6C^{neg/low}, appelée également «monocytes non-classiques» (Carlin et al., 2013). Dans ce modèle, l'adhérence et le rampeur des monocytes murins à la surface de l'endothélium rénal étaient médiés par l'interaction entre LFA-1 et ICAM-1/ICAM-2.

Par la suite, Carlin et coll. ont appliqué un ligand du TLR7 (le resiquimod ou R484) sur la capsule rénale pour induire une inflammation dans les tissus (Carlin et al., 2013). Le R484 augmenta l'adhérence des monocytes murins non-classiques et réduisit leur vitesse de déplacement le long des capillaires rénaux. Le R484 a également permis une augmentation de l'expression de la fractalkine (ou CX3CL1) au niveau des cellules endothéliales rénales via l'activation de leur TLR7, pouvant induire une augmentation du recrutement des monocytes de manière dépendante de leur récepteur à la fractalkine, le CX3CR1.

Des dommages sévères sur l'endothélium rénal ont été observés au niveau des sites où les monocytes murins non-classiques ont été recrutés. Ces monocytes participent à la clairance des débris cellulaires et permettent le recrutement des neutrophiles de manière dépendante du TLR7 monocytaire.

De plus, les monocytes non-classiques produisent la chimiokine CXCL1 ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, le CCL3 et le TNF- α . Ce profil cytokinique observé par l'activation du TLR7 chez les monocytes non-classiques murins était déjà évoqué dans une étude chez les monocytes non-classiques humains, après activation du TLR7 *in vitro* (Cros et al., 2010), comme décrit précédemment.

L'ensemble de ces expériences tendent à démontrer une fonction particulière des monocytes non-classique. Cette population serait donc une population de monocytes sentinelles, patrouilleurs de l'endothélium dépendant de l'interaction entre LFA-1 et ICAM-1/ICAM-2, répondant à des signaux viraux et/ou à l'activation des cellules endothéliales suite à un dommage tissulaire et permettant le recrutement d'autres médiateurs de la réponse immunitaire. Cette capacité de déplacement sur l'endothélium, y compris à contre-sens du flux sanguin capillaire, pourrait être corrélée au profil transcriptomique de cette population, où des gènes impliqués dans le mouvement cellulaire et les réarrangements du cytosquelette sont hautement exprimés par rapport aux autres populations de monocytes.

1.4.3. *Monocytes intermédiaires*

Les monocytes intermédiaires représentent environ 5% des monocytes totaux circulants (Cros et al., 2010). Leur phénotype chez l'homme est défini comme étant CD14⁺, CD16⁺, HLA-DR^{bright}, CCR2^{int}, CXCR1^{int} et CD62L^{int} (Hijdra et al., 2012). Ces molécules de surface ainsi que d'autres sont exprimées à des niveaux intermédiaires par comparaison à ceux des monocytes classiques et des monocytes non-classiques. Cette population est considérée comme principalement pro-inflammatoire, et se retrouve amplifiée dans de nombreuses pathologies inflammatoires comme la maladie de Crohn (Grip et al., 2007), le sepsis (Poehlmann et al., 2009), l'athérosclérose (Rogacev et al., 2011) ou l'insuffisance rénale chronique (Rogacev et al., 2014). L'activation de leur TLR4 par le LPS induit la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et le CCL3 de manière importante, similaire à la population classique (Cros et al., 2010).

❖ Données transcriptomiques

Les analyses transcriptomiques de cette population révèlent un enrichissement de l'expression de certains gènes responsables de l'apprêtement et de la présentation des antigènes par le CMH de classe II, incluant les 6 gènes codant les chaînes α et β du CMH de classe II ainsi que le gène codant la molécule co-stimulatrice CD40 qui est fortement exprimée par cette population (Schmidl et al., 2014; Wong et al., 2011). Ces résultats suggèrent un rôle important dans la présentation de l'antigène pour cette population, notamment en comparaison aux monocytes classiques. De plus, l'expression relativement plus élevée de certains gènes codant des protéines impliquées dans l'angiogenèse, comme le récepteur à l'angiopoïétine-1 (ou TIE2), le récepteur au facteur de croissance vasculaire endothéliale 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2 ou VEGFR-2) et l'endogline (ENG), a été retrouvée chez les monocytes intermédiaires (Zawada et al., 2011). Les monocytes intermédiaires semblent donc être hautement pro-angiogénique.

Dans les analyses transcriptomiques en RNA-seq sur cellule unique effectuées par Villani et coll., les monocytes intermédiaires se retrouvent éparpillés dans les 4 groupes de monocytes identifiés selon l'expression transcriptomique des cellules (Villani et al., 2017). Plus de la moitié des monocytes intermédiaires sont inclus dans les groupes Mono1 et Mono2, correspondant aux monocytes classiques et non-classiques respectivement. Les groupes Mono3 et Mono4 sont constitués principalement de monocytes intermédiaires mais partagent de nombreux gènes avec les monocytes classiques et non-classiques. Ainsi, les monocytes intermédiaires semblent être extrêmement hétérogènes, ne pouvant être isolés des 2 autres populations monocytaires par ce type d'analyse.

❖ Données fonctionnelles

En termes de fonction, la capacité des monocytes intermédiaires à présenter les antigènes a été évaluée suivant leur aptitude à stimuler la prolifération des lymphocytes T (Cros et al., 2010; Liaskou et al., 2013; Zawada et al., 2011). Ces résultats (déjà décrits dans la **section 1.3.1.** de cette thèse) indiquent, selon l'une des études, une absence de capacité à induire la prolifération des lymphocytes T (Cros et al., 2010) alors que pour d'autres études, ce sont les monocytes

intermédiaires qui induisent le plus fortement la prolifération des lymphocytes T parmi les 3 populations (Liaskou et al., 2013; Zawada et al., 2011).

Concernant leur capacité de phagocytose, une expérience *in vitro* a été réalisée avec des billes en latex de 1 μ m (Cros et al., 2010). Les monocytes intermédiaires présentent la plus forte capacité de phagocytose de ces billes comparée aux 2 autres populations de monocytes. Une autre expérience a été effectuée par Rogacev et coll. et démontre que ces mêmes monocytes phagocytent de manière plus efficace les lipoprotéines de basse densité oxydées (Rogacev et al., 2014). De plus, cette phagocytose par les monocytes intermédiaires est associée à une réponse inflammatoire avec production de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6. Il est important de préciser cependant que l'expérience de Rogacev et coll. a été pratiquée sur des monocytes de patients atteints d'insuffisance rénale chronique et que ces résultats peuvent ne pas refléter les fonctions des monocytes à l'état physiologique.

Une récente étude démontre que les monocytes intermédiaires phagocytent plus efficacement des globules rouges infectés par le *Plasmodium falciparum*, l'agent infectieux de la malaria, par rapport aux autres populations de monocytes, et cette phagocytose est liée à une production de TNF- α (Zhou et al., 2015). Elle est dépendante de l'opsonisation du parasite par les anticorps et le C3 du complément. Le blocage du récepteur CD16 inhibe leur capacité à phagocyter les globules rouges infectés.

Il existe également pour cette population de monocytes des divergences fonctionnelles selon les études. Ainsi, Thiesen et coll. ont démontré que ce sont les monocytes classiques qui expriment le plus fortement l'IL-1 β en réponse au LPS et non les monocytes intermédiaires (Thiesen et al., 2014). Dans une autre étude, il a été montré que les monocytes intermédiaires produisent très peu de TNF- α et d'IL-1 β et que c'est la population non-classique qui est la principale productrice de ces cytokines en réponse au LPS (Wong et al., 2011). De même, dans l'étude effectuée par Cros et coll., le profil d'expression transcriptomique des différentes populations de monocytes suggère que les monocytes intermédiaires sont plus proches des monocytes classiques que des non-classiques (Cros et al., 2010) alors que dans d'autres études transcriptomiques, les monocytes intermédiaires sont plus proches des monocytes non-classiques que des monocytes classiques (Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011).

Ces divergences de résultats peuvent, entre autres, provenir des différentes techniques utilisées afin de purifier les monocytes. En effet, l'utilisation d'un gradient de densité, de billes magnétiques de différents types ou encore de tampons de lyse de globules rouges avant analyses des monocytes influencent les populations qui seront retrouvées lors des analyses. C'est également ce que j'ai pu observer lors de ma thèse où l'utilisation de kit de tri par billes magnétiques ne me permettait pas de trier exactement les mêmes populations de monocytes que par l'utilisation d'un trieur cellulaire (données non montrées). L'utilisation de différents anticoagulants pour les prélèvements sanguins peuvent également induire des différences, notamment phénotypique, au niveau des monocytes étudiés. Les anticoagulants les plus utilisés sont l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) (Zawada et al., 2011), l'héparine (Cros et al., 2010) et le citrate de sodium (Thiesen et al., 2014). Enfin, les expressions de CD14 et CD16 chez les monocytes se font suivant un continuum et les fenêtres utilisées pour la sélection des cellules triées par trieur cellulaire vont contenir plus ou moins de « contaminants » fournis par les populations adjacentes, contribuant de multiples manières aux divergences observées. Ainsi, les contrôles permettant de définir le seuil de positivité des cellules pour le CD16 peuvent varier d'un laboratoire à un autre, que ce soit par l'utilisation de contrôles dits flow minus-one (FMO) ou d'anticorps isotypiques. D'autre part, la fenêtre de sélection des monocytes intermédiaires peut être placée plus proche des monocytes classiques ou des monocytes non-classiques, ce qui peut également entraîner les différences observées dans les analyses fonctionnelles (figure 5).

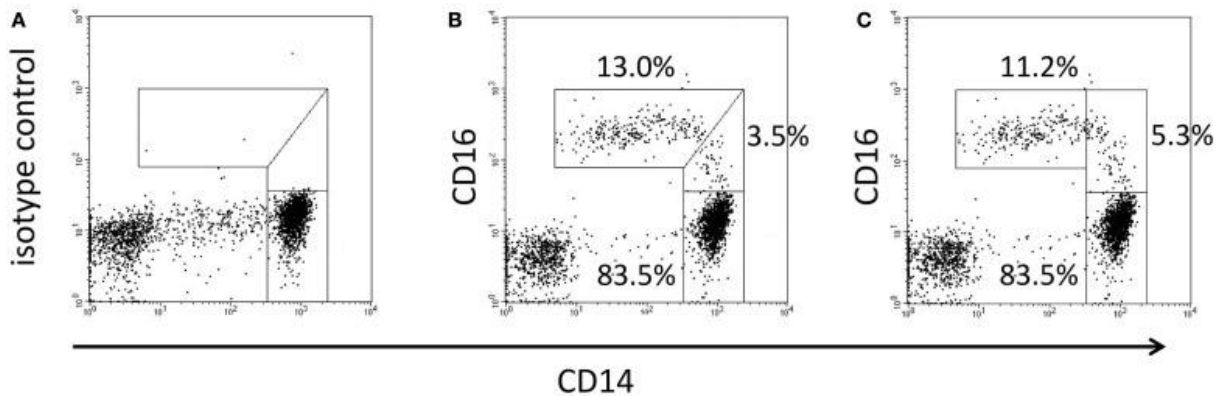


Figure 5. Les différentes stratégies de sélection des monocytes intermédiaires et non-classiques (Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013). *Le contrôle isotypique (A) permet de faire la distinction entre les populations de monocytes classiques et intermédiaires. La distinction entre les populations intermédiaires et non-classiques peut être effectuée à l'aide d'une séparation oblique, distinguant les monocytes CD16⁺ de ceux qui sont CD16⁺⁺ (B) ou à l'aide d'une séparation verticale dans la continuité de celle utilisée pour la population classique, limitant les monocytes non-classiques aux cellules CD14^{dim} (C).*

Néanmoins, une explication additionnelle aux discordances et redondances fonctionnelles entre ces trois populations de monocytes est celle d'une hétérogénéité au sein de ces populations, que la classification suivant les expressions de CD14 et CD16 ne permet pas de fractionner. Ceci est l'un des points qui va être au centre de cette thèse. L'un des objectifs de ces travaux est donc de mieux définir les populations de monocytes, suivant leurs caractéristiques phénotypiques aussi bien que fonctionnelles.

1.5. Les monocytes murins

Les modèles animaux comme la souris ont été très utiles pour l'analyse de nombreuses populations de cellules de l'immunité. Pour les monocytes, la non-concordance des marqueurs utilisés chez l'homme et la souris pour identifier les cellules a rendu la recherche de cellules homologues difficile. Il s'est avéré au fil de la progression des connaissances sur les populations de monocytes humains et murins que des différences de fonctions des cellules dans les deux modèles existaient, en plus des différences de marqueurs.

Les monocytes murins dans leur globalité sont souvent caractérisés par l'expression du récepteur au M-CSF (CD115), du marqueur macrophagique F4/80, de l'intégrine CD11b et du récepteur à la fractalkine, le CX3CR1 (Gordon and Taylor, 2005).

1.5.1. Définitions actuelles des populations de monocytes murins

Deux populations de monocytes murins sont actuellement identifiées, basées sur le niveau d'expression du récepteur Lymphocyte Antigen 6C (Ly6C) : la population Ly6C^{low/neg}, et la population Ly6C⁺, à un ratio 2:3 (Geissmann et al., 2003). Le phénotype des monocytes Ly6C^{low/neg} est décrit comme étant CX3CR1^{high}, CCR2^{neg}, CD43^{high} et CD62L^{neg} alors que le phénotype de la population Ly6C⁺ est CX3CR1^{low}, CCR2⁺, CD43^{low} et CD62L⁺ (Geissmann et al., 2003; Jakubzick et al., 2013). L'expression de CD14 est faible ou non détectable sur l'ensemble des monocytes (Haziot et al., 1996).

Plusieurs travaux ont été menés pour déterminer si les sous-populations de monocytes trouvent leur origine dans la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse, ou en périphérie dans le sang circulant. Les CSH murines vont s'engager dans une succession d'étapes de différenciation similaires aux CSH humaines (Fogg et al., 2006; Geissmann et al., 2003; Iwasaki and Akashi, 2007). Les MDP peuvent se différencier en certains types de macrophages et de cellules dendritiques mais également en monocytes Ly6C⁺. Le cMoP, précurseur intermédiaire entre les MDPs et les monocytes Ly6C⁺, qui n'exprime plus le Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3 ou CD135) peut générer des monocytes, mais pas de cDC ni de pDC (Hettinger et al., 2013).

Enfin, les monocytes Ly6C⁺ peuvent également servir de précurseurs aux monocytes Ly6C^{low/neg} (Geissmann et al., 2010; Varol et al., 2007). Néanmoins, l'origine des monocytes Ly6C^{low/neg} n'est pas encore bien déterminée. Ainsi, ces monocytes peuvent être issus de la différenciation des monocytes Ly6C⁺, directement du précurseur cMoP, ou encore de l'ensemble de ces 2 voies.

1.5.2. Fonctions associées aux sous-populations

Les monocytes murins Ly6C⁺ sont considérés comme des cellules principalement pro-inflammatoires, participant aux réponses immunitaires antibactériennes, antiparasitaires et

antifongiques. Elles migrent vers les tissus périphériques en réponse à des stimuli inflammatoires de manière CCR2-dépendante et sont des précurseurs de cellules dendritiques et de macrophages (Geissmann et al., 2003; Serbina et al., 2008; Zigmond et al., 2012). Au niveau du compartiment intestinal, les macrophages sont continuellement renouvelés par ces monocytes, y compris en condition physiologique. Ce phénomène est probablement dû à un léger état d'inflammation causé par les tissus exposés au microbiote intestinal. Au cours d'une infection, ces cellules sont également productrices de TNF- α , de NO et de ROS et peuvent stimuler la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Saha and Geissmann, 2011). Elles sont également impliquées dans la réparation tissulaire (Movahedi et al., 2008).

Concernant les monocytes Ly6C^{low/neg}, ils migrent également vers les tissus lors de l'inflammation et sont capables de se différencier en macrophages. Néanmoins, cette population se retrouve également dans les tissus en condition physiologique (Geissmann et al., 2003).

Aussi, comme décrit dans la section 1.3.2., les monocytes Ly6C^{low/neg} ont pour fonction de patrouiller le lit vasculaire, le long de l'endothélium (Auffray et al., 2007; Cros et al., 2010; Thomas et al., 2015). Cette interaction est dépendante de LFA-1 et de CX3CR1, et permet l'initiation de la réponse immunitaire suite à une infection ou un dommage tissulaire affectant l'endothélium. L'endothélium produit alors différentes chimiokines, dont du CX3CL1 et du SIP qui seraient en partie responsables du recrutement des monocytes Ly6C^{low/neg}. En réponse à une activation par le TLR7, ces monocytes sentinelles permettraient ainsi le recrutement rapide d'autres cellules immunitaires, dont des neutrophiles. En l'absence de stimulus, les monocytes Ly6C^{low/neg} parcourent la vasculature et phagocytent les microparticules, les débris cellulaires et les corps apoptotiques.

L'étude de ces populations dans certaines pathologies a également permis de préciser certaines fonctions de ces monocytes murins. Ainsi, au cours de l'infarctus du myocarde expérimental, les monocytes sont recrutés au niveau de la lésion dans une première phase où les monocytes Ly6C⁺ dominant et exercent des fonctions pro-inflammatoires qui contribuent à la détersion des tissus lésés. Dans une deuxième phase, le recrutement des monocytes Ly6C^{low/neg} produisant du Transforming Growth Factor beta (TGF- β) favorise la cicatrisation (Nahrendorf et al., 2007).

Ainsi, les fonctions des différentes populations de monocytes chez la souris s'avèrent distinctes et, bien que variant dans leur mode d'action suivant les tissus, les fonctions plutôt inflammatoires des Ly6C⁺ s'opposent à celles de surveillance et de régénération des Ly6C^{low/neg}.

1.5.3. Comparaison avec les monocytes humains

Les modèles murins sont incontournables pour l'analyse des fonctions monocytaires *in vivo* en situation normale et pathologique. Cependant, la validation des données obtenues dans ce domaine dans les modèles animaux reste problématique. Tout d'abord, les monocytes humains sont décrits selon l'expression des récepteurs CD14 et CD16 définissant actuellement trois populations, alors que chez la souris, un marqueur distinct, le Ly6C, est utilisé pour distinguer deux sous-populations (Figure 6). D'autre part, la population humaine de monocytes non-classiques est retrouvée en quantité très marginale dans la circulation, constituant 5 à 10% des monocytes. Chez la souris, cette population représente jusqu'à 40% des monocytes circulants.

Malgré ces différences majeures, des expériences d'analyses transcriptomiques effectuées par Ingersoll et coll. ont comparé les profils d'expression de plusieurs centaines de gènes entre sous-populations humaines et murines. Ces travaux ont montré que la population Ly6C⁺ était plutôt proche de la population humaine CD14⁺ CD16^{neg} alors que la population murine Ly6C^{low/neg} semblait plutôt apparentée aux populations CD14⁺ CD16⁺ et CD14^{dim} CD16⁺ (Ingersoll et al., 2010b). Sur cette base, le rapprochement entre ces populations murines et humaines est souvent effectué dans la littérature, les décrivant comme des populations « homologues ». Il convient néanmoins de noter que l'expression de plus de la moitié des gènes spécifiques à chaque population monocyttaire ne concorde pas entre les espèces.

Les sous-populations monocytaires murines et humaines diffèrent donc en proportion, en phénotype ainsi qu'au niveau transcriptomique, mais également en termes de fonction (Saha and Geissmann, 2011). Par exemple, chez l'humain, les monocytes ne semblent pas être capables de supprimer les fonctions des lymphocytes T, contrairement aux monocytes murins. De plus, bien que les monocytes non-classiques chez l'homme et chez la souris présentent toutes deux la fonction de patrouilleurs de l'endothélium, seuls les monocytes humains possèdent aussi des fonctions anti-inflammatoires, notamment par la production constitutive d'IL-1RA (Cros et al., 2010).

Les différences en expression génique et en fonctions entre les monocytes murins et humains restent donc importantes et doivent mener à une grande prudence dans l'extrapolation des données d'une espèce à l'autre. Une des raisons possibles pour ces différences pourrait tenir à l'insuffisante discrimination entre les populations de monocytes dans chaque espèce, ce qui amène à comparer de larges ensembles de cellules hétérogènes à la fois chez l'homme et chez la souris. L'identification de populations murines à partir de critères discriminants dans les sous-populations de monocytes humains permettrait de mieux déterminer les correspondances fonctionnelles entre les cellules des deux espèces.

Espèce	Murine		Humaine		
Sous-populations de monocytes	Ly6C ^{high}	Ly6C ^{low}	Classique	Intermédiaire	Non-classique
Principaux marqueurs	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{high}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{low}	CD14 ⁺ CD16 ^{neg}	CD14 ⁺ CD16 ⁺	CD14 ^{dim} CD16 ⁺
Récepteurs aux chimiokines	CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{lo}	CCR2 ^{lo} CX3CR1 ^{hi}	CCR2 ⁺	CCR2 ⁺	CCR2 ^{neg}
Fonctions (production de cytokines)	Inflammatoire	Surveillance et régénération	IL-10 (Belge et al., 2002; Rossol et al., 2012; Wong et al., 2011) TNF-α / IL-1β (Boyette et al., 2017)	IL-10 (Mukherjee et al., 2015) TNF-α / IL-1β (Boyette et al., 2017; Cros et al., 2010; Rossol et al., 2012)	IL-10 (Cros et al., 2010) TNF-α / IL-1β (Belge et al., 2002; Mukherjee et al., 2015; Wong et al., 2011)

Figure 6. Comparaison des sous-populations monocytaires chez la souris et chez l'homme (Adapté de Sprangers et al., 2016). Caractérisation phénotypique des sous-populations de monocytes chez la souris et chez l'homme selon l'expression des principaux marqueurs permettant leur identification, l'expression de récepteurs aux chimiokines ainsi que leur caractérisation fonctionnelle incluant les divergences en termes de production cytokiniques chez les monocytes humains selon les auteurs.

2. Différenciation des monocytes en cellules effectrices : cellules dendritiques, macrophages et monocytes activés

2.1. Les cellules dendritiques

2.1.1. Généralités

Le système phagocytaire mononucléé comprend les cellules dendritiques, les macrophages et les monocytes (Guilliams et al., 2014). Les cellules dendritiques sont ainsi des sentinelles du système immunitaire qui initient et dirigent les réponses immunes. Chez l'homme, elles ont surtout été analysées au niveau de la circulation sanguine et dans la peau. L'ensemble des cellules dendritiques retrouvées dans le sang représente environ 1% des PBMC.

L'identification et la caractérisation des cellules dendritiques a débuté avec des études sur les cellules adhérentes des rates de souris par Steinman et Cohn en 1973 (Steinman and Cohn, 1973). Ces cellules se différencient des macrophages par leur morphologie et par leur capacité à stimuler les lymphocytes T de manière plus importante que les autres cellules dites accessoires, tels les macrophages ou les lymphocytes B (Steinman and Witmer, 1978). Les cellules dendritiques sont donc des cellules spécialisées dans la présentation des antigènes qui peuvent migrer des tissus aux organes lymphoïdes afin d'initier les réponses immunitaires adaptatives (Geissmann et al., 2010). Elles peuvent ainsi activer les lymphocytes T naïfs et les cellules NK à l'aide de leur molécule du CMH de classe II et de classe I et orienter la réponse immunitaire vers un profil tolérogénique ou immunogénique, selon leur état d'activation et les stimuli rencontrés (Silvano, 2014).

Les cellules dendritiques diffèrent selon l'organe dans lequel elles sont localisées, les signaux de danger qu'elles peuvent reconnaître ainsi que le type de molécules solubles qu'elles produisent. Elles s'activent en reconnaissant des motifs moléculaires associés aux pathogènes (pathogen associated molecular patterns ou PAMP) ou associés aux dégâts cellulaires (damage associated molecular patterns ou DAMP) via leur pattern recognition receptors (PRR) tels que les TLR ou des récepteurs de lectines de type C (C-type lectin receptor ou CLR), dont l'expression diffère dans les différentes populations de cellules dendritiques.

2.1.2. *Les différentes populations de cellules dendritiques*

A l'image des monocytes, les cellules dendritiques présentent une grande hétérogénéité phénotypique selon les individus et selon le tissu considéré. Néanmoins, différentes populations de cellules dendritiques ont pu être identifiées et caractérisées (Haniffa et al., 2013; Shortman and Liu, 2002).

❖ *Les cellules dendritiques conventionnelles*

Les cDC sont des cellules résidentes retrouvées notamment au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques. Elles expriment le facteur de transcription Zinc Finger And BTB Domain Containing 46 (ZBTB46) et expriment fortement l'intégrine CD11c et le CMH de classe II (CD11c^{high} CMH-II⁺) et peuvent être subdivisées en deux sous-populations : les CD141⁺ appelées cDC1 et les CD1c⁺ appelées cDC2 (Dzionek et al., 2000; Guilliams et al., 2014; MacDonald et al., 2002; Meredith et al., 2012; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). La nomenclature des cDC diffère selon les auteurs, les cDC1 et les cDC2 désignant alternativement les CD141⁺ et les CD1c⁺. Ainsi, celle proposé par Guilliams et coll. a été adopté dans ce manuscrit (Guilliams et al., 2014).

- *Les cDC1 CD141⁺*

Les analyses transcriptomiques des cDC1 suggèrent une grande conservation de cette population dans le sang et dans les tissus entre ces cellules chez l'homme et chez leurs équivalents murins qui sont décrit comme étant CD8⁺ CD103⁺ (Ingersoll et al., 2010b; Lindstedt et al., 2005). Elles expriment le FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) et leur développement est dépendant de cette molécule (Ding et al., 2014). Elles expriment également fortement le TLR3, qui reconnaît des acides ribonucléiques (ARN) double brin viraux, le récepteur C-type lectin domain family 9 member A (CLEC9A) qui reconnaît les cellules endommagées via les filaments d'actines exposés (Zhang et al., 2012), le récepteur nectin-like protein 2 (Nect2) qui reconnaît le cytotoxic and regulatory T cell-associated molecule (CRTAM) des lymphocytes T CD8⁺ (Takeuchi et al., 2009)

et le récepteur aux chimiokines X-C motif chemokine receptor 1 (XCR1) (Figure 6) (Bachem et al., 2010; Caminschi et al., 2008; Galibert et al., 2005; Lindstedt et al., 2005).

Elles sont les principales productrices d'interféron λ (IFN- λ) en réponse à une activation du TLR3, importante notamment dans les réponses antivirales (Lauterbach et al., 2010). Elles peuvent également initier les réponses immunitaires adaptatives en activant les lymphocytes T CD8⁺ et sont aussi impliquées dans les réponses anti-tumorales et antivirales par leur capacité de présentation croisée (Bachem et al., 2010; Jongbloed et al., 2010). L'interaction entre les lymphocytes T CD8⁺ et les cDC1 est facilitée par l'expression de XCR1 par les cellules dendritiques qui permet la reconnaissance du ligand X-C motif chemokine ligand 1 (XCL1), un puissant facteur chimio-attractant sécrété par les lymphocytes T CD8⁺ activés (Dorner et al., 2009).

Ces cellules dendritiques sont également capables d'activer les lymphocytes T CD4⁺ allogéniques, notamment dans le contexte de transplantation (Jongbloed et al., 2010). Elles seraient capables d'orienter la réponse immunitaire vers un profil Th1, en particulier après activation du TLR3, mais également vers un profil Th2, notamment après activation par un virus *Influenza* atténué (Yu et al., 2014). Elles sont aussi capables d'activer les lymphocytes T CD4⁺ mémoires autologues en réponse à une activation par *Aspergillus fumigatus*, et d'induire une réponse Th1 (Schlitzer et al., 2013). Selon une étude de Chu et coll., ces cellules sont aussi impliquées dans des réponses tolérogéniques mais, en raison de leur expression de CD14, il est possible que les cellules analysées soient issues de monocytes et non des cellules dendritiques provenant directement de progéniteurs hématopoïétiques CDP (Chu et al., 2012).

- Les cDC2 CD1c⁺

Les différentes études effectuées sur les cDC2 CD1c⁺ montrent des divergences importantes selon le tissu dans lequel elles sont retrouvées, et sont divisées en sous-populations selon la molécule de surface exprimée (Guilliams and van de Laar, 2015). Par exemple, les cDC2 du derme expriment le CD207 alors que les cDC2 intestinales expriment l'intégrine CD103. Les cDC2 retrouvées dans la circulation sanguine expriment, quant à elles, CD11c, CD11b, CD1c, CMH de classe II, CD45RO et CD172a (Figure 6), ce qui rend ces cellules difficilement discernables des cellules dendritiques issues de monocytes (MoDC) en se basant uniquement sur le phénotype

(Dzionek et al., 2000). L'expression de Flt3 (CD135) et de IRF4 ainsi que l'absence d'expression du marqueur monocytaire CD64 permet de les différencier des MoDC (Langlet et al., 2012; Schlitzer et al., 2013).

Elles expriment la plupart des TLR à de faibles niveaux, mais n'expriment ni le TLR7, ni le TLR9 (Hémont et al., 2013). Elles produisent principalement de l'IL-12 en réponse à une activation de leur TLR8, qui reconnaît les ARN simples brins bactériens et viraux (Nizzoli et al., 2013). Elles peuvent également synthétiser de l'IL-23 en réponse à une activation du TLR8 également, ou de manière constitutive pour les cDC2 pulmonaires (Schlitzer et al., 2013). L'activation du TLR8 pourrait aussi jouer un rôle dans les réponses auto-immunes où des auto-anticorps dirigés contre les ARN du soi sont produits, et les complexes immuns internalisés accèdent aux TLR endosomaux comme le TLR8 (Ganguly et al., 2009).

Les cDC2 sont capables d'induire des réponses immunitaires par l'activation de lymphocytes T CD8⁺, toujours par l'activation du TLR8 mais également du TLR4, de manière dépendante de l'IL-12 (Nizzoli et al., 2013).

Elles peuvent également induire des réponses immunitaires via leur CMH de classe II par l'activation de lymphocytes T CD4⁺ et leur polarisation vers les voies Th1, Th2 ou Th17 (Leal Rojas et al., 2017). En condition inflammatoire, elles sont capables d'induire la polarisation des lymphocytes T vers la voie Th2 (Schlitzer et al., 2013). Les cDC2 expriment plus fortement des gènes associés à la fonction de présentation de l'antigène via le CMH de classe II que les cDC1, tels que Ifi30, HLA-DMA, la cathepsine H et la cathepsine S (Jongbloed et al., 2010).

Les cDC2 sont considérées comme homologues de la population CD11b⁺ des cellules dendritiques de la souris, et partagent de nombreuses similitudes vis-à-vis de leurs fonctions (Haniffa et al., 2013; Robbins et al., 2008)

❖ Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC sont localisées dans le sang et les organes lymphoïdes, et plus rarement dans les tissus non-lymphoïdes en condition physiologique (Reizis et al., 2011). Elles ont été originellement décrites par leur fonction en tant que productrices naturelles d'IFN de type I dans le sang, en

réponse à une activation de leur TLR7 ou de leur TLR9. Elles peuvent également produire de l'IFN de type III dans le cadre de réponses mucoales antivirales (Reizis et al., 2011; Yin et al., 2012).

Contrairement aux cDC, elles n'expriment pas de récepteur CD11c mais expriment le CD123, HLA-DR, CD45RA, le CD303 et le CD304 (Figure 7) (Haniffa et al., 2013; Reizis et al., 2011). Elles expriment le facteur de transcription E2-2 (aussi appelé Transcription Factor 4 ou TCF4) (Cisse et al., 2008). Elles sont capables de stimuler les lymphocytes T naïfs mais de manière moins importante que les cDC (Lozza et al., 2014). La forte production d'IFN par les pDC suggère qu'elles ont un rôle important dans les réponses antivirales. Néanmoins, elles répondent également à la stimulation induite par des pathogènes non-viraux. Les pDC sont donc capables de produire de l'IFN de type I en réponse au champignon *Aspergillus fumigatus* (Loures et al., 2015). Elles répondent aussi au vaccin bilité de Calmette et Guérin, en particulier par une sécrétion de granzyme B et semblent aussi amplifier les réponses immunitaires des cDC afin de permettre une activation optimale des lymphocytes T CD8⁺ (Lozza et al., 2014). Une étude effectuée par Michea et coll. a également permis de mettre en évidence la capacité des pDC sanguines et tonsillaires à s'activer par différentes bactéries à Gram positif et Gram négatif (Michea et al., 2013). Cette activation provoque une sécrétion d'IFN- α et de cytokines inflammatoires, ainsi qu'une stimulation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.

Les pDC seraient également impliquées dans certaines maladies auto-immunes tels que le lupus érythémateux disséminé (Rönnblom and Pascual, 2008), le psoriasis (Lande et al., 2015) et le syndrome de Wiskott-Aldrich (Prete et al., 2013). Pour ces trois pathologies, un taux élevé d'IFN de type I est retrouvé dans les sérums des patients, sécrété par les pDC.

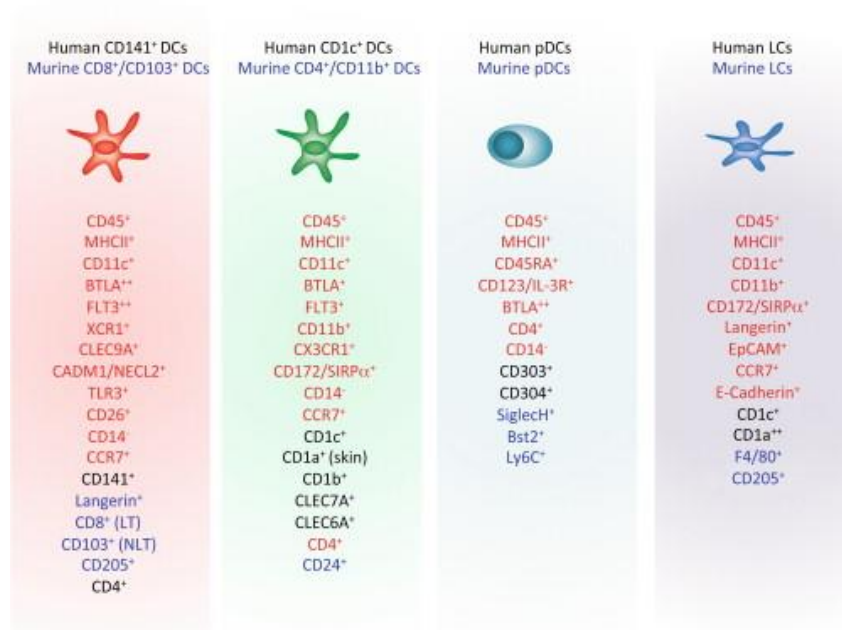


Figure 7. Molécules de surface exprimées par différentes sous-populations de cellules dendritiques chez l'homme et chez la souris (Haniffa et al., 2013). Les marqueurs en rouge sont les molécules de surface exprimées chez les deux espèces, en noir sont celles exprimées exclusivement par les cellules dendritiques humaines et en bleu sont celles exprimées exclusivement par les cellules dendritiques murines.

Bien que ces cellules présentent des fonctions hautement pro-inflammatoires, elles sont également associées à des phénomènes tolérogéniques et d'immunosuppression. Elles auraient un rôle important dans les allergies (Lambrecht and Hammad, 2009) et en transplantation (Rogers et al., 2013). Cette capacité d'induction de la tolérance immunitaire et/ou d'immunosuppression peut être liée à leur capacité à produire des enzymes indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Fallarino et al., 2007) et à induire des lymphocytes T régulateurs (Hadeiba et al., 2008).

Les équivalents murins de ces pDC sont des cellules exprimant le sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins H (siglec-H), le bone marrow stromal antigen 2 (Bst2) et le Ly6C (Haniffa et al., 2013).

❖ Hétérogénéité des cellules dendritiques

Des études récentes mettent en évidence une grande hétérogénéité au sein des populations de cellules dendritiques. Une analyse effectuée en cytométrie de masse sur les cellules dendritiques retrouve la partition de ces cellules en trois populations : les cDC1, les cDC2 et les pDC, comme décrit précédemment (Alcántara-Hernández et al., 2017). Néanmoins, les cDC2 sanguines peuvent être subdivisées en deux ou trois sous-populations selon l'expression du CD172a et du CD163 (Alcántara-Hernández et al., 2017; Villani et al., 2017). Ces sous-populations cDC2 diffèrent en pourcentage selon les individus et surtout selon leur localisation. En effet, les cDC2 sanguines ne corrélatent pas avec les cDC2 cutanées dans cette étude.

Une population de cellules dendritiques à l'intersection des pDC et des cDC2 a également été identifiée par Alcántara-Hernández et coll. et elle serait apparentée aux cellules dendritiques Axl⁺ décrites par Villani et coll., exprimant également siglec1 et siglec6 (Villani et al., 2017). Elles sont distinctes des autres populations de cellules dendritiques de par leur fonction. Capables d'induire la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ allogéniques de manière plus importante que les cDC1 et les cDC2, sachant que les pDC n'induisent pas de prolifération des lymphocytes T dans cette étude.

Ce type de subdivision a permis également d'identifier des pDC, productrices d'IFN, de manière plus pure car distinctes des cellules dendritiques Axl⁺ qui seraient analysées de manière conjointes aux pDC lorsqu'elles ne sont définies que par les marqueurs standards CD123 et CD303 (Villani et al., 2017).

Concernant les cDC1, elles semblent plutôt homogènes et conservées entre les individus bien qu'elles présentent des différences phénotypiques selon leur localisation (Alcántara-Hernández et al., 2017; Villani et al., 2017). Ainsi, le récepteur CLEC9A est exprimé chez les cDC1 sanguines mais pas cutanées. Ceci concorde avec l'observation faite sur les DC migratoires qui perdent l'expression de CLEC9A dans les tissus (Segura et al., 2012). De plus, Schraml et coll. ont démontré une perte de l'expression de CLEC9A durant le développement des cDC1, ce qui pourrait expliquer cette perte d'expression de CLEC9A des cDC1 cutanées (Schraml et al., 2013).

2.1.3. Les cellules dendritiques issues de monocytes

Les cellules dendritiques ne représentent que 0,5% à 1% des PBMC, et sont donc difficiles d'accès en l'état. Ainsi, la majorité des connaissances recueillies ces vingt dernières années sur les cellules dendritiques humaines ont surtout été obtenues *in vitro* par différenciation des monocytes via l'utilisation de GM-CSF et d'IL-4 sur les monocytes en culture (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Cette méthode de différenciation permet d'obtenir des cellules dendritiques au phénotype comparable à celui des cellules dendritiques sanguines, que ce soit en termes de morphologie, de capacité migratoire ou de capacité à stimuler les lymphocytes T naïfs, après maturation par du TNF- α (Chapuis et al., 1997; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Néanmoins, l'utilisation du TNF- α pour la maturation des MoDC induit une réponse allogénique réduite au cours d'une réaction mixte lymphocytaire (mixed lymphocyte reaction ou MLR) par rapport à l'utilisation de lipopolysaccharide des bactéries Gram négatif (Palucka et al., 1998; Pickl et al., 1996; Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

La différenciation des monocytes en cellules dendritiques induit une perte de l'expression de certaines molécules de surface monocytaires tels que le CD14 et le CD64, et ces MoDC expriment alors des marqueurs de cellules dendritiques tels que le DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), le CD32, certaines molécules CD1, des molécules du CMH de classe I et de classe II, les molécules de co-stimulation CD80, CD86 et CD40, ainsi que la molécule d'adhésion ICAM-1 (Geijtenbeek et al., 2000; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). La maturation des MoDC, par exemple avec utilisation de LPS bactérien, conduit à une perte de l'expression de CD32 et une réduction de la capacité de ces cellules à capturer des antigènes. Néanmoins, cette maturation induit une augmentation de l'expression des molécules du CMH ainsi que des molécules de co-stimulation, de CD11c, de ICAM-1 et du marqueur de maturation des cellules dendritiques CD83 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Zhou and Tedder, 1996). Les MoDC matures deviennent donc des inducteurs potentiels de la prolifération des lymphocytes T allogéniques et autologues, et possèdent cette capacité spécifique des cellules dendritiques à stimuler les lymphocytes T naïfs (Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

La différenciation des monocytes en cellules dendritiques à partir des sous-populations CD16^{neg} et CD16⁺ a également été étudiée (Sánchez-Torres et al., 2001). Sánchez-Torres et coll. ont induit

la différenciation et la maturation des monocytes CD16^{neg} et CD16⁺ à l'aide de GM-CSF, d'IL-4 et de TNF- α . Les deux sous-populations de MoDC obtenues présentent des caractéristiques classiques de cellules dendritiques, tels que l'internalisation d'antigènes solubles ainsi que la capacité à stimuler la prolifération des lymphocytes T allogéniques et autologues. Néanmoins, les deux populations de MoDC présentent des différences phénotypiques : les MoDC dérivées de monocytes CD16⁺ expriment plus fortement le CD86, le CD11c et plus faiblement le CD1a et le CD32, comparées aux MoDC issues de monocytes CD16^{neg}. Dans cette expérience, Sánchez-Torres et coll. ont également induit la différenciation et la maturation des deux populations de monocytes à l'aide de LPS au lieu de TNF- α . Dans ces conditions, les MoDC issues de monocytes CD16^{neg} expriment plus fortement de l'ARN messager (ARNm) de la sous-unité p40 de l'IL-12 (IL-12 p40) et sécrètent de plus grandes quantités de la sous-unité p70 de l'IL-12 (IL-12 p70) que les MoDC issues de monocytes CD16⁺. Aussi, les lymphocytes T CD4⁺ stimulés par les MoDC de monocytes CD16⁺ produisent une plus grande quantité d'IL-4 comparés à ces mêmes lymphocytes stimulés par les MoDC issues de monocytes CD16^{neg}.

Une autre étude, menée par Boyette et coll., portait également sur la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, mais en considérant les trois populations de monocytes classiques, intermédiaires et non-classiques (Boyette et al., 2017). Dans ce travail, seuls les monocytes classiques se sont différenciés en acquérant les molécules de surface typiques des cellules dendritiques et ayant la capacité de stimuler la prolifération des lymphocytes T allogéniques en MLR. Cependant, dans cette étude, les monocytes ont été différenciés en MoDC immatures, utilisant le GM-CSF et l'IL-4, sans utiliser de facteurs de maturation comme le TNF- α ou le LPS bactérien. Aussi, les méthodes de purification d'une étude à l'autre sont très divergentes.

2.1.4. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques

Une certaine dynamique dans le développement des différentes populations de cellules immunitaires est essentielle aux réponses immunes. Le réarrangement des T-cell receptors (TCR) durant le développement des lymphocytes T permet de produire des lymphocytes ayant un spectre extrêmement large de TCR, permettant de reconnaître de nombreuses cibles différentes. En contrepartie, ce processus ne permet d'obtenir que très peu de cellules spécifiques d'un antigène

(Moon et al., 2007). L'activation des lymphocytes T est suivie d'une phase d'expansion de ces cellules, indispensable au développement d'une réponse immunitaire effective. L'efficacité de cette réponse et la clairance du pathogène réduit la capacité des CPA à activer les lymphocytes T et la population de cellules effectrices générée subit une étape de contraction. Ainsi, dans une réponse aigue, les réponses lymphocytaires T sont caractérisées par des étapes de prolifération et de contraction : après reconnaissance d'un antigène présenté par les CPA telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes T s'activent (phase d'amorçage), prolifèrent tout en développant des fonctions effectrices (phase d'expansion et phase effectrice), puis la majorité des lymphocytes T spécifiques d'un antigène meurent par apoptose (phase de contraction) et une petite population de lymphocytes T mémoires subsistent afin de permettre une protection immédiate en cas de réinfection (phase mémoire).

L'activation des lymphocytes T nécessitent différents signaux afin d'amorcer la réponse immunitaire (Figure 8). Les cellules T matures circulent dans le sang et les tissus lymphoïdes, scannant les CPA à la recherche de complexes CMH associé à un peptide. Ces complexes CMH-peptide sont reconnus par les TCR des lymphocytes, stoppant ainsi leur migration et formant un contact stable avec la CPA. Ce premier signal d'amorçage de la réponse immune est renforcé par un second signal au niveau de la synapse immunologique entre la CPA et le lymphocyte via les récepteurs de co-stimulation tels que les récepteurs CD28, CD40L et le récepteur inducible T cell co-stimulator (ICOS) des lymphocytes ou les récepteurs CD80 et CD86 des cellules dendritiques matures (Acuto and Michel, 2003). Il existe également des récepteurs d'inhibition de la réponse immune tels que le cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) et programmed cell death 1 (PD-1), impliqués dans les phénomènes de tolérance (Acuto and Michel, 2003).

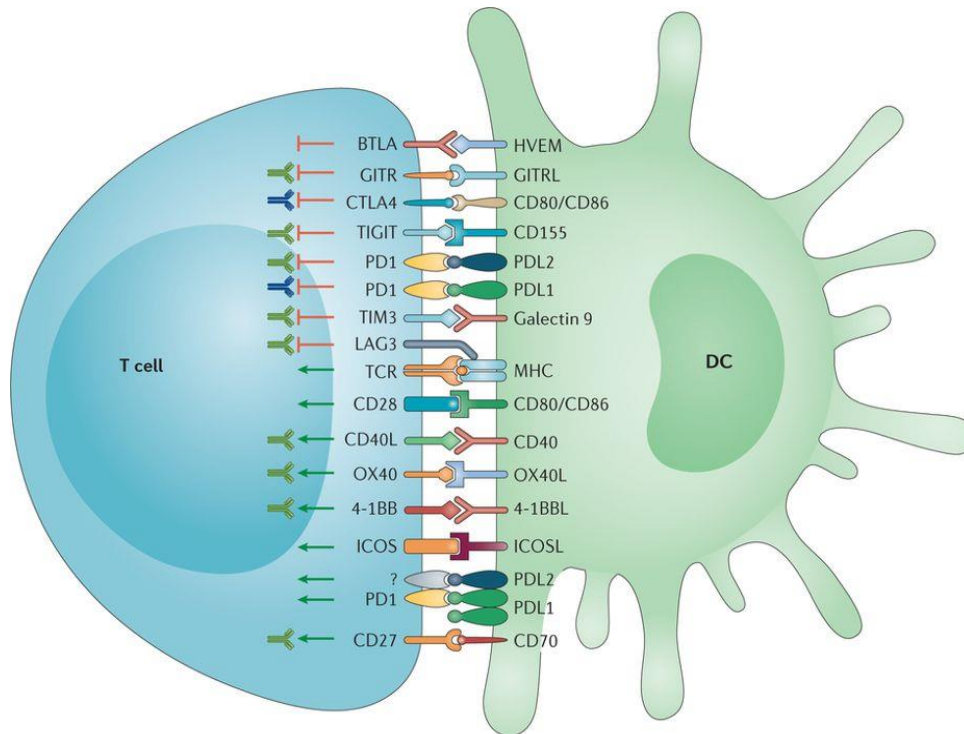


Figure 8. Les interactions entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigènes ou la synapse immunologique (Wykes and Lewin, 2018). Schéma détaillant les principaux récepteurs et leur ligand impliqués dans les interactions entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes. Les molécules d'activation et de co-stimulation induisent et/ou amplifient les réponses des lymphocytes T effectrices (représenté par une flèche verte) et les molécules de surface inhibitrices réduisent/suppriment les réponses des lymphocytes T effectrices (représenté par une flèche orange) (voir liste des abréviations p.14). Les symboles représentant un anticorps représentent les voies étudiées dans les essais cliniques (anticorps verts) et ceux actuellement utilisées en clinique (anticorps bleus).

Les cytokines nécessaires à la polarisation des lymphocytes T sont considérées comme le troisième signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T (avec la ligation du TCR et l'activation des récepteurs de co-stimulation). Elles peuvent être produites par les cellules dendritiques, comme l'IL-12 impliqué dans la polarisation des lymphocytes T vers la voie Th1 (de Jong et al., 2002), l'IL-4 vers la voie Th2, l'IL-1 et l'IL-23 pour les réponses Th17 (de Jong et al., 2005; Khamri et al., 2010) ou l'IL-10 pour les réponses Treg (de Jong et al., 2005).

La caractérisation précise de l'environnement cytokinique établi par les cellules dendritiques dans les interactions entre ces CPA et les lymphocytes T, serait donc cruciale pour comprendre les mécanismes qui induisent une polarisation des lymphocytes T vers une voie donnée. Aussi, selon

le stimulus rencontré, les cellules dendritiques seraient donc capables d'orienter la réponse immunitaire vers une voie plutôt qu'une autre. Par exemple, une activation du TLR4 par *Escherichia coli* ou du TLR2 par *Listeria monocytogenes* induit une réponse Th1 (van Riet et al., 2009). Néanmoins, l'activation du TLR2 par des PAMP dérivés d'helminthes induit plutôt une réponse Th2. L'orientation de la réponse immunitaire semble donc complexe et pourrait ne pas être exclusivement corrélée à l'activation de TLR spécifiques. Une étude menée par Everts et coll. a montré que les MoDC présentant un antigène de *Schistosoma mansoni* induisent une réponse lymphocytaire Th2 indépendamment de l'activation d'un TLR (Everts et al., 2009). Les mécanismes moléculaires responsables de la polarisation différentielle des lymphocytes T auxiliaires semblent donc multiples et complexes, en particulier concernant les mécanismes par lesquels les cellules dendritiques orientent la réponse immunitaire lymphocytaire.

❖ Différenciation et polarisation des lymphocytes T

Après reconnaissance de l'antigène et activation, les lymphocytes T CD4⁺ prolifèrent et une partie de ces cellules deviennent des lymphocytes effecteurs ou auxiliaires. Ils peuvent recruter et activer d'autres cellules de l'immunité innée et favoriser l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et des lymphocytes B spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes T CD4⁺ activés présentent une grande hétérogénéité fonctionnelle, chacun ayant son profil de sécrétion cytokiniques (Figure 8). Ce sont les cytokines produites par les CPA qui, majoritairement, induisent l'orientation de la polarisation des lymphocytes T vers une voie donnée.

Les premières populations de lymphocytes T CD4⁺ distingués par leurs profils cytokiniques furent les populations de lymphocytes T auxiliaires 1 (T helper 1 ou Th1) et Th2 (Mosmann et al., 1986).

L'orientation de la polarisation des lymphocytes vers la voie Th1 nécessite de l'IL-12 ainsi que l'expression de facteurs de transcription tels que le T cell-specific T-box transcription factor (T-bet). L'IFN- γ produit par les Th1 a des effets pléiotropes et permet notamment l'aide à la destruction des pathogènes par les cellules phagocytaires en stimulant la phagocytose et l'activité antimicrobienne des macrophages et des polynucléaires neutrophiles, augmentant la cytotoxicité

des lymphocytes NK, et induisant indirectement la production d'IgG opsonisant (Romagnani, 1995; Schroder et al., 2004).

La polarisation des lymphocytes vers la voie Th2 est dépendante de l'IL-4, qui est aussi la principale cytokine produite par ces cellules, et du facteur de transcription Gata3 (Nair et al., 2006; Romagnani, 1995). Les lymphocytes Th2 coordonnent notamment les réponses immunitaires contre les parasites au niveau des muqueuses et de la barrière épithéliale. L'IL-4 permet le recrutement des mastocytes, des éosinophiles, des basophiles et peut activer les mastocytes, les cellules épithéliales et les cellules des muscles lisses. Cette cytokine peut aussi induire une commutation isotypique des anticorps en IgE qui jouent un rôle crucial dans l'allergie.

D'autres sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ ont également été très étudiées. Les lymphocytes Treg sont des cellules impliquées dans l'induction et la maintenance de la tolérance du soi. Cette population, comprenant elle-même diverses sous-populations, est caractérisée par une sécrétion d'IL-10 et de TGF- β , et par l'expression du facteur de transcription forkhead box p3 (Foxp3) (von Boehmer, 2005). Le développement des Treg est dépendant du TGF- β et de l'IL-2.

Une population de lymphocytes T CD4⁺ productrice d'IL-17, les lymphocytes Th17, a également été découverte. L'orientation de la polarisation des lymphocytes T vers la voie Th17 est induite par le TGF- β et l'IL-6, et par l'expression du facteur de transcription RAR-related orphan receptor gamma 2 (ROR γ t) (Basu et al., 2013). Elles sont notamment impliquées dans la clairance des infections fongiques et bactériennes extra-cellulaires par l'induction du recrutement de polynucléaires neutrophiles.

De nombreuses autres populations de lymphocytes T helper ont été découvertes plus récemment et nécessitent des études plus approfondies afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action et leur implication en physiologie et en pathologie. On distingue ainsi :

- les lymphocytes Th9, producteurs d'IL-9, impliqués dans la protection contre les infections à helminthes (Anuradha et al., 2016),
- les lymphocytes Th22, producteurs d'IL-22, recrutés au niveau de la peau et impliqués dans les défenses antimicrobiennes mais aussi associés à des pathologies cutanées inflammatoires (Raphael et al., 2015),

- les lymphocytes follicular helper T (Tfh), engagés dans la régulation et le développement des réponses impliquant les lymphocytes B spécifiques d'un antigène. Ils expriment le CXCR5 et ICOS (Ma et al., 2012).

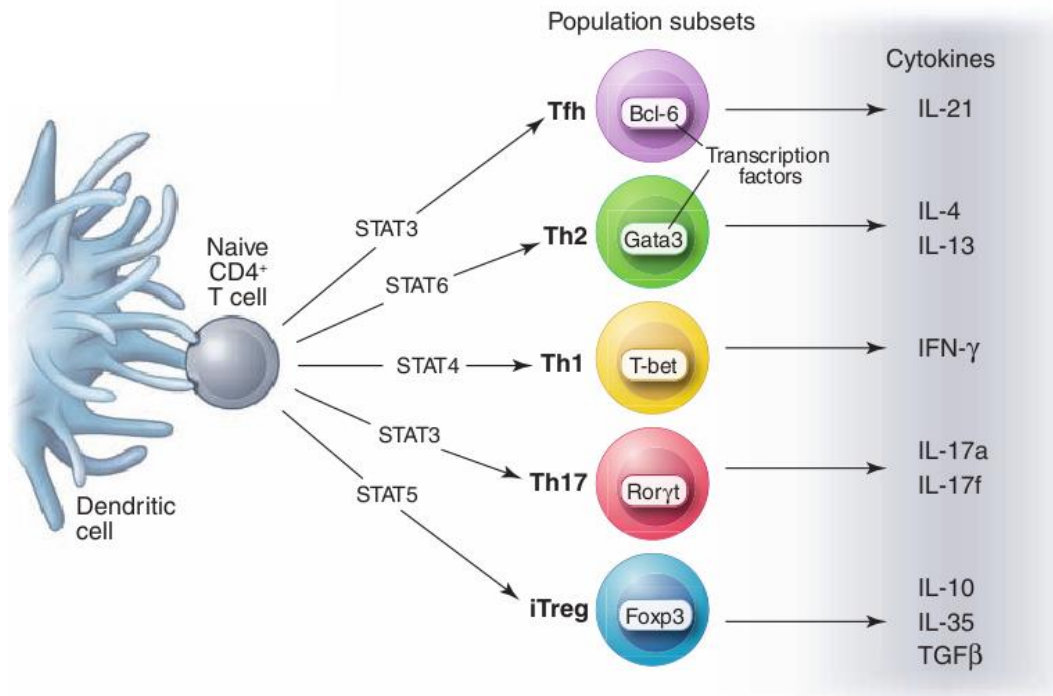


Figure 9. Les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ après activation par une cellule dendritique (O’Shea and Paul, 2010). Des exemples de polarisation des lymphocytes T CD4⁺ possibles après activation par une cellule dendritique sont présentés avec les différents facteurs de transcription spécifiques d’une voie donnée et les cytokines principales sécrétées par ces sous-populations de lymphocytes T CD4⁺.

2.2. Macrophages

Les macrophages constituent une population très hétérogène de cellules spécialisées présentes surtout dans les tissus. Ils présentent des fonctions distinctes et possèdent des profils d’expression de molécules de surface particuliers selon le tissu dans lequel ils résident (Gordon, 2003; Gordon and Taylor, 2005; Taylor et al., 2003). Parmi les macrophages spécialisés dans les tissus, sont retrouvés (Davies et al., 2013) :

- les cellules de Kupfer au niveau du foie,
- les cellules microgliales dans le système nerveux central,

- les macrophages métallophiliques dans la rate,
- les ostéoclastes au niveau des os,
- les macrophages alvéolaires dans les poumons.

Ces cellules sont impliquées dans l'homéostasie tissulaire assurant par leurs fonctions angiogéniques une concentration correcte en métabolites, en facteurs de croissance et en électrolytes afin de maintenir les fonctions des tissus (Jantsch et al., 2014). Elles sont aussi impliquées dans les réponses immunitaires innées et adaptatives en particulier par leur capacité de phagocytose, de clairance des corps apoptotiques, de destruction et de clairance des pathogènes et jouent également un rôle dans la cicatrisation (Davies et al., 2013).

Certaines populations de macrophages sont maintenues dans les tissus par auto-renouvellement mais peuvent être également remplacées par des macrophages issues de monocytes circulants, en particulier à la suite de traumatismes ou au cours de l'inflammation (Arnold et al., 2007). En effet, les macrophages issus de monocytes sont fortement impliqués dans l'inflammation, notamment dans l'élimination des pathogènes alors que les macrophages résidents sont plutôt impliqués dans le développement, l'homéostasie tissulaire et la résolution de l'inflammation (Ginhoux and Jung, 2014).

Les macrophages peuvent être subdivisés en deux sous-populations qui diffèrent à la fois phénotypiquement et fonctionnellement, selon les stimuli rencontrés. Une population activée classiquement dite M1 et une population activée de manière alternative dite M2 (Martinez and Gordon, 2014). Les macrophages M1 sont impliqués dans les phases précoces de l'inflammation, spécialisés dans la destruction des pathogènes intracellulaires et dans la résistance tumorale. Les macrophages M2 sont considérés comme des cellules majoritairement anti-inflammatoires, limitant l'inflammation et aidant à la cicatrisation. Les termes M1 et M2 sont associés aux réponses de type 1 et 2, originellement définies par la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 et Th2, respectivement.

La polarisation des macrophages vers la voie M1 est induite par des stimuli inflammatoires : le LPS, reconnu par leur TLR4 et l'IFN- γ notamment produite par les lymphocytes Th1 et les cellules NK (Figure 9) (Martinez and Gordon, 2014). Leur action antimicrobienne est partiellement due au relargage de médiateurs inflammatoires tels que TNF- α , IL-1 et de l'oxyde nitrique. Ils peuvent

avoir des effets directs sur les particules microbiennes par phagocytose et par sécrétion de ROS. Ces macrophages ont également des effets indirects sur les pathogènes en produisant d'autres cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-12, l'IL-6 et l'IL-1 β , et des chimiokines permettant le recrutement de cellules immunitaires au site inflammatoire. Leur activation induit également l'expression du CMH. Ils ont donc un rôle dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T, mais de manière moins efficace que les cellules dendritiques. De plus, du fait de leur localisation, les macrophages semblent donc surtout être impliqués dans les réponses immunitaires au niveau des tissus comme cellules résidentes alors que les cellules dendritiques sont plus adaptées au développement des réponses immunitaires par leur capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires.

L'activation alternative des macrophages vers la voie M2 est induite par l'IL-4 sécrétée notamment par les lymphocytes Th2, en association avec l'IL-13 (Mahdavian Delavary et al., 2011; Martinez and Gordon, 2014). L'activation des macrophages M2 peut être provoquée par une grande diversité de facteurs tels que des cellules fongiques, des complexes immuns, des parasites comme les helminthes, des composants du complément, des cellules apoptotiques. Cette activation conduit les macrophages M2 à sécréter de l'IL-10 et de manière modérée de l'IL-12.

Les macrophages M2 peuvent être subdivisés en quatre sous-catégories de macrophages : les macrophages M2a, M2b, M2c et M2d, selon leur phénotype, les molécules qui les activent, leur profil d'expression transcriptomique ainsi que les cytokines qu'ils sécrètent (Figure 9) (Mantovani et al., 2004; Röszer, 2015). Les macrophages M2a sont induits principalement par l'IL-4 et l'IL-13 et produisent de l'IL-10 et du TGF- β . Les complexes immuns et l'IL-1 β permettent la polarisation des macrophages vers la voie M2b, pouvant sécréter de l'IL-1, de l'IL-6, de l'IL-10 et du TNF- α . Les macrophages M2c, stimulés par l'IL-10, le TGF- β ou des glucocorticoïdes sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β . Enfin, la polarisation des macrophages vers la voie M2d est induite par l'IL-6, de l'adénosine ou des facteurs leucocytaires inhibiteurs (leukocyte inhibitory factor ou LIF). Ces macrophages M2d peuvent produire de l'IL-10 et du TGF- β , mais aussi de l'IL-12 et du TNF- α . Ces macrophages M2 sont donc plutôt spécialisés dans les réponses anti-inflammatoires, dans l'immuno-régulation ainsi que dans la réparation et le remodelage tissulaire.

Les phénotypes M1 et M2 et leurs subdivisions ont été essentiellement définis et étudiés *in vitro*. L'identification de cellules correspondant à ces phénotypes *in vivo* reste difficile et, pour de

nombreux auteurs, des phénotypes intermédiaires aux états décrits dans cette classification seraient fréquents (Italiani and Boraschi, 2014; Mosser and Edwards, 2008; Sica and Mantovani, 2012). Les phénotypes M1 et M2 pourraient ainsi correspondre à des stades de différenciation représentatifs de cellules différenciées suivant des profils apparentés bien que variés (Mosser and Edwards, 2008).

Sous-populations de macrophages	M1	M2			
		M2a	M2b	M2c	M2d
Stimulation/Activation	LPS IFN- γ GM-CSF	IL-4 IL-13 Infections à helminthes Infections fongiques	Complexes immuns IL-1R	IL-10 TGF- β Glucocorticoïdes	IL-6 LIF Adénosine
Molécules de surface exprimées	CMH II CD86 CD80 CD68 IL-1R TLR2 TLR4 iNOS SOCS3	CMH II CD163 MMR (CD206) TGM2 DecoyR IL-1R II CD200R	CMH II CD86	CD163 TLR1 TLR8	VEGF
Cytokines sécrétées	TNF IL-1 β IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF- β IL-1Ra	IL-1 IL-6 IL-10 TNF- α	IL-10 TGF- β	IL-10 IL-12 TNF- α TGF- β
Chimiokines sécrétées	CCL2 CCL3 CCL4 CCL5 CCL8 CCL9 CCL10 CCL11	CCL17 CCL22 CCL24	CCL1	CCR2	CCL6 CXCL10 CXCL16

Figure 10. Phénotype des sous-populations de macrophages M1 et M2 (adapté de Röszer, 2015 et Duluc et al., 2007). Les principaux signaux permettant l'activation des macrophages vers les voies M1, M2a, M2b, M2c et M2d ainsi que leur phénotype en termes de récepteurs exprimés à la surface de ces cellules, de cytokines et de chimiokines sécrétées (voir liste des abréviations p.14).

Les macrophages peuvent également être responsables d'effets délétères pour l'organisme dans certains environnements tumoraux. Le microenvironnement local autour de la tumeur peut être immunosuppresseur et favoriser la survie tumorale (Gajewski et al., 2013). Bien que la fonction tumoricide des macrophages a été démontrée *in vitro* (Fidler, 1988), les macrophages adoptent un phénotype pro-tumoral *in vivo* au niveau des sites primaires et métastatiques cancéreux (Condeelis and Pollard, 2006; Lin et al., 2001, 2006; Schoppmann et al., 2002). Parmi leurs effets sur la progression tumorale, ils suppriment les réponses lymphocytaires T, ont des activités pro-angiogéniques et promeuvent l'invasion des cellules tumorales, leur motilité et leur intravasation (Qian and Pollard, 2010). Ces macrophages associés aux tumeurs (tumor-associated macrophage ou TAM) représentent donc une cible d'intérêt pour les traitements anti-cancéreux au vu de leurs nombreuses interactions avec les tumeurs.

2.3. Monocytes activés

Une étude récente de Jakubzick et coll. effectuée chez la souris a permis de mettre en évidence la capacité des monocytes à infiltrer les tissus sans procéder à une différenciation en cellule dendritique ou en macrophage (Jakubzick et al., 2013). Une analyse effectuée sur des échantillons de peau, de poumon et de ganglions lymphatiques a révélé la présence de monocytes classiques dans ces tissus, exprimant notamment Ly6C et le CMH de classe II. Les monocytes classiques retrouvés dans ces compartiments ont des propriétés proches des monocytes classiques de la circulation sanguine. De plus, une déplétion spécifique des monocytes sanguins entraîne une baisse des monocytes non-différenciés retrouvés dans les tissus, sans modifier les autres compartiments cellulaires dans ces mêmes tissus.

Ces monocytes dits « résidents » seraient alors impliqués dans la surveillance immunitaire tissulaire à l'instar des cellules dendritiques. Néanmoins, leur mécanisme d'action serait différent des cellules dendritiques car les monocytes résidents ne sont pas spécialisés dans la présentation des antigènes (Drutman et al., 2012). Des mécanismes alternatifs pourraient être mis en jeu dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative, notamment par la production d'IL-15, d'IL-18 et d'IFN de type I (Soudja et al., 2012). De manière intéressante, ces monocytes ne peuvent pas se différencier en macrophage lors de pathologies hautement inflammatoires telles que la maladie de

Crohn (Bain et al., 2013). En effet, dans cette étude de Bain et coll. des monocytes classiques Ly6C^{high} de souris saines ont été transférés chez des souris atteintes de colite. Au niveau des localisations inflammatoires du colon, les monocytes ne parviennent pas à se différencier correctement en macrophage. Néanmoins, ils parviennent à se différencier en macrophage au niveau du tissu non-inflammatoire du colon ou chez des souris saines (Bain et al., 2013).

3. Les monocytes en situation inflammatoire : les grands brûlés

3.1. Définition et atteinte systémique

Les brûlures constituent un type de blessure cutanée ou touchant d'autres tissus organiques, causée par la chaleur, le froid, l'électricité, les radiations, la friction ou au contact de produits chimiques.

Une blessure par brûlure déclenche une nécrose ischémique des différentes couches tissulaires atteintes ainsi que des tissus sous-jacents. La gravité des dégâts causés par la brûlure dépend du type de l'agent responsable de la brûlure, du type d'exposition à l'agent et de la température à laquelle la peau est exposée. Trois zones peuvent être identifiées au niveau de la brûlure (Hettiaratchy and Dziewulski, 2004) (Figure 11) :

- une zone centrale de coagulation caractérisée par des dommages irréversibles des tissus,
- une zone transitionnelle de stase adjacente à la zone de coagulation, sujette à des dommages modérés associés à une fuite vasculaire, une concentration élevée de facteurs vasoconstricteurs et une réaction inflammatoire locale,
- une zone d'hyperémie secondaire à une vasodilatation induite par l'inflammation, caractérisée par une augmentation de la perfusion tissulaire.

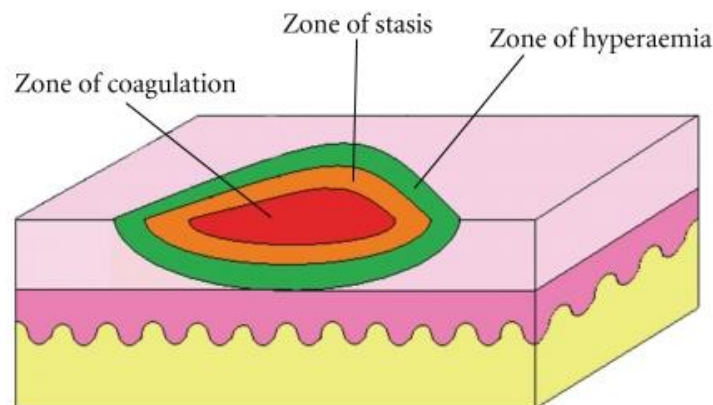


Figure 11. Illustration des zones observables suite à une brûlure (Gandhi et al., 2010). Trois zones peuvent être identifiées suite à une brûlure : une zone centrale de coagulation, une zone intermédiaire de stase et une zone périphérique d'hyperémie.

Outre la blessure localisée, la brûlure peut entraîner des modifications généralisées notamment une augmentation de la perméabilité capillaire dont résulte une fuite de plasma vers les tissus interstitiels pendant les 48 heures suivant la brûlure. La perméabilité capillaire est ensuite soit rétablie, soit, suite à des phénomènes de thromboses, les fluides extravasculaires ne peuvent pas réintégrer la circulation. Cette perte de plasma est la cause du choc hypovolémique pouvant se produire après une brûlure. La quantité de fluide perdue dépend principalement de la superficie de la brûlure. Ainsi, une brûlure qui s'étend sur plus de 15% de la surface corporelle induira un choc hypovolémique. Une brûlure au-delà de 50% de la surface corporelle induira une perte maximale de fluide. Une augmentation de la résistance vasculaire systémique est également observée chez les patients brûlés, réduisant le débit sanguin (Arturson, 1961; Aulick et al., 1977).

Les brûlures ont également un impact sur les membranes cellulaires. Le potentiel membranaire des cellules des muscles squelettiques distants du site traumatique est réduit si la surface corporelle totale atteinte par la brûlure est supérieure à 30% (Baxter, 1974). La baisse du potentiel membranaire est en partie responsable de l'augmentation des flux de sodium et de potassium, pouvant être la cause d'œdèmes tissulaires se formant suivant les altérations membranaires des cellules.

L'hypovolémie induite par la brûlure est associée à la formation et à la sécrétion de médiateurs inflammatoires agissant au niveau systémique entraînant des dysfonctions cardiovasculaires (Aulick et al., 1977; Demling, 1987). Ces événements associés aux brûlures ne permettent pas une bonne oxygénation des tissus et un apport suffisant des nutriments aux cellules. Malgré les traitements pour restaurer les pertes fluidiques du patient, les résistances vasculaires systémiques et pulmonaires augmentent ainsi qu'une baisse des fonctions du myocarde, contribuant ainsi à une exacerbation des réponses inflammatoires et contribue au risque de défaillance d'organe (Demling et al., 1978; Hilton and Marullo, 1986).

Les patients brûlés sont susceptibles aux infections, et ceci croît en fonction de la surface corporelle atteinte par la brûlure (Pruitt, 1984). L'amélioration du traitement des brûlures a permis de réduire l'occurrence des infections bactériennes. Dans une étude ultérieure par Pruitt et coll. sur l'épidémiologie des patients atteints de brûlures, il a été montré qu'outre les infections bactériennes, les infections virales et fongiques étaient aussi responsables du développement de sepsis chez les patients brûlés (Pruitt and McManus, 1992). La cause principale de cette

susceptibilité au sepsis chez les patients brûlés est l'immunosuppression causée par le traumatisme (Hotchkiss et al., 2013; Nunez Lopez et al., 2017). La brûlure affecte les défenses non spécifiques du patient, notamment par altération des fonctions chimiotactiques et phagocytiques des cellules de l'immunité innée, comme les polynucléaires neutrophiles (Fayazov et al., 2009). De même, les macrophages subissent également une altération de leurs fonctions de phagocytose et de production de cytokines (Arturson, 1985; Schmidt et al., 1983). Aussi, les patients brûlés présentent un sérum appauvri en immunoglobulines de toutes classes (Daniels et al., 1974; Rodrick, 1999).

3.2. Réponse inflammatoire

L'activation de la réponse immunitaire innée constitue un événement crucial de l'initiation de l'hyper-inflammation qui suit le traumatisme. Les DAMPs produits suite au traumatisme sont reconnus par les récepteurs des cellules de l'immunité innée et les stimulent. Ils représentent une superfamille de molécules générant des signaux de « danger » ou de perturbation de l'homéostasie qui incluent des PAMPs et des alarmines tels que des annexines, des défensines, des protéines S100 ou des heat-shock proteins (HSP), et sont principalement reconnus par les TLR à la surface des cellules (Bianchi, 2007). Chez la souris et chez l'homme, une augmentation de l'expression du TLR-2 à la surface des monocytes a été démontrée en réponse à une brûlure, en conjonction avec l'augmentation du niveau de DAMPs dans la circulation (Rani et al., 2017; Yu et al., 2016). Une augmentation de l'expression du TLR-4 a également été observée chez l'homme, mais pas chez la souris.

Parmi les premières étapes de l'activation de l'immunité innée, l'activation du complément et le recrutement des neutrophiles représentent des étapes clés dans la réponse à un traumatisme tissulaire. L'activation du complément conduit à l'opsonisation des pathogènes ce qui facilite leur phagocytose (C3b et C4b), au recrutement des leucocytes par chimiotactisme (C3a et C5a) et à la lyse des pathogènes via les complexes d'attaques membranaires (MAC et C5b-9) (Noris and Remuzzi, 2013; Stahel and Barnum, 2006). La production de C3a et C5a permet donc le recrutement des cellules immunitaires au site de l'inflammation par chimiotactisme dont les monocytes et les neutrophiles (Guo and Ward, 2005). Ces cellules migrent également suite à la production d'autres facteurs chimiotactiques tels que la kallikréine et la fibrine, relargués ou

restructurés lors du processus de coagulation. Cette réponse cellulaire permet la phagocytose des tissus nécrosés et des médiateurs endogènes libérés par les tissus brûlés (Tiwari, 2012).

Les différents compartiments cellulaires de l'immunité sont également altérés lors de traumatismes ou de brûlures. En effet, ces types de blessures induisent une dépression des fonctions de la composante innée du système immunitaire, un phénomène décrit comme une paralysie immunitaire clinique (Joshi et al., 1998; Yadavalli et al., 2001). Il est associé à une altération des fonctions des macrophages, une baisse de l'expression des molécules du CMH notamment au niveau des monocytes, et une baisse de la production d'IFN- γ par les cellules immunitaires, notamment les cellules NK. Ces altérations sont une des causes de la susceptibilité accrue aux infections des grands brûlés. Cette susceptibilité pourrait être due en partie à une diminution du nombre de cellules NK dans la circulation, à l'inhibition des fonctions NK causée par des médiateurs solubles associés à la brûlure ou par d'autres populations de cellules immunitaires suppressives (Haik et al., 2015; Joshi et al., 1998; Livingston et al., 1988).

Les cellules natural killer T (NKT) semblent également être impliquées dans cette susceptibilité aux infections. Les CPA peuvent simultanément présenter des antigènes glycolipidiques aux cellules NKT via leur récepteur CD1d et des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4⁺ via leur molécule du CMH II (Faunce et al., 2003; Palmer et al., 2006). L'IL-12 produit par les CPA induit la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2 par les cellules NKT, facilitant les fonctions effectrices des CPA et des lymphocytes T CD4⁺. Suite à une brûlure, les CPA produisent moins d'IL-12 et sécrètent alors de l'IL-6 et du TNF- α . Les cellules NKT activées par ces CPA en présence de grande quantité de cytokines pro-inflammatoires perdent leur capacité à produire de l'IFN- γ et sécrètent de l'IL-4 et du TGF- β . Ces cytokines permettent plutôt une inhibition des fonctions effectrices des CPA et des lymphocytes T CD4⁺. Ainsi, la brûlure dans ce contexte induit une réponse orientée vers la voie Th2 associée à une suppression des fonctions effectrices des lymphocytes T CD4⁺ au lieu d'orienter la réponse immunitaire vers la voie Th1 dans un cadre physiologique (Faunce et al., 2003; Palmer et al., 2006).

Les monocytes de patients brûlés présentent aussi des modifications phénotypiques et fonctionnelles.

Les monocytes circulants de brûlés présentent une surexpression du facteur de transcription MafB chez l'homme et chez la souris (Howell et al., 2012; Williams et al., 2012). Dans ces études, des expériences de blocage de l'expression de MafB ont été effectuées *ex-vivo* par l'utilisation d'ARN interférant associant la diminution de l'expression de MafB à une augmentation de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques.

Chez des patients brûlés, le pourcentage de monocytes exprimant CD16 et HLA-DR diminue au premier jour de la brûlure puis augmente après trois et sept jours (Yu et al., 2016). Une autre étude de Venet et coll. a montré que l'expression de HLA-DR des monocytes totaux et des MoDC est fortement diminuée à deux et trois jours après la brûlure et augmente ensuite pour les patients qui survivent à la brûlure alors qu'elle reste diminuée pour les patients qui décèdent (Venet et al., 2007). Des différences d'expression de HLA-DR des monocytes sont également observées selon la sévérité de la brûlure, les patients sévèrement brûlés présentant des monocytes avec la plus faible expression de HLA-DR (Liu et al., 2003; Yu et al., 2016). Chez des patients brûlés développant un sepsis, le pourcentage de monocytes CD14⁺ HLA-DR⁺ serait davantage diminué qu'en l'absence de sepsis, alors que la proportion de monocytes non-classiques est amplifiée (Venet et al., 2007; Xiu et al., 2016). Cette augmentation relative des monocytes CD14⁺ CD16⁺ est aussi présente chez les patients brûlés non septiques, mais de manière moindre.

Le profil cytokinique retrouvé dans la circulation de patients brûlés influencerait également la différenciation des monocytes. Chez les brûlés, la majorité des macrophages dérivés de monocytes sont de type M2b (Kobayashi et al., 2010). Le CCL2, fortement augmenté dans le sérum des patients, contribuerait à la polarisation des monocytes vers la voie macrophagique M2b et à l'expression du CCL1 par ces macrophages. Des macrophages M2 sont également retrouvés dans les tissus adipeux des patients brûlés (Langouche et al., 2011). D'après Kobayashi et coll., ces macrophages seraient donc en mesure d'inhiber la conversion des macrophages M1 résidents vers la voie M2 (Kobayashi et al., 2010).

Une étude de Altman et coll. a permis de mettre en évidence une altération des fonctions chimiotactiques des monocytes chez les patients brûlés (Altman et al., 1977). Cette altération est plus importante chez les patients brûlés dont la brûlure s'étend sur plus de 40% de la surface corporelle totale. Cette déficience du chimiotactisme chez les monocytes serait donc associée à la sévérité de la brûlure. Plus récemment, une association entre la sévérité des brûlures et une

diminution de l'expression du CD47 des monocytes a pu être établie (Wang et al., 2011). Le CD47 est une protéine de surface impliquée dans l'augmentation du calcium intracellulaire lors de l'adhésion des monocytes à la matrice extracellulaire. Ainsi, la réduction de l'expression de cette molécule de surface pourrait correspondre à l'un des mécanismes induisant une altération du chimiotactisme observée chez les monocytes de patients brûlés.

3.3. Autres pathologies

Les monocytes ont également été étudié dans d'autres contextes inflammatoires. Ainsi, les monocytes intermédiaires augmentent fortement en proportion chez les patients atteints de sepsis (Poehlmann et al., 2009). Plus récemment, les monocytes non-classiques ont été également décrits comme étant fortement augmentés en proportion chez les patients atteints de sepsis, les monocytes non-classiques présentant un profil atypique, mal clarifié (Mukherjee et al., 2015).

Cette augmentation des monocytes CD16⁺ a également été observé dans les maladies auto-immunes (Wong et al., 2012).

Seuls les monocytes intermédiaires augmentent en pourcentage dans l'arthrite rhumatoïde (Rossol et al., 2012). Ces cellules expriment plus fortement HLA-DR et CCR5, et produisent une plus grande quantité de TNF- α et d'IL-1 β que les autres populations de monocytes. Elles sont également capables d'induire fortement l'expansion des Th17 *in vitro*, ce qui pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de cette maladie. La thérapie médicamenteuse administrée aux patients permet un retour du pourcentage de monocytes intermédiaires à des valeurs similaires à celles des individus sains (Amoruso et al., 2016).

Chez les patients atteints de lupus érythémateux, les monocytes CD16⁺ sont augmentés en pourcentage mais il existe des discordances selon les auteurs. Mukherjee et coll. mettent en évidence une augmentation des monocytes non-classique dans une cohorte de 10 patients alors que Zhu et coll. démontrent que les monocytes intermédiaires sont principalement augmentées dans une cohorte de 62 patients (Mukherjee et al., 2015; Zhu et al., 2016). Dans cette dernière étude, les monocytes CD16⁺ expriment fortement CX3CR1, HLA-DR, CD80 et CD86, et induisent la polarisation des lymphocytes T vers la voie Th17.

Les patients atteints de sclérose en plaque présentent, au contraire, une diminution du pourcentage des monocytes intermédiaires et non-classiques (Waschbisch et al., 2016). Les différentes thérapies médicamenteuses utilisées pour traiter cette pathologie permettent un retour à la normale du pourcentage de monocytes CD16⁺. Dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints d'affections neurologiques non-inflammatoires (patients dits témoins dans l'étude), les monocytes intermédiaires sont majoritaires alors que chez des patients atteints de sclérose en plaque récurrentes-rémittentes ce sont les monocytes classiques qui prédominent.

Les différentes sous-populations de monocytes semblent donc variablement affectées par ces types de pathologies. Dans de nombreuses pathologies, les monocytes CD16⁺ sont globalement augmentés et semblent plutôt promouvoir les réponses Th17, ce qui laisse supposer d'un rôle plutôt pro-inflammatoire de ces populations. Des discordances subsistent néanmoins et des travaux plus spécifiques doivent être menés pour mieux caractériser l'impact de ces altérations en pathologie, et notamment pour mieux déterminer les fonctions de ces cellules dans les tissus.

4. Monocytes et plaquettes

Les interactions entre monocytes et plaquettes sont connues depuis longtemps (Giedrojć et al., 2000; Pawelski et al., 2014; Zuchtriegel et al., 2016). Elles jouent un rôle important dans l'extravasation des monocytes. Cependant, les fonctions des différentes sous-populations de monocytes dans ces interactions restent mal connues.

4.1. Plaquettes

Les plaquettes sont des fragments cellulaires dérivés des mégacaryocytes provenant de la moelle osseuse. Leur diamètre est approximativement de 2 microns et elles circulent dans le sang au nombre de 300 000 plaquettes par μl de sang en moyenne chez l'homme, leur volume total excédant celui des autres populations de leucocytes (Kato, 2009). Elles sont surtout connues pour leur rôle dans la formation des thrombi et dans le maintien de l'homéostasie. Néanmoins, leur petite taille par rapport aux autres éléments figurés du sang fait qu'elles circulent à proximité des parois des vaisseaux en flux laminaire. Cette localisation leur permet d'être plus proches de l'endothélium vasculaire que les autres cellules sanguines, ce qui fait de ces plaquettes des candidates idéales pour l'immuno-surveillance.

Les plaquettes ont une durée de vie de 7 à 10 jours. Elles sont en forme de disques biconvexes, n'ont pas de noyau mais possèdent un système tubulaire dense qui dérive du réticulum endoplasmique du mégacaryocyte dont elles sont originaires, et un système canaliculaire ouvert composé de grandes vacuoles et de saccules organisés en réseau (Kovacs and Hartwig, 1996). L'une des principales fonctions du système tubulaire dense est de stocker le calcium. Le système canaliculaire ouvert, quant à lui, communique avec l'extérieur et est considéré comme une réserve de récepteurs et de membrane cellulaire, permettant également des échanges rapides entre le contenu plaquettaire et le milieu environnant.

La membrane cellulaire des plaquettes est recouverte d'une couche de glycocalyx, permettant une meilleure adhésion lors de la formation des thrombi. A l'état physiologique, de nombreux récepteurs sont présents à la surface de plaquettes tels que le récepteur au facteur de von Willebrand (von Willebrand factor ou vWF), les récepteurs à l'adénosine diphosphate, à la thrombine, à

l'adrénaline, au thromboxane A₂, à la sélectine P (ou CD62P), la glycoprotéine CD42b, le CD32a et des récepteurs aux intégrines α 2b (ou CD41), β 1 et β 3 (Moake et al., 1988; Rivera et al., 2009). Ces récepteurs jouent un rôle important dans l'adhésion des plaquettes aux surfaces endommagées et peut aussi participer à l'activation des plaquettes induisant leur agrégation et les interactions avec d'autres cellules immunitaires (Figure 10).

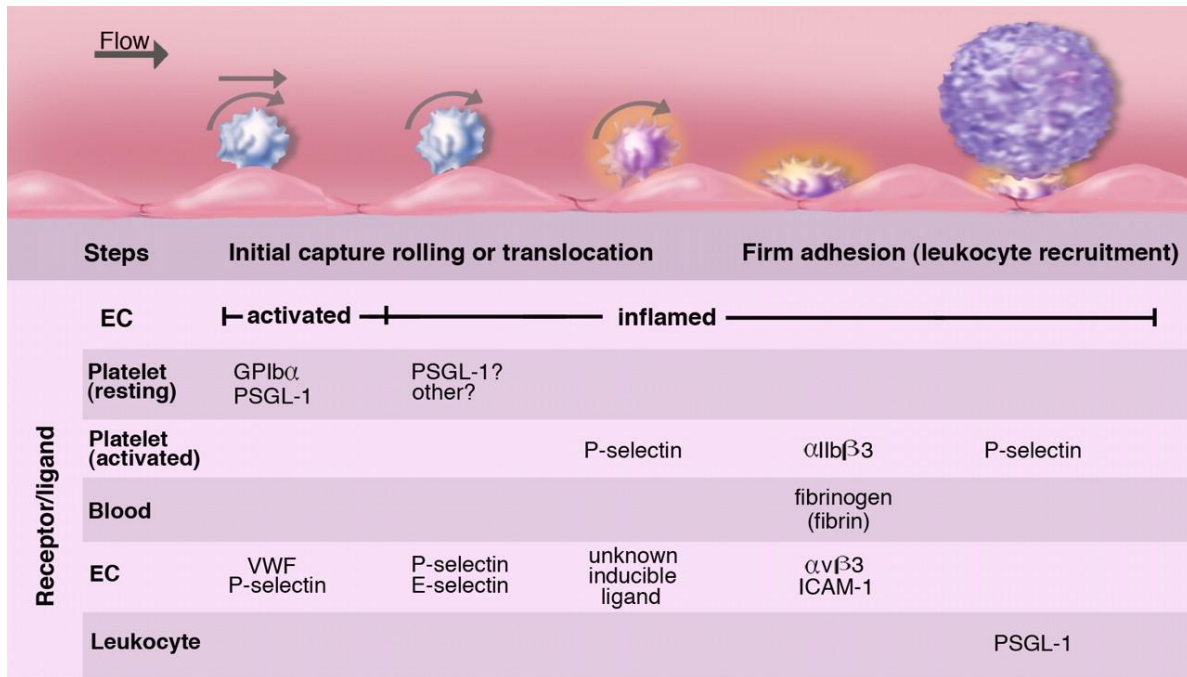


Figure 12. Rôle des plaquettes dans le recrutement de leucocytes (Wagner and Frenette, 2008). Les plaquettes se déplacent dans la circulation sanguine à proximité de l'endothélium vasculaire. Lorsqu'elles s'activent, elles expriment notamment la P-sélectine et des intégrines, leur permettant de mieux adhérer au fibrinogène produit par les cellules endothéliales. Elles peuvent éventuellement y adhérer et permettre le recrutement de leucocytes au site inflammatoire.

Les plaquettes contiennent des granules se situant à proximité du système canaliculaire ouvert au repos, permettant leur relargage rapide à l'activation plaquettaire. Trois types de granules ont été mis en évidence : les granules denses, les α -granules et les lysosomes. Ces granules contiennent des molécules favorisant l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction, la perméabilité vasculaire et des molécules mitogéniques (McNicol and Israels, 1999). Les granules denses contiennent principalement du calcium, de l'adrénaline, de la noradrénaline, de l'histamine et de la sérotonine.

Elles ont pour fonction principale de permettre le recrutement d'autres plaquettes au site de la lésion vasculaire et leur contenu est libéré lors de l'activation plaquettaire. Les granules α stockent les protéines plasmatiques par endocytose et pinocytose, et contiennent notamment la sélectine P, le CD36, le vWF du fibrinogène et de la fibronectine (Blair and Flaumenhaft, 2009).

Une des fonctions principales des plaquettes est de permettre la coagulation afin d'arrêter la perte de sang suite à des dommages vasculaires. Les événements aboutissant à l'activation plaquettaire et à leur fonction peuvent être divisés en trois étapes : l'adhésion initiale, la formation et la croissance du thrombus, et la stabilisation de l'agrégat plaquettaire (Clemetson, 2012).

Les dommages vasculaires entraînent l'exposition de protéines de la matrice sous-endothéliale tels que le collagène et le vWF (Bergmeier et al., 2006). Les plaquettes dans la circulation sanguine entrent en contact avec ces protéines et se lient au vWF via leurs récepteurs glycoprotéine Ib (GPIb) ainsi qu'au collagène via leurs molécules de surface glycoprotéine VI (GPVI) (Bergmeier et al., 2006; Clemetson et al., 1999; Williamson et al., 2002). L'adhésion des plaquettes est également renforcée par la présence des intégrines à leur surface. L'ensemble de ces interactions entraînent l'activation des plaquettes, notamment grâce à la cascade de signalisation induite par le récepteur GPVI et par les intégrines induisant le relargage des granules plaquettaires et du calcium intraplaquettaire (Ahmad et al., 2011; Feinstein and Fraser, 1975). L'intégrine α II β 3 présente à la surface des plaquettes passe à une conformation activée lorsque les plaquettes sont activées, leur permettant de se lier au fibrinogène (Bennett, 2005). Le fibrinogène est un ligand bivalent, et peut ainsi se lier à l'intégrine α II β 3 de deux plaquettes différentes et au récepteur GPIb, participant à la formation de l'agrégat plaquettaire.

La croissance du thrombus par le recrutement d'autres plaquettes entraîne une augmentation de la tension à sa surface, rendant difficile l'adhésion de nouvelles plaquettes approchant l'agrégat (Brass et al., 2011). Aussi, lorsque le thrombus augmente en taille, les plaquettes à la périphérie de l'agrégat sont plus faiblement activées et adhèrent de manière moins importante jusqu'à ce que le thrombus atteigne un état d'équilibre. Ce phénomène limite le recrutement de plaquettes supplémentaires et évite ainsi l'augmentation erratique de la taille du thrombus qui risque moins d'obstruer la circulation sanguine.

Les inflammations tissulaires conduisent à un mauvais équilibre entre les propriétés pro- et anticoagulantes de l'endothélium induisant un recrutement plaquettaire et leur activation (Wagner and Burger, 2003). L'une des premières cytokines présentes aux sites infectieux tissulaires est le TNF- α , une cytokine inhibant la synthèse d'un anticoagulant protéique, la protéine C (Sawdey and Loskutoff, 1991), et induisant la production du facteur tissulaire sur l'endothélium (Kirchhofer et al., 1994). Ces phénomènes résultent en l'activation de la thrombine, un facteur de coagulation, et en la formation de fibrine, permettant le recrutement des plaquettes et leur activation. A l'inverse, le TNF- α provoque également le relargage d'oxyde nitrique par l'endothélium, un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Loscalzo, 2001). Le TNF- α , dans un cadre inflammatoire, permet donc le recrutement et l'activation des plaquettes aux sites inflammatoires et simultanément freine la formation de thrombus, ce qui pourrait empêcher le recrutement des leucocytes.

Des fonctions des plaquettes dans l'immunité adaptative ont également été proposées. Le rôle des plaquettes dans la présentation des antigènes aux lymphocytes a récemment été étudié. En effet, elles possèdent de nombreux éléments nécessaires à cette fonction tels qu'un protéasome actif, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des protéines de transport des antigènes, de la calnexine et de la calréticuline (Han and Baker, 1964; Rowley et al., 2011; Schulz et al., 2010). Au niveau du transcriptome, les plaquettes expriment fortement des ARNm pour la sous-unité β 2-microglobuline du CMH de classe I, le CD68 aussi exprimé chez les macrophages, et HLA-A (Rowley et al., 2011). Des molécules de co-stimulation de cellules T et des molécules d'adhésion associées aux CPA sont également exprimées par les plaquettes tels que CD40, CD44, ICAM-2 et DC-SIGN, ce qui permettrait potentiellement aux plaquettes de présenter des antigènes (Chaipan et al., 2006; Davì and Ferroni, 2005; Koshiishi et al., 1994; Weber et al., 2004). Une expérience effectuée par Chapman et coll. à l'aide de souris immunisées a permis de démontrer que les plaquettes étaient effectivement capables de capturer un antigène, de le présenter via leur CMH de classe I et d'induire l'activation des lymphocytes T *in vitro*, mais aussi de servir de sources antigéniques *in vivo* (Chapman et al., 2012).

4.2. Complexes monocytes-plaquettes

4.2.1. Complexes physiologiques

Les plaquettes peuvent adhérer aux monocytes formant des agrégats monocyte-plaquette (monocyte-platelet aggregate ou MPA). La formation des MPA est considérée comme un marqueur de l'activation plaquettaire qui exprime la sélectine P à leur surface après exocytose des granules α . La sélectine P des plaquettes interagit avec le PSGL-1, exprimé de manière constitutive par les monocytes (Furie and Furie, 2004). L'intégrine $\beta 2$ Mac-1 (CD11b/CD18), et LFA-1 dans une moindre mesure, permettent la stabilisation de cette adhésion à la surface des monocytes (Linden and Furman, 2006; Sumagin et al., 2010). Néanmoins, les MPA sont également retrouvés en situation physiologique, sans augmentation de l'activation des plaquettes et, de manière intéressante, les MPA sont augmentés chez les enfants sains (Yip et al., 2013). Cette étude de Yip et coll. montre donc qu'il existe probablement un autre mécanisme permettant l'association des plaquettes et des monocytes et que ce mécanisme ne dépend ni de l'expression de la sélectine P par les plaquettes ni de l'expression de PSGL-1 par les monocytes (Hui et al., 2015; Yip et al., 2013).

De même, une étude de Bournazos et coll. portant sur les maladies coronariennes aiguës a permis de démontrer que l'adhésion de plaquettes aux monocytes pouvait, par exemple, être dépendante de cations bivalents (Bournazos et al., 2008). En effet, l'ajout d'EDTA (un chélateur de cations bivalents) dans les échantillons sanguins analysés cause une diminution de l'adhésion plaquettaire. De plus, l'adhésion de plaquettes non activées aux monocytes ne semble pas induire de modifications fonctionnelles en termes de migration cellulaire ou de production de cytokines par les monocytes.

La présence de MPA dans la circulation en situation physiologique implique que les éventuels effets de l'adhésion des plaquettes non activées aux monocytes sains interviennent dans l'ensemble des études faites sur les fonctions des monocytes, tant *in vivo* qu'*in vitro*. Les effets de ces interactions restent méconnus. De plus, étant donné que de nombreuses maladies inflammatoires affectent les interactions entre plaquettes et monocytes, le rôle des complexes monocyte-plaquette physiologiques dans le développement des complexes avec des plaquettes activées, ainsi que l'effet sur les modifications phénotypiques et fonctionnelles au niveau des monocytes, restent à préciser.

4.2.2. Complexes inflammatoires

En situation inflammatoire, les plaquettes peuvent s'activer et ainsi exprimer la sélectine P leur permettant de s'associer à des monocytes via leur PSGL-1 (décrit en section 4.2.1.). La mesure des MPA est couramment utilisée afin de mesurer l'activation plaquettaire, la sélectine P exprimée à la surface des plaquettes étant rapidement dégradée (Michelson et al., 1996). L'adhésion des plaquettes activées aux monocytes au niveau des sites de lésions vasculaires pourrait être une composante d'un mécanisme de formation des thromboses (Celi et al., 1994).

Les plaquettes stimulées par la thrombine peuvent induire la production de cytokines par les monocytes. En effet, la liaison du CD40L exprimé par les plaquettes stimulées à son ligand à la surface des monocytes induit chez ces derniers la synthèse d'IL-6 qui est associée à l'angine de poitrine (Biasucci et al., 1996) et à l'augmentation de la synthèse d'IL-1 β et d'IL-12 (Bournazos et al., 2008). Dans cette étude de Bournazos et coll., le blocage de l'interaction entre la sélectine P des plaquettes stimulées et PSGL-1 des monocytes permet de réduire l'inflammation. Par ailleurs, les cytokines produites suite à l'activation des plaquettes abaissent le seuil d'activation des monocytes.

L'interaction des monocytes avec les plaquettes activées est également associée à une augmentation de la production d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α et favorise l'expression du facteur tissulaire. Cet effet semble également être corrélé à la liaison de la sélectine P et de PSGL-1. Ainsi, dans une étude de Lindmark et coll., l'expression du facteur tissulaire est réduite par l'utilisation d'anticorps bloquant la sélectine P (Lindmark et al., 2000).

La production de chimiokines par les monocytes est également induite par l'interaction des monocytes avec des plaquettes stimulées par la thrombine. La ligation de PSGL-1 des monocytes ainsi que la présence de CCL5 produites par les plaquettes induit l'activation du facteur de transcription nuclear factor-kappa B (NF- κ B), ce qui provoque la sécrétion de CCL2 (Bournazos et al., 2008).

L'activation des monocytes suite à leurs interactions avec des plaquettes induit une meilleure adhésion des monocytes, une activité procoagulante plus importante via l'expression du facteur

tissulaire et une activité inflammatoire amplifiée, médiée notamment par la sécrétion de cytokines tels qu'IL-6 et TNF- α (Bournazos et al., 2008).

Les MPA sont augmentés en nombre dans de nombreuses pathologies tels que l'infarctus aigu du myocarde (Michelson et al., 2001), les défaillances rénales (Ashman et al., 2003) et chez les patients à haut risque de maladies cardiovasculaires comme l'angine de poitrine (Ott et al., 1996), ainsi que chez les fumeurs (Harding et al., 2004). Afin de réduire l'inflammation et les phénomènes de thrombose associés à la présence de MPA, de nombreuses molécules inhibitrices de cette interaction ont donc été développées telles que des inhibiteurs de l'expression de sélectine P par les plaquettes ou des antagonistes de ce récepteur, et des molécules bloquant la transcription de CCL2 au niveau des monocytes agrégés (Klinkhardt et al., 2003; Weyrich et al., 2005).

L'activation des plaquettes peut également impacter les fonctions des MPA vis-à-vis de la réponse immunitaire innée. Dans des conditions pro-inflammatoires lors d'une immunisation par *influenza virus*, Passacuale et coll. ont mis en évidence une expansion de la population de monocyte intermédiaire CD14⁺ CD16⁺ ainsi qu'une augmentation de l'adhésion des monocytes à l'endothélium lorsque les plaquettes sont activées (Passacuale et al., 2011). Ainsi, de nombreuses études permettent d'associer les MPA à des effets pro-inflammatoires des monocytes en pathologie, comme dans l'athérosclérose et les maladies cardio-vasculaires, et l'augmentation des MPA serait corrélée à un mauvais pronostic chez les patients (Brown et al., 2018; Lukasik et al., 2012; Wu et al., 2016; Zaldivia et al., 2017).

B. PROJET SCIENTIFIQUE

Les monocytes circulants sont des précurseurs de cellules effectrices de l'immunité (cellules dendritiques inflammatoires, macrophages, monocytes activés) et participent à ce titre à l'initiation et à la résolution de l'inflammation tissulaire et de la réponse immune. Le pool de monocytes sanguins est composé de multiples sous-populations dont les caractéristiques et les fonctions restent très mal connues. En particulier, les monocytes génèrent-ils indistinctement des cellules dendritiques et macrophages pro- ou anti-inflammatoires, reflétant la plasticité des monocytes (Hume, 2012), ou bien des monocytes de phénotypes particuliers sont-ils à l'origine d'effecteurs spécifiques (Shi and Pamer, 2011).

Les différentes populations de monocytes humains sont classées en fonction de l'expression des molécules de surface CD14 et CD16. Trois populations ont ainsi été identifiées : une population de monocytes dite classique CD14⁺ CD16^{neg}, une population non classique CD14^{dim} CD16⁺ et plus récemment, une population intermédiaire CD14⁺ CD16⁺ (Passlick et al., 1989; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Cependant, de multiples fonctions, souvent redondantes, sont associées à ces sous-populations ainsi définies, reflétant leur hétérogénéité.

Le sujet de cette thèse porte sur l'identification et la caractérisation de sous-populations monocytaires circulantes chez l'homme. Ce travail vise à identifier des populations de monocytes susceptibles de posséder des fonctions propres et à déterminer les bases cellulaires et moléculaires des différences fonctionnelles entre populations.

Dans un premier temps, je me suis intéressé à étendre la caractérisation phénotypique de nouvelles populations de monocytes antérieurement identifiées dans le laboratoire, par l'analyse transcriptomique de l'expression de facteurs de transcription en qRT-PCR dans des populations hautement purifiées. Ces résultats ont permis de confirmer l'identité distincte de ces populations. Ils permettent aussi de corrélérer un profil transcriptomique aux phénotypes basés sur l'expression de molécules à la surface cellulaire. Ceci est essentiel pour l'analyse d'échantillons comportant très peu de cellules, comme par exemple de petites biopsies.

L'identification de sous-populations de monocytes pourvues de fonctions spécifiques a été ensuite entreprise. Guidé par des corrélations préalablement établies dans le laboratoire entre

phénotype des monocytes et polarisation des lymphocytes T induite par les cellules dendritiques dérivées de monocytes, mon travail a permis l'identification de monocytes aux fonctions spécifiquement dédiées à l'induction de réponses immunitaires Th2. Pour cela, j'ai effectué plusieurs cycles de tri cellulaire et d'analyse fonctionnelle des cellules en m'appuyant sur la diversité des réponses cellulaires liées aux variations inter-individuelles entre donneurs de sang sains. Ce travail, mené ultimement sur de petites populations cellulaires, montre l'existence de monocytes aux fonctions immunitaires dédiées dès le stade circulant. De plus, cette identification valide une méthode nouvelle pour isoler des populations fonctionnelles à partir de mélanges complexes de cellules de phénotypes voisins.

La caractérisation de monocytes aux propriétés fonctionnelles distinctes pose la question des bases cellulaires et moléculaires déterminant ces différences. Pour déterminer les spécificités des sous-populations de monocytes, j'ai analysé les cellules en cytométrie en images (Amnis – ImageStream), une technique qui combine une analyse de type cytométrie en flux à une visualisation en microscopie à fluorescence de chaque cellule analysée. Par cette analyse, j'ai pu montrer l'association préférentielle de certaines sous-populations de monocytes à des plaquettes, cette particularité renforçant l'identité particulière de chaque sous-population. La présence de plaquettes associées aux monocytes pourrait influencer sur leur capacité à adhérer à l'endothélium. Pour tester cette hypothèse, des monocytes ont été purifiés et désassociés de leurs plaquettes par tri sur trieur cellulaire BD Aria, et l'adhésion à des cellules endothéliales de plusieurs pools cellulaires (monocytes sans et avec associations aux plaquettes) a été analysée. Les résultats montrent un rôle différentiel des plaquettes sur les différentes sous-populations de monocytes en favorisant l'adhésion de certaines mais sans effets notoires pour d'autres.

L'étude des variations de phénotypes et de fonctions des monocytes en conditions pathologiques critiques est d'un grand intérêt pour élucider les mécanismes menant au dysfonctionnement des réponses inflammatoires et immunitaires. La susceptibilité aux infections consécutive à un stress majeur s'observe suite à quantité d'états pathologiques tels que l'infection, le traumatisme, l'accident vasculaire cérébral, ou des états physiologiques comme l'exercice intense. Dans ces états, la contribution des monocytes a été suspectée en raison de la désactivation ou reprogrammation de leurs réponses *ex vivo* aux stimuli inflammatoires comme les agonistes des TLRs. Dans ce travail de thèse, j'ai analysé les modifications phénotypiques des sous-populations

de monocytes, telles que définies dans le laboratoire, chez des patients brûlés, en collaboration avec le service des grands brûlés de l'Hôpital Saint-Louis (Dr Mathieu Legrand). Dix-huit patients ont été prélevés en post-admission, et à 7 et 28 jours plus tard, et leurs monocytes ont été extensivement phénotypés. Les résultats permettent d'identifier les variations quantitatives des différentes populations de monocytes au cours des 4 semaines analysées. De plus, l'apparition de nouvelles populations myéloïdes a été documentée. Dans des analyses en cours utilisant des logiciels d'analyses non-supervisées, les profils d'expression de marqueurs comme les récepteurs aux chimiokines et les molécules d'adhésion suggèrent une dynamique de l'expression en rapport avec les données cliniques des patients. La recherche d'associations entre profils d'expression des sous-populations et évolution clinique contribuera à l'identification de marqueurs diagnostiques et pronostiques.

C. RESULTATS

Article 1

Les monocytes circulants humains participant à l'initiation et à la résolution de l'inflammation tissulaire et à la réponse immunitaire adaptative. Les monocytes se subdivisent en trois différentes sous-populations monocytaires en fonction de l'expression du CD14 et du CD16 : les monocytes classiques $CD14^+CD16^{neg}$, les monocytes non-classiques $CD14^{dim}CD16^+$ et les monocytes intermédiaires $CD14^+CD16^+$. Cette classification est limitée car elle ne permet pas de prédire les fonctions des monocytes selon la population à laquelle ils appartiennent.

Dans cet article, l'objectif a été d'approfondir la caractérisation phénotypique des populations monocytaires circulantes chez l'homme afin de progresser dans l'identification de populations fonctionnelles. L'expression de 17 molécules de surfaces a été analysée en cytométrie en flux sur les PBMC de 28 donneurs sains. Ces résultats ont permis d'identifier une nouvelle population de monocytes appelée « large monocyte » constituée de deux sous-populations $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^+$, distincte de la « small monocytes », composée de trois sous-populations $sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^+$ et $sm14^{dim}16^+$. Ces populations ont été caractérisées phénotypiquement par l'analyse des molécules de surface donc des récepteurs à chimiokines, des FcR, des récepteurs impliqués dans la présentation antigénique ainsi que des molécules d'adhésion.

Je me suis intéressé à étendre la caractérisation phénotypique de ces nouvelles populations de monocytes par une analyse transcriptomique de l'expression de facteurs de transcription en qRT-PCR au niveau de ces sous-populations de monocytes hautement purifiées. Ces résultats permettent de confirmer l'identité distincte de ces populations observée dans les analyses phénotypiques mais aussi d'associer un profil transcriptomique aux phénotypes basés sur l'expression de molécules de surface. Ce type d'analyse est essentiel pour l'étude d'échantillons à faible rendement de cellules, comme par exemple pour l'étude de petites biopsies de patients.

Les résultats présentés font parties d'un article soumis pour publication.

Article 1: Identification of Novel Human Monocyte Subpopulations and Evidence for Phenotypic Groups Defined by Interindividual Variations of Expression of Adhesion Molecules

F. Merah-Mourah¹, S.O. Cohen¹, A.C. Lukaszewicz¹, V. Faivre¹, D. Charron², D. Payen¹, N. Mooney¹, and A. Haziot^{1*}

¹, INSERM U1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

², HLA et Médecine, Hôpital Saint Louis, Paris, France

^{*}, correspondence:

Alain Haziot, M.D.

alain.haziot@inserm.fr

Abstract

Monocytes play a central role in immune responses, functioning as a source for various subsets of tissue dendritic cells and macrophages. Human blood monocytes are currently classified as classical (CD14⁺CD16^{neg}), non-classical (CD14^{dim}CD16⁺) and intermediate (CD14⁺CD16⁺) cells. Although this classification has been helpful in describing monocyte population alterations in inflammation and infection, the particular functions of these subsets have been hard to define, with conflicting results and significant overlaps across these subsets. One likely reason for these ambiguities is in the heterogeneity of these monocyte subsets regrouping cells with highly divergent functions. To achieve progress in the definition of monocyte populations, we have analyzed expression of 17 markers by multicolor flow cytometry in PBMC samples obtained from 28 control donors. To describe monocyte populations as exhaustively as possible, data acquisition was tailored to detect populations present at low frequencies. Our results reveal the existence of novel monocyte subsets detected as larger CD14⁺ cells that were CD16⁺ or CD16^{neg}. These large monocytes (la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺) differed from regular, smaller monocytes (sm14⁺16^{neg}, sm14^{dim}16⁺, sm14⁺16⁺, and sm14^{dim}16^{neg}) with respect to expression of various cell surface molecules, such as FcR, chemokine receptors, and adhesion molecules. Unsupervised multidimensional analysis confirmed the existence of large monocytes and revealed interindividual variations that were grouped according to unique patterns of expression common to several donors. Of particular interest for the definition of these phenotypic groups were the expressions of adhesion molecules CD62L and CD49d, and sialoglycoprotein CD43. To examine how the described populations were altered in inflammation and infection we similarly analyzed monocytes in septic patients at two time points, admission and 2-4 days later. The novel large monocyte population was present in patients and its CD14/CD16 ratio was equally altered as in small monocytes. Patients were readily identified as belonging to a phenotypic group and remained stable over time. Surprisingly, HLA-DR expression was not equally depressed in monocyte populations from a same patient, with a striking sustained expression in sm14⁺16⁺ monocytes. Overall, extending and refining the definition of monocyte subsets as shown here will be instrumental in the identification of the functions of this highly heterogeneous cell type.

Keywords: human, monocyte, subpopulation, interindividual variations, adhesion molecules, monocyte group types

Introduction

Phenotypic definition of cell subsets in the immune system has been instrumental in the identification of new immunological functions and in the delineation of complex networks of cells involved in immune responses. Monocytes, which are mostly precursors of some macrophage and dendritic cell populations, have been hard to divide into populations with clear cut inflammatory and immune functions. This may be due in part to the high number and complexity of phenotypes present in monocyte populations and also to cell plasticity.

A classification of human blood monocyte subsets based on the expression of CD14 and CD16 cell surface receptors was proposed (Passlick et al., 1989) and refined over the years. It consisted initially of two populations described as "classical" monocytes which express CD14 but no CD16 (CD14⁺CD16^{neg} cells), and "nonclassical" monocytes with low CD14 and strong CD16 expression (CD14^{dim}CD16⁺ cells). Further analysis of monocyte phenotypes and functions revealed the heterogeneity of these subpopulations (Belge et al., 2002; Grage-Griebenow et al., 2001). A subset of CD16⁺ monocytes was firstly distinguished on the basis of its expression of CCR5 and on its intermediate expression of receptors divergently expressed in the two other subsets (e.g. CCR2 and CX3CR1) (Ancuta et al., 2003). This additional subset of human monocytes was later identified as "intermediate" with strong CD14 and CD16 expressions (CD14⁺CD16⁺ cells) (Ziegler-heitbrock et al., 2010). Evidence for this third subset was confirmed in transcriptome analysis (Frankenberger et al., 2013; Schmidl et al., 2014; Wong et al., 2011; Zawada et al., 2011).

Alternative combinations of markers, such as CCR2, CX3CR1, and CD64, have been used to define subpopulations of human monocytes although intricate expression of these markers in other cell types such as dendritic cells hindered cell classification and interpretation of functional analysis in purified populations (Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003; Grage-Griebenow et al., 2001; Weber et al., 2000).

Despite progress in phenotypic analysis, immune functions associated with monocyte subpopulations in the steady-state remained ill-defined. Marked functional redundancies between the subpopulations were found, and contradicting results in the literature added to the puzzling difficulties in assigning functions to specific populations (Cros et al., 2010; Mukherjee et al., 2015;

Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Thus, intermediate monocytes were described as the major source of pro-inflammatory cytokines upon stimulation (Rossol et al., 2012; Semnani et al., 2014). In contrast, non-classical monocytes were also described as the most inflammatory monocytes (Belge et al., 2002; Mukherjee et al., 2015; Wong et al., 2012b). Similarly, anti-inflammatory cytokine secretion was alternatively found high in intermediate (Mukherjee et al., 2015) or in classical monocytes (Cros et al., 2010; Smedman et al., 2012; Wong et al., 2011).

Therefore, production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines upon activation, a hallmark property of monocytes, remains hard to ascribe unambiguously to given subsets.

CD16⁺ monocytes have been found in increased numbers and/or proportions in a large number of diseases, reviewed in (Stansfield and Ingram, 2015; Ziegler-Heitbrock, 2007), including infections, autoimmune and cardiovascular diseases. This raised the question of how these cells could be implicated in the initiation and progression of so many diverse pathologies affecting different tissues. It has been proposed that increased numbers of CD16⁺ monocytes would merely be a non-specific response to inflammatory mediators (Ziegler-Heitbrock, 2007). Alternatively, given the extensive phenotypic heterogeneity within CD16⁺ monocyte subpopulations, cells may collectively converge to exert the same function through cell plasticity. A third possibility is that discrete monocyte subsets within the subpopulations as documented by single cell gene expression (Gren et al., 2015) are active in different tissues and pathological settings.

In this study, we stringently assessed the phenotypic heterogeneity of human blood monocytes by multicolor cell surface labeling, flow cytometry analysis, and unsupervised detection of clusters and analysis of their phenotypes. To look for conserved phenotypes, the analysis was extended to 28 healthy Caucasian donors. Modification and/or stability of monocyte populations and their phenotypes during inflammation were documented in septic patients in time-course analysis of blood samples. Results identified novel populations of monocytes with unique morphologic and phenotypic characteristics. Although monocyte populations had heterogeneous phenotypes among healthy donors they could nonetheless be resolved into phenotypic groups based on interindividual variations of expression. In inflammatory conditions, monocyte populations related to those found in controls were identified, and phenotype alterations were distinguished. Therefore, monocyte

distribution within particular phenotypic groups appeared to withstand changes induced by inflammation.

Materials and Methods

Donors and patients

Blood samples from 28 healthy Caucasian donors (Table 1) were obtained from the local blood bank (Etablissement Français du Sang at Saint-Louis Hospital, Paris, France). Blood samples from three septic patients (Table 2) were collected at the Intensive Care Unit, Lariboisière Hospital, Paris, France. The study was approved by the Assistance Publique Hôpitaux de Paris and Cochin Hospital Ethics Committee (3 CCPPRB 2061). In this study, blood collected during routine biological examinations was used after completion of these examinations. Patients or their next of kin received information about the study and gave verbal consent for the use of discarded blood. The need for informed consent was waived by the Ethics Committee. Neither cells nor plasma were stored after the end of experiments and all data was de-identified and analyzed anonymously.

Cell separation from blood samples

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated from venous blood collected in the presence of ACD (Vacutainer, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), by density gradient centrifugation on a cushion of Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France) as described (Faivre et al., 2012).

Briefly, blood was diluted (1:2) with sterile nonpyrogenic Phosphate Buffered Saline (PBS) (Eurobio) and gently layered on 15 ml of Ficoll in a 50 mL Falcon tube (Becton Dickinson). After centrifugation for 15 min at 800 x g at room temperature without brake, PBMC were collected and cells were washed twice (10 min, 300 x g, 4°C) with cold PBS 1X supplemented with 10% decomplexed human AB serum (HABS_{DEC}) (Etablissement Français du Sang, Rungis, France). To saturate cell surface nonspecific binding sites, cells were then incubated in 10 ml PBS supplemented with 10% HABS_{DEC} (PBS/10 % HABS) for 15 min on ice. PBMC were then collected by centrifugation (5 min, 300 x g, 4°C), re-suspended in (PBS/10 % HABS) at a concentration of 4 x 10⁶ cells/ml, and aliquoted in FACS tubes (Becton Dickinson, polypropylene tubes with cap) for further use.

Cell staining

Monoclonal antibodies (MAb) listed in Table 3 were used. Staining of PBMC was designed for 8-color analysis with 3 sets of stained cells. Each set included lineage markers CD3, CD19, CD335/NKp46 all labelled with phycoerythrin (PE) to allow exclusion of T and B lymphocytes and NK cells, respectively. Each set also included CD14 and CD16 for monocyte subsets identification. Other markers, were unique to each set and consisted of CD64, CD32, CCR2 CCR5, CX3CR1 (set 1), CD80, CD86, HLA-DR, CD163, CD7 (set 2), and CD62L, CD162, CD43, CD49d, CD56 (set3). MAb were added to the cell suspension (2×10^6 PBMC in 0.05 ml PBS/10 % HABS) and samples were incubated for 20 min on ice in the dark. Optimal staining by MAbs was determined in preliminary titration experiments. Cells were then washed once in PBS/10 % HABS (5 min, $300 \times g$, 4°C), and once in 1ml of PBS supplemented with EDTA (0.5 mM) (5 min, $300 \times g$, 4°C). Cell pellets were recovered in 0.2 mL PBS EDTA 0.5 mM, placed on ice in the dark and analyzed immediately by flow cytometry.

Flow cytometry analysis

Stained cells were analyzed on a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, Rungis, France) equipped for 8-color analysis. Calibration was performed as recommended in instructions provided by the manufacturer with setup procedures using 7-color Cytometer Setup and Tracking beads and automated setup adjustments keeping variations within acceptable limits set by the manufacturer. Unstained cells, isotype controls coupled to the same fluorochrome used for the marker (except for control MAb for CD32 where Pacific Orange was used as a control for Krome Orange due to lack of availability) and single labeled cells were used to set thresholds for positivity and to correct for spillovers. Compensations were automatically set by DIVA (Becton Dickinson) and manually checked and adjusted. Data was analyzed in different ways as described below.

1. Manual analysis:

Manual gating was performed using FlowJo V10 (Treestar, Ashland, OR). Doublet identification and exclusion was achieved based on fluorescence width versus area pulse measurements (Wersto et al., 2001).

Gating of cells of interest allowed us to validate compensations for each label. Thresholds for positivity were set to exclude 99 % of the label obtained with isotype controls (Ig) for each marker. Percentage of positive cells and specific mean fluorescence intensity (MFI) for each label and for each subpopulation were then determined. Specific MFI was calculated as:

$$\text{MFI} = \text{MFI}_{\text{MAb}} - \text{MFI}_{\text{Ig}}$$

Percentage of positive cells and specific MFI were presented in bubble and color map graphs using OriginPro (Northampton, MA). MFI were designated as dim, med, and bri (for dim, medium, and bright, respectively) according to the intensity of expression of a marker in a population. Percentage of positive cells were noted as lo, int, and hi (for low, intermediate, and high, respectively) to reflect the proportion of cells that were positive for a marker in a population. MFI and percentage of positivity were written as subscript and superscript, respectively ($X_{\text{MFI}}^{\text{percent pos}}$), when both were assigned to a marker. Network visualization of associations of sub-group phenotypes in donors was performed using Gephi version 0.9.1 (Bastian et al., 2009). In Gephi, the layout map was obtained using the ForceAtlas 2 algorithm with repulsion and attraction strengths set at 1 000 and 1.0, respectively (Jacomy et al., 2014).

2. Unsupervised analysis:

Unsupervised multidimensional analysis was performed using two algorithms.

SPADE (Spanning tree Progression of Density normalized Events)(Qiu et al., 2011) was used as provided in the Cytobank suite (<https://premium.cytobank.org/cytobank/login>). Importing FlowJo data is not supported in Cytobank. SPADE analysis of data was performed on .fcs files generated by DIVA. SPADE is an unsupervised data analysis algorithm, which organizes cells into hierarchies of related phenotypes (trees) and identifies population clusters. The number of target nodes was set to 600, defining how many corresponding clusters SPADE will seek out within our data. It is generally recommended to pick many more population nodes than are expected and to then work backwards to the cell identity based on the major branches identified. The size of downsampled events target was set to 10 000 corresponding to the absolute number of cells analyzed in each run. Identification of populations of interest in SPADE allowed us to characterize and to define clusters of monocytes through single cell measure of 11 simultaneous parameters

(FSC-A, FSC-H, FSC-W, SSC-A, SSC-H, SSC-W, CD14, CD16, CD3-CD19-NKp46, Density and Cluster).

viSNE (visualization of high-dimensional single-cell data) (Amir et al., 2013) was also available in the Cytobank suite (<https://premium.cytobank.org/cytobank/login>). viSNE is an unsupervised high-dimensional analysis tool intended for data sets generated from both mass and fluorescence cytometry. It allows multidimensional data visualization in 2D plots representing three parameters (x and y axes, and color scale). Plots can be drawn for all possible combinations of markers used in the study, thus allowing to select the most informative combination for a cell sample. All possible combinations were applied to SPADE branches that included small and large monocytes in all 28 donors and 3 septic patients, and all the graphs were analyzed.

qRT-PCR

Monocytes were isolated from PBMC by cell sorting on a FACS Aria Cell Sorter II (Becton Dickinson). Cell sorting was based on negative selection against CD3, CD19 and NKp46, in order to exclude T cells, B cells and NK cells, respectively, and on the expression of CD14 and CD16.

Purified cells were lysed in TriReagent and stored at -20°C. RNA was purified by chloroform extraction and isopropanol precipitation. RNA was dissolved in 10 µL RNase-free water and stored at -80°C or directly used for a reverse transcription. Quality and quantity of RNA samples were assessed using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA).

RNA samples were used as a template for cDNA synthesis using the kit SuperScript III First-Strand Synthesis system kit and random hexamers provided by the kit was used as primers (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific).

The quantitative expression of early growth response 1 (EGR1), cAMP responsive element binding protein 5 (CREB5), spleen focus forming virus proviral integration oncogene (SPI1), hairy and enhancer of split 4 (HES4), actine beta (ACTB) and 18s ribosomal RNA (18S) genes were measured using the kit Takyon™ Low Rox Probe MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Seraing,

Belgium). The necessary primers and probes (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific) for qPCR use the Taqman technology, or probe hydrolysis, and were labeled at the 5'-end by FAM fluorophore and a NFQ quencer at the 3'-end. qPCR was achieved by following the recommendations of Takyon™ kit, using the instrument 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The sequences recognized by the probes were

EGR1: TGACCGCAGAGTCTTTTCCTGACAT;

CREB5: TTGATGCCAATGGAGCGACAAATGT;

SPI1: CAGTCTTGGCCACCAGGTCTCCTAC;

HES4: CAGGTGACGGCCGCGCTCAGCGCCG;

ACTB: CCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCA;

18S: CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA.

Data was normalized to the expression of internal controls (ACTB and 18S) to obtain the ΔC_t (Cycle Threshold). The relative quantification of the expression of mRNA of EGR1, CREB5, SPI1 and HES4 genes was determined by using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method ($\Delta\Delta C_t$ was calculated in relation to the relative expression of mRNA of these genes in PBMC used as calibrator).

Statistical analysis

Statistical analysis was done with GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA)

Results

1. Identification of new populations of monocytes in human healthy donors

In order to further define human blood monocyte populations, we have analyzed labeled PBMC from 28 healthy individuals (Table 1) by flow cytometry. Settings, which were chosen to achieve a comprehensive study of monocyte populations, included an optimized procedure to reduce non-specific labeling, the acquisition of 1×10^6 events to analyze rare populations, and the exclusion of non-myeloid cell lineages ($CD3^+$, $CD19^+$, and $NKp46^+$ ($CD335$) cells, Figure 1A). According to previously published studies (Wong et al., 2012b) and to recent guidelines that have been proposed to define monocytes (Ziegler-heitbrock et al., 2010), $CD14$ positive cells with or without expression of $CD16$ were considered (Figure 1B). In PBMC analyzed in these conditions, $CD14^+$ cells formed three main clusters according to their size and granularity, as shown in Figure 1C. In addition to a main cluster representing 78.4 ± 14.0 % (mean \pm SD) of $CD14^+$ cells and appearing to correspond to the commonly defined monocyte population, two new cell populations were identified. A clearly visible set of larger cells was present in all donors and constituted 8.8 ± 6.0 % of $CD14^+$ cells. Cells in this cluster were named large monocytes (la) in contrast to the denser set of smaller $CD14^+$ cells, thus named small monocytes (sm). A less abundant set of $CD14^+$ cells was consistently found in all donors (Figure 1C), adjacent to small monocytes but slightly more granular, and were named Small Granular Cells (SGC). After exclusion of doublets (Wersto et al., 2001) (Figure 1E, 1F, 1G, 1H), the expressions of $CD14$ and $CD16$ were analyzed in these three populations.

Small monocytes were divided into four populations (Figure 1I). A major $CD14^+/CD16^{neg}$ population consisted of 77.2 ± 13.0 % of this cell cluster and were named $sm14^+16^{neg}$. Populations of $CD14^+/CD16^+$ cells (4.4 ± 2.3 %) named $sm14^+16^+$, and of $CD14^{dim}/CD16^+$ cells (3.2 ± 2.6 %) named $sm14^{dim}16^+$ were also identified in all donors. A fourth population of $CD14^{dim}/CD16^{neg}$ cells named $sm14^{dim}16^{neg}$ was identified in 16 out of 28 donors where it represented 2.4 ± 1.5 % of small monocytes.

Large monocytes (Figure 1J) were divided in two populations, a $CD14^+/CD16^{neg}$ population representing 79.2 ± 10.0 % of large monocytes and named $la14^+16^{neg}$, and a $CD14^+/CD16^+$ population (10.0 ± 5.2 %) named $la14^+16^+$. The higher expression of $CD14$ in large monocytes is

clearly shown in Figure 1M where the profiles of CD14 and CD16 expressions in large (blue contours) and small monocytes (red contours) were overlaid. A substantial part of $la14^+16^{neg}$ monocytes had a higher CD14 expression than $sm14^+16^{neg}$ cells, and almost all $la14^+16^+$ monocytes expressed more CD14 than $sm14^+16^+$ cells. Thus, this newly described set of large monocytes differed from small monocytes with respect to FSC scatter and levels of CD14 expression. It is likely that in many previous studies classical monocytes included $sm14^+16^{neg}$ and parts or all $la14^+16^{neg}$ cells, and similarly intermediate monocytes included $sm14^+16^+$ and some or all $la14^+16^+$. $sm14^{dim}16^+$ monocytes appeared to fit with the definition of non-classical monocytes.

In SGC, the expression of CD14 was weak contrasting with a very bright expression of CD16, as seen in Figure 1K. This set of cells corresponded to the faintly $CD14^+$ part of a larger set of $CD14^{neg}/CD16^{bright}$ cells distinct from lymphocytes and monocytes and present in PBMC from all donors, as shown in Figures 1D in lineage^{neg} PBMC and in Figure 1L for its CD14 and CD16 expression.

Therefore, a total of six populations of monocytes were distinguished (Figures 1I and 1J) according to lineage selection, SSC and FSC light scattering, and the levels of CD14 and CD16 expression.

2. Phenotypic characterization of each of the newly defined populations of monocytes

To further characterize the identified monocyte populations, the expression of 15 selected markers was analyzed in monocytes obtained from a panel of 28 Caucasian healthy donors (Table 1). Markers included functional cell surface receptors such as Ig FcR CD64 and CD32 in addition to CD16, chemokine receptors CCR2, CCR5, and CX3CR1, antigen presentation and co-stimulatory molecules HLA-DR, CD86, and CD80, adhesion molecules CD62L, CD162, CD43, CD49d, and CD56. The expressions of scavenger receptor CD163 (Bover et al., 2007; Kristiansen et al., 2001) and immunoglobulin superfamily CD7 molecule (Stillwell and Bierer, 2001) were also determined. Results shown in figure 2 are presented as bubbles, the size of which size corresponds to the percentage of positive cells and the color reflects the MFI according to the indicated heatmap scale of colors. Marker expression for each of the six monocyte populations is presented in individual panels (Figure 2A to 2F). The results confirm the widely shown preferential expression

of CCR2 and CX3CR1 in CD16^{neg} (Figure 2A, 2B and 2F) and CD16⁺ (Figure 2C, 2D and 2E) monocytes, respectively (Geissmann et al., 2003). In all donors a large percentage of monocytes from all populations expressed HLA-DR. Similarly, in most donors, adhesion molecules CD49d, CD162, and CD62L were expressed in a high percentage of cells. Differences of expression between monocyte populations were however identified, with higher expression of antigen presentation molecules HLA-DR (MFI) and CD86 (percent of positives) in la14⁺16^{neg} compared to sm14⁺16^{neg} (Figure 2A and 2B), higher intensity of expression of adhesion molecules CD49d, CD162, and CD62L in la14⁺16⁺ compared to sm14⁺16⁺ (Figure 2D and 2E). A globally lower expression of most markers characterized sm14^{dim}16^{neg} monocytes (Figure 2F). Individual variation between donors was however one of the salient feature of the analysis of expression for many genes. Remarkably, similar variations were identified in donors, which were unrelated, allowing the identification of groups among our panel of donors. In sm14⁺16^{neg} monocytes (Figure 2A), 15 out of the 28 donors had a high percentage of monocytes positive for CD49d and CD162 (CD49d^{hi} and CD162^{hi}) with a MFI in the bright to medium range (CD49d^{hi}_{bri/med}, CD162^{hi}_{bri/med}). Among this group, two donors were set apart based on CD62L^{hi}_{med} expression defining profile OP-02, and three others were distinguished according to a CD43^{lo}_{dim} expression (OP-03). The remainder was named OP-01. Similarly, a second group of five donors was individualized on the basis of a CD49d^{int}_{med} and CD43_{dim} phenotype, a profile named OP-04. A final group of three donors (OP-05) was identified with the common phenotype CD49d^{int/lo}_{med} and CD43_{med/dim}. In this two last groups, a CD162^{hi}_{bri} and CD62L^{hi}_{bri} expression was found. Five donors from this panel could not be categorized along a unique phenotype.

Similarly, the other monocyte populations could also be split according to the patterns of expression of adhesion molecules. Variations in the number of donors analyzed in each monocyte population were due to the inability to assess the expression of markers when cell numbers were too low. Among large monocytes, la14⁺16^{neg} monocytes (n=28) (Figure 2B) were distinct from their CD16^{neg} counterpart sm14⁺16^{neg} monocytes (Figure 2A) in their overall stronger expression of several cell surface molecules (CD163, HLA-DR, CD86, CX3CR1, and CCR2). In contrast, adhesion molecules CD162 and CD62L were in general similarly expressed in la14⁺16^{neg} and sm14⁺16^{neg}. Several groups of donors were defined in la14⁺16^{neg} monocytes according to the expression of adhesion molecules CD49d and CD43 with a CD49d^{hi}_{bri}, CD43^{hi}_{dim} phenotype

(n=8), a $CD49d_{bri/med}^{hi}$, $CD43_{med/dim}^{hi}$ phenotype (n=10), and a $CD49d_{bri}^{hi}$, $CD43_{dim}^{int}$ phenotype (n=3), and were named OP-10, OP-11, and OP-12, respectively. In 7 donors, atypical profiles with $CD43_{bri}^{hi}$ (n=2), $CD43^{neg}$ (n=3), and $CD49d_{med/dim}^{int/hi}$, $CD43_{dim}^{int/hi}$ (n=2) were found.

In $sm14^{+}16^{+}$ monocytes (Figure 2C), the expression of CD49d and CD162 was relatively conserved among most of the donors with a large majority of donors (20 out of 26) phenotyped as $CD49d_{bri/med}^{hi}$ and $CD162_{bri/med}^{hi}$. Among these, three profiles could be identified according to CD43 and CD62L expression with the following phenotypes $CD43_{dim}^{hi}$ and $CD62L_{med}^{hi}$ (n = 7) with a low level of CCR5 expression in some donors, $CD43_{med}^{hi}$ (n = 10), and $CD43_{dim}^{hi}$, and $CD62L_{variable}^{hi}$ (n = 3). These profiles were named OP-20, OP-21, and OP-22. Six donors had distinct patterns of expressions of these markers and were not grouped.

$la14^{+}16^{+}$ monocytes (n=23) (Figure 2D) differed from $sm14^{+}16^{+}$ monocytes (Figure 2C) with a stronger expression of adhesion molecules CD49d, CD162, and CD62L, and of CD163, and a brighter expression of CCR2 when expressed. Donors were grouped based on expression of adhesion molecules CD49d and CD43 with a $CD49d_{bri}^{hi}$, $CD43_{dim}^{hi}$ group (n=6), a $CD49d_{bri}^{hi}$, $CD43_{med}^{hi}$ group (n=7), a $CD49d_{bri/med}^{hi}$, $CD43_{med/dim}^{hi}$ group (n=5), and a $CD49d_{bri}^{hi}$, $CD43_{bri}^{hi}$ group (n=3). These groups were termed OP-30 to OP-33. Two donors with atypical combinations of expression of adhesion molecules were left ungrouped (numbers 26 and 28).

Less individual variability with respect to adhesion molecules was detected in $sm14^{dim}16^{+}$ monocytes (n=23) (Figure 2E). A fairly consistent expression of CD49d, CD162, as well as HLA-DR, and CX3CR1 was found in these cells with the exception of four donors (on the right side of the figure) with lower expression of CD49d and/or CX3CR1. Two main patterns named OP-40 and OP-41 were identified with a $CD49d_{bri}^{hi}$, $CD43_{dim}^{hi}$, and $CD162_{bri}^{hi}$ phenotype (n =9) in which varying degrees of CD62L expression were distinguished, and a $CD49d_{bri}^{hi}$, $CD43_{med}^{hi}$ phenotype (n=10) including 7 donors characterized as $CD162_{bri}^{hi}$ and $CD62L_{med}^{hi}$. Four donors had a $CD49d_{int}^{hi}$, $CD162_{bri/int}^{hi}$ phenotype together with lower expression of CX3CR1.

The $sm14^{dim}16^{neg}$ monocyte population (Figure 2F) could be analyzed in 16 donors only, due to its varying presence among monocyte populations. Profiles of expression in this population were strikingly different from its $CD16^{+}$ counterpart, $sm14^{dim}16^{+}$ monocytes (Figure 2E) with low

expression of adhesion molecules CD49d, CD162, CD62L and of chemokine receptor CX3CR1. Remarkably, HLA-DR was similarly expressed but this expression was coupled with scant CD86 expression in most donors. Groups were defined along expression of CD49d and CD62L with 5 donors characterized as $CD49d_{med}^{hi}$, $CD62L_{dim}^{int/lo}$, and six donors as $CD49d_{med}^{int/lo}$, $CD62L_{med}^{hi/int}$ named OP-50 and OP-51, respectively. Five donors remained without classification.

From these results, it appears that variations in the expression of selected markers (CD49d, CD43, CD162, and CD62L) did not occur randomly in the monocyte subpopulations and may correspond to a concerted profile of gene expression. In an attempt to further define monocyte phenotypes across the subpopulations, we set out to determine which profiles detected in small and large monocytes were more likely to be associated in healthy donors. We used the network analysis tool Gephi to map the connectivity between profiles OP-01 to OP-51 based on the 28 donors analyzed. As shown in Figure 3, OP profiles formed clusters based on relations to profiles found in each donor.

Four clusters were identified and consisted of profiles from each monocyte subpopulations that are more likely to be associated in a whole monocyte population (Table 4). Thus, monocyte phenotype I was composed of profiles OP-01, -10, -22 or -20, -30, -40 or -42, and -50 and was present in 5 donors. In monocyte phenotype II, no profile was strongly associated with $la14^{+}16^{neg}$ monocytes, with donors 3 and 14 having profile OP-11, donor 20 having profile OP-12, and donors 13, 18, and 19 having no characteristic $la14^{+}16^{neg}$ profile. However, in other monocyte subpopulations, these donors shared profiles OP-04 or -05, -20, -32, -41, and -51. Monocyte phenotype III included profiles OP-01 or -02, -11, -21, -31, and -43 or -44 with however some divergence in donors 22 (with OP-33), 23 and 25 (with OP-10). Donors 17 and 25 had profile OP-51 in subpopulation $sm14^{dim}16^{neg}$ whereas no other donor had distinctive profiles in this subpopulation. Monocyte phenotype IV was much less defined and included profiles OP-03 and -12 found in only two donors (5 and 8). Conspicuous in these two donors was the paucity of CD16 positive monocytes, a feature also found in donor 9, which bridged monocyte phenotypes IV (with OP-03) and I (with OP-10). Monocyte phenotypes II and III were also linked by donors 7, 15, and 24 that shared parts of their profiles. Overall, identification of these monocyte phenotypes in donors further reinforces the notion that monocyte expression of adhesion molecules shapes the phenotypes of these cells in subsets within subpopulations. However, in parallel with conserved

patterns of expression of adhesion molecules, some markers varied considerably among donors, affecting the number of positive cells and/or the level of expression (e.g. CD64, CD163, CD32).

Having established the overall expression of selected markers in newly defined monocyte populations and after describing characteristic expression profiles within each population, we sought to analyze the combined expression of the markers at a single cell level within each monocyte population. Analysis of the expression of 17 markers in addition to morphological parameters in monocytes from 28 patients generated multidimensional data sets that required analysis by computational methods able to detect shared profiles of expression present in groups of cells (Aghaeepour et al., 2013). These methods allow automated unbiased analysis of data in an unsupervised manner. Among the many tools now available for this task, we selected SPADE, a hierarchical analysis generating branched tree structure of related cells, followed by analysis with viSNE, which allows visualization of high-dimensional single-cell data.

3. Identification of clusters of defined phenotypes within monocyte populations

3.1. SPADE analysis

To further identify clusters of monocytes based on cell surface phenotype and to determine the relatedness between these subpopulations, we used SPADE, which is able to establish a hierarchy of cell clusters within complex populations in an unsupervised manner (Qiu et al., 2011). Flow cytometry data for each healthy donor was processed with SPADE, generating a tree where each node corresponded to cells of similar morphology and receptor expression. We used SPADE for 20 markers at high resolution and specificity (target number of nodes: 600; downsampled events targets: absolute number 10,000), generating large numbers of nodes and branches. Displays of trees indicated the size of node populations as well as the mean expression of a selected marker (here, CD14) by a color code (figure 4). Analysis of side and forward scatter properties of each branch of the tree together with CD14 expression allowed us to identify branches corresponding to small and large monocytes. Interestingly, monocyte populations were resolved in two distinct tree patterns, SP-1 and SP-2 (Figure 4A and 4B, respectively), in our donors. In SP-2, a cell population of low to negative CD14 expression and low side scatter was intercalated between the branches corresponding to small and large monocytes. SP-1 and SP-2 structures were found in eleven and

seven donors, respectively. Four donors had tree structures that did not fall within the SP-1 or SP-2 types and were unique to each donor. In six donors (5, 10, 11, 26, 27, and 28), small and large monocytes did not cluster in single, well-defined branches.

These results validated the individualization of small and large monocytes as subpopulations (Figure 1), and suggested that individual variations between donors may shape the make-up of monocyte populations.

3.2 viSNE analysis

Monocyte populations identified by SPADE were subjected to analysis with the viSNE algorithm. viSNE creates 2-D plots where the expression of each marker is taken into account to determine the position of each cell (Amir et al., 2013). This allows visualization of multidimensional data in complex two-dimensional data plots. Series of dot plots were thus generated for SPADE-defined small and large monocytes from each donor and for each sample tube (Table 3). Analysis of these profiles showed a large extent of variations between donors, with multiple populations of monocytes detected. Strikingly, among these interindividual variations, common patterns were distinguishable in groups of unrelated donors, and these shared features were particularly visible when data sets were visualized with selected markers, CD49d and CD43, used in x and y axis and an additional marker, CD62L, selected for MFI color-coded representation (Figure 5). In sm14⁺16⁺ monocytes we identified 3 subpopulations that were present in 9 donors. These three subpopulations were formed of CD43⁺CD49d⁺CD62L^{hi} cells, CD43^{dim/neg}CD49d^{hi}CD62L^{dim} cells, and CD43^{neg}CD49d^{dim}CD62L^{hi} cells and their concomitant presence in one donor was defined as profile a. In a second set of donors, only populations CD43^{dim/neg}CD49d^{hi}CD62L^{dim} cells, and CD43^{neg}CD49d^{dim}CD62L^{hi} were identified defining profile b (n=5). A third profile (named c, n=4) consisted of CD43⁺CD49d⁺CD62L^{hi} cells and CD43^{dim/neg}CD49d^{hi}CD62L^{dim} cells together with an intermediate population in between these two and of variable CD43 expression. A d profile was found in four donors and consisted of CD43⁺CD49d⁺CD62L^{hi} cells and CD43^{dim/neg}CD49d^{hi}CD62L^{dim} cells as in profile c but without the intermediate cells. Finally, only one donor (donor 10) had a unique profile (named e) with a CD43⁺CD49d^{hi}CD62L^{dim} major cell population and a CD43^{hi}CD49d^{hi}CD62L^{hi} minor cell population. Interestingly, donors regrouped according to these patterns of expression in sm14⁺16⁺

monocytes turned out to share similarities of expression for several markers in all other monocyte subpopulations. Therefore, classification of donors into profiles a to d initially defined in sm14⁺16⁺ monocytes revealed clusters of donors with shared patterns of expression across all monocytes populations (Table 5).

From these results, it appeared that numerous populations of monocytes could be distinguished and were shared between donors. Most importantly, many monocyte populations were present in a fraction of the donors, defining complex intertwined phenotypic groups (a, b, c, d, and e) in our panel of 28 Caucasian healthy donors. The existence of such phenotypic groups among a population of healthy donors may further refine the definition of monocytes subsets and overlooking these variabilities might have been an impediment in the definition of functional populations among global monocyte populations or even among the three monocyte subsets so far described in the literature.

4. Divergences between groups defined according to mean expression in a population versus single cell expression of multiple markers

Results presented in Figures 2 and 5 clearly indicated that similar patterns of inter-individual variations of expression of markers, mostly adhesion molecules, were recognizable in our panel of 28 non-related donors. However, comparison of Tables 4 and 5 shows that groups of donors constituted from profiles of mean expression of adhesion molecules in monocyte subpopulations (Figure 2) and combined expression of multiple markers at the single cell level (Figure 5) do not coincide. This points to the existence of intricate patterns of regulation of gene expression in this cell type. It also raises the question of which biological significance may be attached to each classification. Identification of immune cell populations with defined phenotypes has been highly instrumental to advancing the understanding of immune functions and their mechanisms. Consequently, groups based on complex phenotypes determined at the single cell level might seem more relevant to the biology of monocytes (Table 5). Alternatively, since monocytes are innate, non-clonal immune cells with limited functions inside the vasculature, functional relevance may depend on the expression of discrete molecules in cells which otherwise express disparate phenotypes. Adhesion molecules would be candidates for such a role given their involvement in cell recruitment and tissue infiltration. Thus, phenotypic groups defined according to expression of

specified adhesion molecules may associate with particular cell functions. In vitro functional studies and analysis in patients should help determine the associations between the classifications proposed here and functional significance in different settings.

5. Profiles of expression of transcription factors in human monocyte subpopulations

To further clarify the identification and characterization of monocyte subpopulations, the expression of selected transcription factors was examined by qRT-PCR in purified monocyte populations and SGC obtained from three healthy donors. The choice of factors analyzed here was based on a previous transcriptomic RNA-seq analysis of transcription factors expressed in purified classical, non-classical and intermediate monocytes (Schmidl et al., 2014). Factors that had been shown to provide a strong discrimination between these monocyte populations were selected. These included CREB5 for its strong expression in classical monocytes, HES4 and MXD3 for nonclassical monocytes, and HES1 and EGR1 for intermediate ones (Xue et al., 2014).

NR4A1, which has been shown to be preferentially expressed in CD14^{dim}CD16⁺ monocytes (Hanna et al., 2012) was also included. SPI1 (PU.1), which is strongly expressed in precursor and circulating myeloid cells (Chen et al., 1995), was used as a positive control.

As shown in Figure 6, CREB5 was strongly expressed in sm14⁺16^{neg} and in la14⁺16^{neg}. This may be expected if both subsets would be considered as part of CD16^{neg} classical monocytes analyzed by others (Ingersoll et al., 2010a; Schmidl et al., 2014). However, it was also expressed in la14⁺16⁺ monocytes at a level similar to those of CD16^{neg} monocytes. No expression was found in sm14^{dim}16⁺ and sm14⁺16⁺ monocytes.

HES4 and MXD3 were strongly expressed in sm14^{dim}16⁺ monocytes (Figure 6) that are likely to correspond to nonclassical monocytes (Schmidl et al., 2014). However, expression in other subsets was also found. HES4 expression was found in other CD16⁺ positive monocytes (sm14⁺16⁺ and la14⁺16⁺). MXD3 was expressed in all monocyte subsets although the level of expression was significantly lower in sm14⁺16^{neg}, la14⁺16^{neg}, and la14⁺16⁺ monocytes.

Expression of HES1 and EGR1 was found in sm14⁺16⁺ monocytes but was also strong in other subpopulations (Figure 6). HES1 expression was strong in sm14^{dim}16⁺ monocytes and EGR1 was similarly expressed in all monocytes.

NR4A1 was also expressed in all monocytes with no significant difference between sm14^{dim}16⁺ cells and other monocytes subsets in contrast to a previous report (Hanna et al., 2012).

PU.1 was, as expected, expressed by all populations of monocytes studied (Figure 6). Interestingly, its expression was much stronger in the SGC population. In that population, CREB5 was also strongly expressed whereas HES4 and NR4A1 were low.

Overall, these results clearly showed differences in expression of some transcription factors between sm14^{dim}16⁺ monocytes and sm14⁺16^{neg} and la14⁺16^{neg} monocytes with statistically significant differences for CREB5, HES4, MXD3, and HES1 expressions. sm14^{dim}16⁺ monocytes also significantly differed from la14⁺16⁺ monocytes for the expression of CREB5 and MXD3. However, no difference was found between sm14^{dim}16⁺ and sm14⁺16⁺ monocytes for the expression of these genes. Similarly, none of the genes analyzed differed in sm14⁺16^{neg} and la14⁺16^{neg}. CREB5 expression allowed however to distinguish sm14⁺16⁺ and la14⁺16⁺ monocytes, validating the flow cytometry-based discrimination between these two close populations.

6. Variations in monocyte populations and their phenotypes during inflammation

In order to determine how inflammation affected the monocyte populations described above, we analyzed blood monocytes in three septic patients. Clinical and biological characteristics of the patients are shown in Table 2. Blood was collected within 12 h after admission in the ICU (D0) and a second sample was obtained 48-96 h post-admission (D2-4). Full analysis of both samples allowed to assess the evolution and/or stability of monocyte populations and phenotypes over the early phase of sepsis. In this analysis, we used the same cell isolation procedure, staining, and gating strategy as for control donors (Figure 1).

6.1. Morphology and CD14/CD16 expression

Morphological analysis and CD14/CD16 expression patterns of monocytes were similar in all three patients, and profiles for one of them (UEM) is shown in Figure 7. Small and large monocytes

were unambiguously identified at D0 (Figure 7A) and were present in similar proportions as in controls ($79.4\% \pm 9.5$ for small monocytes, $8.0\% \pm 4.1$ for large monocytes, with a large to small mean ratio of 0.10 compared to 0.11 for healthy donors). At D2-4 (Figure 7B), monocytes appeared morphologically smaller and the two populations, small and large, could still be distinguished although some level of overlap was present. At this time point, $84.4\% \pm 6.3$ of CD14⁺ cells were small monocytes (no statistically significant difference with controls and with patients D0, unpaired Welch t test and paired t test, respectively), and $4.3\% \pm 3.1$ were large monocytes ($p = 0.041$ vs. patients D0, paired t test), showing a relative decrease in large monocyte population with a large to small mean ratio of 0.05. CD14/CD16 dot plots indicated that both small and large monocytes consisted of CD16^{neg} and CD16⁺ populations at both time points. A shift toward lower CD14 expression in both small and large monocytes was found at D0 and faded by D2-4. The ratio of CD16⁺ to CD16^{neg} monocytes increased dramatically at D0 compared to healthy donors ($p = 0.047$ for small monocytes; no statistically significant difference for large monocytes, unpaired Welch t test), with a mean ratio 0.34 for small monocytes and 0.42 for large monocytes compared to 0.09 and 0.13 for healthy donors, respectively. At D2-4, the ratio remained high (no statistically significant difference for small monocytes; $p = 0.028$ for large monocytes, unpaired Welch t test) with a mean ratio 0.28 for small monocytes and 0.39 for large monocytes. Increase in CD16⁺ cells concerned only sm14⁺16⁺ (4.2-fold increase on average compared to healthy donors) and la14⁺16⁺ monocytes (2.7-fold increase) at D0, while sm14^{dim}16⁺ monocytes also increased at D2-4 (2-fold increase) with lower sm14⁺16⁺ (3-fold increase) and steady la14⁺16⁺ (2.6-fold increase) proportions.

The SGC population was increased in patients, but returned to close to normal at D2-4. Interestingly, CD16 expression was dramatically decreased in fractions of SGC, leading to CD16^{bri}, CD16⁺, and CD16^{neg} populations, the latter forming the majority of SGC at D2-4.

6.2. Markers' expression in monocyte subpopulations

Expression of cell surface molecules included in our platform for monocyte phenotype analysis is shown in Figure 8 for all three patients. Many of these markers were expressed at levels close to the lower end of expression in control donors. For example, the MFI for CD162 in sm14⁺16^{neg}, sm14⁺16⁺ and sm14^{dim}16⁺ monocytes (Figure 8A, 8C and 8E) but not in the other monocyte

populations from patients were lower than in most of the controls although the numbers of positive cells were similar. CD49d expression in patients was similarly low except in sm14^{dim}16^{neg} monocytes. Other markers such as CD43 and CD163 were normally expressed in patients. On the other hand, CD64, when expressed in sm14^{dim}16⁺ and sm14^{dim}16^{neg} patient monocytes, was found with higher MFI than in controls. HLA-DR has been of particular interest in septic patients since its lower expression in monocytes correlated with reduced cell functions (Faivre et al., 2007; Munoz et al., 1991) and was associated with increased susceptibility to infection (Hotchkiss et al., 2013). HLA-DR expression was as expected lower in some monocyte populations, but unexpectedly the MFI and percentage of positive cells were conserved in sm14⁺16⁺ and la14⁺16⁺ monocytes (Figure 8C and 8D). In addition, the expression of HLA-DR was unevenly decreased among monocyte populations with a marked decrease in sm14⁺16^{neg}, la14⁺16^{neg}, and sm14^{dim}16^{neg} (lower MFI and ratio of positive cells) contrasting with a mild reduction of MFI in sm14^{dim}16⁺ monocytes.

Analysis of monocyte phenotypes at admission and after an interval of 2-4 days for each patient allowed to assess how markers' expression evolved over time in each monocyte population (Figure 8). It clearly showed that for a majority of the 15 markers analyzed in 6 subpopulations, no noteworthy change occurred in a 2-4 day period. This gives evidence of overall stability of expression of these surface molecules analyzed in the same individual over time, even though patients had infections and systemic inflammation. Changes in expression clearly affected different markers in the patients (Figure 8). This may not be surprising as patients were heterogeneous with respect to the time of sepsis onset at admission, the type of infection, and comorbidities. Since decreased HLA-DR expression has been correlated with deficient monocyte functions (Faivre et al., 2007; Munoz et al., 1991), its variation reflects on the immune status of these cells in the patients. In patient UEM, HLA-DR expression in sm14⁺16^{neg} and sm14^{dim}16^{neg} monocytes was strongly depressed at both time points, suggesting low monocyte functions at D0 and no recovery over time in these cells. In la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺, expression decreased over time with a lower ratio of positive cells and would reflect deteriorating cell functions. In sm14^{dim}16⁺ monocytes, HLA-DR expression increased in MFI and ratio of positive cells, while in sm14⁺16⁺ it retained almost normal expression over time. A very different evolution of HLA-DR expression was found in patient EUI. In sm14⁺16^{neg}, la14⁺16^{neg}, and sm14^{dim}16^{neg} monocytes, expression strongly dropped at the second time point, while still within normal values in sm14⁺16⁺, sm14^{dim}16⁺

and $la14^+16^+$ monocytes. Finally, in ITB patient, HLA-DR expression increased slightly in $sm14^+16^{neg}$ and $la14^+16^{neg}$ monocytes, remained high and normal in $sm14^+16^+$, $sm14^{dim}16^+$, and $la14^+16^+$ monocytes and stayed depressed in $sm14^{dim}16^{neg}$ monocytes. Therefore, these results would suggest deep and/or sustained deterioration of monocyte functions in several populations in UEM over the first days of hospitalization, worsening functions in three populations in patient EUI, and a trend toward recovery of monocyte functions in patient ITB. Variations of expression of other markers, which may then be interpreted through the prism of HLA-DR expression, indicate a profound decrease of CD163 expression in all monocyte populations in patient UEM no matter what the expression of HLA-DR was. In patient EUI, a strong decrease in CD43 expression paralleled HLA-DR loss of expression, together with a loss of CD64 expression in all monocyte populations except in $sm14^+16^+$ cells. Marked variations of expression in ITB patient were found in CD86 going along with increasing HLA-DR expression.

Notably, FcR CD32 expression was highly variable and diverse in all monocyte populations in all 3 patients, pointing to a variability of expression that persists even when monocyte populations are narrowly defined.

The combined expression of markers at a single cell level was then determined with unsupervised algorithm-based analysis.

6.3. SPADE analysis

Unsupervised SPADE analysis of PBMC from each patient at two time points was performed with the two data files (D0 and D2-4) from a same patient analyzed in a single run. This allowed to build a patient specific tree and to compare related clusters (Figure 9). Differences between patients were in line with the heterogeneity in tree structure seen with control donors (Figure 5). Patients UEM and EUI had tree structures similar to SP-1 profiles (Figure 5A), while ITB's was similar to control donors #2 (data not shown), which was unique in our panel of control donors.

6.4. viSNE analysis

Analysis of the expression of markers in monocyte subpopulations as defined in the SPADE tree showed that, based on the expression of CD43, CD49d, and CD62L, patient ITB (Figure 10E

and F) had a profile similar to phenotypic group a (Figure 6A). This is mostly visible with D2-4 sample, but also in D0 sample as differences between CD62L scales (which were automatically set by viSNE) in the two dot-plots largely explained the color shifts. Patients UEM and EUI profiles of expression showed similarities but were not obviously related to one of the healthy donors' profiles. However, the presence of $CD43^{dim}CD49d^{hi}CD62L^{dim}$ cells and of $CD43^{dim/neg}CD49d^{dim}CD62L^{hi}$ cells in these patients make them close to profile b, which was defined by two similar populations. Clearly, profiles from patients UEM and EUI were distinct from all other profiles (a, c, d, and e) defined in healthy donors (Table 5).

The expressions of markers for each patient as visualized with viSNE were then compared to that of control donors in the same phenotypic group. The very small number of patients analyzed here precluded drawing general conclusions regarding monocyte phenotype variation in sepsis. However, the extent of differences may indicate which monocyte populations were more affected during inflammation and how these variations evolved over time in a given patient.

Results showed that in septic patient UEM (supplementary Table 1) most of markers expression alterations were concentrated to $sm14^{+}16^{+}$ monocytes although their HLA-DR expression was almost completely conserved. Differences of expression between patient EUI (supplementary Table 2) and control donors in phenotypic group b were also important in $sm14^{+}16^{+}$ monocytes, although differences in large monocytes were also substantial. In $sm14^{+}16^{+}$ monocytes, decreased expression of HLA-DR was mild. In ITB patient samples (supplementary Table 3), a smaller number of variations of expression compared to control donors in phenotypic group a were found and these were mostly concentrated in $sm14^{+}16^{+}$ and $sm14^{dim}16^{+}$ monocytes.

Variations of expression between time points D0 and D2-4 (supplementary Tables 1-3) were abundant, present in all monocyte populations, and affected altogether all of the markers tested. However, viSNE analysis through one set of molecules (HLA-DR, CD86, and CD163) showed that combined expression of the three markers in single cells were varying in a noticeable way in $sm14^{+}16^{+}$ monocytes (supplementary Figure 1). At D0, in all three patients, CD163 bright expression was restricted to cells with either $HLA-DR^{bri}CD86^{bri}$ or $HLA-DR^{dim}CD86^{dim}$ expression, forming a diagonal-like shape in a graph where the 3 markers are readily shown (supplementary Figure 1, left column). At D2-4 however, patterns of CD163 bright cells were radically different in the 3 patients (supplementary Figure 1, right column). In patient UEM (line

A), CD163^{bri} cells expressed various levels of HLA-DR and CD86. In contrast, in patient EUI (line B), CD163^{bri} cells were mostly HLA-DR^{dim}, whereas in patient ITB (line C) they were HLA-DR^{bri}. Given the link between monocyte HLA-DR expression and monocyte functions (Faivre et al., 2007; Munoz et al., 1991), these results suggest that analysis of CD163 expression may be a useful marker for the analysis of sm14⁺16⁺ monocyte functions during sepsis.

Discussion

The definition of human monocyte subsets has recently progressed by distinguishing "intermediates" CD14⁺CD16⁺ monocytes from bona fide "non-classical" CD14^{dim}CD16⁺ cells within CD16⁺ monocytes (Ziegler-heitbrock et al., 2010). The vast majority of human blood monocytes (80-85%), "classical" monocytes, remained so far as one cluster. However, monocyte functions often did not align with these clusters, with considerable discrepancies and overlaps in the assignment of inflammatory and immunologic roles to these subsets (Cros et al., 2010; Mukherjee et al., 2015; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Further dissection of monocyte populations is therefore warranted in order to progress in the definition of less ambiguous functional human monocyte populations.

To advance toward this goal, we have performed a comprehensive flow cytometry analysis of multicolor labeled human monocytes present in PBMC. First, we showed that additional larger populations of monocytes were readily detectable by flow cytometry when high numbers of events ($\geq 1 \times 10^6$) were analyzed. These "large" monocytes, representing around 9 % of CD14⁺ myeloid cells in PBMC, were composed of a majority of CD16^{neg} cells (la14⁺16^{neg} monocytes) and of less abundant CD16⁺ cells (la14⁺16⁺ monocytes), paralleling the division of commonly described "smaller" monocytes (sm14⁺16^{neg}, sm14⁺16⁺, and sm14^{dim}16⁺ monocytes). These are seemingly included within the "classical", "intermediate" and "non-classical" subpopulations so far described. In addition, within small monocytes, a CD14^{dim} CD16^{neg} population was also identified. Its expression of CD14, HLA-DR and CD86 together with lack of expression of lymphocyte lineage markers suggests its belonging to the monocytic cell type, confirming and extending results by others (Selimoglu--Buet D , Wagner-Ballon O , Saada V , Bardet V , Itzykson R , Bencheikh L , Morabito M , Met E , Debord C , Benayoun E , Nloga AM , Fenaux P , Braun T , Willekens C , Quesnel B , Adès L , Fontenay M , Rameau P , Droin N , Koscielny S, 2015).

Within these six monocyte populations, analysis of expression of 15 additional myeloid markers (such as FcRs, chemokine receptors, antigen presentation molecules, adhesion molecules) showed substantial variability of expression in healthy donors. Interestingly, variations in phenotype did not come out as random. Instead, groups of donors could be delineated with similar patterns of expression, and this was found in manual analysis of the data as well as in unsupervised algorithm-based analysis. Manual analysis was used to define receptor expression at the

subpopulation level. Among our panel of 28 healthy unrelated donors, profiles were defined (OP-01 to OP-51) in the six monocyte subpopulations. Some combinations of these profiles were preferentially associated in donors, thus defining signatures of markers expression that characterized the whole monocyte phenotype present in a donor. Automated unsupervised analysis was performed using a combination of hierarchical clustering of single cell phenotype with SPADE and visualization of high dimensional data with viSNE. It indicated, at the single cell level, the existence of four phenotypic groups of monocytes based on inter-individual variations of expression.

Significant differences were found between groups defined using manual and unsupervised methods. This is however not unexpected since in manual analysis groups were coarsely defined according to mean expression of markers (mostly adhesion molecules) in whole subpopulations of monocytes. In contrast, in unsupervised analysis, combined expression of adhesion molecules at the single cell level was the basis for group definition. The significance of each of the methods of grouping will have to be determined in functional studies. A composite phenotype common to a group of monocytes may seem more likely to convey a specific immunologic function. However, considering the nature of the cell type under study leads to an alternative hypothesis. Recruitment of monocytes to a tissue may depend on the expression of key cell surface adhesion molecules irrespective of the associated phenotype, and subsequent differentiation of monocytes in the tissues may follow cues from the environment (Rivollier et al., 2012), superseding the original expression program present in the cells. Therefore, the different groupings of donors using these various methods may not be competing or exclusive, and may be considered as clustering of donors according to distinct characters present in their monocytes.

Although variability among donors in the expression of multiple genes in human monocytes has been previously recognized by cytofluorometry and transcriptome analysis (Hudig et al., 2014; Segura et al., 2018; Wong et al., 2011), clusterization of individuals in distinct profiles of expression has so far not been done. The mechanisms leading to shared interindividual variations in monocyte phenotypes described here are unknown. Evidence has recently accumulated showing monocyte specific effects of single nucleotide polymorphisms (SNP) and sex, epigenetic modifications particular to monocytes, age related alterations, as well as environmentally linked changes in monocytes (with factors such as viral infections, microbiota composition, and lifestyle

choices). Some of these variations have been directly linked to phenotype changes. SNPs in the *FcGR2* locus were associated with levels of CD32 expression in monocytes, but not in B lymphocytes (Roederer et al., 2016). Combinations of the two SNPs rs1801274 and rs10800309 generates six genotypes, and each was associated with a distinctive proportion of CD32+ monocytes in blood (Roederer et al., 2016). In our results, no cluster of donors was defined based on CD32 expression, and this may be due to the smaller size or higher heterogeneity of our cohort of donors. Sex difference has also been linked to various monocyte phenotypes and functions (Brodin and Davis, 2017; Liston et al., 2016; Piasecka et al., 2018). Particularly, the expression of CD163 was higher in intermediate monocytes from women (Puissant-Lubrano et al., 2018), a pattern however not found in this study even after breaking up monocytes into subpopulations and OP profiles.

Although not directly linked to specific steady-state expression phenotypes, other genetic variations have been associated with monocyte biology. Interindividual disparities in blood monocyte counts have been linked to a locus in chromosome 2q31 close to the *ITGA4* gene, which encodes for the adhesion molecule CD49d (Nalls et al., 2011). A SNP in the *IRF5* gene region was associated with variable cytokine expression following monocyte activation with various TLR agonists (Hedl and Abraham, 2012). Likewise, SNP rs1057233 (G) in the 3' untranslated region of the *SP11* (PU.1) gene, which is linked to delayed onset of Alzheimer disease, was associated with low expression of the transcription factor PU.1 in monocytes and reduced phagocytic ability (Huang et al., 2017). Gene expression analysis in activated monocytes identified the immune response effects of numerous cis variants and of trans regulatory genes including the MHC and *IRF2* (Fairfax et al., 2014).

Epigenetic profiles specific to individuals have been described in blood monocytes. In epigenome wide association studies (EWAS), analysis of locus specific DNA methylation signatures in classical monocytes has shown interindividual variable CpG site methylations associated with disease susceptibilities and tobacco exposure and these were specific to monocytes (Hachiya et al., 2017). In bulk non-fractionated monocytes, interindividual variations in DNA methylation were linked to cis-located SNPs (Schröder et al., 2017). In addition, epigenetic modifications that were not linked to genetic variants in cis were associated with specific profiles of expression of Tec kinase and eicosanoid signal pathway molecules, NF- κ B, CXCL8, and IL-10

(Chen et al., 2016a). However, the contribution of epigenetic variations to the generation of distinct phenotypes appeared limited. Transcriptome variance due to epigenetic features (DNA methylation and histone modifications) in monocytes was on average 4 to 7 times lower than variance due to genetic variation (Chen et al., 2016a). Methods to fully ascertain the extent of tissue-specific genome wide DNA methylation are however still in progress (Chen et al., 2016a; Hachiya et al., 2017).

Infections and particularly the CMV status has been shown to be associated with immune cell phenotypes (Brodin and Davis, 2017). CD64 expression in classical, intermediate, and non-classical monocytes was slightly but significantly increased in CMV positive subjects (Puissant-Lubrano et al., 2018).

Overall, these studies suggest that multiple mechanisms are likely to affect steady-state gene expression in monocytes, and combinations of intrinsic and environmental factors may determine phenotype differences between individuals. Although variable exposure to common microorganisms may alter gene expression in specific ways as shown in monozygous twins (Brodin et al., 2015), genetic variations would seem a more probable cause for shared variations in unrelated donors. Stability in immune cell frequency in blood samples analyzed months apart (Brodin and Davis, 2017; Liston et al., 2016) is consistent with strong constraints acting most likely at the genetic level. Along this line, our results showed stability of individual patterns of expression in monocyte from sepsis patients analyzed over time.

Complete equivalence between $sm14^{+}16^{neg}$, $sm14^{+}16^{+}$, and $sm14^{lo}16^{+}$ monocytes described in this study and classical, intermediate, and non-classical monocytes, respectively, is unlikely since CD14 and CD16 expressions in small and large monocytes partly overlapped (Figure 1M). Small and large monocytes needed to be carefully distinguished according to their morphological properties in order to be individualized in CD14/CD16 scatter plots. Therefore, cell populations used previously for characterization of phenotypic or functional properties of classical and intermediate monocytes may include contaminating $la14^{+}16^{neg}$ and $la14^{+}16^{+}$ monocytes, respectively.

Large $CD16^{neg}$ and $CD16^{+}$ monocytes were individualized as novel monocyte populations on the basis of their unique position in FSC/SSC scatter plots. None of the 15 markers analyzed had

an expression profile allowing to unambiguously distinguish large from small monocytes on a population basis (Figure 2). However, comparison of large and small monocytes (la14⁺16^{neg} vs. sm14⁺16^{neg}, and la14⁺16⁺ vs. sm14⁺16⁺) in individual donors indicated that adhesion molecules CD62L, CD162, and CD49d were expressed at higher levels in large monocytes. Analysis of the expression of transcription factor CREB5 confirmed that la14⁺16⁺ and sm14⁺16⁺ monocytes formed two distinct subsets (Figure 6). In addition, SPADE hierarchical trees for each donor obtained with no manual intervention in the analysis also individualized large monocytes as clusters.

A similar analysis of samples from septic patients at day 0 and day 2-4 post admission showed that all six populations of monocytes (4 small and 2 large) were identified and increased frequency of CD16⁺ monocytes was present in small and large monocytes. Severely reduced expression of HLA-DR has been repeatedly documented as a marker of sepsis. Surprisingly, sm14⁺16⁺ monocytes actually conserved HLA-DR expression although it was depressed in other monocyte populations. Patterns of combined HLA-DR, CD86, and CD163 were associated with alterations in HLA-DR expression and therefore possibly with monocyte functions. Identification of septic patients as belonging to a single phenotypic group, and as determined in unsupervised manner, was achievable and characteristic profiles were maintained in inflammatory conditions. Grouping according to the SPADE/viSNE profiles appeared therefore as the most robust and reliable method to identify patterns of expression shared by individual donors. Confirming the belonging to a given phenotypic group at two time points in patients supports the view that profiles of expression characteristic of a group remain stable in each individual.

HLA-DR expression in monocytes from septic patients has been recognized as a marker associated with immune depression and its decreased expression was correlated with impaired monocytes functions *ex vivo* (Faivre et al., 2007; Munoz et al., 1991). Altered expression of HLA-DR in monocyte subpopulations has not been thoroughly investigated. Kim et al. reported differential expression of HLA-DR in CD14^{high} and CD14^{low} monocytes with a more pronounced decrease in the former population (Kim et al., 2010). The levels of circulating cortisol correlated with decreased HLA-DR expression and IL-10 levels were more specifically correlated to decreased expression in CD14^{high} monocytes. Our results indicate that HLA-DR expression is mostly unchanged in sm14⁺16⁺ monocytes from septic patients even though it is profoundly

depressed in other monocyte populations in these same patients. Differential regulation of expression in monocyte subsets may involve responsiveness to various mediators as proposed (Fumeaux and Pugin, 2002) via distinct patterns of expression of receptors and signaling molecules. Functional consequences of decreased or sustained HLA-DR expression remain to be fully explored. HLA-DR expression was nonetheless heterogeneous in sm14⁺16⁺ monocytes and disparities in the expression of other markers, such as CD163 as shown here, may be useful for the identification functional subsets related to clinical evolution in patients. Ex vivo studies indicated that although HLA-DR expression was returning to normal in vitro after culture in conventional culture medium (Faivre et al., 2007), cell functions were durably altered with defects in T lymphocyte activation and induction of regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines (Faivre et al., 2012). The evolution of expression of other receptors such as CD163 in sm14⁺16⁺ monocytes and particularly in relation with the level of expression of HLA-DR as shown in our results further point to the heterogeneity of monocytes within subpopulations and suggest the existence of a range of distinct functional states that requires further dissection of these subsets.

Overall, this study further documents the complexity of human monocyte phenotypes and populations, identifying novel subpopulations, and pointing to the relatedness of phenotypes detected in unrelated donors. The analysis of monocytes in patients with sepsis points to a robust maintenance of subpopulations even in a highly inflammatory setting. A better dissection of human monocyte populations will help identify functional cell subsets and provide tools for efficient monitoring of immune functions in patients with inflammatory diseases.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. N. Dulphy for extensive and continuous help in the operation of the BD FACSCANTO, Dr. E. Clave and C. Douay for expert assistance in setting the qRT-PCR protocols, and Dr.N. Setterblad, Dr. S. Duchez, and C. Doliger from the Imaging, Cell Selection and Genomics Core Facility at Institut Universitaire d’Hématologie, Université Paris 7 – Paris Diderot for excellent assistance in cell sorting experiments. We are greatly indebted to Dr. H. Haziot-Thalhammer for invaluable insight in graph theory. This work was supported by institutional funding from INSERM, Paris, France, and has been published under the framework of the LABEX TRANSPLANTEX [ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTEX] and benefits from funding from the French government, managed by the French National Research Agency (ANR) as part of the Investments for the Future program.

Author Contributions Statement

AH, NM, DC and DP contributed to the conception of the work; FM, SC, and AH designed the experiments; FM, SC, ACL, and VF acquired data; FM, SC, and AH analyzed the data; FM, SC, NM, and AH wrote the paper.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no personal, financial, or professional conflict of interest.

References

1. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* (1989) 74:2527–2534.
2. Grage-Griebenow E, Flad H, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* (2001) 69:11–20.
3. Belge K-U, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* (2002) 168:3536–3542.
4. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* (2003) 197:1701–7.
5. Ziegler-heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Derek N, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *e-Blood* (2010) 116:e74–e80.
6. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* (2011) 118:e16-31.
7. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, et al. SuperSAGE evidence for CD14 ++CD16 + monocytes as a third monocyte subset. *Blood* (2011) 118:
8. Frankenberger M, Ekici AB, Angstwurm MW, Hoffmann H, Hofer TPJ, Heimbeck I, et al. A defect of CD16-positive monocytes can occur without disease. *Immunobiology* (2013) 218:169–174.
9. Schmidl C, Renner K, Peter K, Eder R, Lassmann T, Balwierz PJ, et al. Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. *Blood* (2014) 123:90–100.
10. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* (2003) 19:71–82.
11. Weber C, Belge K, Hundelshausen P Von, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukocytes Biol* (2000) 67:699–704.
12. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* (2001) 31:48–56.

13. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* (2010) 33:375–386.
14. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* (2008) 67:152–159.
15. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B, et al. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* (2015) 5:13886.
16. Semnani RT, Moore V, Bennuru S, McDonald-Fleming R, Ganesan S, Cotton R, et al. Human monocyte subsets at homeostasis and their perturbation in numbers and function in filarial infection. *Infect Immun* (2014) 82:4438–4446.
17. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14^{bright}CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* (2012) 64:671–677.
18. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunol Res* (2012) 53:41–57.
19. Smedman C, Ernemar T, Gudmundsdotter L, Gille-Johnson P, Somell A, Nihlmark K, et al. FluoroSpot analysis of TLR-activated monocytes reveals several distinct cytokine-secreting subpopulations. *Scand J Immunol* (2012) 75:249–258.
20. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* (2007) 81:584–92.
21. Stansfield BK, Ingram D a. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Transl Med* (2015) 4:5.
22. Gren ST, Rasmussen TB, Janciauskiene S, Hakansson K, Gerwien JG, Grip O. A single-cell gene-expression profile reveals inter-cellular heterogeneity within human monocyte subsets. *PLoS One* (2015) 10:1–20.
23. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Human Monocytes Differentiate into Dendritic Cells Subsets that Induce Anergic and Regulatory T Cells in Sepsis. *PLoS One* (2012) 7.
24. Wersto RP, Chrest FJ, Leary JF, Morris C, Stetler-Stevenson MA, Gabrielson E. Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis. *Commun Clin Cytom* (2001) 46:296–306.

25. Bastian M, Heymann S, Jacomy M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Third Int AAAI Conf Weblogs Soc Media* (2009)361–362.
26. Jacomy M, Venturini T, Heymann S, Bastian M. ForceAtlas2, a continuous graph layout algorithm for handy network visualization designed for the Gephi software. *PLoS One* (2014) 9:1-12.
27. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD, Bruggner R V, Linderman MD, et al. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat Biotechnol* (2011) 29:886–891.
28. Amir ED, Davis KL, Tadmor MD, Simonds EF, Levine JH, Bendall SC, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* (2013) 31:545–552.
29. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* (2001) 409:198–201.
30. Bover LC, Cardo-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, Takeya M, et al. A Previously Unrecognized Protein-Protein Interaction between TWEAK and CD163: Potential Biological Implications. *J Immunol* (2007) 178:8183–8194.
31. Stillwell R, Bierer BE. T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation. *Immunol Res* (2001) 24:31–52.
32. Aghaeepour N, Finak G, Dougall D, Khodabakhshi AH, Mah P, Obermoser G, et al. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat Methods* (2013) 10:228–238.
33. Xue J, Schmidt S V., Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* (2014) 40:274–288.
34. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, Punt JA, Wu R, Herrley E, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res* (2012) 110:416–427.
35. Chen HM, Zhang P, Voso MT, Hohaus S, Gonzalez D a, Glass CK, et al. Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood* (1995) 85:2918–28.
36. Ingersoll M, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier E, Frankenberger M, Hoffmann R, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* (2010) 115:10–20.

37. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* (1991) 88:1747–1754.
38. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Accelerated in vitro differentiation of blood monocytes into dendritic cells in human sepsis. *Clin Exp Immunol* (2007) 147:426–439.
39. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol* (2013) 13:862–874.
40. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* (2015) 156:649–654. doi:10.1182/blood
41. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med* (2012) 209:139–55.
42. Hudig D, Hunter KW, Diamond WJ, Redelman D. Properties of human blood monocytes. II. Monocytes from healthy adults are highly heterogeneous within and among individuals. *Cytom Part B Clin Cytom* (2014) 86:121–134.
43. Segura V, Valero M, Cantero L, Muñoz J, Zarzuela E, García F, et al. In-Depth Proteomic Characterization of Classical and Non-Classical Monocyte Subsets. *Proteomes* (2018) 6:8.
44. Roederer M, Quaye L, Mangino M, Beddall MH, Mahnke Y, Chattopadhyay P, et al. The genetic architecture of the human immune system: a bioresource for autoimmunity and disease pathogenesis. *Cell* (2015) 161:387-403.
45. Piasecka B, Duffy D, Urrutia A, Quach H, Patin E, Posseme C, et al. Distinctive roles of age, sex, and genetics in shaping transcriptional variation of human immune responses to microbial challenges. *Proc Natl Acad Sci* (2018) 115:E488–E497.
46. Liston A, Carr EJ, Linterman MA. Shaping Variation in the Human Immune System. *Trends Immunol* (2016) 37:637–646.
47. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:21-29.
48. Puissant-Lubrano B, Apoil PA, Guedj K, Congy-Jolivet N, Roubinet F, Guyonnet S, et al. Distinct effect of age, sex, and CMV seropositivity on dendritic cells and monocytes in human blood. *Immunol Cell Biol* (2018) 96:114–120.
49. Nalls MA, Couper DJ, Tanaka T, van Rooij FJA, Chen M-H, Smith A V., et al. Multiple Loci Are Associated with White Blood Cell Phenotypes. *PLoS Genet* (2011) 7:e1002113.

50. Hedl M, Abraham C. IRF5 Risk Polymorphisms Contribute to Interindividual Variance in Pattern Recognition Receptor-Mediated Cytokine Secretion in Human Monocyte-Derived Cells. *J Immunol* (2012) 188:5348–5356.
51. Huang K, Marcora E, Pimenova AA, Di Narzo AF, Kapoor M, Jin SC, et al. A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer’s disease. *Nat Neurosci* (2017) 20:1052–1061.
52. Fairfax BP, Humburg P, Makino S, Naranbhai V, Wong D, Lau E, et al. Innate Immune Activity Conditions the Effect of Regulatory Variants upon Monocyte Gene Expression. *Science* (2014) 343:1246949-1.
53. Hachiya T, Furukawa R, Shiwa Y, Ohmomo H, Ono K, Katsuoka F, et al. Genome-wide identification of inter-individually variable DNA methylation sites improves the efficacy of epigenetic association studies. *npj Genomic Med* (2017) 2:1–13.
54. Schröder C, Leitão E, Wallner S, Schmitz G, Klein-Hitpass L, Sinha A, et al. Regions of common inter-individual DNA methylation differences in human monocytes: Genetic basis and potential function. *Epigenetics and Chromatin* (2017) 10:1–18.
55. Chen L, Ge B, Casale FP, Vasquez L, Kwan T, Garrido-Martín D, et al. Genetic Drivers of Epigenetic and Transcriptional Variation in Human Immune Cells. *Cell* (2016) 167:1398-1414.
56. Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJL, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* (2015) 160:37–47.
57. Kim OY, Monsel A, Bertrand M, Coriat P, Cavaillon J-M, Adib-Conquy M. Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. *Crit Care* (2010) 14:R61.
58. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* (2002) 166:1475–1482.

Figure legends

Figure 1. Gating strategy and identification of monocyte subpopulations.

PBMC were separated and stained with antibodies directed at various cell surface molecules (Table 3). Lineage markers were used to exclude lymphocyte subsets (A) and CD14⁺ cells were selected (B). Forward and side scatter identified small and large clusters of monocytes and small granular cells (SGC) (C). After exclusion of doublets (E, F, G, H), the expressions of CD14 and CD16 were analyzed in gated cells (I, J, K, L). Overlay of small and large monocyte CD14/CD16 profiles is shown in (M).

Figure 2. Phenotypes of subpopulations of monocytes as analyzed with our typing platform.

PBMC from 28 donors were separated and stained with antibodies directed at various cell surface molecules (y-axis and Table 3). Cells were analyzed as described in Figure 1. Fluorochrome-matched isotype controls were used to determine MFI and percentage of positive cells, which are presented as dots with matched color and size, according to the color and size scale legend. Monocytes subsets: (A) sm14⁺16^{neg}, (B) la14⁺16^{neg}, (C) sm14⁺16⁺, (D) la14⁺16⁺, (E) sm14^{dim}16⁺ and (F) sm14^{dim}16^{neg}. In each subpopulation, donors were grouped according to similar expression of markers as noted at the top of the panels and recapitulated with the OP nomenclature at the bottom of the panels.

Figure 3. Connectivity map between donors and defined phenotypic profiles.

To determine which phenotypic profiles identified in subpopulations of monocytes were more likely to be associated in a given donor, a network analysis was performed with Gephi. Phenotypic profiles are presented as green dots and donors are presented as pink dots. The size of the dots is proportional to the number of links. (A) complete network with ovals around clustered donors as listed in Table 4, (B-E) donor representative of each cluster with links to corresponding phenotypic profiles, and (F) non-clusterized donors.

Figure 4. Identification of small and large monocytes using unsupervised analysis tool SPADE.

PBMC were isolated and stained as described in Figure 1 and 2 and a hierarchy of related monocyte phenotype was determined by SPADE. Two SPADE profiles were identified: (A) profile SP-1 with representative donor 13, and (B) profile SP-2 with representative donor 4. CD14 expression is presented according to color scales shown. Gated branches were identified as small and large monocytes according to their FSC/SSC profiles.

Figure 5. viSNE profile of sm14⁺16⁺ monocytes.

Small and large monocytes identified with SPADE (Figure 4) were analyzed with viSNE. Expression of markers CD43, CD49d and CD62L in sm14⁺16⁺ monocytes was represented in dot plot profiles. Profiles shown in A, C, D, E, and F correspond to monocyte subpopulations a, b, c, d, e identified in Table V. Panel B show a schematic representation of monocyte populations identified in profile a (A) and that are found in various combinations in profiles b, c, d, and e.

Figure 6. Differential expression of selected transcription factors in monocyte subpopulations.

PBMC were isolated, stained, analysed as described in Figure 1, and subpopulations were purified by cell sorting. Purified cells were lysed in TriReagent, RNA was purified by chloroform extraction and isopropanol precipitation, and used as template for cDNA synthesis. Samples were probed for the quantitative expression of indicated genes in a Taqman expression system. Data were expressed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ Mann-Whitney U test).

Figure 7. Gating strategy and identification of monocyte subpopulations in septic patients.

PBMC were separated and stained with antibodies directed at various cell surface molecules (Table 3). Gating strategy was identical to that presented in Figure 1. Results shown were from patient UEM at D0 (A) and at D4 (B).

Figure 8. Phenotypes of subpopulations of monocytes in septic patients as analyzed with our typing platform.

PBMC from 3 patients (UEM, EUI, ITB) were separated from blood collected at two different time points (D0 and D2-4) and were stained with antibodies directed at various cell surface molecules (y-axis and Table III). Cells were analyzed as described in Figure 1. Fluorochrome-matched isotype controls were used to determine MFI and percentage of positive cells, which were presented as dots with matched color and size, according to the color and size scale legend. Monocytes subsets analyzed in each panel are noted in the graph.

Figure 9. Identification of SPADE monocyte tree profiles in septic patient.

PBMC were isolated and stained as described in Figure 2 and a hierarchy of related monocyte phenotype was determined by SPADE. Tree representation of profiles in septic patient at two time point (A) UEM D0, (B) UEM D2-4, (C) EUI D0, (D) EUI D2-4, (E) ITB D0 and (F) ITB D2-4. CD14 expression is presented according to color scales shown. Gated branches were identified as small and large monocytes according to their FSC/SSC profiles.

Figure 10. viSNE profile of monocytes sm14+16+ in septic patients.

Small and large profiles identified with SPADE (Figure 5) were analyzed with viSNE. Expression of all markers in the tube test (Table III) by sm14+16+ monocytes was represented through dot plot profiles of CD43, CD49d and CD62L. (A) patient UEM D0 and D2-4, (B) patient EUI D0 and D2-4 and (C) patient ITB D0 and D2-4.

Supplementary Figure 1. viSNE profiles via representation of HLA-DR, CD86 and CD163 expression in sm14⁺16⁺ monocytes from septic patients.

Small and large profiles identified with SPADE (Figure 5) were analyzed with viSNE. Expression of markers HLA-DR, CD86 and CD163 in sm14⁺16⁺ monocytes was represented in dot plot profiles. (A) patient UEM D0 and D2-4, (B) patient EUI D0 and D2-4 and (C) patient ITB D0 and D2-4.

Donor ID	Age (years)	Sex (M / F)	Monocyte fraction (%) ^a	Monocyte counts (x10 ⁹ /L)
1	33	M	5,5	0,2
2	44	M	4,4	0,2
3	42	M	5,6	0,2
4	58	M	5,2	0,2
5	40	M	4,6	0,3
6	49	M	6,3	0,3
7	37	F	5,5	0,3
8	22	F	4	0,3
9	32	M	4,1	0,2
10	62	F	5,1	0,2
11	42	F	6,6	0,3
12	33	M	4,1	0,3
13	42	M	7,8	0,3
14	29	F	6,1	0,3
15	37	F	6,7	0,4
16	29	F	5,3	0,3
17	65	M	3,7	0,1
18	26	M	6,8	0,3
19	52	F	10,1	0,5
20	61	F	5,4	0,3
21	20	M	12,7	0,5
22	55	M	6,5	0,3
23	34	F	5,8	0,3
24	46	M	5,1	0,2
25	61	F	4,8	0,2
26	63	M	9	0,4
27	42	M	3	0,2
28	41	M	6,4	0,2

Table 1. Characteristics of blood donors.

^a, numbers express the percentage in PBMC

Patient ID	Day of Sample collection	Age (yrs)	Sex (M/F)	Monocyte fraction (%) ^a	Monocyte counts (x10 ⁹ /L)	Diagnosis	Micro organism (blood culture)	No. of organ failure	Release from ICU	Alive after 1 year
UEM	Day 0	63	M	1,5	0,36	Severe sepsis,	Staphylococcus aureus	2	Day 8	yes
	Day 4			6,1	0,76	Infectious myositis of lower limb	Staphylococcus aureus			
EUI	Day 0	65	M	2	0,58	Severe sepsis, secondary peritonitis after anastomotic small intestine fistula, catheter-related infection	Staphylococcus aureus	0	Day 3	yes
	Day 2			10,2	0,48		none			
ITB	Day 0	70	M	7,7	1,47	Septic shock, lung infection, leg cellulitis, diabetes	Streptococcus aerogenes	3	Day 3	yes
	Day 2			6,2	0,56		none			

Table 2. Biological and clinical characteristics of septic patients.

^a, numbers express the percentage in PBMC

Marker	Clone	Isotype	Clone of isotype control	Label	Marker Supplier	Isotype Supplier	Test Tube used
CD3	UCTH1	IgG1	MOPC-21	PE	Biolegend	Biolegend	1,2 & 3
CD19	HIB19						
NKp46	9E2						
CD14	RMO52	IgG2a	MOPC-173	FITC	Beckman & Coulter	Biolegend	1,2 & 3
CD16	3G8	IgG1	MOPC-21	PerCP-Cy5.5	BD	BD	1,2 & 3
CD64	10.1	IgG1	MOPC-21	APC-H7	BD	BD	1
CD32	2E1	IgG2a	L11511	Krome Orange / Pacific Orange	Beckman & Coulter	Invitrogen	1
CD192/CCR2	TG5/CCR2	IgG2b	MPC-11	Alexa Fluor647	Biolegend	Biolegend	1
CD195/CCR5	HEK/1/85a	Rat IgG2a	RTK2758	Pacific Blue	Biolegend	Biolegend	1
CX3CR1	2A9-1	Rat IgG2b	RTK4530	PE-Cy7	Biolegend	Biolegend	1
CD80	L307.4	IgG1	MOPC-21	APC-H7	BD	BD	2
CD86	2331/FUN-1	IgG1	MOPC-21	PE-Cy7	BD	BD	2
HLA-DR	L243/G46-6	IgG2a	G155-178	V500	BD	BD	2
CD163	RM3/1	IgG1	MOPC-21	Alexa Fluor647	Biolegend	Biolegend	2
CD7	M-T701	IgG1	X40	V450	BD	BD	2
CD62L	Dreg-56	IgG1	679.1MC7	APC-Alexa Fluor750	Invitrogen	Beckman & Coulter	3
CD162	FLEG	IgG2a	eBM2a	APC	eBioscience	eBioscience	3
CD43	DF-T1	IgG1	IS5-21F5	VioGreen	Miltenyi	Miltenyi	3
CD49d	9F10	IgG1	MOPC-21	PE-Cy7	Biolegend	Biolegend	3
CD56	MEM-188	IgG2a	MOPC-173	Pacific Blue	Biolegend	Biolegend	3

Table 3. Antibodies used. Monoclonal antibodies were from mouse unless specified.

Donors	OP profiles	Global monocyte phenotypes
1 - 2 - 11 12 - 21	01 10 20 / 22 30 40 / 42 50	I
3 - 13 - 14 - 18 - 19 - 20	04 / 05 11 / 12 20 32 41 51	II
4 - 6 - 10 - 16 - 17 - 22 - 23 - 25	01 / 02 10 / 11 21 31 / 33 43 / 44 51	III
5 - 8	03 12	IV
7 - 9 - 15 - 24 - 26 - 27 - 28		Non clusterized

Table 4. Clusters of donors defined according to phenotypic profiles identified in monocyte subpopulations.

viSNE Profile	Donors	Phenotype in sm14⁺16⁺
a	2 – 4 – 8 – 14 – 15 – 16 – 19 – 21 - 25	CD43 ⁺ CD49d ⁺ CD62L ^{hi} CD43 ^{dim/neg} CD49d ^{hi} CD62L ^{dim} CD43 ^{neg} CD49d ^{dim} CD62L ^{hi}
b	1 – 3 – 6 – 12 - 13	CD43 ^{dim/neg} CD49d ^{hi} CD62L ^{dim} CD43 ^{neg} CD49d ^{dim} CD62L ^{hi}
c	7 – 9 – 22 - 23	CD43 ⁺ CD49d ⁺ CD62L ^{hi} in-between population CD43 ^{dim/neg} CD49d ^{hi} CD62L ^{dim}
d	17 – 18 – 20 - 24	CD43 ⁺ CD49d ⁺ CD62L ^{hi} CD43 ^{dim/neg} CD49d ^{hi} CD62L ^{dim}

Table 5. Identification of four monocyte phenotypic profiles by viSNE analysis.

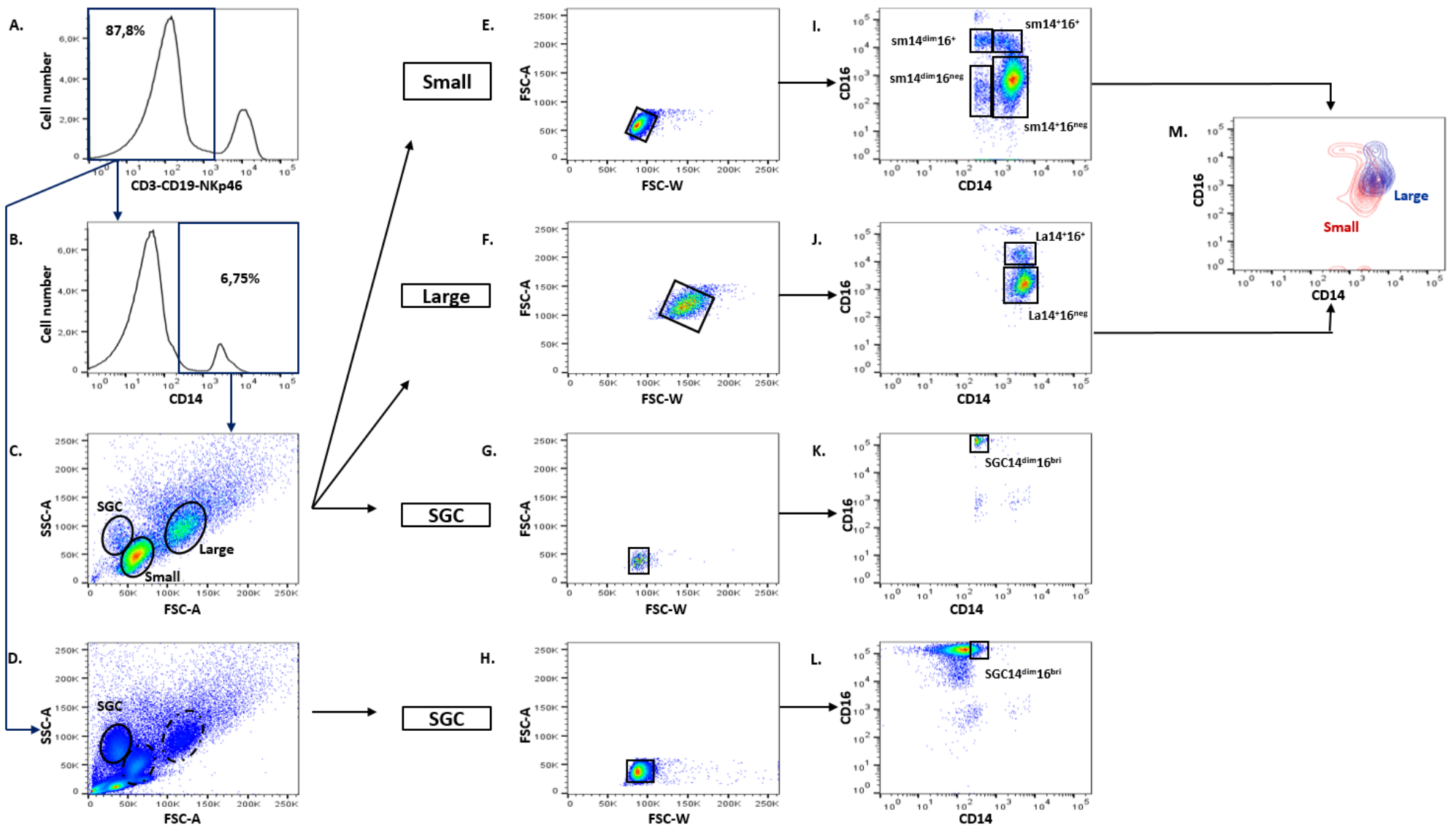


Figure 1. Gating strategy and identification of monocyte subpopulations.

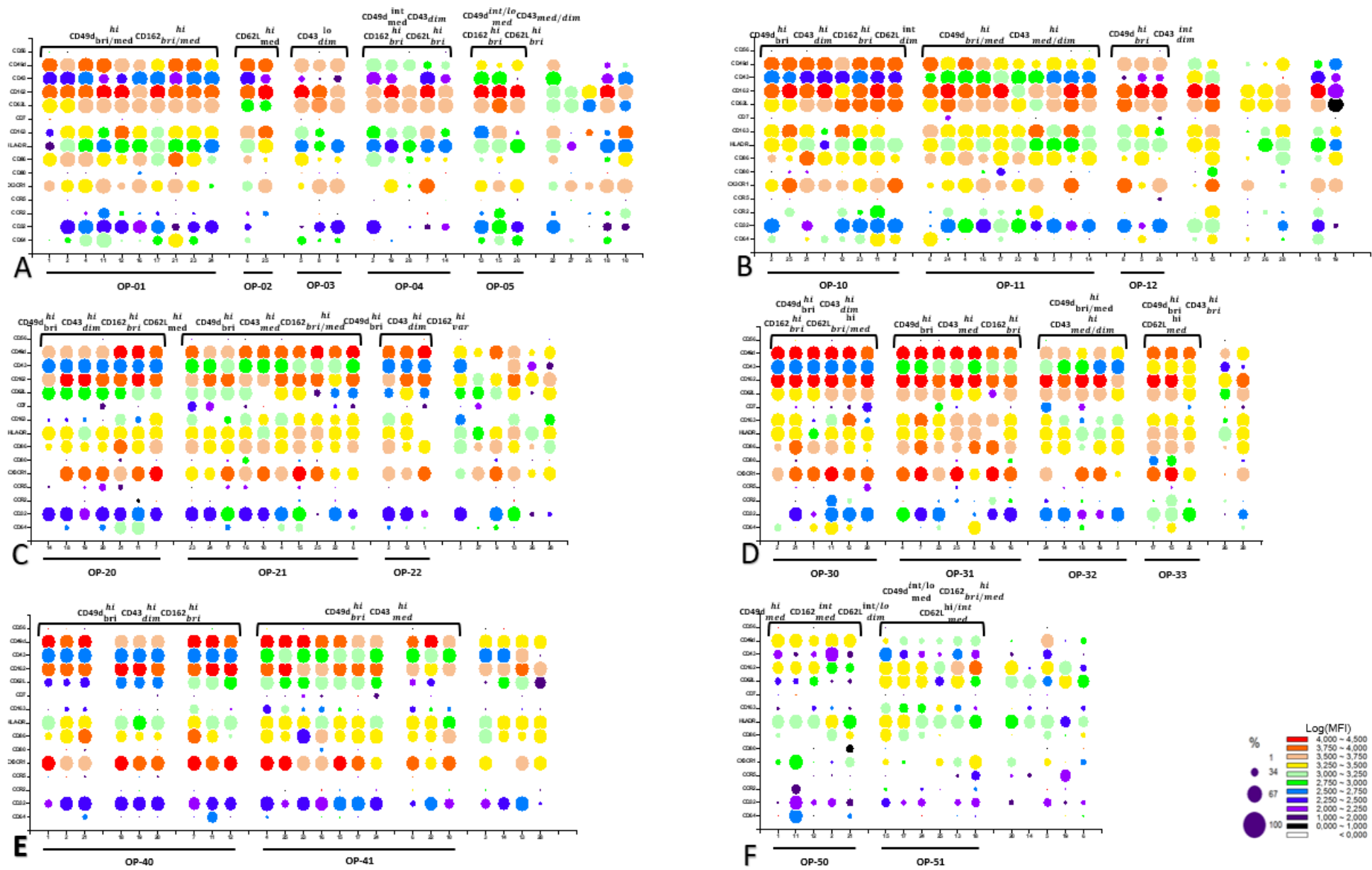


Figure 2. Phenotypes of subpopulations of monocytes as analyzed with our typing platform.

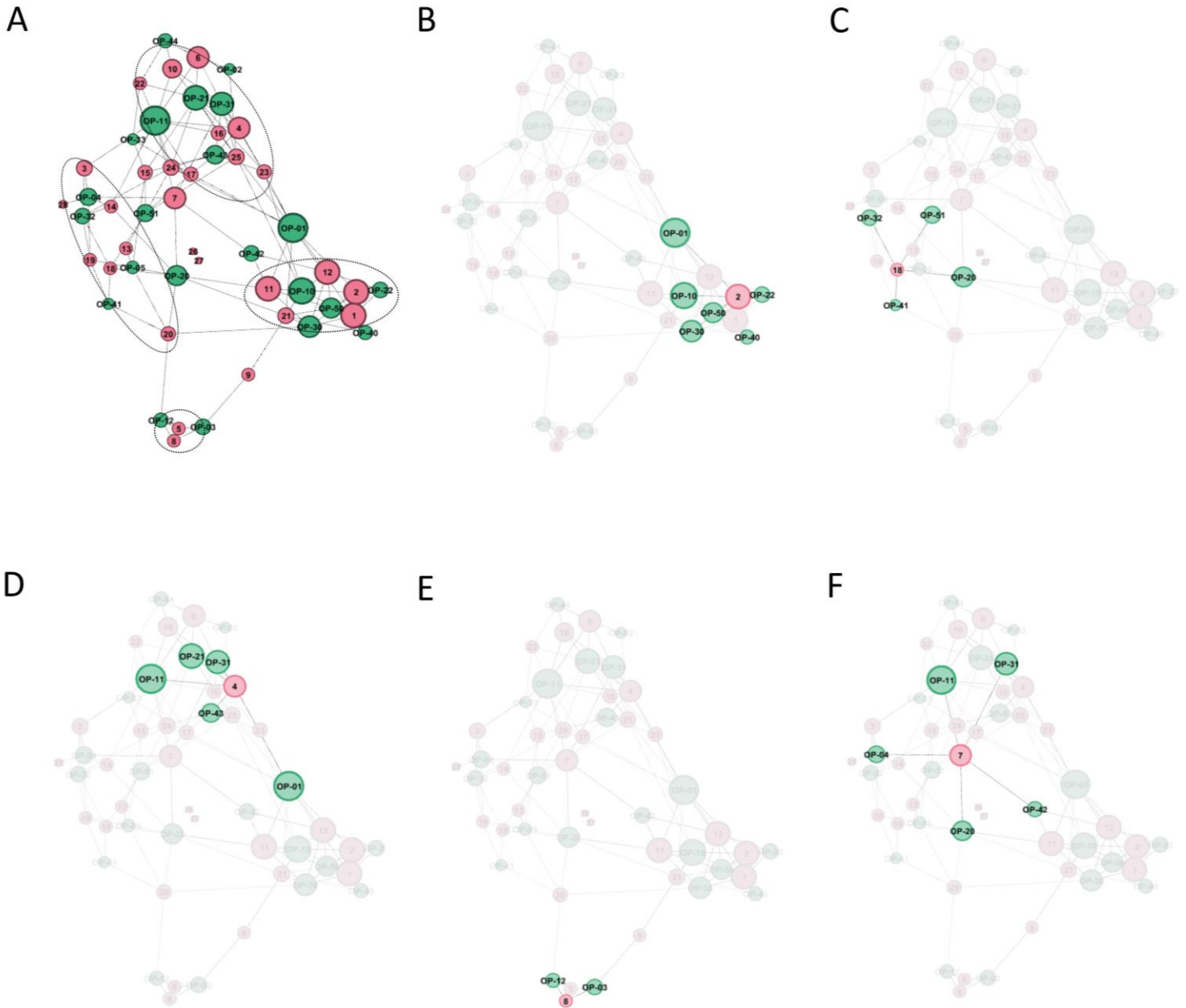


Figure 3. Connectivity map between donors and defined phenotypic profiles.

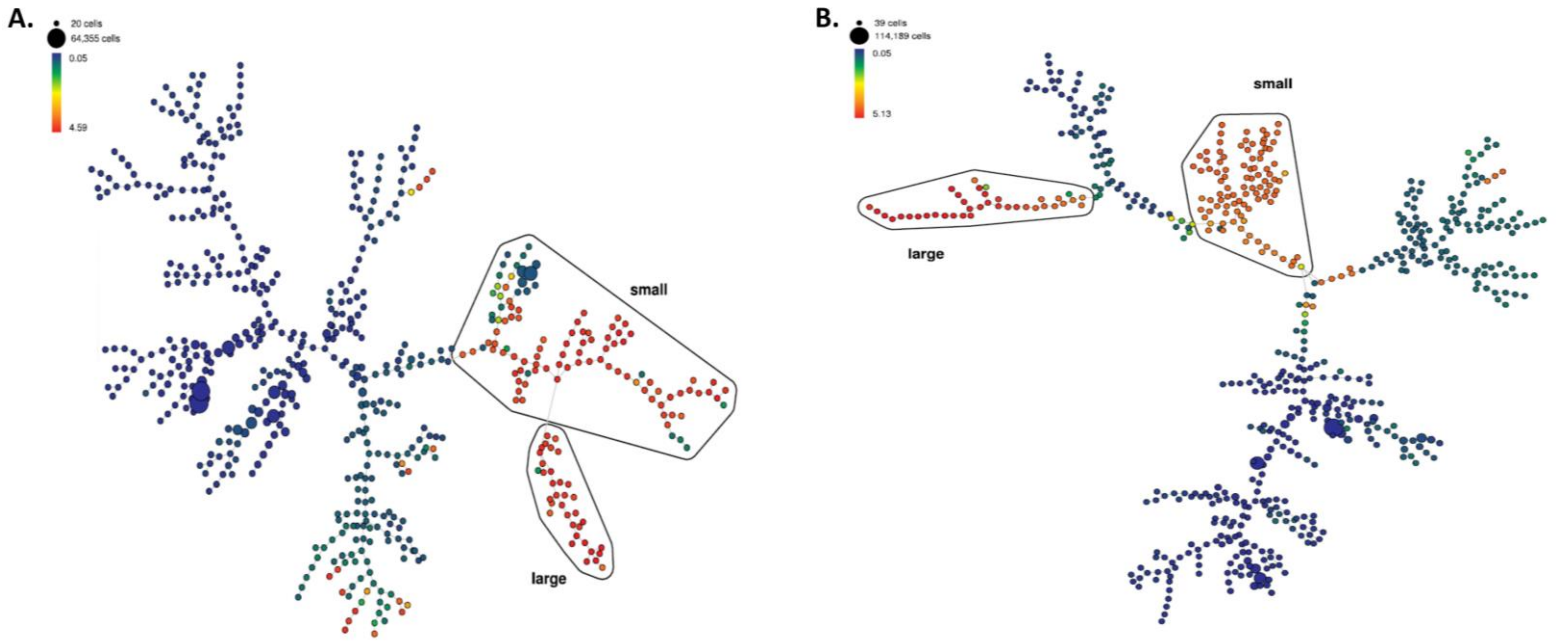


Figure 4. Identification of small and large monocytes using unsupervised analysis tool SPADE.

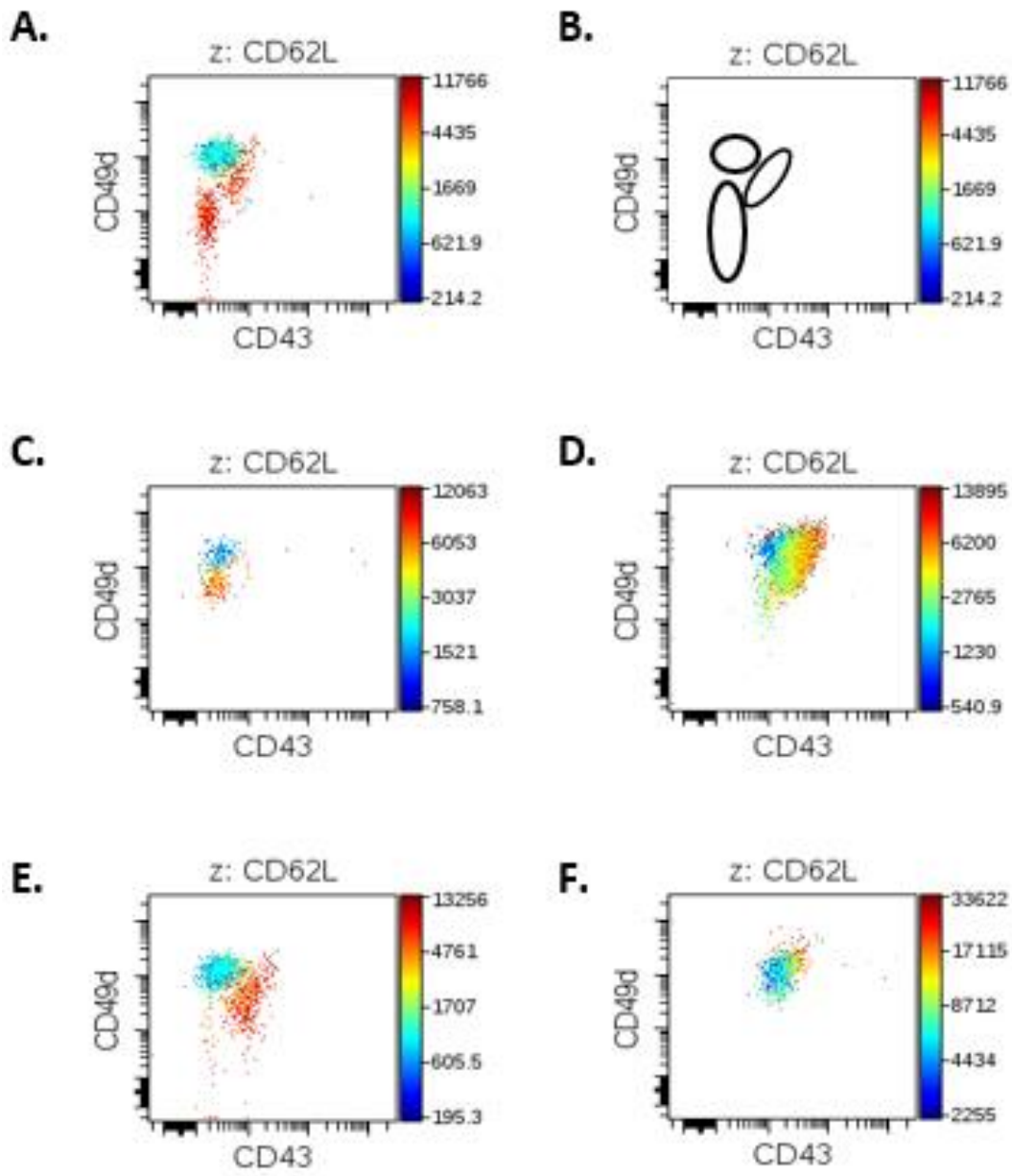


Figure 5. viSNE profile of sm14⁺16⁺ monocytes.

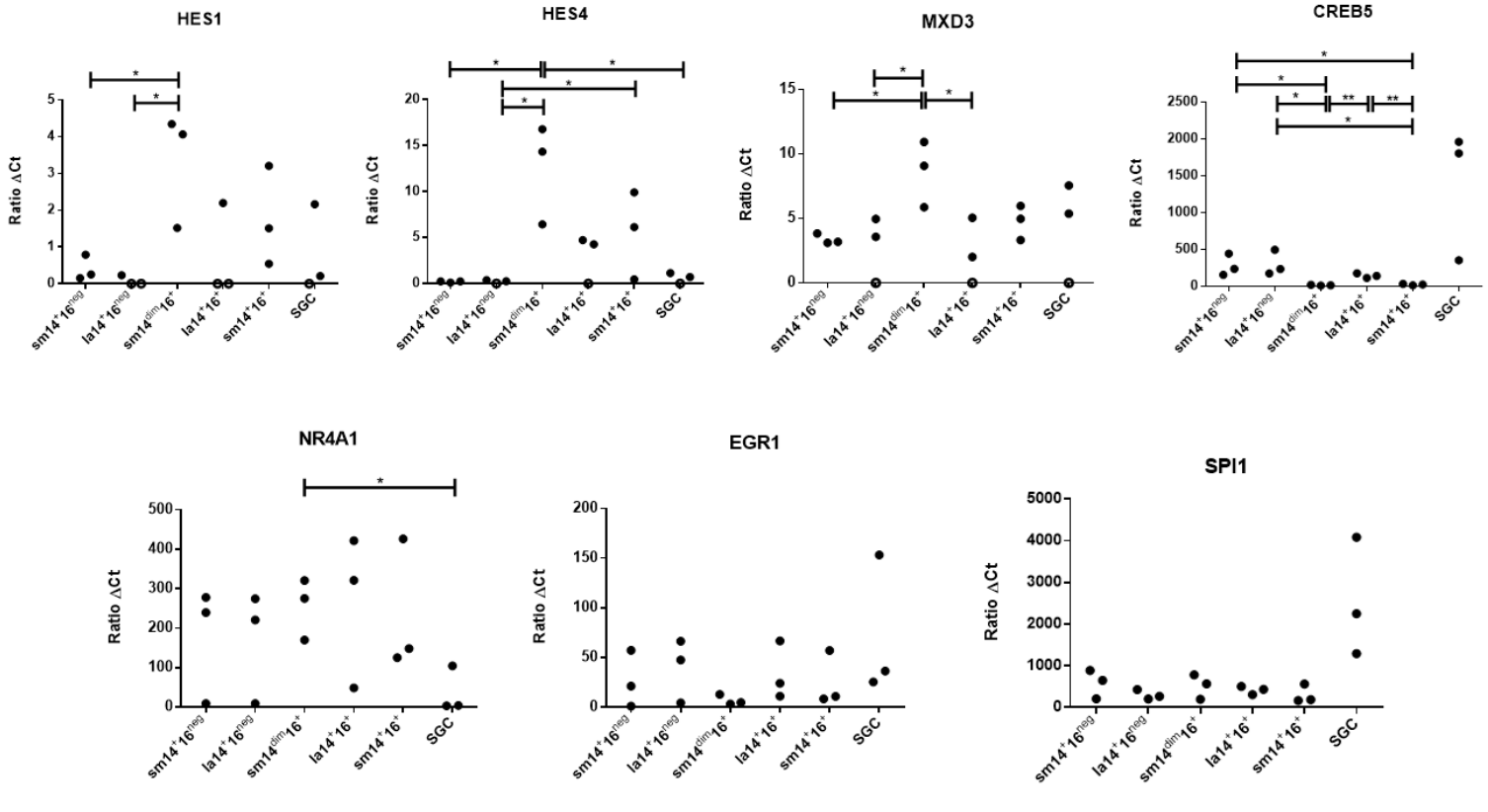


Figure 6. Differential expression of selected transcription factors in monocyte subpopulations.

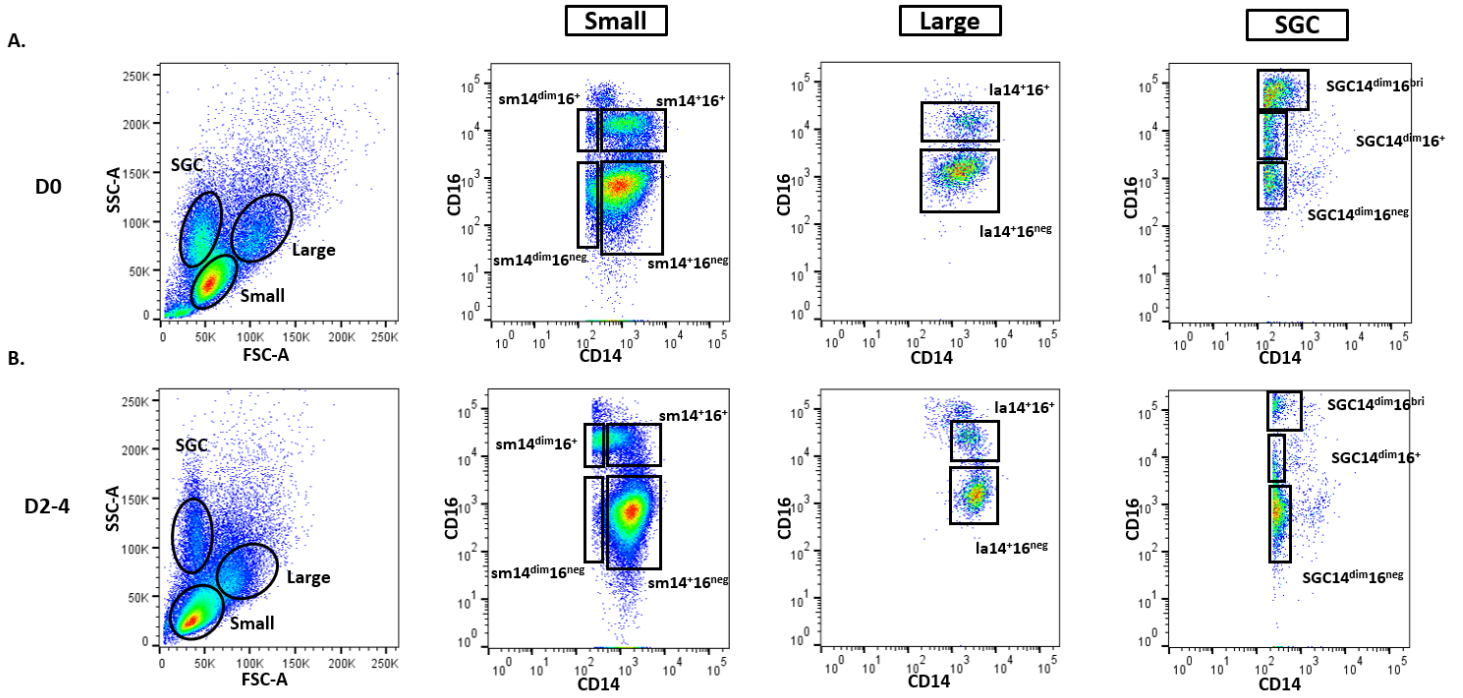


Figure 7. Gating strategy and identification of monocyte subpopulations in septic patients.

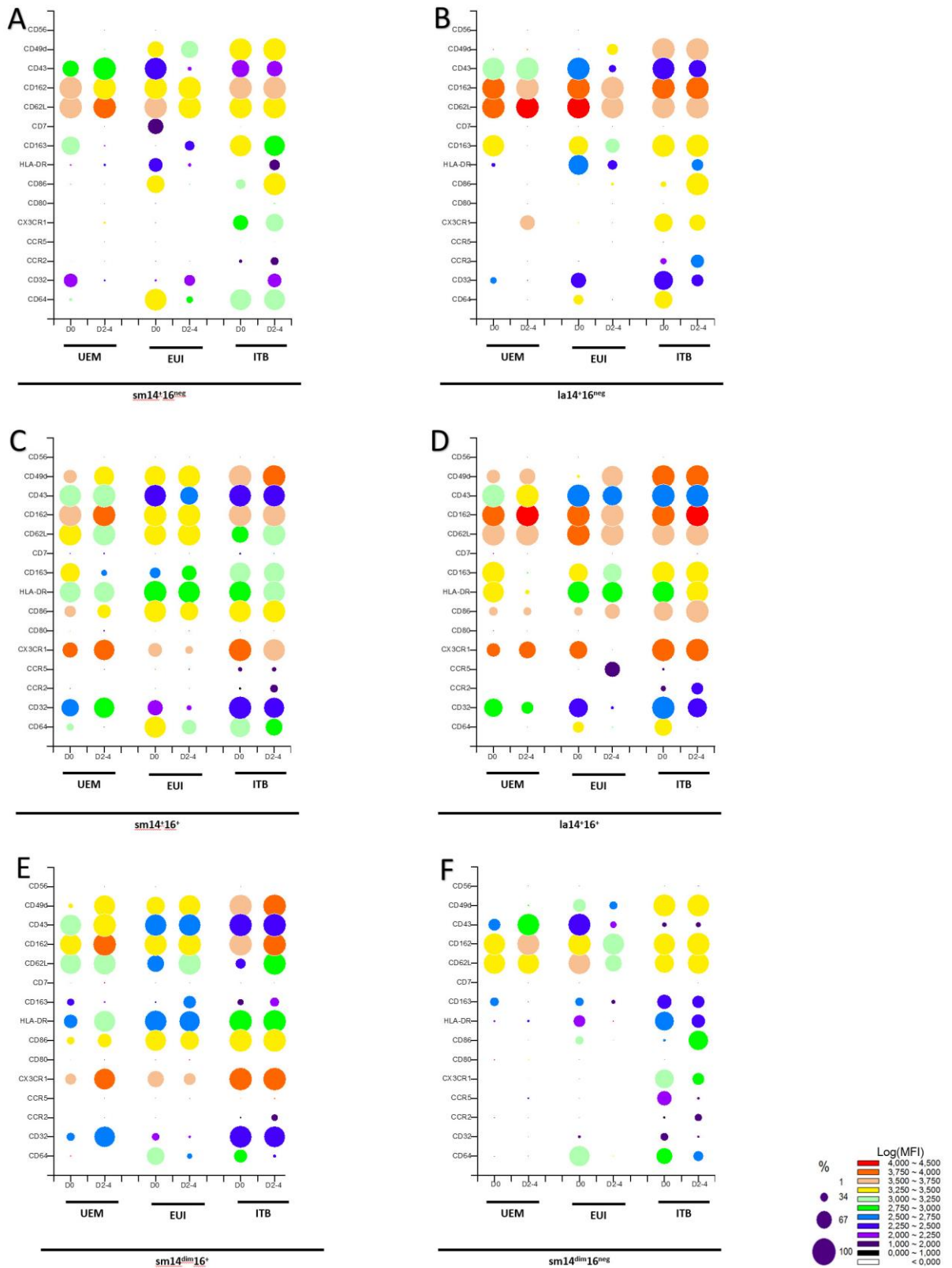


Figure 8. Phenotypes of subpopulations of monocytes in septic patients as analyzed with our typing platform.

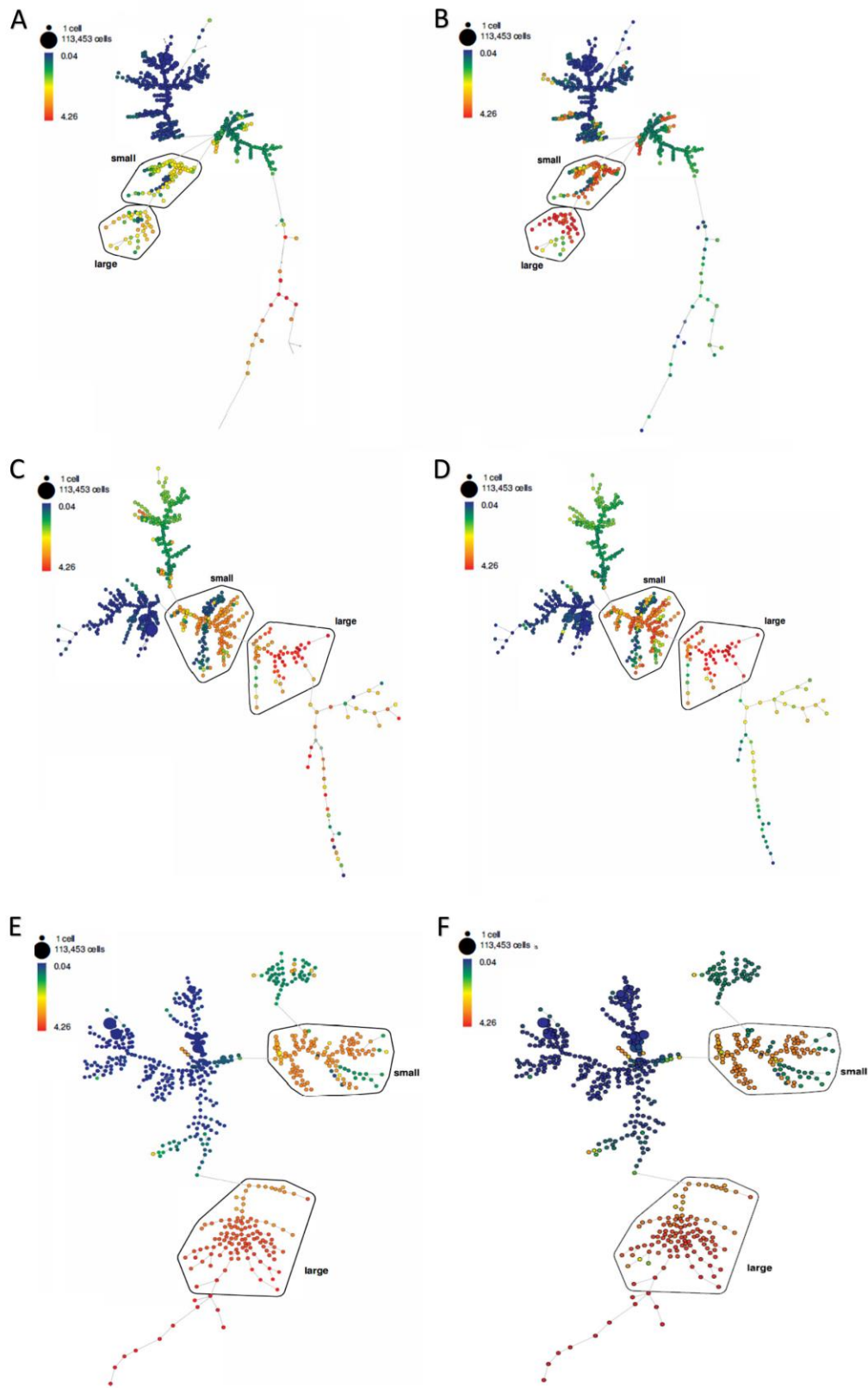


Figure 9. Identification of SPADE monocyte tree profiles in septic patient.

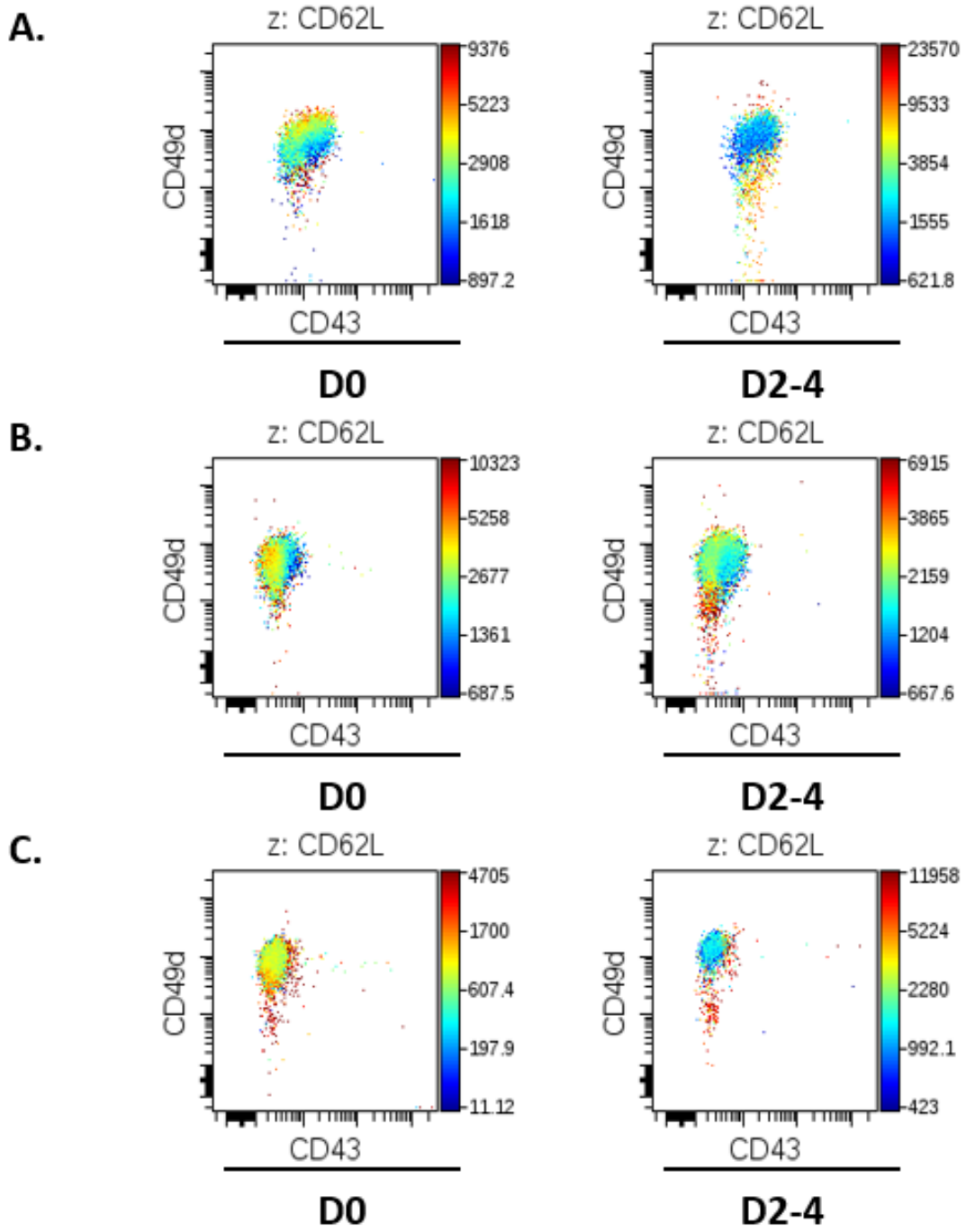
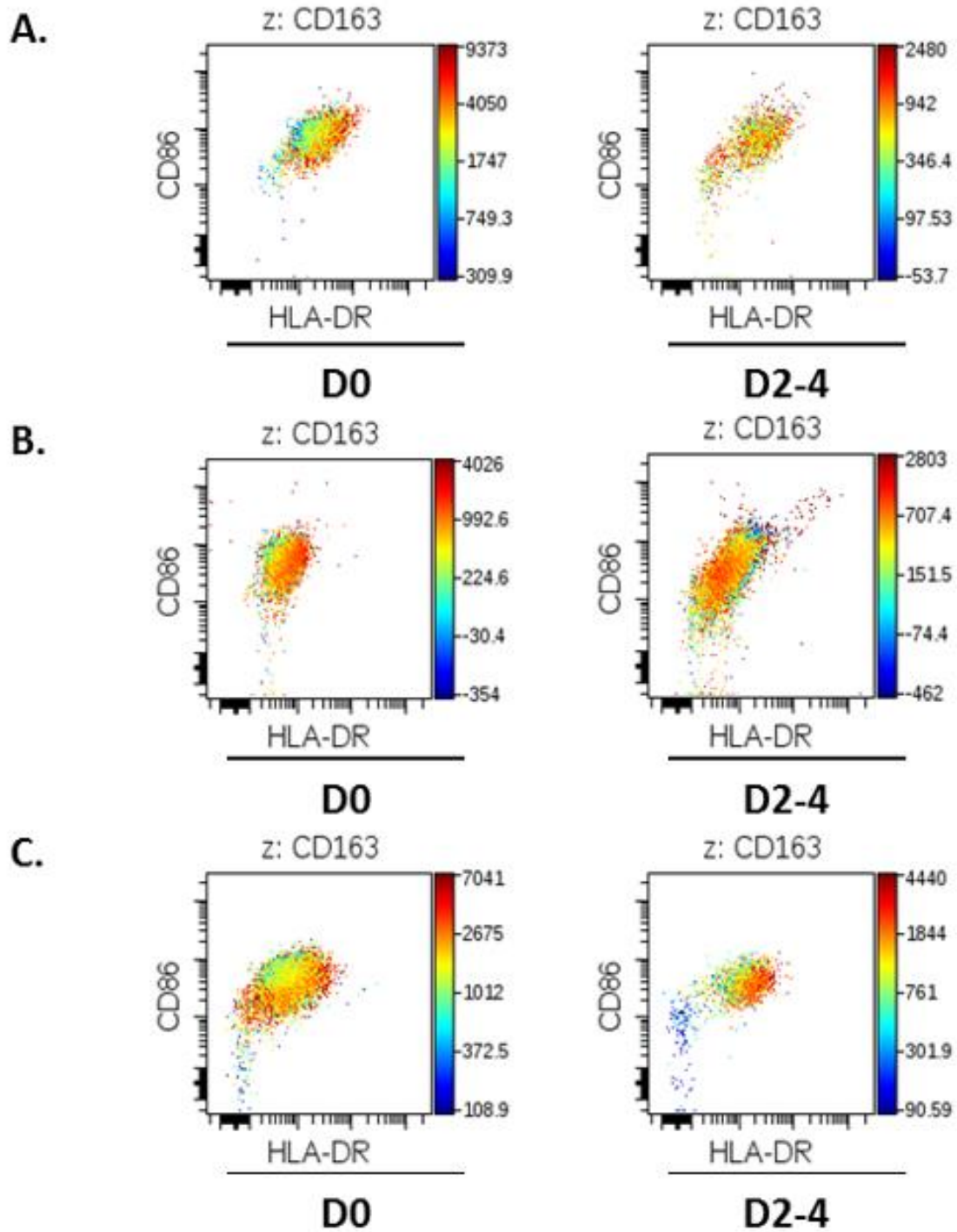


Figure 10. viSNE profile of monocytes sm14+16+ in septic patients.



Supplementary Figure 1. viSNE profiles via representation of HLA-DR, CD86 and CD163 expression in sm14⁺16⁺ monocytes from septic patients.

Article 2

L'analyse extensive des monocytes circulants humains a permis l'identification de nouvelles populations de monocytes : les « small monocytes » constitués des trois sous-populations $sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^+$ et $sm14^{dim}16^+$, et les « large monocytes » composés des deux sous-populations $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^+$ (Merah-Mourah et al., soumis).

Afin de déterminer les fonctions de ces sous-populations, les monocytes de trois donneurs sains ont été marqués avec l'ensemble des anticorps utilisés dans l'article précédent et les cinq sous-populations de monocytes ont été purifiées à l'aide d'un trieur cellulaire, différenciées en cellules dendritiques (MoDC) puis mises en co-culture avec des lymphocytes T allogéniques. L'analyse de la polarisation de ces lymphocytes T a été faite par l'étude des cytokines produites lors de la co-culture (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17 et TGF- β). Malgré une grande hétérogénéité des réponses au sein des différents donneurs, la recherche de corrélation entre les concentrations de cytokines induites et le niveau d'expression des molécules de surfaces des monocytes ont permis d'établir un lien fort entre l'IL-4 induite et l'expression de CD43 et de CD49d au sein des monocytes $sm14^+16^+$. Cette corrélation suggère que des monocytes au phénotype particulier se différencient en MoDC aux propriétés distinctes des autres MoDC et engagent la polarisation des lymphocytes T dans une voie déterminée dès le stade circulant. Cette corrélation a ensuite été validée par plusieurs cycles de purifications séquentielles de populations enrichies en potentiel de polarisation des lymphocytes T vers la voie Th2, en progressant par une recherche itérative de corrélations entre sous-populations au sein des $sm14^+16^+$ et la réponse cytokinique induite. Cette étude a permis l'identification d'une population $CD49d^{dim/neg} CD43^{dim}$ possédant tout le potentiel de polarisation des lymphocytes T vers la voie Th2 au sein des monocytes $sm14^+16^+$ et n'induisant par d'autre polarisation, et montre l'existence de monocytes aux fonctions immunitaires dédiées dès le stade circulant.

Les résultats présentés font parties d'un article prêt à être soumis pour publication.

Article 2: Identification of specific Th2-prone monocyte subpopulation in humans.

S.O. Cohen¹ and F. Merah-Mourah¹ (equal contribution), D. Charron², N. Mooney¹, and A. Haziot¹

¹, INSERM U1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

², INSERM U976, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Abstract

Blood monocytes are heterogeneous cells that play essential roles in inflammation and immunity as precursors of some populations of macrophages and dendritic cells. The functions of monocyte derived cells are thought to be dependent on environmental cues present in the tissues that the cells infiltrate, and ranges from pro-inflammatory to regenerative phenotypes. We report here the identification and purification of a human blood monocyte population dedicated to Th2 responses following its *in vitro* differentiation in dendritic cells. These monocytes were part of the recently identified small CD14⁺ CD16⁺ monocyte subpopulation and were characterized with a CD43^{dim} CD49d^{dim/neg} phenotype. Identification of this Th2-prone monocyte population was made possible by taking advantage of the inter-individual variations in both monocyte subpopulations and functional cell responses in unrelated human individuals. An iterative process of correlation searches between quantified monocyte marker expression and capacity of monocyte-derived dendritic cells to polarize allogenic T cells led to a retrospective identification of monocytes specifically involved in the functional response. This procedure of prospective and quantitative retrospective identification of functional cell populations has broad potential applications and has allowed us to reveal the existence of a small unique monocyte population dedicated to Th2 responses.

Introduction

Monocytes are circulating myeloid cells making up to 3% of leukocytes and are mostly considered as precursors for macrophages and dendritic cells in inflammatory and non-inflammatory conditions. As such, monocytes are considered as plastic cells that, upon extravasation, differentiate in effector cells depending on the milieu of the tissue that they infiltrate. However, monocytes are highly heterogeneous and the significance of this heterogeneity is largely unknown. Human monocytes have been phenotypically divided on the basis of CD14 and CD16 expression and three subsets have been defined, with CD14⁺ CD16^{neg} classical, CD14⁺ CD16⁺ intermediate, and CD14^{dim} CD16⁺ non-classical monocytes. Recently, we have extended this classification to six subpopulations according to light scattering and markers expression with small monocytes sm14⁺16^{neg} and large monocytes la14⁺16^{neg} within classical monocytes, sm14⁺16⁺ and la14⁺16⁺ within intermediate ones, sm14^{dim}16^{neg} as a new population variably present in healthy donors, and sm14^{dim}16⁺ corresponding to non-classical monocytes (Merah-Mourah et al., submitted). Importantly, these populations remain very heterogeneous. Assigning unambiguous functions to human subsets of monocytes has been challenging and most of the knowledge on monocyte functions is derived from the mouse, where however corresponding homologous subpopulations are not obvious. An additional level of complexity comes from inter-individual variations in human monocyte phenotypes, which we recently analyzed with the definition of six phenotypic groups variably related in a panel of 28 Caucasian donors (Merah-Mourah et al., submitted). The effects of these variations on monocyte functions remain to be determined. Here, we have analyzed the ability of the five commonly found subsets of monocytes to polarize T cells in vitro. Taking advantage of inter-individual variations of monocyte populations in healthy donors, we identified within sm14⁺16⁺ monocytes a population which was, after differentiation in DC, specifically dedicated to Th2 polarization of T cells.

Materials and Methods

Blood donors

Blood samples were obtained from the local blood bank (Etablissement Français du Sang at Saint-Louis Hospital, Paris, France) (Table I). Donors were informed that blood would be used for research purposes. All experiments were performed according to institutional ethical guidelines.

Cell separation, staining, and analysis

Cells were isolated, stained and analyzed as previously described (Merah-Mourah et al., submitted). Briefly, blood was collected in four ACD (*Becton Dickinson (BD), Le Pont de Claix, France*) and PBMC were separated by gradient density centrifugation. PBMC were washed and non-specific binding sites were blocked by incubation in PBS supplemented with 10% decomplemented human AB Serum (*Etablissement Français du Sang, Rungis, France*).

Cells were stained with monoclonal antibodies (Table II) and suspended in PBS-EDTA 0.5 mM before analysis.

Cell fluorescence was analyzed on a FACS Canto II flow cytometer (*BD, Rungis, France*) with acquisition of 1×10^6 events allowing a comprehensive analysis of monocytes (Merah-Mourah et al., submitted). Data were analyzed using Diva (BD) and Flow Jo (*Treestar, Ashland, OR*).

Cell sorting

Monocyte subpopulations were purified on a FACS Aria III (*BD*) cells sorter. Gating was set after acquisition of 1×10^6 events, lineage^{neg} (CD19-CD3-NKp46) were excluded, and CD14⁺ cells were selected. Gates identifying small and large monocytes were set according to light scatter properties (Merah-Mourah et al., submitted) and CD14/CD16 dot plot profiles were used to identify the various monocyte populations. Cells from selected populations were purified according to standard procedures as recommended by the manufacturer.

Differentiation of MoDC and mixed leukocyte cultures (MLR)

Purified monocytes or fractions thereof were differentiated in dendritic cells (MoDC) in the presence of GM-CSF and IL-4 (both from R&D) as previously described. Immature MoDC were matured in the presence of LPS (10 ng/ml) as described. Mature MoDC and allogenic T cells were co-cultured at a ratio of 1 MoDC for 10 T cells as described.

Cytokine assays

Cytokine concentrations in culture supernatants were determined by ELISA using commercial kits for IL-4 (*BD*), IFN- γ , IL-10, IL-17 and TGF- β 1 (all from *R&D, Abingdon, UK*).

Results

We have recently identified novel human monocyte subsets by flow cytometry based on light scattering properties and CD14 and CD16 expression (Merah-Mourah et al., submitted). A total of six monocyte subpopulations were thus identified out of which five were consistently found in 28 control donors. In order to identify T cell activation functions associated with these human monocyte subpopulations, we analyzed the ability of the five commonly found monocyte subsets to polarize allogenic T cells in co-cultures. Monocyte subpopulations from three control donors (donors 1, 2, and 3) were phenotyped (15 markers in addition to CD14 and CD16, supplementary Table I), purified by flow cytometry cell sorting, differentiated in dendritic cells (MoDC), and LPS matured MoDC were co-cultured for five days with allogenic T cells. Culture supernatants were analyzed for the presence of IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10, and TGF- β (normalized for 10,000 T cells), and T cell expression of FoxP3 and CD25 was determined by flow cytometry. Results showed that matured MoDC generated from each monocyte subpopulation induced all types of polarized T cells (Th1, Th2, Th17, Tr1, and Treg) (data not shown). However, results from individual donors varied quantitatively with respect to the intensity of the different types of induced polarization. Although this was somehow expected with random donors, we reasoned that individual variations in the phenotype of monocytes might condition the functions of the MoDC and their ability to activate T cells. To test this proposition, we checked if levels of cytokine produced would retrospectively correlate with the expression of monocyte markers. This generated 750 plots (5 cytokines analyzed, 15 markers evaluated for intensity of expression (MFI) and percent of positive cells, 5 subpopulations of monocytes), out of which over 95 % showed no correlation at all. However, in a few cases, a linear relationship between the level of expression of a monocyte marker and the concentration of induced T cell cytokine was found. As shown in Figure 1A, the concentration of IL-4 in co-cultures of MoDC generated from sm14⁺16⁺ monocytes strictly correlated ($R^2=0.999$) with the percentage of monocyte positive for the expression of CD43 present in donors. In contrast, the expression of CD43 in these same monocytes showed no relation to the concentrations of other cytokines assayed (Figure 1B). This suggested that, although the number of CD43⁺ sm14⁺16⁺ monocytes were close in the 3 donors, it was indicative of the existence of a CD43⁺ population able to polarize T cells towards a Th2 differentiated state, and that this population was present in variable amounts in different donors. In these same samples, the

expression of CD49d (Figure 2) also showed a relation to the induction of IL-4 production ($R^2=0.819$), suggesting that CD49d expression may be informative in the identification of monocytes inducing Th2 polarization. We therefore used these two markers to identify the Th2-prone monocyte population within the sm14⁺16⁺ phenotype. As seen in Figure 3, the CD43/CD49d dot plots profiles differed substantially in the three donors. It consisted mostly of a cell dense double positive cloud of similar expression in the three donors. Two additional CD49d^{dim} to CD49d^{neg} cells populations were present in variable amounts in the donors and had CD43^{dim} or CD43⁺ expressions. To identify the relevant population, we used a new set of three control donors (donors 4, 5, and 6) and the CD43 CD49d dot plot profiles of sm14⁺16⁺ monocytes of these donors is showed in Figure 4. We purified three pools of monocytes from these cells: the major double positive CD43⁺ CD49d⁺ monocytes (within the gates shown in Figure 4); the remainder “out-of-the-gate” fraction; the total population of sm14⁺16⁺ monocytes, as control. Purified cells were differentiated in MoDC, and LPS matured MoDC were co-cultured with allogeneic T cells. As shown in Figure 5, cultures set with gated cells produced low or no amounts of IL-4. In contrast, in cultures with MoDC from “out-of-gate” cell fraction the highest concentration of IL-4 was consistently detected, as well as the lowest IFN- γ concentration. This result indicated that the putative Th2-prone monocyte population was not present in the dense cloud of CD43⁺ CD49d⁺ cells, and it led us to look for IL-4 inducing activity in the two other minor cell clouds. In order to better locate this activity prior to cell sorting, we looked for correlations between the numbers of cells present in newly defined gates within the minor cell clouds present in donors 4, 5, and 6 and the concentrations of IL-4 detected in the cultures and normalized for 10,000 T cells. As shown in Figure 6, two gates were initially drawn, gate a (in violet) that included the CD49d^{dim} CD43⁺ sm14⁺16⁺ monocytes, and gate b (in black) that included the CD49d^{dim} and CD49d^{neg} that were CD43^{dim} (Figure 6A). A strong correlation ($R^2 = 0.848$) was found between cell numbers present in gate b and the normalized concentrations of IL-4, while no relation at all with cells present in gate a was apparent. To further locate the active cells, cells present in gate b were divided in gate c and d, including CD49d^{dim} and CD49d^{dim/neg} sm14⁺16⁺ monocytes, respectively (Figure 6A), and correlations between cell numbers in the gate and normalized IL-4 concentrations were searched. As shown in Figure 6C, cell numbers in gate d were in linear relationship with induced IL-4 ($R^2 = 0.987$), whereas no such relation was found with cell numbers in gate c ($R^2 = 0.582$). These results strongly suggested that sm14⁺16⁺ Th2-prone monocytes were CD49d^{dim/neg} CD43^{dim}. To positively

identify these Th2-prone cells, CD49d^{dim/neg} CD43^{dim} sm14⁺16⁺ monocytes were purified from a third set of three control donors (donors 7, 8, and 9) together with “out-of-gate” fraction, and total sm14⁺16⁺ monocytes (Figure 7A). Derived mature MoDC were co-cultured with allogeneic T cells and cell culture supernatants were assayed for cytokines. As seen in Figure 7B, strong concentrations of IL-4 were induced by mature MoDC derived from CD49d^{dim/neg} CD43^{dim} sm14⁺16⁺ monocytes. In donors 7 and 8, no IL-4 was detectable in cultures derived from “out-of-gate” fractions, indicating that all Th2 committed monocytes present in the sm14⁺16⁺ population were CD49d^{dim/neg} CD43^{dim}. Conversely, no IFN- γ (figure 7B), IL-17, IL10, and TGF- β (not shown) was detectable in cultures derived from CD49d^{dim/neg} CD43^{dim} sm14⁺16⁺ monocytes, suggesting that this monocyte population was strictly inducing Th2 polarization. In donor 9, cultures derived from CD49d^{dim/neg} CD43^{dim} sm14⁺16⁺ monocytes showed the greater part of IL-4 with a 3-fold increase over “out-of-gate” derived cultures, in parallel with a minor production of IFN- γ . Results with this donor are consistent with a slight cell contamination in the gate of interest.

Together, these results showed that a Th2-prone monocyte population was present in the blood of healthy donors and it was part of the CD14⁺ CD16⁺ cells small monocytes that had a CD49d^{dim/neg} CD43^{dim} phenotype. Importantly, these results demonstrate that functional cell populations can be identified in complex cell mixtures using a combination of prospective identification (PI) through extensive phenotyping and of retrospective quantitative identification (RQI) based on inter-individual variations in cell numbers and phenotypes. Iterative use of this method allows to guide the search for functional cells thus avoiding extensive exploratory cell sorting strategies.

Discussion

We report here the identification of human blood monocytes specifically committed to Th2 polarization of T cells once they are differentiated in MoDC according to standard protocols. Their presence in healthy donors points to naturally occurring cell populations which may be involved in homeostatic and regulatory functions. These cells were part of sm14⁺16⁺ monocytes (Merah-Mourah et al., submitted) which form the major part of intermediate monocytes according to current nomenclature. The functions of monocytes are considered as non-specific and the functional particularities of monocyte subsets reside in the intensity of the inflammatory responses, such as levels of cytokine secretion or phagocytic ability. One monocyte subset, non-classical CD14^{dim} CD16⁺ is believed to patrol the vasculature, a function of tissue surveillance akin to that of other myeloid cells involved in inflammatory non-specific responses. Following extravasation, monocytes are precursors of dendritic cells and macrophages in several tissues in inflammatory or non-inflammatory conditions. The functional phenotype adopted by monocyte derived cells is considered to be dependent on signals from the environment of the cells. The Th2 committed functions of sm14⁺16⁺ CD43^{dim} CD49d^{dim} monocytes described here is to our knowledge the first description of a monocyte population with dedicated function towards one type of adaptive responses. Noticeably, all the Th2 potential of sm14⁺16⁺ monocytes was present in this population. sm14⁺16⁺ CD43^{dim} CD49d^{dim} monocytes fulfilled all current criteria to be considered as monocytes. These results suggest the presence within monocyte populations of cells already engaged in gene expression programs directed towards development of one specific type of immune response, together with cells able to adapt and develop according to the environment.

Although much progress has recently been made in defining the conditions for the development of type 2 immunity, many mechanisms leading to specific Th2 responses remain unclear. Dendritic cells are required for the development of Th2 responses in many experimental models, as shown by depletion and reconstitution experiments. Specific mechanisms at the interface between dendritic cells and CD4⁺ T cells remain unsatisfactorily understood. Factors such as the strength of the interaction MHC-peptide-TCR has been considered to be a factor, together with DC production of IL-4 in the absence of IL-12, and DC expression of OX40L and CD40 expression. However, the

cytokine environment and key polarizing events at the interface between DC and CD4⁺ T cells remain to be fully defined. The availability of populations of MoDC specifically engaged in the Th2 polarization of CD4⁺ T cells *in vitro* will allow to analyze the molecular interactions at play in the development of these responses.

The method described here to identify monocytes committed to Th2 responses requires having several starting populations where the sought subpopulation is unevenly represented. In a first prospective step, the expression of as many markers relevant to the cell type is determined in the starting populations, before proceeding to process the cells for quantitative functional assays. Then, results of the assays are retrospectively correlated with the expression of the markers in the different starting populations. Correlations may be linear, as presented here, or any other type, depending on the proliferative properties of the sought subpopulation in steps to prepare and perform the functional assay. Thus, this method includes prospective (P) followed by quantitative retrospective (QR) steps to identify a functional population. This P/QR method requires however, that events occurring in cultures with the different starting populations, such as proliferation and apoptosis, remain comparable. The relation between function and marker expression was, as shown here, indicative of a link between the markers and the sought population but did not point directly to a monocyte subset. It provided, however, cues for seeking correlations in a smaller monocyte population. Guided iterative searches for correlations between phenotype and function turned out as a powerful mean to identify a small Th2 prone cell population within very heterogeneous monocyte populations. We used starting populations with naturally occurring unequal cell concentrations, as monocyte populations are highly variable among individuals (Merah-Mourah et al., submitted). However, several populations with heterogeneous cell composition could easily be generated from a single sample by combinatorial mixing of sorted subpopulations.

The identification of cells with a defined function within a heterogeneous population has been a recurring question in development studies and in stem cell biology. Methods of cell lineage tracing solely based on transplantation have been used in the past, with either transplantation of

bulk cell populations with chromosomal abnormalities, or single cell transplantation, followed by progeny analysis. Recently, powerful cell tracking methods, such as bar coding, tissue specific expression of reporter gene, combined to single cell sequencing, have been developed and have been instrumental in tracking progenitors and precursors in numerous models of development and differentiation . These recent methods require however cell modifications to introduce a unique marker and access to extensive genomics facilities for cell analysis. In addition, these technologies aim at the identification of single cell precursors, a task that is not needed in many fields of research such as analysis of the innate immune system.

Acknowledgements

We thank Dr. N. Setterblad, Dr. S. Duchez, and C. Doliger from the Imaging, Cell Selection and Genomics Core Facility at Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris Diderot - Paris 7 for excellent assistance in cell sorting experiments. This work was supported by institutional funding from INSERM, Paris, France, and has been published under the framework of the LABEX TRANSPLANTEX [ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTEX] and benefits from funding from the French government, managed by the French National Research Agency (ANR) as part of the Investments for the future program.

References

1. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38: 792–804
2. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol*. 2014;5: 1–22
3. Wong KL, Yeap WH, Tai JJY, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012;53: 41–5
4. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*. 2010;33: 375–386
5. Alonso MN, Wong MT, Zhang AL, Winer D, Suhoski MM, Tolentino LL, et al. Th1, Th2, and Th17 cells instruct monocytes to differentiate into specialized dendritic cell subsets. *Blood*. 2011;118:3311–3320
6. Kool M, Hammad H, Lambrecht B. Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity. *F1000 Biol Rep*. 2012;4: 6
7. van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, et al. In vivo depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med*. 2005;201: 981–991
8. Yamane H, Paul WE. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4⁺ T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev*. 2013;252: 12–23
9. Kuipers H, Heirman C, Hijdra D, Muskens F, Willart M, van Meirvenne S, et al. Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization. *J Leukoc Biol*. 2004;76: 1028–1038

10. Jenkins SJ, Perona-Wright G, Worsley AGF, Ishii N, MacDonald AS. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J Immunol.* 2007;179: 3515–23
11. Etzrodt M, Endele M, Schroeder T. Quantitative single-cell approaches to stem cell research. *Cell Stem Cell.* Elsevier Inc.; 2014;15: 546–558
12. Buchholz VR, Schumacher TNM, Busch DH. T Cell Fate at the Single-Cell Level. *Annu Rev Immunol.* 2016;34: 65–92
13. Perié L, Hodgkin PD, Naik SH, Schumacher TN, deBoer RJ, Duffy KR. Determining Lineage Pathways from Cellular Barcoding Experiments. *Cell Rep.* 2014;6: 617–624
14. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Human Monocytes Differentiate into Dendritic Cells Subsets that Induce Anergic and Regulatory T Cells in Sepsis. *PLoS One.* 2012;7

Figure legends

Figure 1. Correlations between CD43 expression in sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells.

PBMC from donors 1, 2, and 3 were isolated, stained with Mab (Table II), and monocyte subpopulations were analyzed as described (Merah-Mourah et al., submitted). Small monocytes CD14⁺ CD16⁺ were purified by flow cytometry cell sorting, differentiated in MoDC, and co-cultured with allogenic T cells. Cytokines present in culture supernatants were assayed by ELISA and concentrations were normalized for 1 x 10⁴ T cells. Correlations between normalized cytokine concentrations and expression of markers in monocytes (% of positive cells and MFI) were searched.

Figure 2. Correlations between CD49d expression in sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells.

PBMC from donors 1, 2, and 3 were isolated, stained with Mab (Table II), and monocyte subpopulations were analyzed as described (Merah-Mourah et al., submitted). Small monocytes CD14⁺ CD16⁺ were purified by flow cytometry cell sorting, differentiated in MoDC, and co-cultured with allogenic T cells. Cytokines present in culture supernatants were assayed by ELISA and concentrations were normalized for 1 x 10⁴ T cells. Correlations between normalized cytokine concentrations and expression of markers in monocytes (% of positive cells and MFI) were searched.

Figure 3. Profiles of expression of CD43 and CD49d in healthy donors 1, 2, and 3.

PBMC were isolated, stained with Mab (Table II), and monocyte subpopulations were analyzed as described (Merah-Mourah et al., submitted). Small monocytes CD14⁺ CD16⁺ were purified by flow cytometry cell sorting, and expression of CD43 and CD49d was analyzed with Flow Jo.

Figure 4. Profiles of expression of CD43 and CD49d in healthy donors 4, 5, and 6.

PBMC were isolated, stained with Mab (Table II), and monocyte subpopulations were analyzed as described (Merah-Mourah et al., submitted). Small monocytes CD14⁺ CD16⁺ were purified by flow cytometry cell sorting, and expression of CD43 and CD49d was analyzed with Flow Jo.

Figure 5. Cytokine production in allogeneic MLR between MoDC derived from different monocyte fractions and T cells.

PBMC from donors 4, 5, and 6 were isolated, stained with lineage antibodies (CD3, CD19, NKp46), CD14, CD16, CD43, and CD49d, and monocyte subpopulations were analyzed as described (Merah-Mourah et al., submitted). Fractions of small monocytes CD14⁺ CD16⁺ (gate shown in Figure 4, and out-of-gate cells) together with unfractionated small monocytes CD14⁺ CD16⁺ were purified by flow cytometry cell sorting, differentiated in MoDC, and co-cultured with allogeneic T cells. Cytokines present in culture supernatants were assayed by ELISA and concentrations were normalized for 1 x 10⁴ T cells.

Figure 6. Correlations between CD43 and CD49d expression in fractions of sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells.

(A) Small monocytes CD14⁺ CD16⁺ from donors 4, 5, and 6 analyzed in Figure 4 were probed for correlations with production of IL-4 in MLR. Gates a and b were drawn to select CD43^{hi} CD49d^{low} and CD43^{low} CD49d^{low/neg} cells, respectively. (B) IL-4 concentrations normalized for 1 x 10⁴ T cells were plotted against percentage of cells in gates a and b. (C) Gate b was divided in gates c and d to select CD43^{low} CD49d^{low} and CD43^{low} CD49d^{low/neg} cells, respectively. IL-4 concentrations normalized for 1 x 10⁴ T cells were plotted against percentage of cells in gates c and d.

Figure 7. Cytokine production in allogeneic MLR between MoDC derived from small CD14⁺ CD16⁺ CD43^{low} CD49d^{low/neg} monocytes and T cells.

PBMC from donors 7, 8, and 9 were isolated, stained with lineage antibodies (CD3, CD19, NKp46), CD14, CD16, CD43, and CD49d, and monocyte subpopulations were analyzed as described (Merah-Mourah et al., submitted). (A) CD43 and CD49d profiles of expression and gate used for selection of CD43^{low} CD49d^{low/neg} monocytes and purification by flow cytometry cell sorting. Out-of-gate cells together with unfractionated small monocytes CD14⁺ CD16⁺ were also purified. All monocyte fractions were differentiated in MoDC, and co-cultured with allogeneic T cells. Cytokines present in culture supernatants were assayed by ELISA and concentrations were normalized for 1×10^4 T cells. (B) Il-4 and IFN- γ normalized concentrations in culture supernatants from MoDC derived from small CD14⁺ CD16⁺ CD43^{low} CD49d^{low/neg} monocytes, out-of-gate small CD14⁺ CD16⁺ monocytes, and unfractionated small CD14⁺ CD16⁺ monocytes.

Donor ID	Sample date	Age (years)	Sex (M/F)	% Mono	Mono (x10⁹/L)
1	2013/02/14	52	F	10,1	0,5
2	2013/02/28	26	M	6,8	0,3
3	2013/04/25	65	M	3,7	0,1
4	2015/02/12	53	M	6,2	0,3
5	2015/02/16	61	F	5,7	0,3
6	2015/02/19	32	F	3,8	0,2
7	2015/11/23	34	F	5	0,2
8	2016/01/13	41	F	N/A	N/A
9	2016/03/10	62	F	15,2	1,1

Table I. Characteristics of blood donors.

Marker	Clone	Isotype	Clone	Label	Marker supplier	Isotype supplier
CD3	UCTH1	IgG1	MOPC-21	PE	Ozyme	Ozyme
CD19	HIB19					
NKp46	9E2					
CD14	RMO52	IgG2a	MOPC-173	FITC	Beckman & Coulter	Ozyme
CD16	3G8	IgG1	MOPC-21	PerCP-Cy5.5	BD	BD
CD64	10.1	IgG1	MOPC-21	APC-H7	BD	BD
CD32	2E1	IgG2a	L11511	Krome Orange / Pacific Orange	Beckman & Coulter	Invitrogen
CD192/CCR2	TG5/CCR2	IgG2b	MPC-11	Alexa Fluor647	Ozyme	Ozyme
CD195/CCR5	HEK/1/85a	Rat IgG2a	RTK2758	Pacific Blue	Ozyme	Ozyme
CX3CR1	2A9-1	Rat IgG2b	RTK4530	PE-Cy7	Ozyme	Ozyme
CD80	L307.4	IgG1	MOPC-21	APC-H7	BD	BD
CD86	2331/FUN-1	IgG1	MOPC-21	PE-Cy7	BD	BD
HLA-DR	L243/G46-6	IgG2a	G155-178	V500	BD	BD
CD163	RM3/1	IgG1	MOPC-21	Alexa Fluor647	Ozyme	Ozyme
CD7	M-T701	IgG1	X40	V450	BD	BD
CD62L	Dreg-56	IgG1	679.1MC7	APC-Alexa Fluor750	Invitrogen	Beckman Coulter
CD162	FLEG	IgG2a	eBM2a	APC	eBioscience	eBioscience
CD43	DF-T1	IgG1	IS5-21F5	VioGreen	Miltenyi	Miltenyi
CD49d	9F10	IgG1	MOPC-21	PC-7	Ozyme	Ozyme
CD56	MEM-188	IgG2a	MOPC-173	Pacific Blue	Ozyme	Ozyme

Table II. List of antibodies used. Monoclonal antibodies were from mouse unless specified.

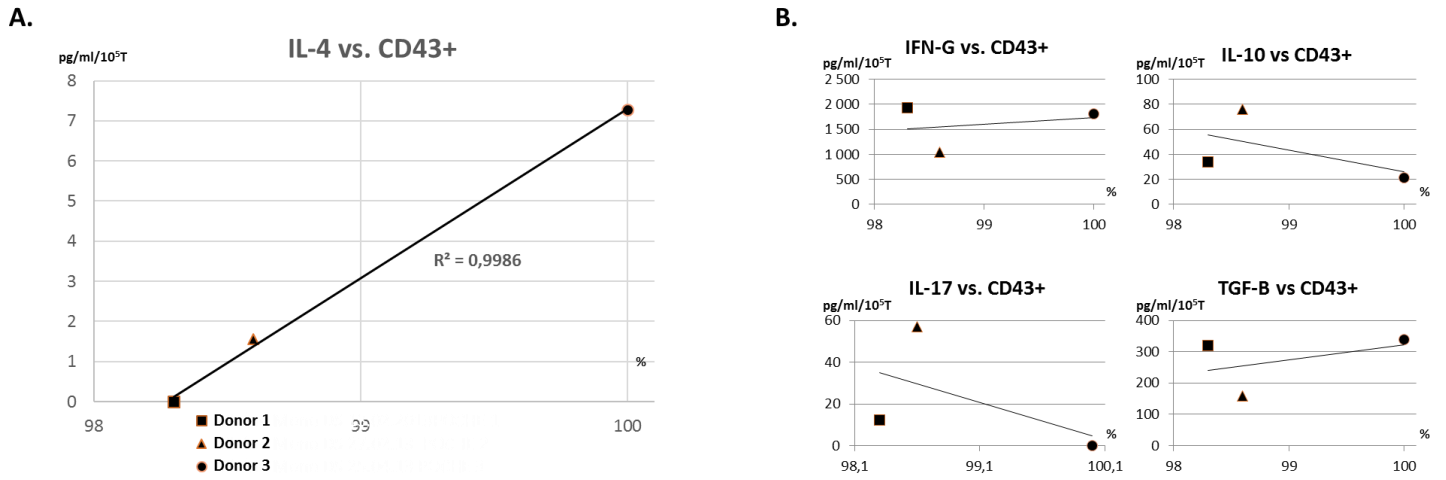


Figure 1. Correlations between CD43 expression in sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells.

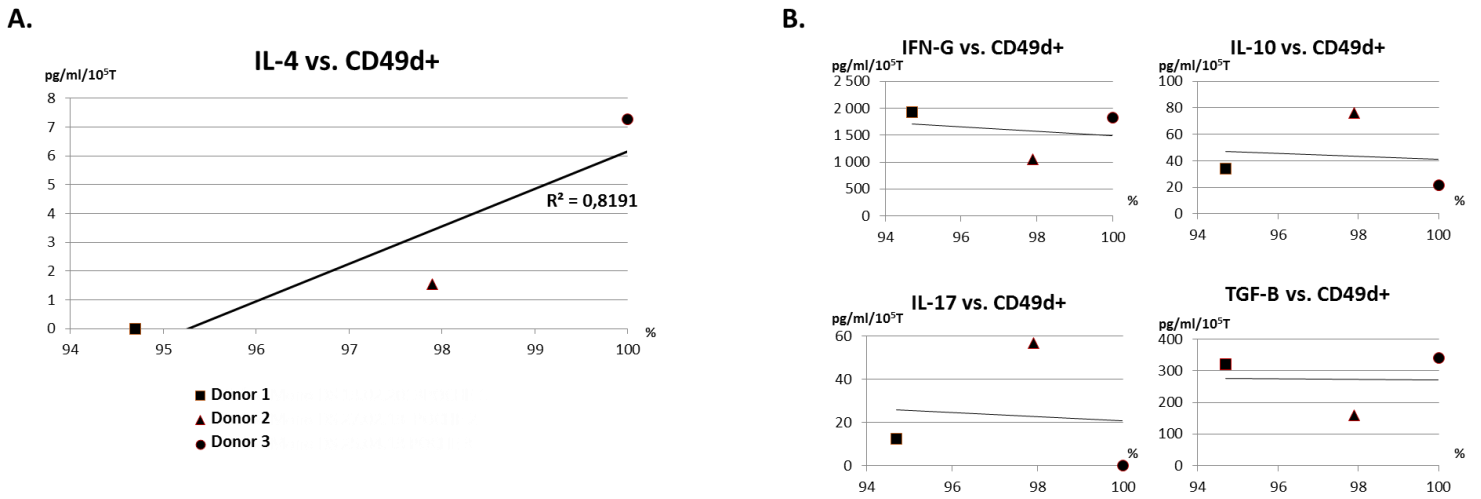


Figure 2. Correlations between CD49d expression in sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells.

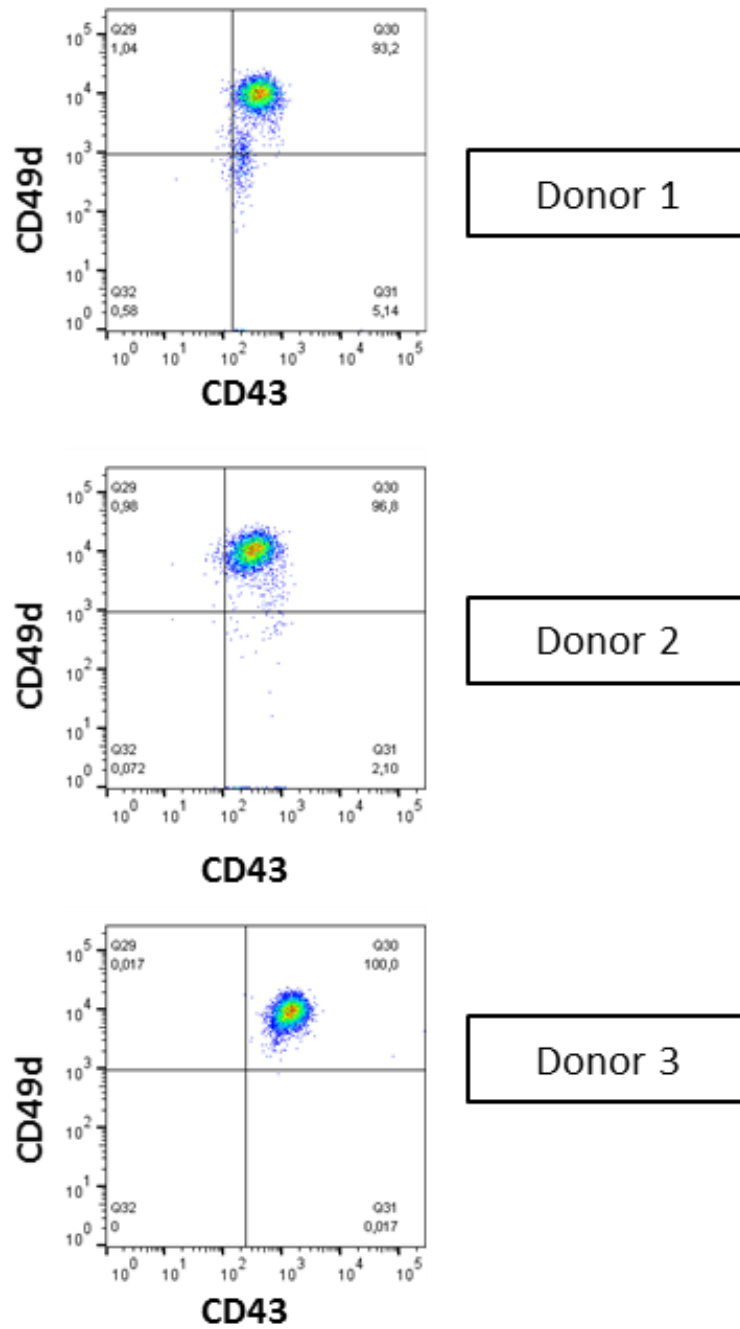


Figure 3. Profiles of expression of CD43 and CD49d in healthy donors 1, 2, and 3.

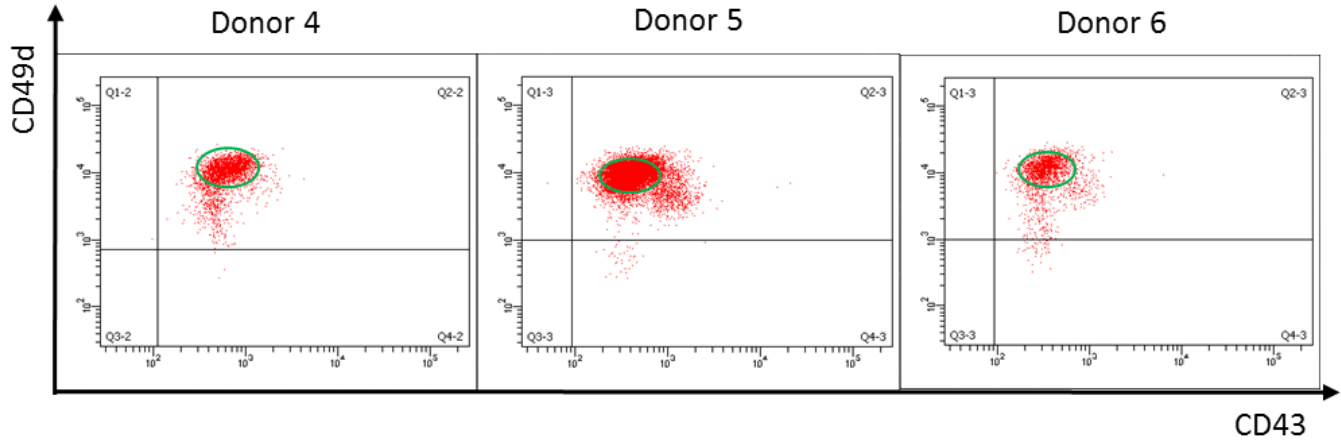


Figure 4. Profiles of expression of CD43 and CD49d in healthy donors 4, 5, and 6.

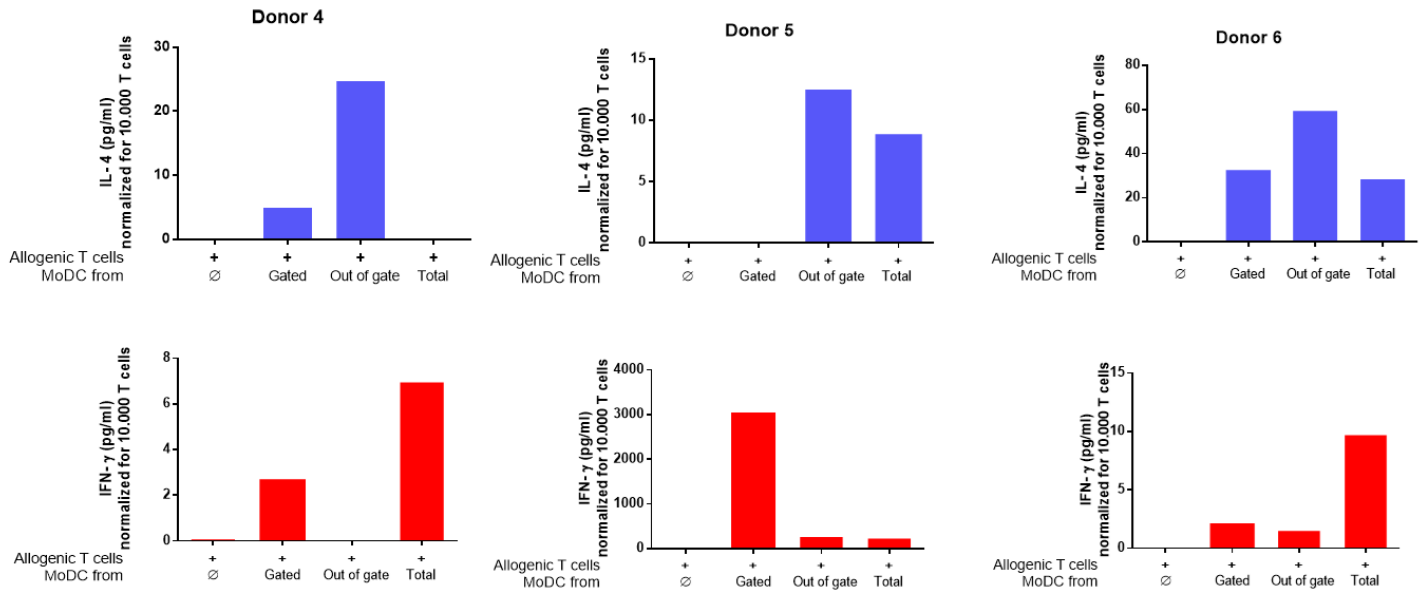
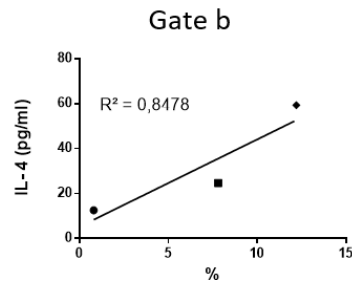
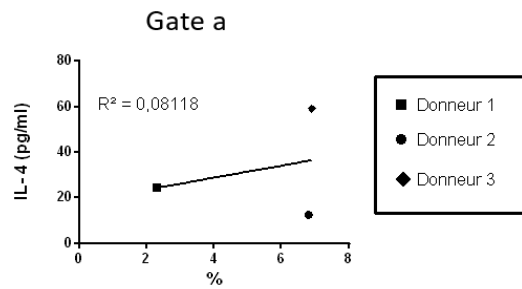
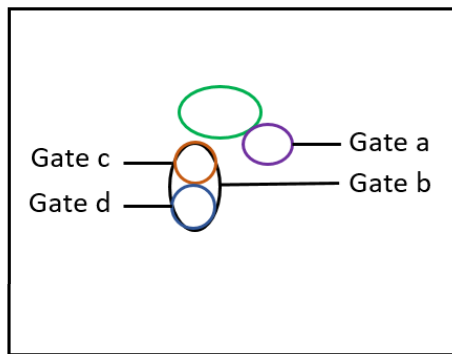
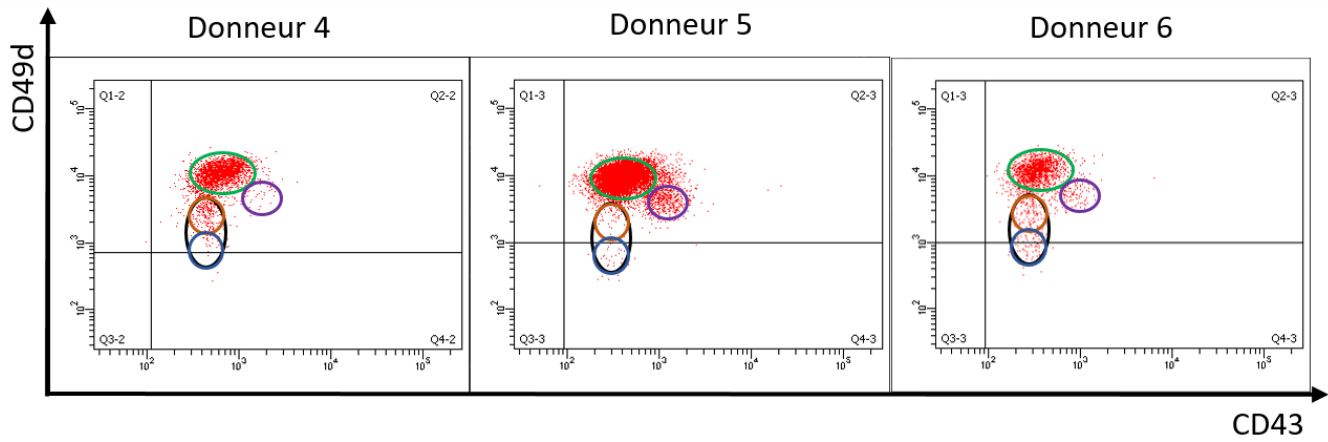
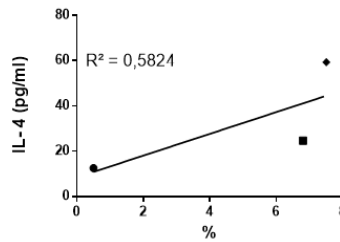


Figure 5. Cytokine production in allogeneic MLR between MoDC derived from different monocyte fractions and T cells.



Gate c



Gate d

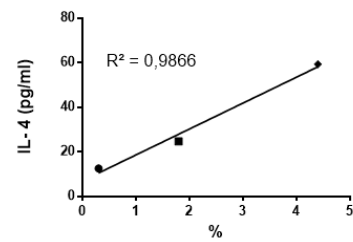


Figure 6. Correlations between CD43 and CD49d expression in fractions of sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells.

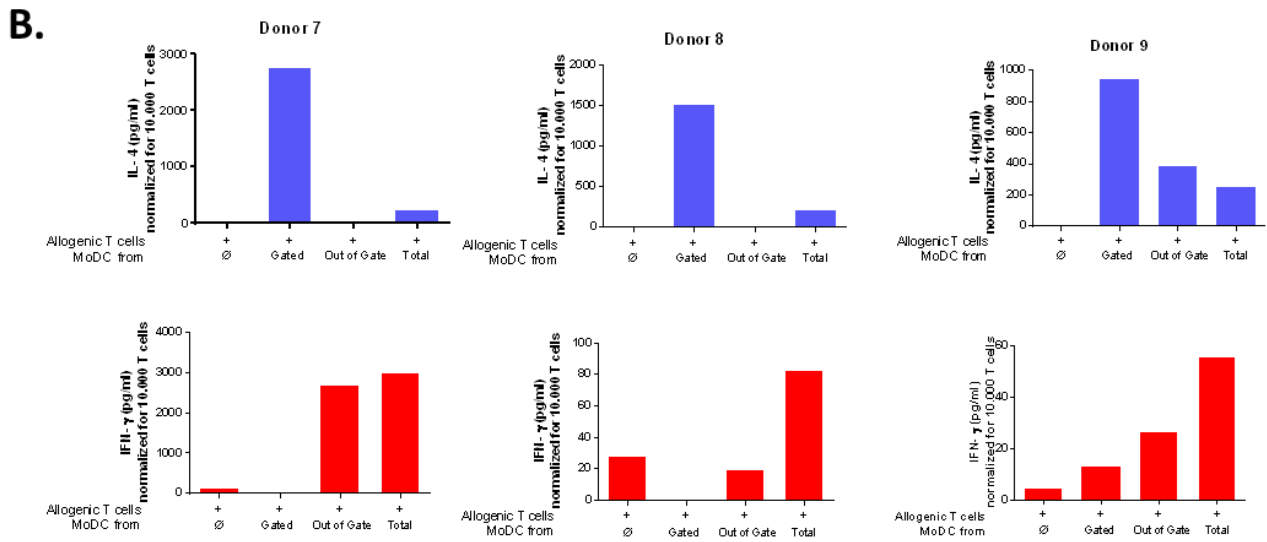
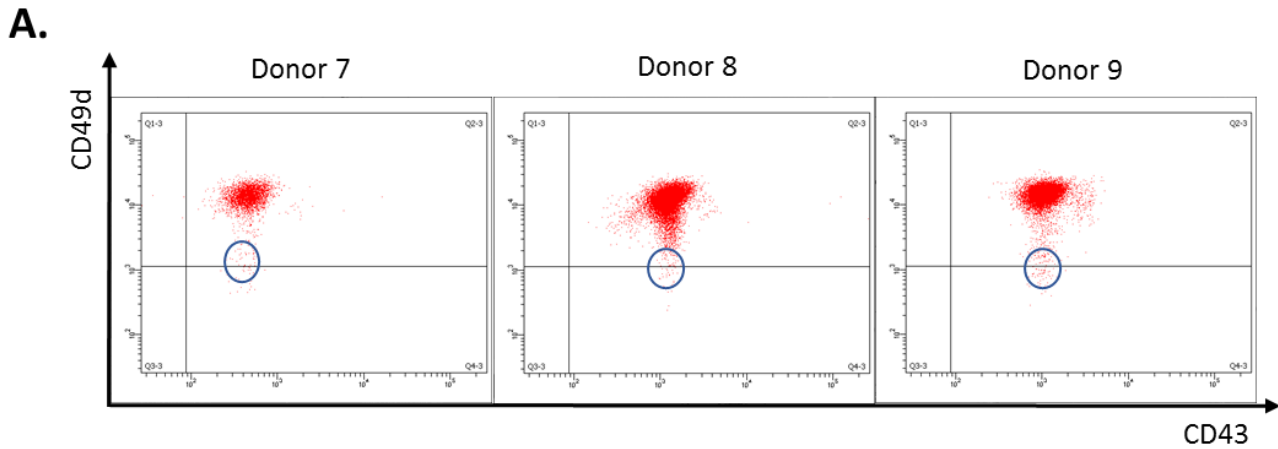


Figure 7. Cytokine production in allogeneic MLR between MoDC derived from small CD14⁺ CD16⁺ CD43^{low} CD49d^{low/neg} monocytes and T cells.

Article 3

Les plaquettes peuvent adhérer aux monocytes formant des agrégats monocyte-plaquette (monocyte-platelet aggregate ou MPA). Ses associations ont surtout été étudiées en situation pathologique mais peuvent également se former en situation physiologique. Le rôle des MPA reste mal connu.

Afin de déterminer le rôle des plaquettes dans les fonctions monocytaires, les monocytes de trois donneurs sains ont été marqués avec le marqueur CD42b, spécifique des plaquettes et CD62P, présent à la surface des plaquettes activées. L'analyse de ces cellules a été effectuée en cytométrie en images (Amnis – Imagestream X), une technique qui combine une analyse de type cytométrie en flux à une visualisation en microscopie à fluorescence de chaque cellule analysée.

Dans un premier temps, une comparaison du profil morphologique et phénotypique des monocytes a été effectuée entre les cellules analysées en cytométrie de flux classique, et celles analysées en cytométrie en images. Les cinq sous-populations de monocytes précédemment identifiées au sein du laboratoire ($sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^+$, $sm14^{dim}16^+$, $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^+$) ont été retrouvées, avec un profil morphologique (FSC/SSC) et phénotypique (CD14/CD16) comparable.

Ensuite, les résultats ont permis de mettre en évidence une association préférentielle de certaines sous-populations de monocytes à des plaquettes majoritairement non-activées, cette particularité renforçant l'identité particulière de chaque sous-population.

Pour étudier le rôle de cette association préférentielle qui pourrait influencer sur la capacité des monocytes à adhérer à l'endothélium, les monocytes ont été purifiés et désassociés de leurs plaquettes par tri sur trieur cellulaire BDFacs Aria 3, et l'adhésion à des cellules endothéliales de plusieurs pools cellulaires (monocytes sans et avec associations aux plaquettes) a été analysée. Les résultats montrent un rôle différentiel des plaquettes sur les différentes sous-populations de monocytes en favorisant l'adhésion de certaines mais sans effets notoires pour d'autres.

Article 3: Monocyte subpopulations differentially bind platelets in steady state.

S.O. Cohen¹, F. Merah-Mourah¹, A.R. Cross¹, J. Lion¹, N. Mooney¹, and A. Haziot¹

¹, INSERM U1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Abstract

We previously identified new monocyte subsets characterized with higher FSC and SSC in flow cytometry (“large” monocyte $la14^+16^{neg}$ and $la14^+16^+$), in addition to three “small” monocyte subsets ($sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^+$ and $sm14^{dim}16^+$). We first investigated the morphological difference between these monocyte subpopulations using imaging flow cytometry. Our results show that spontaneous association between monocyte and platelets in the steady state differed among monocyte subpopulations, accounting for part of light scattering differences. $sm14^+16^{neg}$ and $sm14^{dim}16^+$ monocytes were poorly associated with platelets, half of $sm14^+16^{neg}$ were associated with 1-2 platelets, whereas all $la14^+16^{neg}$ and $la14^+16^+$ monocytes bound 2-4 platelets. To determine the impact of these associations in terms of adhesion to the endothelium, a model was developed to study the adhesion of monocyte subsets with or without associated platelet to the endothelium. $sm14^+16^{neg}$ monocytes associated with platelets attached more efficiently to the endothelium compared to platelet free cells. In contrast, association with platelets did not alter the ability of “large” monocytes to adhere to endothelial cells. These spontaneous and preferential interactions with platelets seem to be involved in the adhesion functions of monocyte subpopulations, highlighting the functional differences of the newly defined populations.

Introduction

Monocytes form a major cell type of human peripheral blood, making up to 10% of all circulating leukocytes. They have been phenotypically divided on the basis of CD14 and CD16 expression, and three subpopulations have been previously defined: classical CD14⁺ CD16^{neg}, intermediate CD14⁺ CD16⁺, and non-classical monocytes CD14^{dim} CD16⁺ (Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013). Recently, using procedures to get better resolution of small populations in unsupervised analysis, we have identified two main subsets of monocytes with distinct light scattering properties: small monocytes with an expected profile and novel large monocytes, which altogether divide into six subpopulations according to CD14 and CD16 expression. Thus, small monocytes include sm14⁺16^{neg}, sm14⁺16⁺, sm14^{dim}16⁺ and sm14^{dim}16^{neg} cells; large monocytes comprise la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺ cells (Merah-Mourah et al., submitted). While sm14^{dim}16⁺ monocytes clearly correspond to non-classical monocytes, the relationship of newly defined subpopulations to previously described ones remain unclear since small and large monocytes have overlapping CD14/CD16 profiles (Merah-Mourah et al., submitted) and large monocytes may have been occasionally included in classical and intermediate monocytes in past studies. sm14^{dim}16^{neg} monocytes are unevenly present in healthy donors and have a clear monocytic phenotype, as previously reported (Merah-Mourah et al., submitted).

The apparent greater size of large monocytes in flow cytometry may be due to increased cell volume as seen in cell activation, or to cell association with particles of various nature present in the blood. It is well known that platelets can bind to monocytes forming circulating monocytes-platelet aggregates (MPA) (Wu et al., 2016; Yip et al., 2013). The mechanisms by which MPA form have been well characterized in pathological conditions. Activated platelets express α -granule P-selectin (CD62P) on the cell surface through exocytosis, and this receptor interacts with its ligand PSGL-1 (CD162) constitutively expressed by monocytes (Furie and Furie, 2004). This interaction is dependent of platelet activation with agents such as thrombin and ADP, and leads to monocyte activation and inflammatory interactions with the endothelium (Bournazos et al., 2008). Interestingly, MPA can also form in physiological condition (Yip et al., 2013), and the association in steady state does not involve P-selectin expressed by platelet nor PSGL-1 expressed by monocytes. The mechanisms of this interaction remain unknown. The functions of steady state

MPA have not been studied as actively as their activated counterparts. Of note, steady state MPA are significantly increased in children (Yip et al., 2013).

To determine the structural particularities present in monocytes subsets, and to identify cell intrinsic and extrinsic factors associated with monocyte heterogeneity, we analyzed monocytes from healthy donors using imaging flow cytometry, which combines high throughput surface phenotyping with morphological data analysis via microscopic visualization of each cell. The ability of different subsets of monocytes to interact with endothelial cells has been analyzed.

Materials and methods

Blood donors

Blood samples were obtained from the local blood bank (Etablissement Français du Sang at Saint-Louis Hospital, Paris, France). Donors were informed that blood would be used for research purposes. All experiments were performed according to institutional ethical guidelines.

Cell separation from blood samples

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated from venous blood collected in the presence of ACD (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), by density gradient centrifugation on a cushion of Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France) as described.

Briefly, blood was diluted with an equal volume of sterile nonpyrogenic Phosphate Buffered Saline (PBS) (Eurobio) and gently layered on 15 ml of Ficoll in a 50 mL Falcon tube (Becton Dickinson). After centrifugation 15 min at 800 x g at room temperature without brake, the ring containing PBMC was collected and cells were washed twice (10 min, 300 x g, 4°C) with cold PBS 1X supplemented with 10% decomplexed human AB serum (HABS_{DEC}) (Etablissement Français du Sang, Rungis, France). To saturate cell surface nonspecific binding sites, cells were then incubated in 10 ml PBS supplemented with 10% HABS_{DEC} (PBS/10 % HABS_{DEC}) for 15 min on ice. PBMC were then collected by centrifugation (5 min, 300 x g, 4°C), re-suspended in (PBS/10 % HABS_{DEC}) at a concentration of 4 x 10⁶ cells/ml, and aliquoted in FACS tubes (Becton Dickinson, polypropylene tubes with cap) for further use.

Cell sorting

Monocyte subpopulations were purified on a FACSAria III (Becton Dickinson) cells sorter. Gating was set after acquisition of 1x10⁶ events, lineage^{neg} (CD19-CD3-NKp46) were excluded, and CD14⁺ cells were selected. Gates identifying small and large monocytes were set according to light scatter properties (Merah-Mourah F. et al., submitted) and CD14/CD16 dot plot profiles were

used to identify the various monocyte populations. Cells from selected populations were purified according to standard procedures as recommended by the manufacturer.

Cell separation, staining, and analysis

Cells were isolated, stained and analyzed as previously described (Merah-Mourah F. et al., submitted). Briefly, blood was collected in ACD tubes (Becton Dickinson) and PBMC were separated by gradient density centrifugation. PBMC were washed and non-specific binding sites were blocked by incubation in PBS supplemented with 10% HABS_{DEC}.

Cells were stained with a monoclonal antibodies cocktail containing phycoerythrin (PE) conjugated mouse antihuman CD3 (clone UCHT1, BioLegend, San Diego, CA, USA), CD19 (clone HIB19, BioLegend), NKp46 (clone 9E2, BioLegend); fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated mouse antihuman CD14 (clone RMO52, Beckman Coulter, Brea, CA, USA); peridinin chlorophyll protein complex with cyanine-5.5 (PerCP-Cy5.5) conjugated mouse antihuman CD16 (clone 3G8, Becton Dickinson). Cells were suspended in PBS-EDTA 0.5 mM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) before analysis to prevent aggregates formation.

Cell fluorescence was analyzed on a BDFACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson) with acquisition of 1×10^6 events allowing a comprehensive analysis of monocytes (Merah-Mourah F. et al., submitted). Data were analyzed using BDFACS Diva (Becton Dickinson) and Flow Jo (Treestar, Ashland, OR, USA).

Imaging flow cytometry

Imaging flow cytometry (IFC) was performed on a two-camera Amnis Image Stream X Mark II with INSPIRE acquisition software (Merck, Darmstadt, Germany). Excitation lasers used for analysis include 200 mW 488 nm, 200 mW 561 nm and 120 mW 642 nm. A 1.88 mW 785 nm laser provided a scatter signal and measurement of SpeedBeads for internal calibration. FITC, PE and PerCP-Cy5.5 was excited by the 488 nm laser and emission captured respectively in the range 480–560 nm (Ch02), 560–595 (Ch03) and 642–745 (Ch05), PE-Cy7 was excited by the 561 nm laser and emission captured in the range 745–780 nm (Ch06), Allophycocyanin (APC) was excited

by the 642 nm laser and emission captured in the wavelength range 642-745 nm (Ch11). All images were captured with the 20x magnification objective.

The feature “spot count” in Amnis IDEAS in combination with an eroded CD42b mask, from which a dilated CD14 mask was subtracted, was used to quantify the number of platelets bound to monocytes in each subpopulation. This count method was compared to manual counts of platelets attached to 100 monocytes in each subpopulations and results obtained by the two methods were similar.

Platelets isolation

Following gradient density centrifugation of blood samples as describe above, the diluted plasma layer enriched in platelets was collected and an equal volume of a 12.5% ACD (Becton Dickinson) in PBS solution was added. After a centrifugation 10 mn at 300 x g at room temperature without brake to remove contaminating cells, the supernatant was collected and platelets were recovered by centrifugation 20 mn at 900 x g at room temperature without brake. The resulting supernatant named Platelet-Poor-Plasma (PPP) was set aside for further use in monocyte-platelet co-culture. One ml of 12.5% ACD-PBS solution was used to gently rinse the platelet pellet without resuspension in order to avoid platelet activation.

Monocyte:platelet complex formation

After cell sorting, monocytes were stained with CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer recommendations. Platelets was added at 500:1 ratio in a polypropylene round-bottom 96-well plate (VWR, Radnor, PA, USA) and incubated 1 hour at 37°C and 5% CO₂ in complete RPMI medium, composed of RPMI 1640 medium (ThermoFisher) supplemented with 10% human serum AB, 1% sodium pyruvate (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany), 1% glutamine, and 1% penicillin and streptomycin (ThermoFisher). Cells were stained with the same monoclonal antibodies cocktail used for the cell separation, supplemented with APC conjugated mouse anti-human CD42b (eBioscience, Paris, France) and PE-Cy7 conjugated mouse anti-human CD62P (BioLegend, Paris, France). Cell

fluorescence was analyzed on a BDFACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed using BDFACS Diva (Becton Dickinson) and Flow Jo (Treestar).

Endothelial cell culture

The human mammary epithelial cells (HMEC)-1 cell line, provided by A. Kesikli (University of Regensburg, Germany), was cultured in complete MCDB 131 medium, composed of MCDB 131 medium (ThermoFisher) supplemented with 12.5% fetal calf serum, hydrocortisone 1 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), epidermal growth factor 10 ng/mL (BD Biosciences, San Jose, CA), 6 mM glutamine, penicillin 100 IU/mL and streptomycin 100 µg/mL (ThermoFisher) and used between passages 8 and 18.

Endothelial cells were stained with CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (ThermoFisher) according to the manufacturer recommendations. Then, 50.000 endothelial cells per well were cultured in a 96-well plate at 37°C and 5% CO₂ overnight, before the adhesion assay.

Adhesion assay to endothelial cell monolayer

Monocyte-platelets complexes were collected and incubated 1 hour with endothelial cells at 1:5 (monocyte:HMEC) ratio with complete RPMI medium supplemented with 10% of PPP in a 96-well plate. The supernatant was collected for the analysis of non-adherent cells. The cells were incubated 5 min at 37°C with trypsin (Life Technologies) to recover adherent cells, without wash step to avoid loss of adherent cells. Then, 100 µl of complete RPMI medium was added to each well to inhibit trypsin. The adherent cells were stained with two monoclonal antibodies: APC conjugated mouse antihuman CD42b (eBioscience) and PE-Cy7 conjugated mouse antihuman CD62P (BioLegend).

Cell fluorescence was analyzed on a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed using Diva (Becton Dickinson) and Flow Jo (Treestar).

Results

To investigate the basis for morphological differences between monocyte subpopulations detected by flow cytometry (Merah-Mourah F. et al., submitted), we analyzed PBMC using an imaging flow cytometer. This technology produces bright field and fluorescence images of each cell passing through the laser beam, therefore combining advantages of traditional flow cytometry and microscopy.

Identification of small and large monocytes by Imagestream analysis

We adapted gating to match the strategy used to define monocyte populations by flow cytometry. Firstly, we selected all lineage negative (CD3/CD19/NKp46) cells (Figure 1A). CD14⁺ cells, defining monocytes, were then selected (Figure 1B and 1C). Single cells were gated using aspect ratio and area of brightfield (Figure 1D), a dot plot commonly used to isolate single cells in this technique. Representative objects found most frequently in the excluded gate are shown in Figure 1E, and very few actual cell doublets were present. In order to identify small and large monocytes we analyzed cells (Figure 1F) according to area of brightfield in x-axis and intensity of darkfield in y-axis. Area of brightfield is defined as the number of pixels that make up the brightfield image, and is related to cell size and to forward scatter (FSC) of blood cells analyzed at 488 nm in flow cytometry (Shapiro, 1995). Darkfield image locates and quantifies light reflected by sub-cellular structures and depends on granularity similarly to side scatter (SSC). In this representation, monocytes formed an elongated cloud of cells spanning across the brightfield axis, contrasting with two well delimited clouds of cells for small and large monocytes as identified by flow cytometry (Merah-Mourah et al., submitted). We considered that the left and right ends of this cloud may correspond to small and large monocytes. To prevent analysis of contaminated populations due to overlaps between small and large monocytes, we thoroughly excluded cells between the two gates.

Monocytes in gates likely defining small and large monocytes were examined according to CD14 and CD16 expression (Figure 2). In CD14/CD16 dot plots (Figures 2A and 2C), the gate selecting smaller cells showed a profile consistent with small monocytes with sm14⁺16^{neg},

sm14⁺16⁺ and sm14^{dim}16⁺ small monocytes (Figure 2A). The larger cells formed a single cloud, similarly to large monocytes, with a majority of CD16-negative cells, and a small fraction of CD16⁺ cells, that we then considered as la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺ monocytes, respectively (Figure 2C). Microscopy images of the different monocyte subpopulations are shown in Figure 2B, with fluorescence intensities of CD14 and CD16 matching the phenotype. Brightfield images did not point to obvious size difference between small and large monocytes. Strikingly, large monocytes had particles consistently attached to their surface, and these particles were not labeled by CD14 and CD16 antibodies. Particles were also found attached to small monocytes, although attachment was less frequent and particles seemed less numerous. We then set to accurately determine the size of small and large monocytes, and to identify the attached particles.

Analysis of monocyte size in the different subpopulations

To compare the size of monocytes included in different subpopulation, we created a mask that delineate the contour of CD14 expression in the image of each cell analyzed. This excluded attached particles which did not express CD14 as seen in Figure 2B. Therefore, the area defined within this mask was directly related to the cell size, independently of attached particles. As shown in Figure 3A, when monocytes present in small and large gates were compared, size differences were clearly apparent. The size of small monocytes was evenly distributed in a bell shape curve. In contrast, the curve was more complex for large monocytes, with a right shift to larger sizes and with an additional shoulder of even larger cells found in one donor. Overall, cell area for large monocytes was significantly higher than for small monocytes (Figure 3D). When individual subpopulations within small and large monocytes were compared, sm14⁺16^{neg} and sm14^{dim}16⁺ monocytes had a similar size distribution (Figure 3B and 3D) whereas sm14⁺16⁺ were slightly larger. The large monocyte subpopulations la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺ were very similar (Figure 3C and 3D). Therefore, cell area allowed to distinguish between the three small monocytes subpopulations and the two large monocytes subpopulations. These results showed that although attached particles undoubtedly contributed to the main size difference between large and small monocytes in conventional and imaging flow cytometry, intrinsic cell size differences between small and large are also detectable.

Identification of particles attached to monocytes

It has been reported that platelets were frequently found attached to monocytes in PBMC fractions, including samples from healthy donors (Hui et al., 2015; Yip et al., 2013), and also in whole blood prior to any cell separation (Hui et al., 2015). We then looked for expression of platelets markers in particles attached to monocytes.

We used antibodies against CD42b, a surface membrane glycoprotein expressed by all platelets, involved in the initial platelet adhesion to subendothelium following a vascular injury by binding to von Willebrand factor (Zahger et al., 1995). We also used antibodies against P-Selectin (CD62P), which is expressed by activated platelets. As shown in Figure 4, almost all of the particles attached to monocytes were stained with antibodies to CD42b, and a lesser proportion was also labeled with anti CD62P. This positively identified platelets as the particles attached to monocytes. As expected from analysis of brightfield images, small monocyte populations were mostly associated with none or only one platelet, whereas large monocyte populations were associated with more platelets.

Quantification of monocyte platelets associations in the different subpopulations

To determine the level of platelets associated to the different subpopulations of monocytes, we first analyzed the expression of CD42b and CD62P by imaging flow cytometry. CD42b expression associated with sm14⁺16^{neg} showed a biphasic profile with 74.3% positive cells (Figure 4B). In sm14⁺16⁺ monocytes, a strong peak of CD42b negative cells was detected although 48.5% of cells were positive with varying levels of positivity (Figure 4B). sm14^{dim}16⁺ monocytes had the lowest proportion of CD42b positive cells (12.9%). In contrast, all large monocytes were positive for CD42b and its expression was slightly higher in the la14⁺16⁺ population compared to la14⁺16^{neg} monocytes. Also, CD42b expression in large monocytes subpopulations was higher than CD42b expression in the three small monocytes subpopulations.

The expression of CD62P was less variable among subpopulations of monocytes (Figure 4C). The results indicate that there is no differential activation of platelets among small monocyte

populations while large monocyte populations had more activated platelets attached to their surface.

In order to further characterize platelet-monocyte interactions, the spot count feature available in the Imagestream analysis software was used to measure the number of platelets attached per monocyte. To use this function, we needed to design a mask strictly restricted to CD42b expression in order to isolate and count each platelet around the cells. Briefly, CD14 fluorescence was selected and the defined area was slightly dilated to define and exclude the monocyte cell surface from the count of platelets at the periphery of the cells (Figure 5A). Then, CD42b fluorescence was selected and slightly eroded to separate and precisely identify platelets present around the monocytes, and to better distinguish individual platelets. Most of sm14^{dim}16⁺ monocytes (79.5%) had no attached platelets and 12.1% were counted with one associated platelet (Figure 5B and Table I). The sm14⁺16^{neg} and sm14⁺16⁺ monocytes were similar with respectively 43.8% and 56.6% of cells free of platelets. Around 30% of cells were associated with 1 platelet and around 12% were associated with 2 platelets. For la14⁺16^{neg}, around 60% of monocytes were associated with 1-2 platelets and about 27% were associated with 3-4 platelets. Similarly, 42.7% of la14⁺16⁺ monocytes were associated with 1 platelet, 29.3% with 2 platelets, and 21% with 3-4 platelets. Large monocytes had clearly more interactions with platelets than small monocytes, which is consistent with the analysis of the expression of CD42b. Overall, these results indicate that large monocytes bind more platelets at their cell surface than small monocytes, which are themselves heterogeneous in term of capacity to associate with platelets.

Functions of monocyte:platelets complexes

In order to analyze the effects of attached platelets on monocyte functions, we sorted the different monocyte subpopulations by flow cytometry. Unexpectedly, following purification, large monocytes were almost completely concentrated in the small monocyte gate, whereas in contrast small monocytes retained its FSC/SSC profile (Figure 6A and 6B). Labeling with anti CD42b showed an almost complete loss of platelet associated fluorescence in all monocyte subpopulations (Figure 6C and 6D), suggesting that the procedures taking place in the cell sorter to separate cells were sufficient to dissociate the monocytes:platelets complexes. This led us to determine the

functions of monocyte subpopulations in their platelet-free and platelet complexed forms. To generate these complexes *in vitro*, platelet-free monocytes from different subpopulations (small CD16-negative, small CD16-positive, and large monocytes) were associated with separated autologous platelets, and monocytes were incubated for 2 hours with platelets at a physiologically relevant ratio of 500:1. As shown in Figure 7, the percentage of small CD16-negative monocytes positive for CD42b increased from 5.5% to 29.8%. Similarly, CD42b positivity increased in small CD16-positive and large monocytes from 3.1% and 5.9% to 29.8% and 35.6%, respectively. These results indicate that monocytes have the potential to re-associate spontaneously to autologous platelets after a short incubation, without any additional reagent. CD62P labeling showed that platelets have not been activated during purification and following association with monocytes (data not shown).

In order to understand the effects of interactions with platelets, we then analyzed the adhesion of each monocyte fraction, free or complexed to platelets, to a monolayer of endothelial cells. Monocytes from small monocytes CD16^{neg}, small monocytes CD16⁺ and large monocytes, re-associated with platelets, were co-cultured with endothelial cell and analyzed by flow cytometry. Monocytes were stained with crystal violet prior to forming platelet complexes and incubated with CFSE labeled endothelial cells. Adherent cells were dissociated, analyzed by flow cytometry, and the ratio of monocyte to endothelial cells within adherent cells was determined. As presented in Figure 8A, the different fractions of monocytes free of platelets adhered at similar rates to endothelial cells. Re-association of sm14⁺16^{neg} monocytes with platelets significantly increased adhesion to endothelial cells compared to a combination of non-complexed monocytes and platelets added separately to the endothelial monolayer (Figure 8B). In contrast, no difference was found in the adhesion of platelet-complexed small CD16⁺ or large monocytes to endothelial cells compared to platelet-free monocytes or monocytes and platelets added separately. These results indicate that interactions between monocytes and platelets have distinct effects on different population of monocytes, and adhesion of sm14⁺16^{neg} monocytes to endothelial cells is selectively enhanced by association with platelets. Large monocytes, which bind multiple platelets *in vivo*, did not display changes in adhesion to endothelial cells after forming complexes with platelets. This suggests that large monocyte can be distinguished according to adhesion functions, in addition to cell surface marker expression (Merah-Mourah et al., submitted) and spontaneous binding of multiple platelets in steady state (Figure 5 and 7).

Discussion

Deciphering the heterogeneity of human monocytes and ascribing functions to subpopulations remains an arduous task. Identification of the various populations that compose this cell type should lead to a better understanding of the many roles it plays in steady-state, inflammation, and immune responses. We have recently shown that the three previously described populations of monocytes found in human blood (classical, intermediate, and non-classical) were actually made of six subpopulations stemming from two main sets of cells with distinctive apparent size as resolved by flow cytometry (Merah-Mourah et al., submitted). These small and large monocytes additionally differed in cell surface expression of several markers.

In this study, we looked at structural bases for apparent size difference in monocytes. Using imaging flow cytometry, which records bright field and fluorescence images of each cell analyzed by flow cytometry, we found that large monocytes had higher numbers of attached platelets at their cell surface. However, this association could not explain by itself all of the shift towards larger size in flow cytometry analysis since monocytes that bound equal numbers of platelets were found in small and large subpopulations. Image analysis excluding attached platelets showed that large monocytes had actually a slightly larger cell area when examined in bright field. Therefore, a combination of larger cell size and increased platelet binding may account for the increased forward scatter of this novel monocyte subpopulation.

A fraction of monocyte-bound platelets analyzed in healthy donors showed a low but consistent expression of the marker for platelet activation CD62P. This expression was equally found in platelets bound to small and large monocytes. CD62P expression was found in single platelets associated with monocytes, suggesting that the level of platelet activation was short of what is required to induce platelet aggregation. In this state of minimal activation, CD62P-positive platelets bound to monocytes seem akin to previously described circulating activated platelets. These are present in the blood of healthy donors and are poised to be recruited by activated neutrophils bound to inflamed endothelium (Sreeramkumar et al., 2014). Association of higher numbers of circulating activated platelets with progression of atherosclerotic lesions has also been described (Huo et al., 2003). It has been shown that CD62P was a major actor in the binding of activated platelets to monocytes (Bournazos et al., 2008). It should be noted that in this study association of purified platelets to monocytes yielded CD62P-negative monocyte:platelets

complexes (Figure 7). This indicates that the purification of platelets did not result in their activation, and neither did their binding to monocytes. Furthermore, this confirmed previous results showing that blocking CD62P did not prevent the attachment of minimally activated platelets to monocytes (Hui et al., 2015). Receptors involved in the binding of platelets to monocytes in steady state differ from the ones used by activated platelets and remain so far unknown (Hui et al., 2015).

Future studies should determine if association of CD62P-positive platelets to monocytes requires a pre-activation state in monocytes. It has been shown that binding of activated platelets induces monocyte activation (Passacquale et al., 2011; Wang et al., 2007) and soluble factors released by platelets play a critical role in this activation (Stephen et al., 2013). Since the association of purified platelets to monocytes yielded CD62P-negative monocyte:platelets complexes (Figure 7), this suggests that conditions used to generate the complexes *in vitro*, either in platelet purification or in complex formation, allowed to produce only this type of monocyte:platelet association. This in turn would indicate that procedures used to generate the complexes did not induce undesirable activation of monocytes. Results of the adhesion assay to endothelial cells (Figure 8) should therefore be strictly interpreted as a test of adhesion of resting CD62P-negative monocyte:platelets complexes.

With respect to identification of monocyte subpopulations, in the same way platelet association has allowed us to identify large monocytes, the modality of platelet association could further allow to cluster cells with similar platelet binding ability and identify populations that are in comparable activation state or with similar recruitment/adhesion potential to the endothelium. *In vivo* association of monocytes with CD62P-negative or -positive platelets may reflect different states of activation in monocytes and distinct effector and differentiation potential. Recent experiments in human volunteers suggested that monocytes appeared in the blood stream as CD14⁺CD16^{neg} cells and progressively differentiated into CD14⁺CD16⁺ and CD14^{dim}CD16⁺ cells, with these phenotypes corresponding to differentiation steps associated with CD16 expression (Patel et al., 2017). Senescence markers were identified in CD14^{dim}CD16⁺ monocytes, suggesting that this phenotype corresponded to a more differentiated stage (Ong et al., 2018). Binding of platelets, as described here, may correspond to additional differentiation steps. Interestingly, roughly half of sm14⁺16^{neg} monocytes formed complexes with 1 to 2 platelets and the other half was free of association, as were the majority of sm14⁺16⁺ and sm14^{dim}16⁺ (Figure 5 and Table I). This

distinctive property may be useful to characterize functional subpopulations within the most abundant population of monocytes in steady state and disease. On the other hand, $la14^+16^+$ monocytes bound platelets as strongly as $la14^+16^{neg}$ monocytes, suggesting that these monocytes are engaged in a distinct path of differentiation (Figure 5 and Table I). Future studies should determine if platelet binding correspond to particular states of monocyte activation and differentiation.

Recently, it was reported that vesicles derived from platelets specifically bound monocytes (Weiss et al., 2018). Strikingly, these vesicles were more associated with $CD14^+CD16^+$ and $CD14^{dim}CD16^+$ monocytes which include $sm14^+16^+$ and $sm14^{dim}16^+$ monocytes that poorly bound platelets as shown here. Furthermore, unlike platelets, vesicle binding was resistant to cell sorter cell separation, suggesting that platelet and vesicle binding use different mechanisms.

In several studies, the association of platelets to monocyte subpopulations was assessed in healthy donors used as controls for patients in various pathologies. At base line, higher proportions of monocyte:platelets complexes were found in $CD14^+CD16^+$ monocytes and lowest levels were in $CD14^{dim}CD16^+$ ones (Zhou et al., 2013). Since small and large monocytes were not distinguished in this study, differences with our results may come from including $la14^+16^+$ monocytes, which avidely bind platelets, together with platelet-low $sm14^+16^+$ within $CD14^+CD16^+$ monocytes. A similar explanation together with differences in gating strategies may account for discrepancies in platelet association with monocyte subsets described by Czepluch et al. in healthy blood donors (Czepluch et al., 2014). This highlights the critical significance of fine definition of monocyte subpopulation in order to identify the interactions of individual subsets and their related functions.

References

1. Ziegler-Heitbrock, L., and Hofer, T.P.J. (2013). Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol* 4, 23.
2. Wu, Q., Ren, J., Hu, D., Wu, X., Li, G., Wang, G., Gu, G., Chen, J., Li, R., Li, Y., et al. (2016). Monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates: implications in predicting septic mortality among surgical critical illness patients. *Biomarkers* 21, 509-516.
3. Yip, C., Ignjatovic, V., Attard, C., Monagle, P., and Linden, M.D. (2013). First Report of Elevated Monocyte-Platelet Aggregates in Healthy Children. *PLoS ONE* 8, e67416.
4. Furie, B., and Furie, B.C. (2004). Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends in Molecular Medicine* 10, 171–178.
5. Bournazos, S., Rennie, J., Hart, S.P., Fox, K.A.A., and Dransfield, I. (2008). Monocyte Functional Responsiveness After PSGL-1–Mediated Platelet Adhesion Is Dependent on Platelet Activation Status. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 1491–1498.
6. Shapiro, H.M. (1995). *Practical flow cytometry*, 3rd edition (Wiley-Liss).
7. Hui, H., Fuller, K., Erber, W.N., and Linden, M.D. (2015). Measurement of monocyte-platelet aggregates by imaging flow cytometry. *Cytometry* 87, 273–278.
8. Zahger, D., Fishbein, M.C., Garfinkel, L.I., Shah, P.K., Forrester, J.S., Regnstrom, J., Yano, J., and Cercek, B. (1995). VCL, an antagonist of the platelet GP1b receptor, markedly inhibits platelet adhesion and intimal thickening after balloon injury in the rat. *Circulation* 92, 1269–1273.
9. Sreeramkumar, V., Adrover, J.M., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Rossaint, J., Bilbao, I., Nacher, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., et al. (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346, 1234–1238.
10. Huo, Y., Schober, A., Forlow, S.B., Smith, D.F., Hyman, M.C., Jung, S., Littman, D.R., Weber, C., and Ley, K. (2003). Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* 9, 61–67.

11. Passacquale, G., Vamadevan, P., Pereira, L., Hamid, C., Corrigan, V., and Ferro, A. (2011). Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS ONE* 6, e25595.
12. Wang, H.-B., Wang, J.-T., Zhang, L., Geng, Z.H., Xu, W.-L., Xu, T., Huo, Y., Zhu, X., Plow, E.F., Chen, M., et al. (2007). P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat. Immunol.* 8, 882–892.
13. Stephen, J., Emerson, B., Fox, K.A.A., and Dransfield, I. (2013). The uncoupling of monocyte-platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. *J. Immunol.* 191, 5677–5683.
14. Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* 214, 1913–1923.
15. Ong, S.-M., Hadadi, E., Dang, T.-M., Yeap, W.-H., Tan, C.T.-Y., Ng, T.-P., Larbi, A., and Wong, S.-C. (2018). The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. *Cell Death Dis* 9, 266.
16. Weiss, R., Gröger, M., Rauscher, S., Fendl, B., Eichhorn, T., Fischer, M.B., Spittler, A., and Weber, V. (2018). Differential Interaction of Platelet-Derived Extracellular Vesicles with Leukocyte Subsets in Human Whole Blood. *Sci Rep* 8, 6598.
17. Zhou, X., Zhang, L., Ji, W.-J., Yuan, F., Guo, Z.-Z., Pang, B., Luo, T., Liu, X., Zhang, W.-C., Jiang, T.-M., et al. (2013). Variation in dietary salt intake induces coordinated dynamics of monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in humans: implications in end organ inflammation. *PLoS ONE* 8, e60332.
18. Czepluch, F.S., Kuschicke, H., Dellas, C., Riggert, J., Hasenfuss, G., and Schäfer, K. (2014). Increased proatherogenic monocyte-platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J. Intern. Med.* 275, 144–154.

Figure legends

Figure 1. Gating strategy and identification of small and large monocytes by imaging flow cytometry.

PBMC were separated and stained with antibodies directed at various cell surface molecules (table?). Cells were analyzed on the image cytometer Amnis Imagestream X (Merck). (A) Lineage markers were used to exclude lymphocyte subsets; (B) CD14⁺ cells were selected and (C) visualized in brightfield and fluorescence imaging. (D) Area of brightfield and aspect ratio, a common measure describing how round or oblong a cell is, were used to identify doublets and (E) brightfield images of excluded objects are shown. (F) Forward (area of brightfield) and side scatter were used to identify small and large clusters of monocytes (F). Dot plots and images are representative of analyzes done in 3 donors.

Figure 2. Identification of monocytes subpopulations, and visualization of cells and attached particles.

PBMC were stained and gated as described in Figure 1. The expression of CD14 and CD16 were analyzed in (A) small and (C) large clusters of monocytes. (B) Brightfield image of monocytes from each subpopulation and visualization of their CD14 (blue) and CD16 (red) expression. Dot plots and images are representative of analyzes done in 3 donors.

Figure 3. Cell size of monocytes in the different subpopulations after exclusion of attached particles.

PBMC were stained and gated as described in Figure 1, and monocytes subpopulations were gated as in Figure 2. A mask was created to strictly cover CD14 expression thus excluding attached particles and cell area values were determined for all monocyte populations: (A) sizes of small monocytes (purple) and large monocytes (white), (B) sizes of monocyte subsets sm14⁺16^{neg} (yellow), sm14⁺16⁺ (dark green), sm14^{dim}16⁺ (red) and (C) sizes of la14⁺16^{neg} (light green) and

la14⁺16⁺ (pink) are presented from one representative donor out of 3 analyzed donors. (D) Cell areas of monocyte subpopulations from 3 healthy donors are represented. (**, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$ one-way ANOVA test)

Figure 4. Identification of particles attached to monocytes as platelets and expression of platelet markers in the different monocytes subpopulations.

PBMC were stained and gated as described in Figure 1 and additionally stained with antibodies against platelet markers CD42b and CD62P, and monocyte subpopulations were gated as in Figure 2. (A) Brightfield and fluorescence images of particles attached to monocytes (CD14⁺/blue) in each subpopulation. CD42b is in red and activated platelet marker CD62P is in green. Expression profiles of (B) CD42b and (C) CD62P in each monocyte subpopulations. Images and histograms are representative of analyzes done in 3 donors.

Figure 5. Quantification of monocyte:platelets associations in the different monocytes subpopulations.

PBMC were stained and gated as described in Figure 1 and additionally stained with antibodies against platelet markers CD42b and CD62P, and monocyte subpopulations were gated as in Figure 2. Two masks were created to count the platelets attached to monocytes (A) a CD14 mask dilated to ensure that it included all the monocyte surface, and a CD42b mask eroded to be centered on platelets and allow counts of overlapping platelet images; images of dilated CD14 mask, eroded CD42b mask minus the CD14 mask, and merged resulting image are shown. (B) Spot count feature built in the Amnis Imagestream X (Merck) was used to quantify the number of platelets associated with monocytes in each subpopulation. Images and histograms are representative of analyzes done in 3 donors.

Figure 6. Impact of cell sorting on monocyte apparent size and expression of platelet markers.

Monocytes from each subpopulation were purified on a cell sorter BDFACS Aria III (Becton Dickinson) after staining and gating as described in Figure 1 and 2. The size (FSC) and the granularity (SSC) of monocytes is represented (A) before cell sorting and (B) after cell sorting of the different monocyte subpopulations. The expression of platelet marker CD42b (C) before cell sorting and (D) after cell sorting are represented for each subpopulation. Dot plots and histograms are representative of analyzes done in 3 donors.

Figure 7. *In vitro* reassociation of platelets to monocytes and expression of platelet markers in formed complexes.

Monocytes subpopulations were purified on a cell sorter as described in Figure 6. Platelet-free purified monocytes were incubated with purified autologous platelets as described in Methods and association of monocytes and platelets in complexes was determined. Expression of (A) CD42b and (C) CD62P in platelet-free monocytes from small CD16^{neg}, small CD16⁺ and large monocytes populations, and of (B) CD42b and (D) CD62P in the same subpopulations after incubation with autologous platelets. Dot plots are representative of analyzes done in 5 donors.

Figure 8. Effects of platelet attachment on monocyte adhesion to the endothelial cells *in vitro*.

Purified monocytes small CD16^{neg}, small CD16⁺ and large monocytes subpopulations were labeled, complexed or not to platelets, cocultured with labeled endothelial cells and monocyte endothelial cell adhesion was assayed by flow cytometry. (A) Ratio of platelet-free monocytes to endothelial cells for each subpopulation. (B) Fold increase of monocytes adherent to endothelial cells when monocytes were complexed *in vitro* to platelets (M:P) or not complexed and added separately (M+P). (*, $p < 0,05$ t Student test). 3 donors were analyzed.

Subpopulations	Percentage of monocytes attached to a specific number of platelets (%)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
sm14⁺16^{neg}	43.8	36	12.6	4.3	1.7	0.8	0.4	0.2	0.1	0.1
sm14⁺16⁺	56.6	25.7	11.8	3.7	1.5	0	0.7	0	0	0
sm14^{dim}16⁺	79.5	12.1	4	1.2	1	1	0.4	0.6	0.1	0
la14⁺16^{neg}	5.7	30.9	29	18.5	8.9	3.9	1.9	0.5	0.4	0.3
la14⁺16⁺	4	42.7	29.3	12	9.3	0	1.3	1.3	0	0

Table I. Percentages of monocyte:platelets associations in the different monocytes subpopulations.

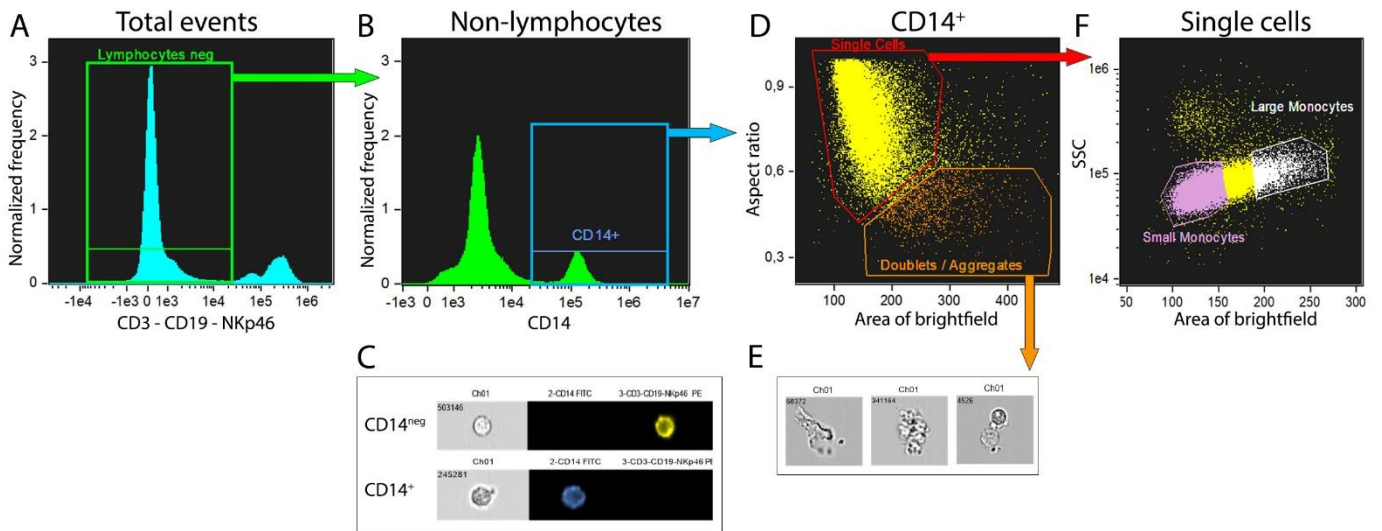


Figure 1. Gating strategy and identification of small and large monocytes by imaging flow cytometry.

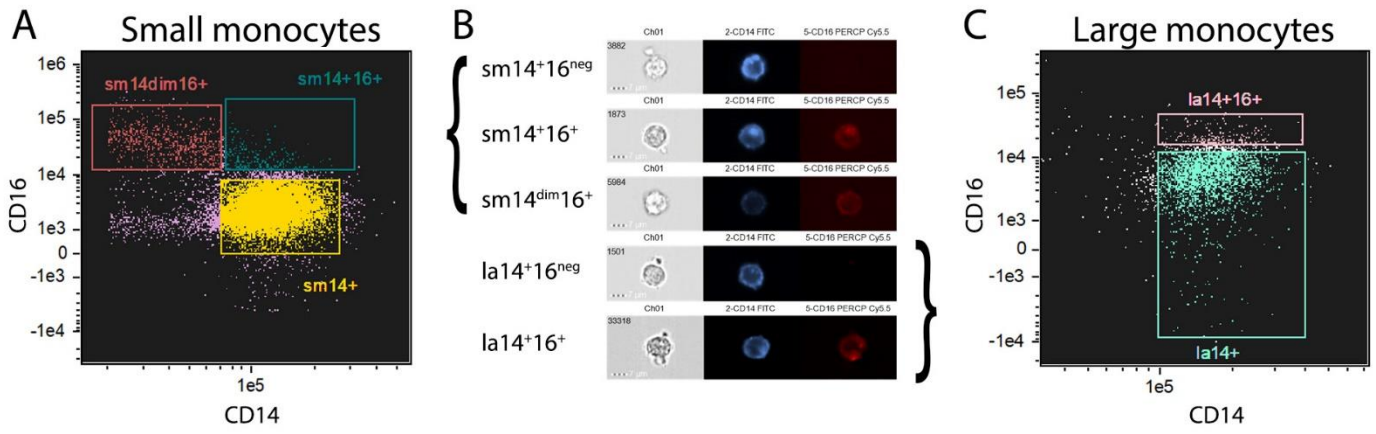


Figure 2. Identification of monocytes subpopulations, and visualization of cells and attached particles.

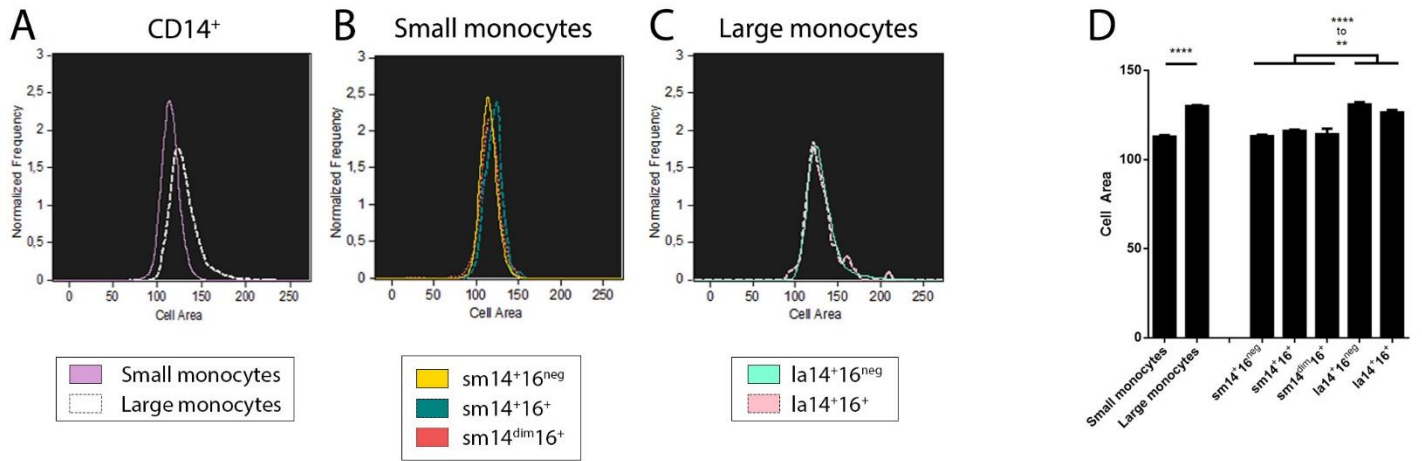


Figure 3. Cell size of monocytes in the different subpopulations after exclusion of attached particles.

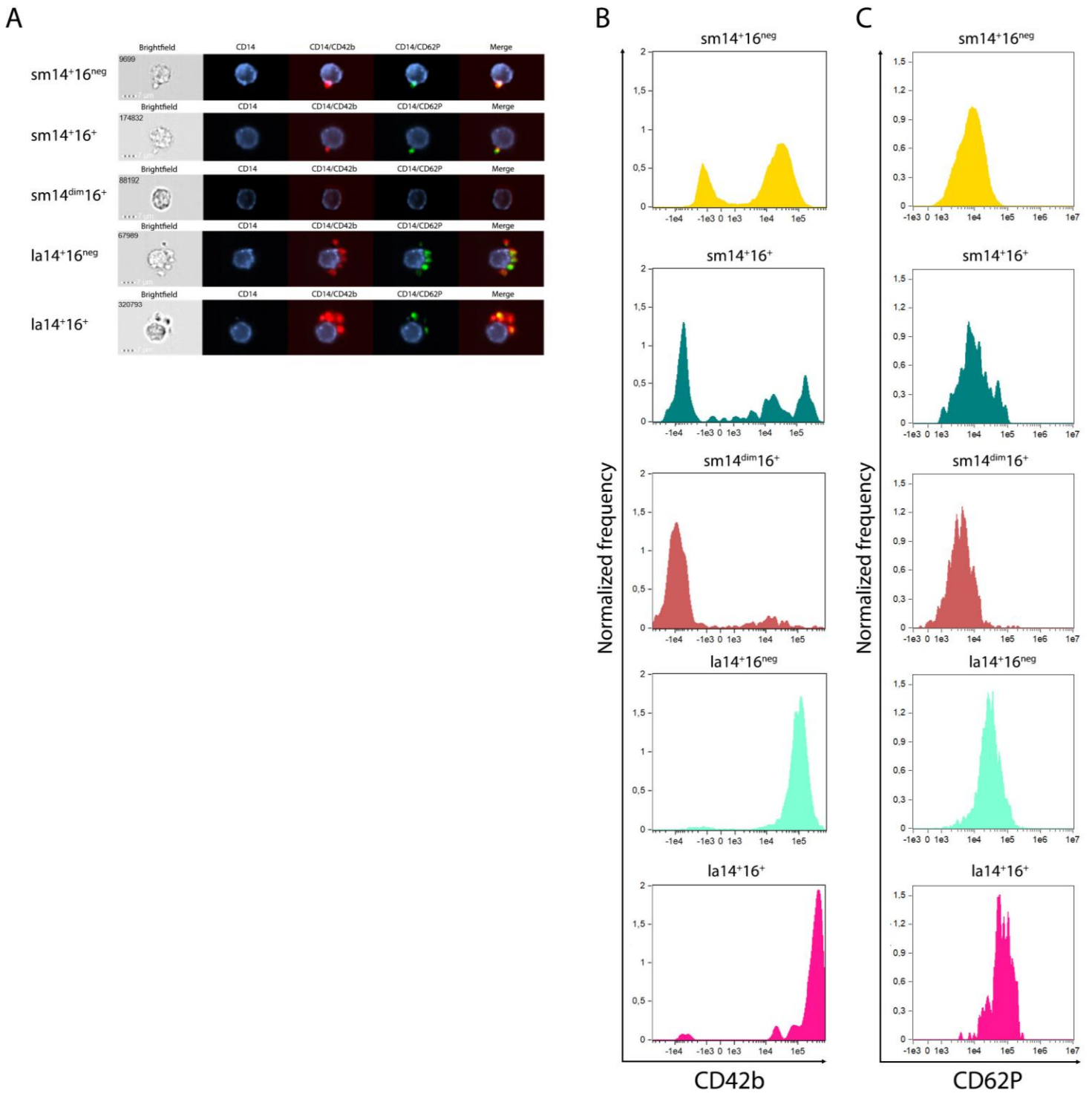


Figure 4. Identification of particles attached to monocytes as platelets and expression of platelet markers in the different monocytes subpopulations.

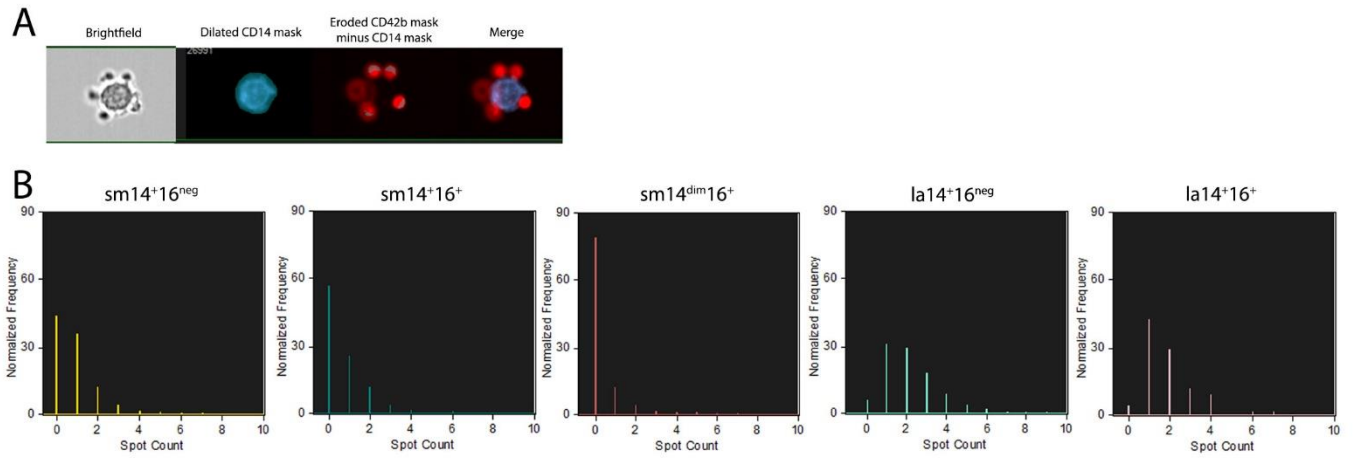


Figure 5. Quantification of monocyte:platelets associations in the different monocytes subpopulations.

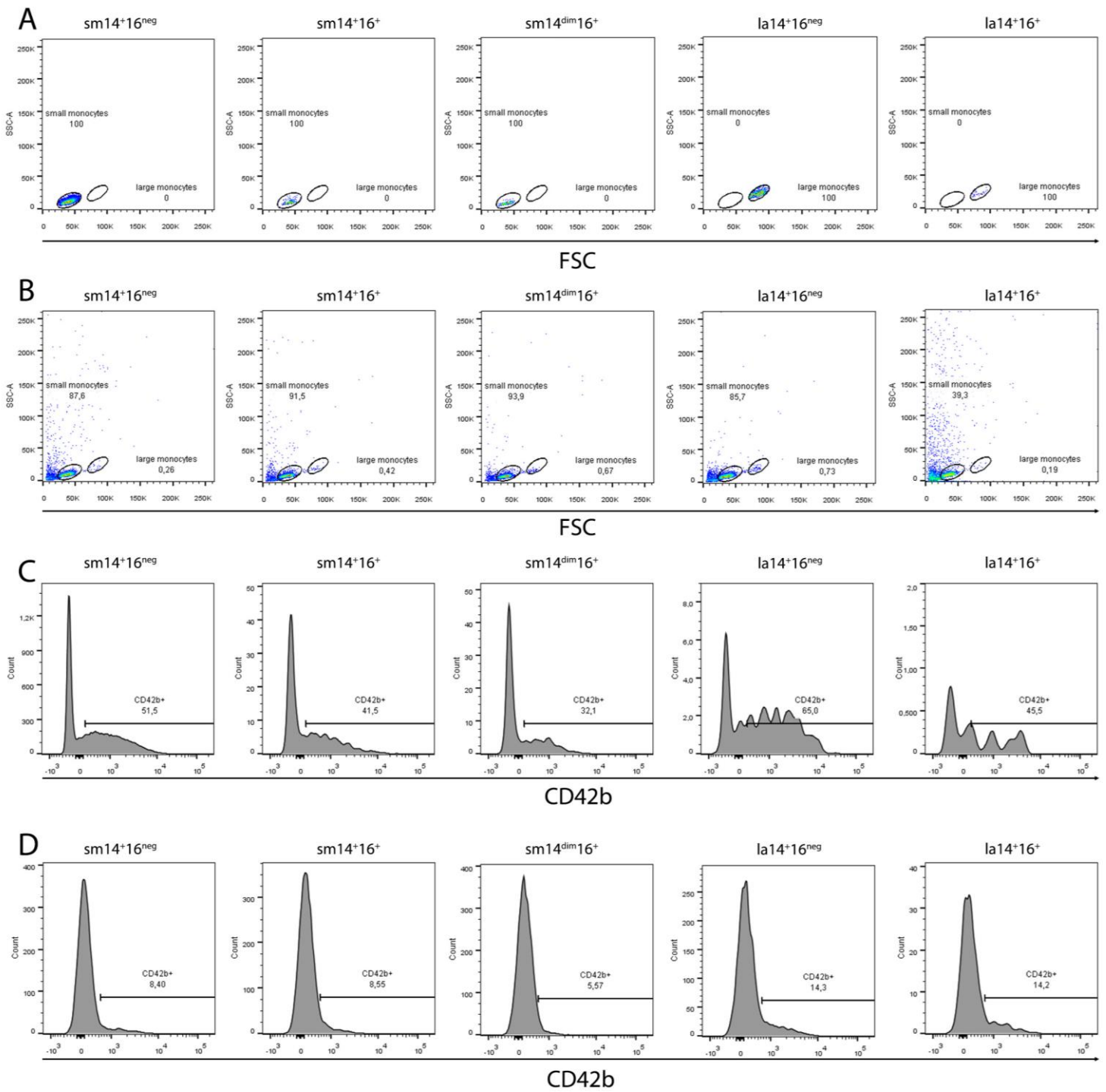


Figure 6. Impact of cell sorting on monocyte apparent size and expression of platelet markers.

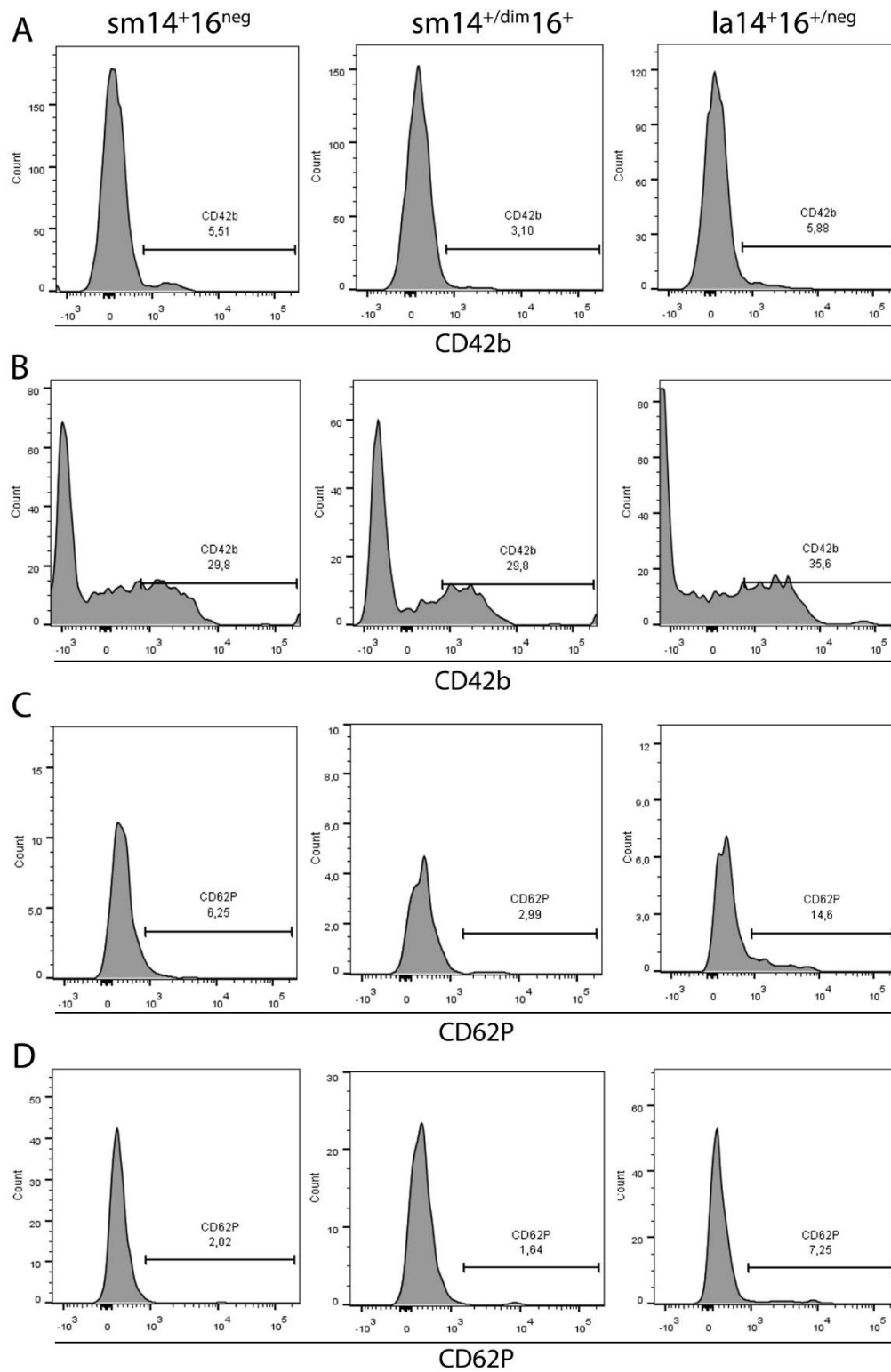


Figure 7. *In vitro* reassociation of platelets to monocytes and expression of platelet markers in formed complexes.

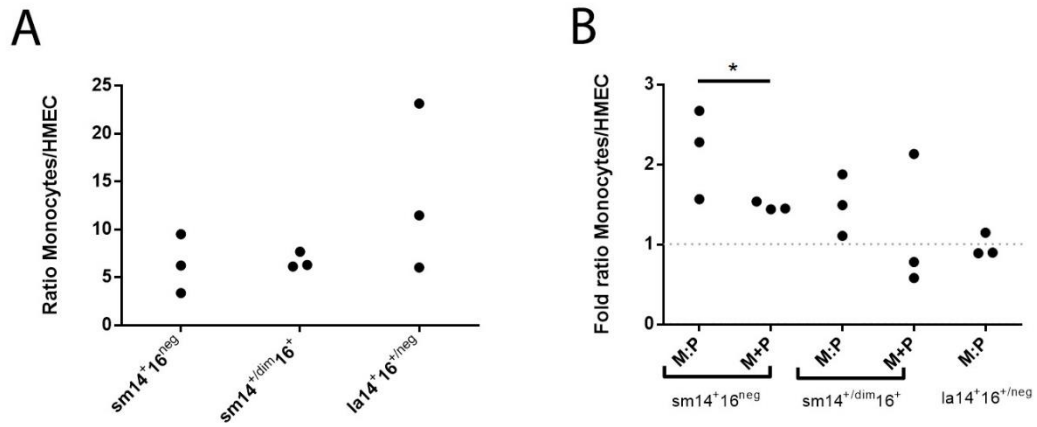


Figure 8. Effects of platelet attachment on monocyte adhesion to the endothelial cells *in vitro*.

RESULTATS – LES GRANDS BRULES

Variations phénotypiques chez les monocytes de brûlés graves

S.O. Cohen, Q. Ressaire, L. Homyrda, A. Mebazaa, A. Toubert, H. Moins-Teisserenc, M. Legrand, et A. Haziot.

Introduction

Les monocytes sont des cellules impliquées dans les réponses précoces aux stress. L'hétérogénéité de ce type cellulaire pose la question de la réponse particulière de chaque population qui le compose et des fonctions cellulaires développées au cours du processus. Les réponses immunitaires au stress se caractérisent par une alternance entre pro-inflammation initiale et anti-inflammation secondaire (Hotchkiss et al., 2013). Cette deuxième phase expose les patients aux risques d'infections avec des germes opportunistes, et est source de morbidité importante dans les centres de soins intensifs (Article annexe, Legrand et al., 2015). Cette phase de dépression des réponses immunitaires est associée à une reprogrammation des fonctions des monocytes, avec en particulier une faible réponse *ex vivo* aux stimuli inflammatoires (Munoz et al., 1991), un effondrement de l'expression des molécules HLA-DR (Liu et al., 2003; Venet et al., 2007; Yu et al., 2016), et une différenciation en cellules dendritiques induisant anergie et suppression immunitaire (Faivre et al., 2012).

Les brûlures graves entraînent de nombreuses variations de phénotypes et de fonctions des monocytes (Altman et al., 1977; Kobayashi et al., 2010; Yu et al., 2016). L'analyse des monocytes chez les patients brûlés présente l'avantage d'une connaissance précise de la date de début du stress. Ceci permet de pouvoir analyser les cellules tôt et avec un délai quasi-uniforme chez les patients. De plus, l'intensité du stress, en proportion de l'étendue de la brûlure, est relativement quantifiable. L'analyse des altérations phénotypiques des monocytes est cruciale pour comprendre les mécanismes qui mènent au dysfonctionnement des réponses inflammatoires et immunitaires.

Afin de caractériser les modifications de l'état des monocytes au cours de la brûlure, les monocytes de dix-huit patients brûlés prélevés en post-admission, et à 7 et 28 jours plus tard ont

été extensivement phénotypés. Ce travail a été effectué en collaboration avec le Dr. Matthieu Legrand du service d'Anesthésie Réanimation et Traitement Chirurgical des Grands Brûlés de l'Hôpital Saint-Louis. Les résultats obtenus, qui sont toujours en cours d'analyse, permettent de mettre en évidence des différences quantitatives au niveau des proportions des sous-populations de monocytes analysés ($sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^+$, $sm14^{dim}16^+$, $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^+$). La population $sm14^+16^{neg}$ étant fortement majoritaire, je me suis concentré sur ces cellules pour cette partie de l'analyse phénotypique des monocytes chez les grands brûlés. La recherche d'association entre les profils d'expression des sous-populations et l'évolution clinique contribuera à l'identification de marqueurs diagnostiques et pronostiques.

Ainsi, l'objectif de ce travail est la recherche :

- de particularités phénotypiques monocytaires communes chez les patients,
- d'associations entre les profils phénotypiques des monocytes de certains patients et leurs caractéristiques cliniques, ce qui permettrait d'identifier des marqueurs biologiques à des buts diagnostiques, pronostiques et d'évaluation des mesures thérapeutiques,
- plus spécifiquement, d'identifier des profils associés à un état d'immunodépression et de susceptibilité à l'infection.

Matériels et méthodes

Patients brûlés

Les échantillons de patients brûlés ont été collectés au service anesthésie réanimation et traitement chirurgical des grands brûlés (hôpital Saint-Louis, Paris, France). Les patients inclus dans le projet sont des patients brûlés donc la surface corporelle brûlée (SCB) est supérieure à 20%.

Purification des PBMC, marquages et analyses

Les cellules ont été purifiées, marquées et analysées comme décrit précédemment (Merah-Mourah et al., soumis). Brièvement, le sang des patients brûlés a été récolté dans trois tubes ACD (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) et les PBMC ont été séparés par gradient de densité. Les PBMC ont été lavés et les sites de fixations non-spécifiques ont été bloqués en incubant les cellules avec du PBS supplémenté avec 10% de sérum AB humain (Etablissement Français du Sang, Rungis, France).

Les cellules ont été marquées avec des anticorps monoclonaux (Table 3, Article 1) et remises en suspension avec du PBS supplémenté avec de l'EDTA à 0,5 mM.

La fluorescence des cellules marquées a été analysée avec le cytomètre en flux BDFACS Canto II (Becton Dickinson) en acquérant 1×10^6 évènements afin d'obtenir une analyse suffisamment extensive des monocytes (Merah-Mourah et al., soumis). Les données ont été analysées via le logiciel BDFACS Diva (Becton Dickinson) et Flow Jo (Treestar, Ashland, OR, USA).

Analyses t-SNE

Les données obtenues en cytométrie en flux ont été analysé via le logiciel Flowjo (Treestar). L'analyse t-SNE a été effectuée en utilisant les paramètres par défaut proposés par Flowjo (iterations = 1000, perplexity = 20, $\theta = 0,5$). Les données ont été sous-échantillonnées à 5000 monocytes $sm14^+16^{neg}$ par patients via la fonction « downsample », puis ont été fusionnées en

utilisant la fonction « concatenate » afin de pouvoir effectuer une analyse comparable sur l'ensemble des échantillons de patients.

Résultats

Caractérisation clinique des grands brûlés

Comme montré dans la Table I, notre groupe de patients brûlés constituait un ensemble cliniquement hétérogène. Les patients inclus dans l'étude présentaient tous une brûlure grave (SCB supérieure à 20%), mais différaient par quantités de paramètres personnels et cliniques tels que les co-morbidités, les complications diverses et les traitements. Les prélèvements ont été effectués en post-admission, 7 j, et 28 j plus tard, dans le respect des conditions éthiques, et permettent l'analyse aux temps précoces et la recherche de dynamique dans l'évolution des phénotypes monocytaires en relation avec l'état clinique. Les étapes successives de l'analyse des données ont été :

1. analyse des profils small/large et CD14/CD16 des patients : dot plots, quantifications/catégorisation,
2. analyse multiparamétrique dans chaque sous-population de monocytes,
3. analyse multiparamétrique cellule par cellule à l'intérieur de chaque sous-population et de manière non-supervisée.

La comparaison de profils phénotypiques monocytaires, dont nous savons la complexité (Article 1, Merah-Mourah et al., soumis), chez des patients hétérogènes (Table I) posait le risque de dispersion des associations et de difficulté à obtenir une vue synthétique des relations entre caractères biologiques et cliniques. Nous avons donc dans un premier temps cherché à grouper les patients suivant la présence et l'intensité des signes cliniques et biologiques répertoriés durant leur séjour en centre de soins intensifs. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel GEPHI pour générer une carte de connectivités entre les patients et les données cliniques (Figure 1). Chaque patient, représenté par un disque vert, est relié aux données cliniques (disque rose) qui lui correspondent, et le cas échéant chaque lien est pondéré par l'intensité du signe clinique/biologique quand celui-ci est quantitatif. Dans cette analyse, quatre groupes de patients peuvent être distingués :

- Groupe 1 : grand brûlé (GB) 6, GB13, GB18 et GB19,
- Groupe 2 : GB7, GB8 et GB15,
- Groupe 3 : GB4, GB9, GB12, GB14 et GB17,
- Groupe 4 : GB2, GB3, GB5, GB10, GB11 et GB16.

La taille (FSC) et la granulosité (SSC) des « small monocytes » et des « large monocytes » ne semblent pas être altérées. Le pourcentage de ces populations reste dans la moyenne de ce qui est observé chez les individus sains ($78,4 \pm 14,0\%$ pour les « small monocytes », $8,8 \pm 6,0\%$ pour les « large monocytes », Article 1).

Le profil phénotypique des « small monocytes » et des « large monocytes » en post-admission a été analysé en termes d'expression du CD14 et du CD16 (Table 2). Une amplification relative (en pourcentage) de la population $sm14^+16^+$ et/ou $sm14^{dim}16^+$ par rapport aux donneurs sains est considérée lorsque le pourcentage de l'une de ces populations est supérieur à 6,7% (limite haute du pourcentage de ces cellules retrouvé chez les individus sains, Article 1). Une diminution de l'expression du CD14 et du CD16 a également pu être observée chez certains patients. Concernant les « large monocytes », une diminution du pourcentage de la population $la14^+16^+$ est observé lorsque celui-ci est inférieur à 5% (limite basse du pourcentage de ces cellules retrouvé chez les individus sains, Article 1). Enfin, la population $la14^+16^{neg}$ peut présenter une diminution de l'expression du CD14, visible par un aspect incurvé de cette population. L'ensemble de ces modifications phénotypiques est détaillé dans la Table 2. L'analyse des profils ainsi définis indique que l'augmentation du pourcentage de monocytes $CD16^+$ « small » et « large » se retrouve chez les patients GB3, GB10, GB11, GB16 et GB19. On note que quatre de ces patients sont dans le groupe de connectivité 4 (Figure 1), et le cinquième, GB19, est proche de ce même groupe. De même, un profil CD14/CD16 incurvé chez les monocytes « large » avec aspect normal des monocytes « small » est présent chez les patients GB14 et GB17, qui sont tous deux dans le groupe 3 en relation étroite. Enfin, les patients à profil normal en post-admission (GB6, GB8 et GB18)

sont pour deux d'entre eux dans le groupe 1. Ces observations intéressantes représentent des pistes à approfondir dans l'exploration en cours des données générées dans ce travail et éventuellement dans de nouvelles investigations.

Caractérisation phénotypique des monocytes sm14⁺16^{neg} en post-admission chez les grands brûlés

Afin de caractériser plus en détail les altérations phénotypiques présentes chez les monocytes sm14⁺16^{neg} des grands brûlés, l'expression de quinze marqueurs (Table 3, Article 1) a été analysée chez les dix-huit patients brûlés. Les récepteurs analysés incluent les récepteurs Fc CD64 et CD32 en plus du CD16, les récepteurs de chimiokines CCR2, CCR6 et CX3CR1, des récepteurs impliqués dans la présentation des antigènes et des molécules de co-stimulations HLA-DR, CD86 et CD80, les molécules d'adhésions CD62L, CD162, CD43, CD49d et CD56, ainsi que le récepteur scavenger CD163 et la molécule CD7 faisant partie de la superfamille des immunoglobulines. Les résultats obtenus (Figure 3) sont représentés sous forme de bulles dont la taille correspond au pourcentage de cellules positives et la couleur reflète la moyenne d'intensité de fluorescence (Mean Fluorescence Intensity ou MFI). Chez la majorité des patients, les molécules d'adhésion CD162 (ligand de la P-sélectine) et CD62L (L-sélectine) sont exprimés fortement en termes de pourcentage et de MFI. Par contre, l'expression de l'intégrine $\alpha 4$ CD49d est sensiblement plus faible en MFI comparée aux individus sains (Article 1). L'intensité de l'expression du CD43 reste faible pour l'ensemble des patients, malgré un pourcentage de CD43 variable selon les individus. L'expression de HLA-DR est grandement diminuée en MFI mais aussi en pourcentage, comme attendu au cours d'un stress majeur (Venet et al., 2007; Yu et al., 2016). Seuls les patients GB8 et GB13 conservent un fort pourcentage de cellules positives pour HLA-DR, avec une MFI très faible. La molécule de co-stimulation CD86 est également faiblement exprimée chez les patients, avec un pourcentage de cellules positives variables. Ainsi, les molécules impliquées dans la présentation de l'antigène analysées ici sont très diminuées par rapport aux donneurs sains dans les monocytes sm14⁺16^{neg}. Les récepteurs pour le fragment Fc des Ig CD64 et CD32 ainsi que le récepteur à chimiokine CCR2 ont une expression très peu variable en pourcentage mais aussi en MFI chez l'ensemble des donneurs, excepté pour le pourcentage de CCR2 chez le patient GB4. Le récepteur CX3CR1 est très faiblement exprimé en MFI et en pourcentage comme généralement retrouvé pour les

monocytes $sm14^+16^{neg}$, excepté pour les patients GB4, GB5, GB9, GB18 et GB19 où le pourcentage de cellules positives varie entre 50 et 80%.

Des correspondances entre l'expression de ces marqueurs dans la sous-population $sm14^+16^{neg}$ et les profils cliniques rassemblés en groupes (Figure 1) ont été recherchées. On observe tout d'abord et de façon inattendue que les pourcentages de cellules positives pour l'expression de HLA-DR et CD43 sont fortement corrélés, avec un haut pourcentage pour les patients GB8, GB12, GB13, GB14, GB15, GB18 et GB19. Or, ces patients sont essentiellement présents dans les deux groupes de connectivités 1 et 2 de la Figure 1 : GB13, GB18 et GB19 sont trois des quatre patients du groupe 1 ; GB8 et GB15 sont deux des trois patients du groupe 2 ; les deux derniers patients (GB1 et GB14) sont dans le groupe 3, et les six patients du groupe 4 ont tous un très faible pourcentage de monocytes $sm14^+16^{neg}$ positif pour HLA-DR et CD43. La corrélation d'expression entre HLA-DR et CD43 (une molécule fortement et variablement glycosylée) est peu documentée. Chez les DC dérivées de monocytes (MoDC), l'engagement de CD43 induit une augmentation de l'expression d'HLA-DR (Fanales-Belasio et al., 1997). Une confirmation de ces associations sur une plus grande cohorte de patients sera nécessaire, ce qui permettrait d'envisager des investigations sur la signification biologique et clinique de ces associations.

Analyse t-SNE

Pour poursuivre cette approche exploratoire, une analyse non-supervisée de la population de monocytes $sm14^+16^{neg}$ des dix-huit patients en post-admission a été effectuée à l'aide de l'algorithme t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE). Cet algorithme permet la création d'un graphe à deux dimensions où l'expression de chaque marqueur considéré est prise en considération avec chaque cellule positionnée sous la forme d'un point. Ce type d'analyse permet la visualisation de données multidimensionnelles représentées sous la forme d'un simple graphe à deux dimensions. Les cellules ayant un phénotype similaire sont positionnées proches les unes des autres dans le graphe t-SNE à deux dimensions. Trois analyses ont été effectuées et diffèrent par les marqueurs qui ont été considérés : la première analyse t-SNE suivant les récepteurs Fc et récepteurs à chimiokines CD64, CD32, CCR2, CCR5 et CX3CR1 (FcR+ChR) (Figure 4), la seconde analyse selon les marqueurs essentiellement impliqués dans la présentation de l'antigène

CD80, CD86, HLA-DR, CD163 et CD7 (AgPres) (Figure 5), et la troisième analyse suivant les molécules d'adhésion CD62L, CD162, CD43, CD49d et CD56 (AdhMol) (Figure 6).

Comme montré précédemment pour les donneurs sains (Article 1), plusieurs profils sont identifiables et, étonnamment, sont partagés entre des patients différents définissant ainsi des groupes phénotypiques. La classification décrite (Article 1, Figure 2) est difficilement utilisable ici en raison de la forte dépression de l'expression de CD49d. Cependant, les associations entre patients diffèrent suivant les séries de marqueurs analysés. Ainsi, par exemple, le patient GB8 a un profil FcR+ChR similaire à celui des patients GB6, GB7 et GB10 (Figure 4), mais il est par contre comparable aux patients GB13 et GB15 pour le profil AgPres et à nouveau au patient GB15 pour le profil AdhMol. Les patients GB8 et GB15 sont par ailleurs dans le même groupe de connectivité (groupe 2, Figure 1) avec le patient GB7.

Des associations entre l'état clinique des patients et les groupes phénotypiques des patients ont été plus systématiquement recherchées. Les patients GB9, GB14 et GB17 du groupe t-SNE FcR+ChR-2 (Figure 4) sont tous trois dans le groupe de connectivité clinique Gephi-3 (Figure 1). De plus, les patients GB9 et GB17 partagent le profil t-SNE AgPres-2 (Figure 5), où se retrouvent également trois des quatre patients du groupe Gephi-1. Les monocytes des patients GB8 et GB15 sont phénotypiquement proches et font partie du groupe t-SNE AgPres-4 (Figure 5) et du groupe t-SNE AdhMol-7 (Figure 6). De plus, les données cliniques (Figure 1) tendent à rapprocher ces mêmes patients dans le groupe Gephi-2. Enfin, les patients GB3, GB5 et GB11 sont dans le groupe t-SNE AgPres-3 (Figure 5) et les patients GB2, GB5 et GB16 se retrouvent dans le groupe t-SNE AdhMol-1 (Figure 6). L'ensemble de ces patients semblent avoir des données cliniques proches car ils se trouvent tous dans le même groupe Gephi-4 (Figure 1).

De manière intéressante, les monocytes sm14⁺16^{neg} du patient GB4 semblent peu hétérogène en termes d'expression des récepteurs Fc et des récepteurs à chimiokines (Figure 4).

L'ensemble de ces résultats tendent à montrer qu'il est possible de regrouper les patients selon le phénotype de leurs monocytes, et que cela pourrait corrélérer avec les données cliniques.

Ces résultats indiquent, comme chez les donneurs sains (Article 1), l'existence de similarités entre patients. Ces similarités s'assemblent, suivant les caractères analysés (ici des groupes fonctionnels

FcR+ChR, AgPres, AdhMol) en groupes partiellement superposés. Cet enchevêtrement de similarités résulte du partage incomplet des facettes du phénotype monocyttaire de chaque patient. Sur l'ensemble des patients, cela génère un réseau multidimensionnel de similarités reflétant les phénotypes partagés. Les avancées dans l'analyse des réseaux complexes permettront de mieux appréhender les relations entre les données phénotypiques (Berlingiero et al., 2011). Surtout, le défi sera de discerner les rôles de chaque facette phénotypique dans les fonctions inflammatoires et immunitaires des monocytes et des cellules qui en dérivent (DC, macrophages) suivant le tissu et le contexte physiopathologique. Par ailleurs, il conviendra de déterminer si les similarités entre patients correspondent aux similarités inhérentes aux individus, comme celles trouvées entre sujets sains, ou si elles résultent de convergences induites par l'état pathologique de chacun. L'accès aux individus avant brûlure étant exclu, il serait possible d'analyser le phénotype monocyttaire au décours de la phase critique. Plusieurs études récentes, en particulier par l'analyse du système immunitaire en pré- et post-vaccination, suggèrent une stabilité sur le long terme des variations interindividuelles, malgré les perturbations occasionnelles induites par la pathologie et en l'absence de passage à la chronicité (Liston et al., 2016). Ainsi, une analyse des monocytes à distance de l'épisode traumatique pourrait révéler la part des convergences due au partage de phénotypes inhérents aux individus et celle résultant de la confluence vers un phénotype dicté par l'état pathologique.

Légendes des figures

Figure 1. Visualisation des connexions entre les patients brûlés et les données cliniques partagées.

Afin de déterminer la proximité des patients suivant les données cliniques et biologiques, une analyse de réseau a été effectuée. Les nœuds verts correspondent aux patients et les rouges représentent les données cliniques. Les données qualitatives sont tabulées suivant leur présence ou absence, et les données quantitatives sont sous forme de scores.

Cardior : cardiorythmie, Eth : éthyliste, Hypoth : hypothyroïdie, Obèse : obésité, Diab : Diabète, HTA : hypertension artérielle, PSY : pathologie psychiatrique, Inhal : inhalation de fumée, Inhal1/Inhal2 : stade de l'inhalation de fumée, Cyanokit : hydroxocobalamine, Cathéco : administration de catécholamines, SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë, EER : épuration extra-rénale, Bact : bactériémie, Death : mort du patient, IGS2 : indice de gravité simplifié, ABSI1 à ABSI4 : abbreviated burn severity index ou le score de sévérité de brûlure est séparé en 4 groupes, du moins grave (1) au plus grave (4), UBS1/UBS2 : unité de brûlure standard séparé en 2 groupes selon si grave (1) ou si la survie est exceptionnelle (2), et Sepsis0 à Sepsis3 : développement d'un sepsis séparé en 4 groupes selon le nombre de défaillances d'organes (le groupe sepsis3 incluant aussi les patients ayant plus de 3 défaillances d'organes).

Figure 2. Particularités phénotypiques des sous-populations monocytaires chez les patients brûlés prélevés en post-admission.

Les PBMC des dix-huits patients ont été marqués à l'aide d'anticorps dirigés contre CD14, CD16 et 15 autres molécules de surface (Article 1, Table 3). (A) Les modifications en termes d'expression du CD14 et du CD16 ainsi que les modifications d'aspect des populations de monocytes pour chaque patient grand brûlé sont décrits dans le tableau. Des graphes représentatifs de ces modifications sont présentés (B) pour les small monocytes et (C) pour les large monocytes.

Figure 3. Profils t-SNE des monocytes sm14⁺16^{neg} des grands brûlés : analyse suivant l'expression des marqueurs CD64, CD32, CCR2, CCR5 et CX3CR1.

Les monocytes sm14⁺16^{neg} identifiés par cytométrie de flux ont été analysés à l'aide de l'algorithme t-SNE suivant l'expression des marqueurs CD64, CD32, CCR2, CCR5 et CX3CR1. Les monocytes proches phénotypiquement sont également proches physiquement selon cette représentation. L'ensemble des monocytes chez tous les patients sont représentés en rouge, et ceux retrouvés chez le patient considéré est représenté en bleu. Les patients présentant des profils phénotypiques similaires ont été regroupés.

Figure 4. Profils t-SNE des monocytes sm14⁺16^{neg} des grands brûlés : analyse suivant l'expression des marqueurs CD80, CD86, HLA-DR, CD163 et CD7.

Les monocytes sm14⁺16^{neg} identifié par cytométrie de flux ont été analysés à l'aide de l'algorithme t-SNE suivant l'expression des marqueurs CD80, CD86, HLA-DR, CD163 et CD7. Les monocytes proches phénotypiquement sont également proches physiquement selon cette représentation. L'ensemble des monocytes chez tous les patients sont représentés en rouge, et ceux retrouvés chez le patient considéré est représenté en bleu. Les patients présentant des profils phénotypiques similaires ont été regroupés.

Figure 5. Profils t-SNE des monocytes sm14⁺16^{neg} des grands brûlés : analyse suivant l'expression des marqueurs CD62L, CD162, CD43, CD49d et CD56.

Les monocytes sm14⁺16^{neg} identifiés par cytométrie de flux ont été analysés à l'aide de l'algorithme t-SNE suivant l'expression des marqueurs CD62L, CD162, CD43, CD43 et CX3CR1. Les monocytes proches phénotypiquement sont également proches physiquement selon cette représentation. L'ensemble des monocytes chez tous les patients sont représentés en rouge, et ceux retrouvés chez le patient considéré est représenté en bleu. Les patients présentant des profils phénotypiques similaires ont été regroupés.

Figure 6. Phénotypes de la sous-population sm14⁺16^{neg} des grands brûlés en post-admission.

Les PBMC des dix-huit patients ont été marqués à l'aide d'anticorps dirigés contre CD14, CD16 et 15 autres molécules de surface (Article 1, Table 3) Le pourcentage de cellules positives pour les différents marqueurs est proportionnel à la taille des bulles, et la MFI est représenté suivant le code couleur indiqué en marge de la figure.

Patients	Age (ans)	Sexe	Durée de l'hospitalisation (jours)	Surface corporelle Brûlée (SCB)	Score ABSI	Score UBS	Score SOFA à l'arrivée	Développement d'un Sepsis	Décès à J28
GB2	78	F	40	25	7	91	2	oui	non
GB3	27	H	40	50	8	176	3	oui	non
GB4	61	H	2	51	12	80	3	oui	oui
GB5	22	H	48	55	8	118	4	non	non
GB6	80	H	41	20	6	35	0	oui	non
GB7	67	F	155	57	11	136	4	oui	non
GB8	72	F	1	38	11	128	13	non	oui
GB9	46	H	73	31	8	45	9	oui	non
GB10	64	F	11	25	8	34	6	oui	oui
GB11	41	H	28	20	4	35	0	oui	non
GB12	48	F	56	54	12	184	3	oui	non
GB13	22	H	25	19	3	29	0	non	non
GB14	54	F	85	40	10	160	7	oui	non
GB15	54	H	2	73	11	223	8	non	oui
GB16	58	H	48	40	9	121	0	oui	non
GB17	72	F	19	70	13	280	7	oui	oui
GB18	45	H	12	24	6	24	1	non	non
GB19	18	H	30	45	8	45	0	oui	Non

Table I. Données cliniques des patients brûlés.

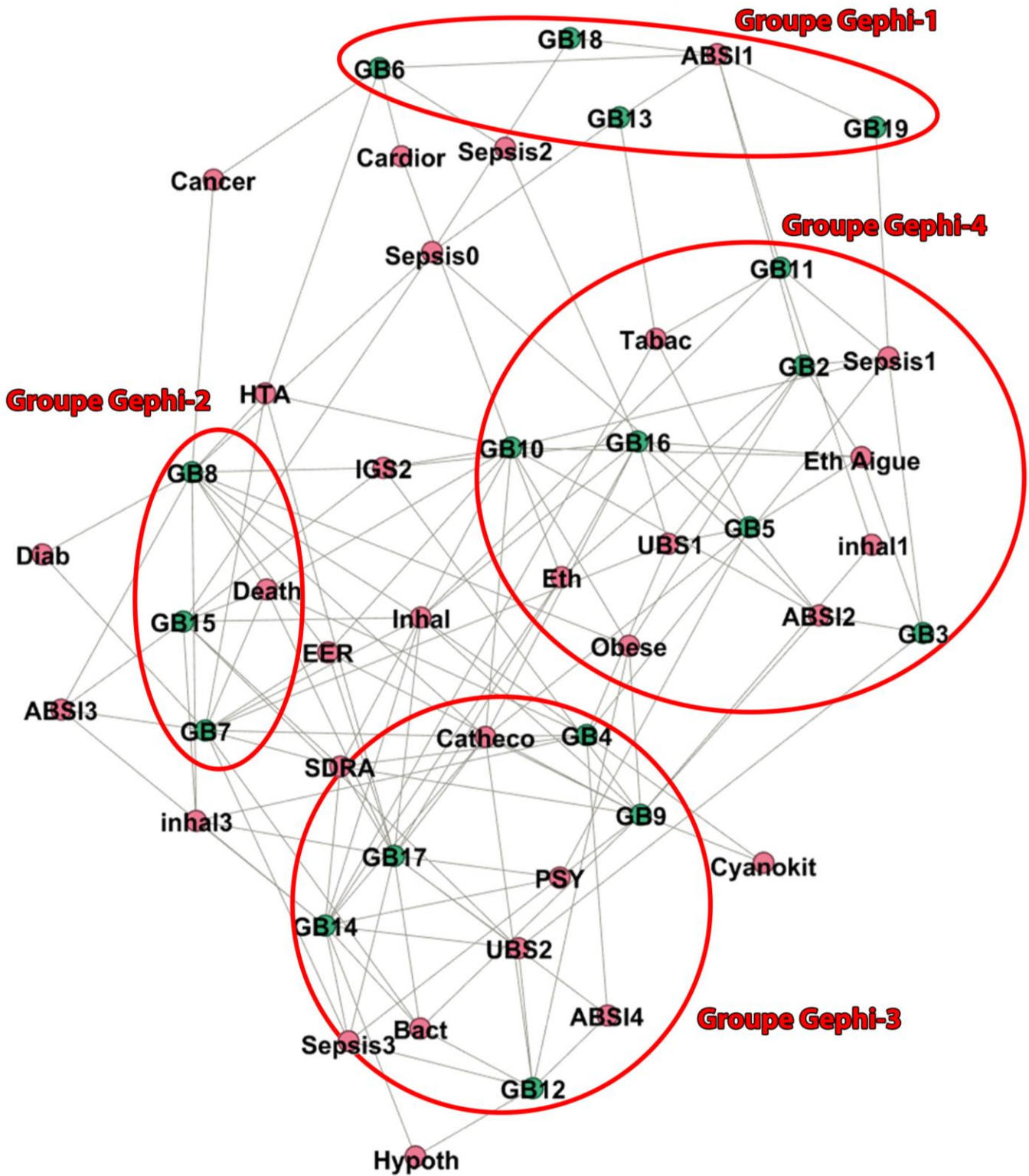
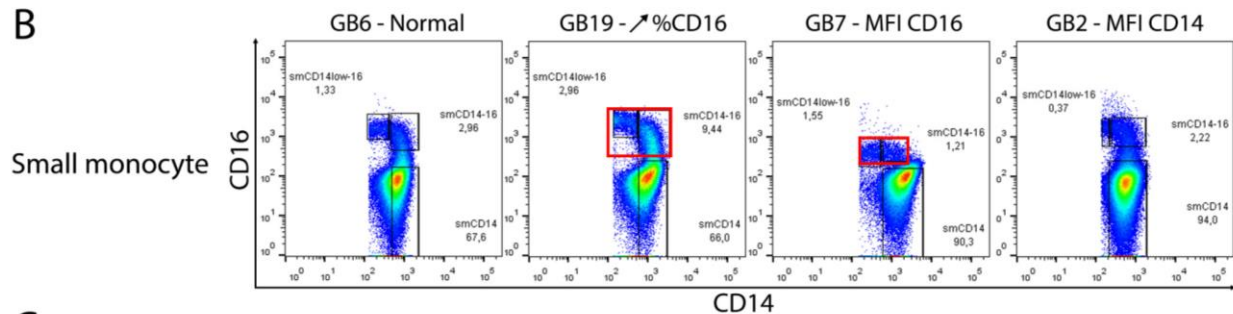


Figure 1. Visualisation des connexions entre les patients brûlés et les données cliniques.

A

Profil	Small monocytes				Large monocytes			
	Normal	Augmentation du pourcentage de CD16	Diminution de l'expression de CD16	Diminution de l'expression de CD14	Normal	Aspect incurvé	Augmentation du pourcentage de CD16	Diminution du pourcentage de CD16
GB3		X					X	
GB10		X					X	
GB11		X				X	X	
GB16		X	X				X	
GB19		X					X	
GB9	X					X	X	
GB14	X					X		
GB17	X					X		
GB6	X				X			
GB8	X				X			
GB18	X				X			
GB4			X				X	
GB5			X					X
GB7			X		X			
GB15			X					X
GB2				X	X			
GB12				X	X			
GB13	X					X		X

B



C

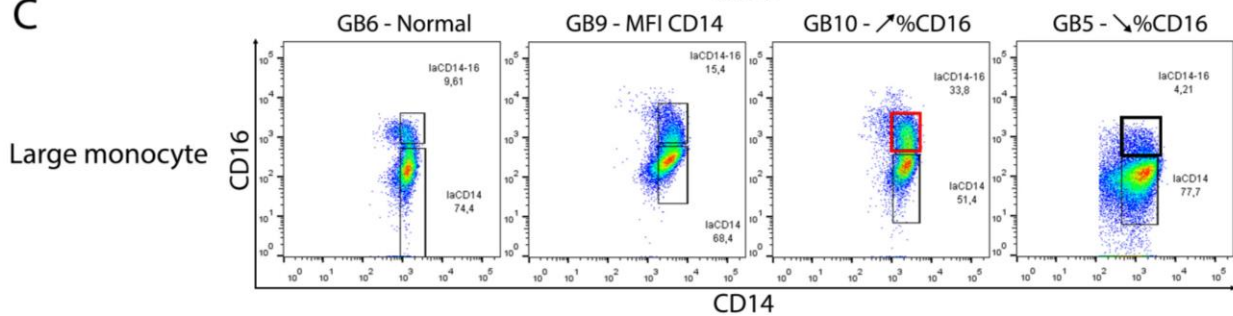


Figure 2. Particularités phénotypiques des sous-populations monocytaire chez les patients brûlés en post-admission.

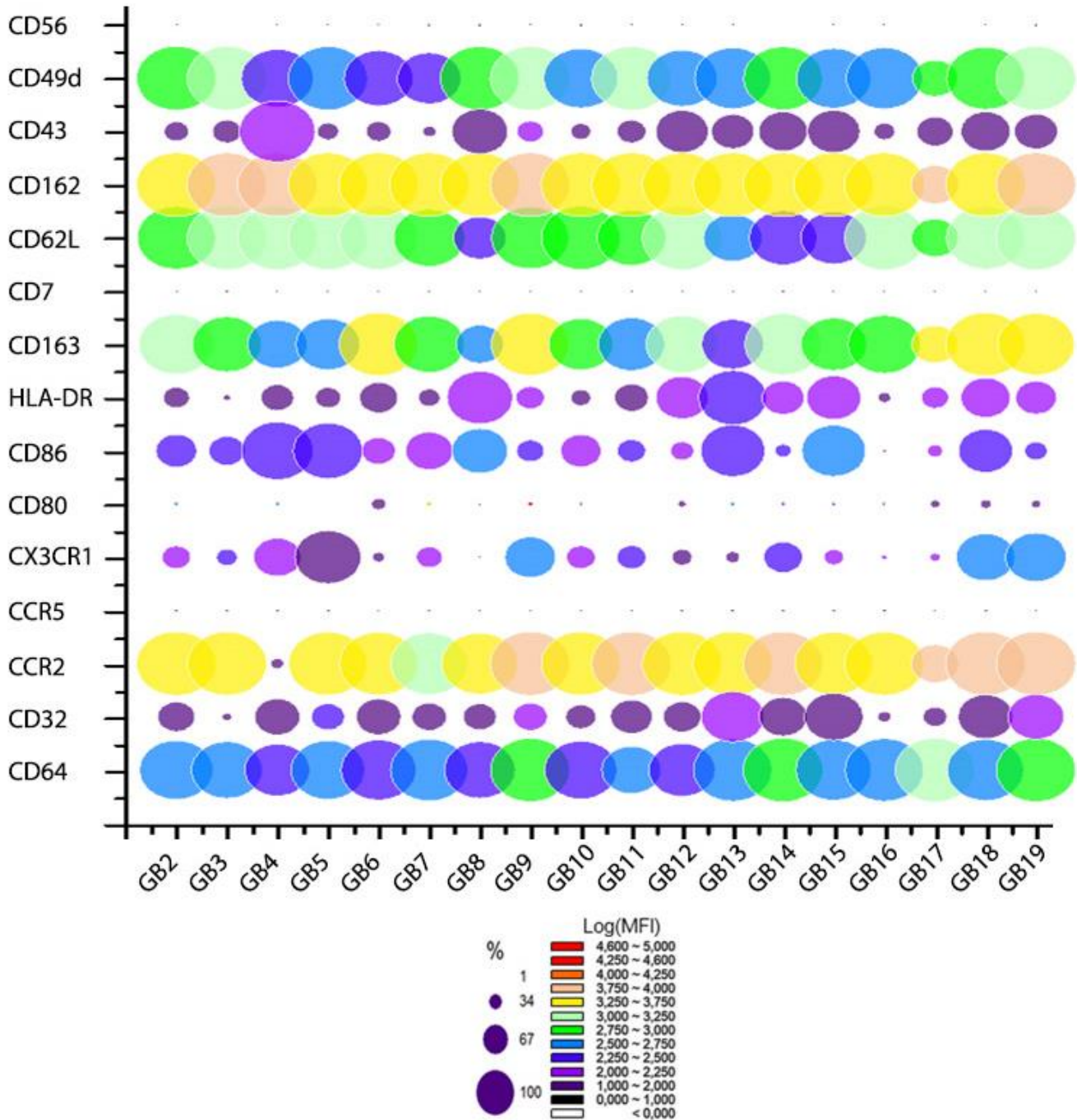


Figure 3. Phénotypes de la sous-population sm14⁺16^{neg} des grands brûlés en post-admission.

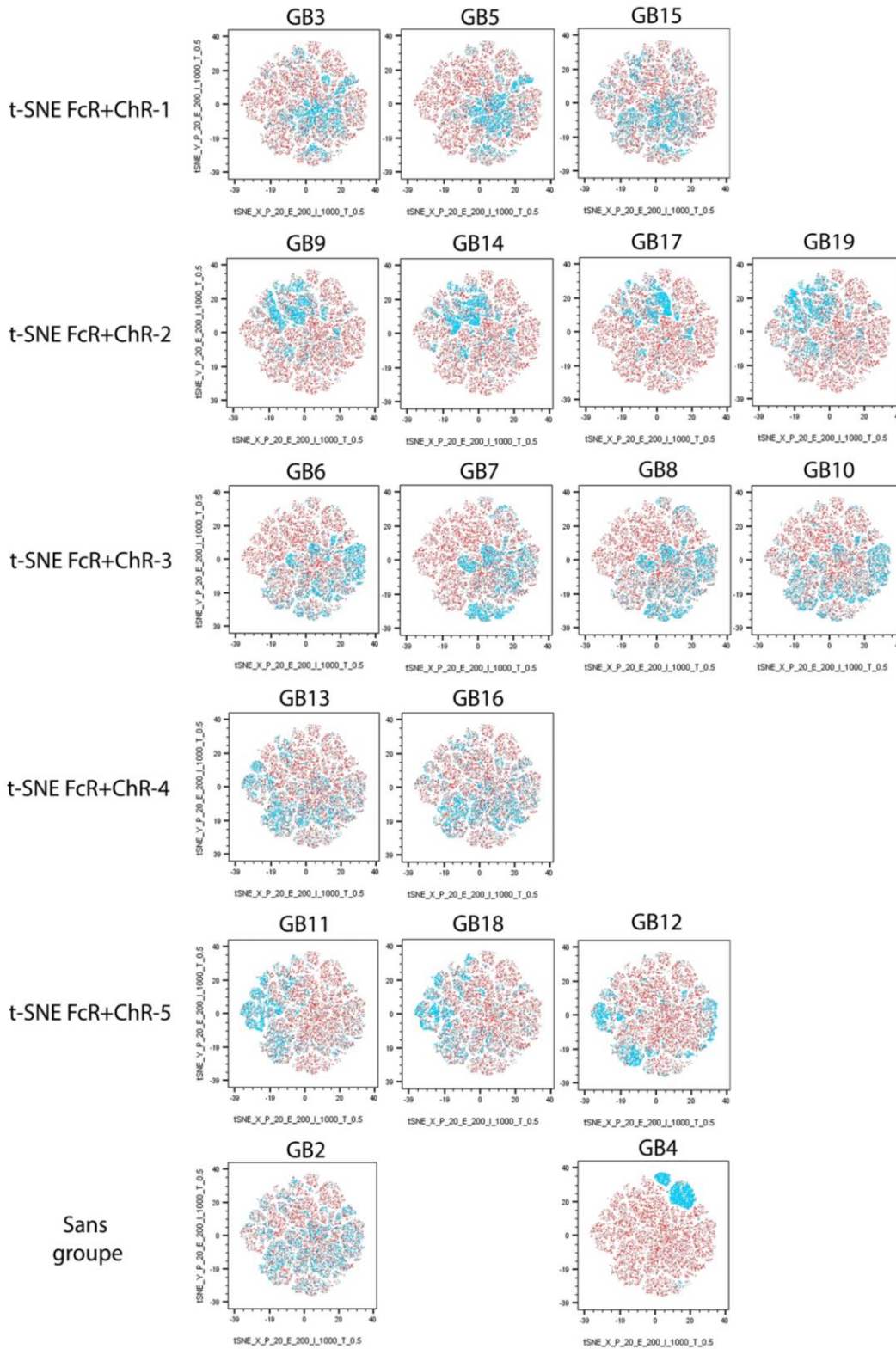


Figure 4. Profils t-SNE des monocytes sm14⁺16^{neg} des grands brûlés : analyse suivant l'expression des marqueurs CD64, CD32, CCR2, CCR5 et CX3CR1.

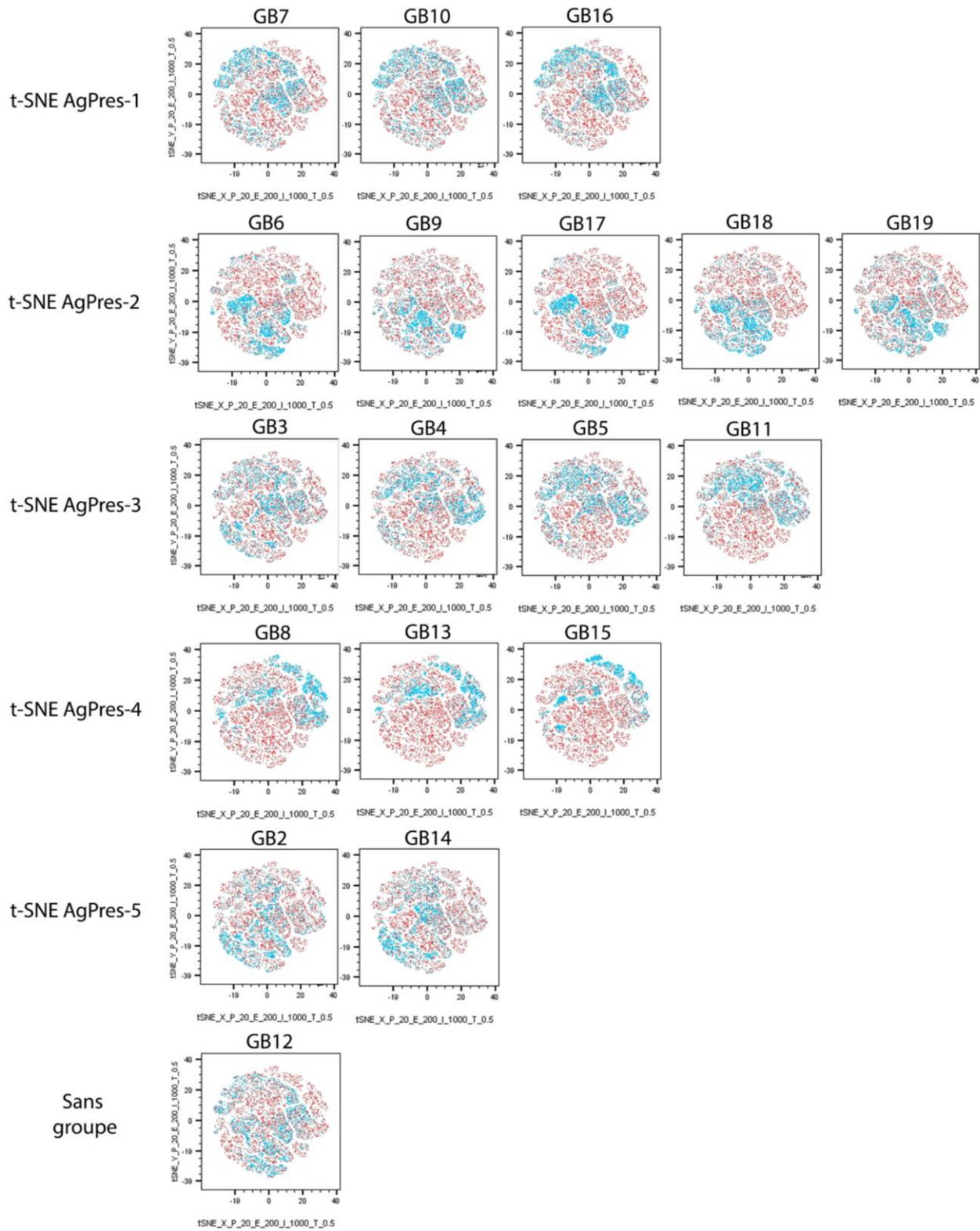


Figure 5-4. Profils t-SNE des monocytes sm14⁺16^{neg} des grands brûlés : analyse suivant l'expression des marqueurs CD80, CD86, HLA-DR, CD163 et CD7.

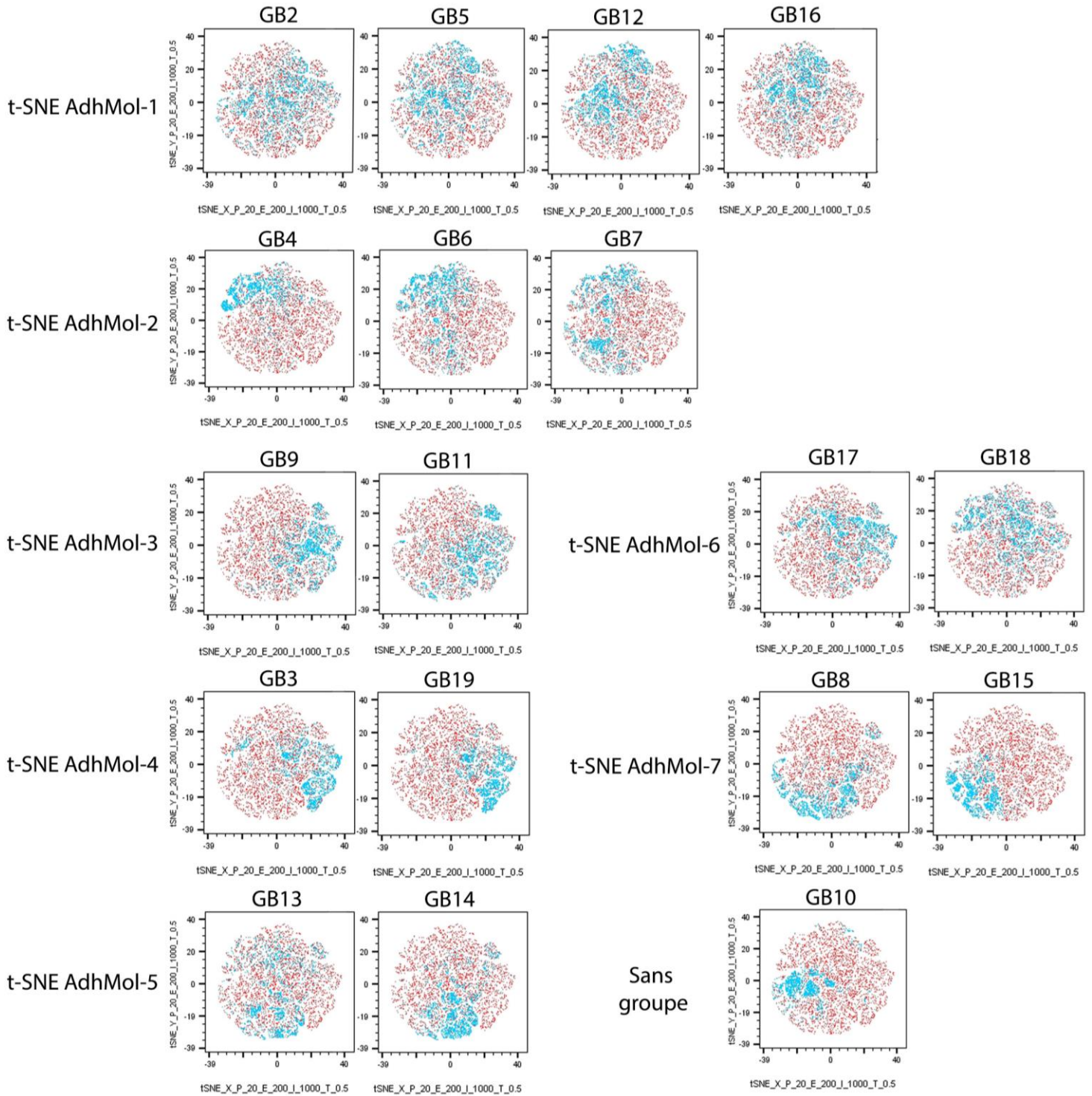


Figure 6-5. Profils t-SNE des monocytes sm14⁺16^{neg} des grands brûlés : analyse suivant l'expression des marqueurs CD62L, CD162, CD43, CD49d et CD56.

D. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de mieux caractériser les différences morphologiques et fonctionnelles des nouvelles populations de « large » monocytes $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^+$, mais également des populations « small » monocytes $sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^+$ et $sm14^{dim}16^+$.

Au cours de cette thèse, de nombreuses mises au point ont été effectuées afin de s'assurer de la reproductibilité des expériences mais aussi de leur pertinence. Par exemple, les différentes populations de monocytes identifiées dans l'article 1 ont été analysées sur le cytomètre en flux BDFACS Canto II (Becton Dickinson) alors que ces mêmes cellules pour les différents tests fonctionnels ont été purifiées à l'aide du trieur cellulaire BDFACS Aria III (Becton Dickinson). Malgré l'utilisation des mêmes lasers, les réglages de la puissance des lasers ainsi que les filtres utilisés sont différents et la sensibilité des détecteurs FSC et SSC ne sont pas exactement similaires. Afin d'identifier les populations d'intérêt sans ambiguïté sur les deux instruments, j'ai effectué des analyses de monocytes provenant des mêmes échantillons sanguins de donneurs sains sur les deux appareils, en parallèle. Bien que les populations « small monocytes » et « large monocytes » restent aisément discernables, cela a révélé les différences de résolution des deux populations entre les deux appareils : il est plus aisé de distinguer les populations small et large en FSC/SSC sur le cytomètre BDFACS Canto II. Néanmoins, les proportions de chaque population restent identiques d'un cytomètre à l'autre.

De plus, la question des contrôles à utiliser est importante pour s'assurer que les résultats sont comparables d'un donneur à un autre. La comparaison entre l'utilisation de contrôles isotypiques et l'utilisation des FMO (fluorescence minus one) a été effectuée. Le contrôle FMO d'un fluorochrome est constitué de l'ensemble des fluorochromes utilisés, excepté celui qui est mesuré. J'ai effectué un marquage sur deux donneurs sains en utilisant les isotypes contrôles correspondants aux anticorps utilisés et les FMO correspondants. Les résultats de cette expérience ont permis de confirmer que ces deux techniques étaient équivalentes selon nos conditions de marquages. L'utilisation de contrôles isotypiques a été conservée pour la cohérence avec les résultats précédents. De plus, contrairement aux analyses faites sur d'autres types cellulaires comme les lymphocytes, les contrôles FMO ou isotypiques doivent être réalisés pour chaque expérience en

raison du bruit de fond inhérent aux monocytes et ne peuvent être réutilisables d'une expérience à l'autre. Les contrôles isotypiques présentent alors un avantage pratique et non-négligeable vis-à-vis du coût.

L'analyse de l'expression de facteurs de transcription par qRT-PCR des populations de monocytes a permis de mettre en évidence certains facteurs de transcription qui permettraient de discriminer entre les différentes populations. Il serait intéressant d'approfondir cette analyse en analysant un plus grand nombre de facteurs de transcription sur puce ou RNA-seq afin d'obtenir des profils d'expression propre à chaque population. Ce type d'analyse serait pertinent pour l'étude de biopsie cutanée de grands brûlés, par exemple, où l'analyse par cytométrie en flux serait difficile à réaliser sur cellules extraites des tissus, mais aussi afin de pouvoir déterminer et affiner l'identification fonctionnelle des populations de monocytes. Le rôle des facteurs de transcription dans ces populations peut être approfondi par des techniques de blocages, comme par l'utilisation de siRNA.

L'une des populations de cellules identifiées au cours de ce projet est la population small granular cells (SGC) (Figure 1, Article 1). Ces cellules expriment peu ou pas le CD14 et n'exprime pas HLA-DR. Ce phénotype évoque la possibilité d'une analogie avec les cellules suppressives myéloïdes (myeloid-derived suppressor cells ou MDSC). Chez les donneurs sains, les SGC expriment fortement le CD16. De manière intéressante, chez les dix-huit patients brûlés analysés, l'expression du CD16 par ces cellules est extrêmement variable, et n'est pas identique à l'expression du CD16 des SGC de donneurs sains. Voulant approfondir le rôle de ces cellules, une étude a été amorcée sur la fonction des SGC. Le phénotype évoquant les MDSC, je me suis intéressé à la fonction suppressive que pourrait avoir ces cellules. Ainsi, après avoir purifié les populations de SGC selon l'expression du CD16, elles ont été mises en coculture avec des lymphocytes T allogéniques, marqués au CellTrace CFSE et activés par des billes anti-CD3/CD28. Ainsi, les SGC semblent avoir tendance à supprimer fortement la prolifération des lymphocytes T allogéniques. Néanmoins, il faudrait réitérer les expériences sur un nombre de donneurs plus élevé, mais également résoudre certains soucis techniques de reproductibilité : pour certaines conditions effectuées en triplicat, on ne pouvait observer de fonctions suppressives par les SGC que sur deux réplicats sur trois. Il serait donc intéressant de résoudre ces problèmes techniques et de poursuivre l'analyse fonctionnelle de cette population, que ce soit sur des SGC issues de donneurs sains mais

également sur des SGC issues de patients grands brûlés au vu des variations phénotypiques qu'elles subissent dans cette pathologie.

Concernant l'analyse des patients grands brûlés, les résultats présentés sont restreints à la population $sm14^+16^{neg}$ en post-admission. Ceci en raison du temps considérable pris par le traitement des échantillons avec le logiciel t-SNE et le temps d'analyse des données obtenues. J'ai été donc contraint de limiter le nombre de sous-populations analysées et les temps de prélèvement à présenter dans ce mémoire. Le choix des $sm14^+16^{neg}$ pour initier cette analyse repose sur le fait que cette population est très largement majoritaire parmi les monocytes et le nombre de cellules à inclure dans l'analyse n'est pas un facteur limitant pour cette population. Néanmoins, l'ensemble de populations identifiées sont en cours d'analyse et les profils t-SNE sont actuellement en cours de génération. Avec l'ensemble des résultats en post-admission mais aussi à J7 et à J28 après admission, il sera possible d'analyser les variations phénotypiques que subissent les monocytes au cours du temps et de l'évolution clinique des patients. Les résultats préliminaires tendent à montrer qu'il existerait une dynamique des variations phénotypiques au cours du temps. Ces variations pourraient être retrouvées chez plusieurs patients, mais survenant à des temps différents suivant les patients. De plus, il a été intéressant de remarquer que la population de monocytes spécifiquement dédiée aux réponses Th2 identifiée dans l'article 2 est présente à un très fort pourcentage à J7 chez la majorité des patients grands brûlés. L'un des prochains objectifs concernant cette partie du projet consistera donc à isoler et purifier cette population chez les patients brûlés à J7 et de vérifier si elle conserve leur fonction inductrice de réponses Th2.

L'identification d'une population de monocytes sanguins spécifiquement dédiée aux réponses Th2 chez des individus sains s'oppose à la représentation actuelle des monocytes considérés comme des cellules de l'immunité innée sans prédétermination et s'orientant vers des fonctions diverses dictées par l'environnement tissulaire. Bien que cet aspect plastique de la biologie des monocytes ait été plusieurs fois démontré dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que tous les monocytes ne suivraient pas ce schéma de spécialisation fonctionnelle. Certaines populations de monocytes pourraient donc suivre une voie de développement différente, les engageant dans un programme d'expression génique aboutissant à une fonction immunitaire déterminée dès le stade circulant. Il est également possible que l'ensemble des monocytes serait prédéterminé vers une fonction particulière mais qui peut être

contrecarrée dans les conditions fortement orientées des modèles *in vitro* et *in vivo*. Afin de mieux caractériser la réponse des monocytes dédiés aux réponses Th2 présentée dans ce manuscrit, ces monocytes pourraient être analysés dans des conditions différentes, notamment par l'utilisation de stimuli de maturation différent du LPS comme l'IFN de type I, ou l'anti-CD40. Ces voies d'activation diffèrent fonctionnellement du LPS (Castiello et al., 2011). La maturation des MoDC par le LPS, utilisée dans ce travail, induit une augmentation de l'expression de nombreux gènes codant pour des chimiokines tels que CCL4, CCL5, CCL18 et CCL20 qui sont impliquées dans le recrutement des monocytes, des DC immatures, des lymphocytes T et B, des granulocytes et des cellules NK. Une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion telles que la molécule ICAM1 a également été démontrée. L'augmentation de l'expression génique de ces chimiokines et de la molécule ICAM1 a également été retrouvée au niveau protéique. Les fonctions associées à ces molécules sont notamment le recrutement d'une grande variété de cellules immunitaires, et à l'activation d'une réponse immune contre le pathogène. La maturation des MoDC par l'IFN de type I induit l'expression du CXCR3L, des chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL11 et des cytokines tels que l'IL-15. Ces molécules sont fortement associées aux réponses Th1. La maturation des MoDC par l'IFN de type I induirait donc l'activation de la réponse immunitaire orientée vers un profil Th1. La stimulation des MoDC par l'anti-CD40 permettrait plutôt une orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th2, induisant une augmentation de l'expression du CCL17 et des récepteurs à l'IL-10R, à l'IL-13 et au GM-CSF. L'ensemble de ces résultats (Castiello et al., 2011) a cependant été obtenu à partir de monocytes totaux, et les effets des différents signaux de maturation sur des sous-populations restent à déterminer.

Ainsi, l'utilisation de ces différents stimuli de maturation permettrait de déterminer si la fonction de la population de monocytes dédiés aux réponses Th2 est prédéterminée, ou si cette population conserve une certaine plasticité si les conditions sont fortement orientées vers un autre type de réponse immunitaire.

L'identification d'une population de monocytes dédiée aux réponses Th2 serait d'un grand intérêt en pathologie, notamment dans le contexte de maladies dont les réponses immunitaires sont orientées vers la voie Th2 comme l'asthme ou l'allergie (Hoseini-Shahrestanak et al., 2018). En termes d'applications thérapeutiques, cette avancée pourrait aider au monitoring des patients afin d'analyser les variations de cette population au cours de l'évolution de la maladie, lors du

traitement et éventuellement être prédictif d'une possible aggravation. Il serait donc intéressant d'analyser ces cellules chez des patients et d'étudier leur capacité à induire une différenciation des lymphocytes T vers la voie Th2 ou les autres types de réponses qu'ils peuvent induire. Ils peuvent également être la cible de thérapeutiques, notamment dans le cas où ces cellules sont amplifiées et délétères pour le patient. A l'inverse, si leur présence est associée à une évolution bénéfique chez les patients, elles pourraient être ciblées pour tenter d'induire leur expansion.

La caractérisation morphologique des monocytes qui a également permis de mettre en évidence des associations préférentielles de certaines populations de monocytes à des plaquettes a été effectué à l'aide du cytomètre en images Amnis Imagestream X. L'utilisation de cette technique a ajouté certaines contraintes comparativement à la cytométrie en flux classique. Les capacités de l'appareil permettent d'enregistrer un grand nombre d'évènements, mais à une vitesse moindre comparativement au cytomètre en flux classique. Aussi, le fait d'enregistrer une image pour chaque évènement augmente considérablement le temps d'analyse pour les expériences où beaucoup d'évènements sont enregistrés pour pouvoir analyser de petites sous-populations, ce qui rend l'exploitation des données difficiles. La limite sur le temps d'acquisition a nécessité le traitement des échantillons sanguins le lendemain de leur prélèvement. Des études ont démontré que l'activation plaquettaire et leur agrégation pouvaient être influencés par le temps de conservation de l'échantillon sanguin avant la purification des cellules (Dijkstra-Tiekstra et al., 2011). Ainsi, afin de vérifier l'impact du traitement de l'échantillon le lendemain de son prélèvement, des tests ont été effectués afin de comparer les résultats obtenus sur les échantillons de sang frais et ceux obtenus sur des échantillons de deux autres donneurs sains mais qui ont été traités le lendemain du prélèvement. Aucune modifications morphologiques en termes de FSC et de SSC, ni modifications phénotypiques en termes d'expression du CD14, du CD16, CD42b et du CD62P, ni aucune différences en termes de nombre de plaquettes associées aux différentes populations de monocytes n'ont pu être observées. Les observations faites sur les échantillons analysés ne semblent donc pas être biaisées par le temps, une nuit à température ambiante, pendant lequel les échantillons ont été conservés avant traitement. Par ailleurs, le temps d'acquisition des données et d'analyse est un frein important qu'il faut prendre en considération pour la caractérisation de petites populations de cellules qui demandent l'acquisition d'un grand nombre d'évènements.

L'algorithme d'analyse t-SNE qui a été utilisé pour l'analyse des monocytes de grands brûlés est un des outils informatiques disponibles d'analyse des données de cytométrie. En plus de l'automatisme qu'apporte cette approche, son usage permet d'éviter le biais éventuel de l'analyse manuelle, tels qu'une composante subjective dans le fenêtrage des populations de cellules. Ce type d'analyse permet également d'aborder l'analyse des populations de monocytes en prenant en compte le grand nombre de marqueurs utilisés dans leur ensemble. L'utilisation généralisée de ce type d'analyse permettrait d'envisager une comparaison des résultats entre laboratoires meilleure qu'elle ne l'est actuellement.

L'analyse t-SNE a également permis de rapprocher un grand nombre de données cliniques et les profils d'expression des récepteurs et marqueurs monocytaires qui pourront être davantage détaillés dans des analyses prochaines. Le choix des marqueurs à analyser par cette méthode sera affiné suivant les résultats obtenus afin de mieux déterminer les marqueurs qui seraient corrélés à certaines données cliniques.

E. BIBLIOGRAPHIE

Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 939–951.

Aghaeepour, N., Finak, G., Dougall, D., Khodabakhshi, A.H., Mah, P., Obermoser, G., Spidlen, J., Taylor, I., Wuensch, S.A., Bramson, J., et al. (2013). Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat. Methods* *10*, 228–238.

Ahmad, F., Boulaftali, Y., Greene, T.K., Ouellette, T.D., Poncz, M., Feske, S., and Bergmeier, W. (2011). Relative contributions of stromal interaction molecule 1 and CalDAG-GEFI to calcium-dependent platelet activation and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* *9*, 2077–2086.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193–197.

Alcántara-Hernández, M., Leylek, R., Wagar, L.E., Engleman, E.G., Keler, T., Marinkovich, M.P., Davis, M.M., Nolan, G.P., and Idoyaga, J. (2017). High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity* *47*, 1037-1050.e6.

Altman, L.C., Furukawa, C.T., and Klebanoff, S.J. (1977). Depressed mononuclear leukocyte chemotaxis in thermally injured patients. *J. Immunol.* *119*, 199–205.

Amir, E.D., Davis, K.L., Tadmor, M.D., Simonds, E.F., Levine, J.H., Bendall, S.C., Shenfeld, D.K., Krishnaswamy, S., Nolan, G.P., and Pe'er, D. (2013). viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat. Biotechnol.* *31*, 545–552.

Amoruso, A., Sola, D., Rossi, L., Obeng, J.A., Fresu, L.G., Sainaghi, P.P., Pirisi, M., and Brunelleschi, S. (2016). Relation among anti-rheumatic drug therapy, CD14(+)CD16(+) blood monocytes and disease activity markers (DAS28 and US7 scores) in rheumatoid arthritis: A pilot study. *Pharmacol. Res.* *107*, 308–314.

Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S.K., Luscinskas, F.W., and Gabuzda, D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.* *197*, 1701–1707.

Antonchuk, J., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* *109*, 39–45.

Anuradha, R., Munisankar, S., Bhootra, Y., Jagannathan, J., Dolla, C., Kumaran, P., Nutman, T.B., and Babu, S. (2016). IL-10- and TGF β -mediated Th9 Responses in a Human Helminth Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *10*.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* *204*, 1057–1069.

- Arturson, G. (1961). Pathophysiological aspects of the burn syndrome with special reference to liver injury and alterations of capillary permeability. *Acta Chir. Scand. Suppl. Suppl 274*, 1–135.
- Arturson, G. (1985). Neutrophil granulocyte functions in severely burned patients. *Burns. Incl. Therm. Inj. 11*, 309–319.
- Ashman, N., Macey, M.G., Fan, S.L., Azam, U., and Yaqoob, M.M. (2003). Increased platelet-monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. *Nephrol. Dial. Transplant. 18*, 2088–2096.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science 317*, 666–670.
- Aulick, L.H., Wilmore, D.W., Mason, A.D., and Pruitt, B.A. (1977). Influence of the burn wound on peripheral circulation in thermally injured patients. *Am. J. Physiol. 233*, 520–526.
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., et al. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J. Exp. Med. 207*, 1273–1281.
- de Baey, A., Mende, I., Riethmueller, G., and Baeuerle, P.A. (2001). Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. *Eur. J. Immunol. 31*, 1646–1655.
- Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol. 6*, 498–510.
- Bastian, M., Heymann, S., and Jacomy, M. (2009). Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. *Third Int. AAAI Conf. Weblogs Soc. Media 361–362*.
- Basu, R., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2013). The Th17 family: flexibility follows function. *Immunol. Rev. 252*, 89–103.
- Baxter, C.R. (1974). Fluid volume and electrolyte changes of the early postburn period. *Clin. Plast. Surg. 1*, 693–703.
- Belge, K.-U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol. 168*, 3536–3542.
- Bennett, J.S. (2005). Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J. Clin. Invest. 115*, 3363–3369.
- Bergmeier, W., Piffath, C.L., Goerge, T., Cifuni, S.M., Ruggeri, Z.M., Ware, J., and Wagner, D.D. (2006). The role of platelet adhesion receptor GPIIb β far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. 103*, 16900–16905.

- Berlingerio, M., Coscia, M., Giannotti, F., Monreale, A., and Pedreschi, D. (2011). Foundations of Multidimensional Network Analysis. In 2011 International Conference on Advances in Social Networks Analysis and Mining, pp. 485–489.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 1–5.
- Biasucci, L.M., Vitelli, A., Liuzzo, G., Altamura, S., Caligiuri, G., Monaco, C., Rebuffi, A.G., Ciliberto, G., and Maseri, A. (1996). Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* *94*, 874–877.
- Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009). Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* *23*, 177–189.
- Blumenstein, M., Boekstegers, P., Fraunberger, P., Andreesen, R., Ziegler-Heitbrock, H.W., and Fingerle-Rowson, G. (1997). Cytokine production precedes the expansion of CD14+CD16+ monocytes in human sepsis: a case report of a patient with self-induced septicemia. *Shock* *8*, 73–75.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* *6*, 338–344.
- Bournazos, S., Rennie, J., Hart, S.P., Fox, K.A.A., and Dransfield, I. (2008). Monocyte Functional Responsiveness After PSGL-1–Mediated Platelet Adhesion Is Dependent on Platelet Activation Status. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1491–1498.
- Bover, L.C., Cardo-Vila, M., Kuniyasu, A., Sun, J., Rangel, R., Takeya, M., Aggarwal, B.B., Arap, W., and Pasqualini, R. (2007). A Previously Unrecognized Protein-Protein Interaction between TWEAK and CD163: Potential Biological Implications. *J. Immunol.* *178*, 8183–8194.
- Boyette, L.B., Macedo, C., Hadi, K., Elinoff, B.D., Walters, J.T., Ramaswami, B., Chalasani, G., Taboas, J.M., Lakkis, F.G., and Metes, D.M. (2017). Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE* *12*.
- Boyum, A. (1974). Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* *4*, 269–274.
- Brass, L.F., Wannemacher, K.M., Ma, P., and Stalker, T.J. (2011). Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury. *J. Thromb. Haemost.* *9 Suppl 1*, 66–75.
- Brodin, P., and Davis, M.M. (2017). Human immune system variation. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 21–29.
- Brodin, P., Jojic, V., Gao, T., Bhattacharya, S., Angel, C.J.L., Furman, D., Shen-Orr, S., Dekker, C.L., Swan, G.E., Butte, A.J., et al. (2015). Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* *160*, 37–47.
- Brown, R.A., Lip, G.Y.H., Varma, C., and Shantsila, E. (2018). Impact of Mon2 monocyte-platelet aggregates on human coronary artery disease. *Eur. J. Clin. Invest.* *48*, e12911.

- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C.Y., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L.H., et al. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* *112*, 3264–3273.
- Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., and Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* *153*, 362–375.
- Castiello, L., Sabatino, M., Jin, P., Clayberger, C., Marincola, F.M., Krensky, A.M., and Stroncek, D.F. (2011). Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *60*, 457–466.
- Celi, A., Pellegrini, G., Lorenzet, R., De Blasi, A., Ready, N., Furie, B.C., and Furie, B. (1994). P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 8767–8771.
- Chaipan, C., Soilleux, E.J., Simpson, P., Hofmann, H., Gramberg, T., Marzi, A., Geier, M., Stewart, E.A., Eisemann, J., Steinkasserer, A., et al. (2006). DC-SIGN and CLEC-2 Mediate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capture by Platelets. *J. Virol.* *80*, 8951–8960.
- Chapman, L.M., Aggrey, A.A., Field, D.J., Srivastava, K., Ture, S., Yui, K., Topham, D.J., Baldwin, W.M., and Morrell, C.N. (2012). Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I. *J. Immunol.* *189*, 916–923.
- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., and Gluckman, J.C. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* *27*, 431–441.
- Chen, H.M., Zhang, P., Voso, M.T., Hohaus, S., Gonzalez, D. a, Glass, C.K., Zhang, D.E., and Tenen, D.G. (1995). Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood* *85*, 2918–2928.
- Chen, L., Ge, B., Casale, F.P., Vasquez, L., Kwan, T., Garrido-Martín, D., Watt, S., Yan, Y., Kundu, K., Ecker, S., et al. (2016a). Genetic Drivers of Epigenetic and Transcriptional Variation in Human Immune Cells. *Cell* *167*, 1398-1414.e24.
- Chen, L., Ge, B., Casale, F.P., Vasquez, L., Kwan, T., Garrido-Martín, D., Watt, S., Yan, Y., Kundu, K., Ecker, S., et al. (2016b). Genetic Drivers of Epigenetic and Transcriptional Variation in Human Immune Cells. *Cell* *167*, 1398-1414.e24.
- Chiba, S. (2006). Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells* *24*, 2437–2447.
- Chow, K.V., Sutherland, R.M., Zhan, Y., and Lew, A.M. (2017). Heterogeneity, functional specialization and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* *95*, 244–251.
- Chu, C.-C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Grys, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., et al. (2012). Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J. Exp. Med.* *209*, 935–945.

- Cisse, B., Caton, M.L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N.S., Kant, S.G., et al. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* *135*, 37–48.
- Clemetson, K.J. (2012). Platelets and primary haemostasis. *Thromb. Res.* *129*, 220–224.
- Clemetson, J.M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T.N., and Clemetson, K.J. (1999). The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J. Biol. Chem.* *274*, 29019–29024.
- Collison, J.L., Carlin, L.M., Eichmann, M., Geissmann, F., and Peakman, M. (2015). Heterogeneity in the Locomotory Behavior of Human Monocyte Subsets over Human Vascular Endothelium In Vitro. *J. Immunol.* *195*, 1162–1170.
- Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* *124*, 263–266.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., et al. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* *33*, 375–386.
- Czepluch, F.S., Kuschicke, H., Dellas, C., Riggert, J., Hasenfuss, G., and Schäfer, K. (2014). Increased proatherogenic monocyte-platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J. Intern. Med.* *275*, 144–154.
- Dahl, R., Iyer, S.R., Owens, K.S., Cuylear, D.D., and Simon, M.C. (2007). The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.* *282*, 6473–6483.
- Daniels, J.C., Larson, D.L., Abston, S., and Ritzmann, S.E. (1974). Serum protein profiles in thermal burns. I. Serum electrophoretic patterns, immunoglobulins, and transport proteins. *J. Trauma* *14*, 137–152.
- Davì, G., and Ferroni, P. (2005). CD40-CD40L interactions in platelet activation. *Thromb. Haemost.* *93*, 1011–1012.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* *14*, 986–995.
- Demling, R.H. (1987). Fluid replacement in burned patients. *Surg. Clin. North Am.* *67*, 15–30.
- Demling, R.H., Will, J.A., and Belzer, F.O. (1978). Effect of major thermal injury on the pulmonary microcirculation. *Surgery* *83*, 746–751.
- Dijkstra-Tiekstra, M.J., van der Meer, P.F., Cardigan, R., Devine, D., Prowse, C., Sandgren, P., de Wildt-Eggen, J., and Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative (2011). Platelet concentrates from fresh or overnight-stored blood, an international study. *Transfusion (Paris)* *51 Suppl 1*, 38S-44S.

- Ding, Y., Wilkinson, A., Idris, A., Fancke, B., O’Keeffe, M., Khalil, D., Ju, X., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Shortman, K., et al. (2014). FLT3-ligand treatment of humanized mice results in the generation of large numbers of CD141⁺ and CD1c⁺ dendritic cells in vivo. *J. Immunol.* *192*, 1982–1989.
- Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., et al. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* *31*, 823–833.
- Drutman, S.B., Kendall, J.C., and Trombetta, E.S. (2012). Inflammatory spleen monocytes can upregulate CD11c expression without converting into dendritic cells. *J. Immunol.* *188*, 3603–3610.
- Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.-P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegon, I., Catala, L., Ifrah, N., et al. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* *110*, 4319–4330.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* *165*, 6037–6046.
- Everts, B., Perona-Wright, G., Smits, H.H., Hokke, C.H., van der Ham, A.J., Fitzsimmons, C.M., Doenhoff, M.J., van der Bosch, J., Mohrs, K., Haas, H., et al. (2009). Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J. Exp. Med.* *206*, 1673–1680.
- Fairfax, B.P., Humburg, P., Makino, S., Naranbhai, V., Wong, D., Lau, E., Jostins, L., Plant, K., Andrews, R., and Mcgee, C. (2014). Europe PMC Funders Group Innate Immune Activity Conditions the Effect of Regulatory Variants upon Monocyte Gene Expression. *343*, 1–30.
- Faivre, V., Lukaszewicz, A.C., Alves, A., Charron, D., Payen, D., and Haziot, A. (2007). Accelerated in vitro differentiation of blood monocytes into dendritic cells in human sepsis. *Clin. Exp. Immunol.* *147*, 426–439.
- Faivre, V., Lukaszewicz, A.C., Alves, A., Charron, D., Payen, D., and Haziot, A. (2012). Human Monocytes Differentiate into Dendritic Cells Subsets that Induce Anergic and Regulatory T Cells in Sepsis. *PLoS ONE* *7*.
- Fallarino, F., Gizzi, S., Mosci, P., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2007). Tryptophan catabolism in IDO⁺ plasmacytoid dendritic cells. *Curr. Drug Metab.* *8*, 209–216.
- Fanales-Belasio, E., Zambruno, G., Cavani, A., and Girolomoni, G. (1997). Antibodies against sialophorin (CD43) enhance the capacity of dendritic cells to cluster and activate T lymphocytes. *J. Immunol.* *159*, 2203–2211.
- Faunce, D.E., Gamelli, R.L., Choudhry, M.A., and Kovacs, E.J. (2003). A role for CD1d-restricted NKT cells in injury-associated T cell suppression. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 747–755.
- Fayazov, A.D., Shukurov, S.I., Shukurov, B.I., Sultanov, B.C., Namazov, A.N., and Ruzimuratov, D.A. (2009). Disorders of the Immune System in Severely Burned Patients. *Ann. Burns Fire Disasters* *22*, 121–130.

- Feinstein, M.B., and Fraser, C. (1975). Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. Inhibition by PGE1 and dibutyryl cyclic AMP. *J. Gen. Physiol.* *66*, 561–581.
- Fidler, I.J. (1988). Macrophage therapy of cancer metastasis. *Ciba Found. Symp.* *141*, 211–222.
- Fingerle, G., Pforte, A., Passlick, B., Blumenstein, M., Ströbel, M., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* *82*, 3170–3176.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* *311*, 83–87.
- Frankenberger, M., Ekici, A.B., Angstwurm, M.W., Hoffmann, H., Hofer, T.P.J., Heimbeck, I., Meyer, P., Lohse, P., Wjst, M., Häussinger, K., et al. (2013). A defect of CD16-positive monocytes can occur without disease. *Immunobiology* *218*, 169–174.
- Fumeaux, T., and Pugin, J. (2002). Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *166*, 1475–1482.
- Furie, B., and Furie, B.C. (2004). Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol. Med.* *10*, 171–178.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* *128*, 415–435.
- Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* *14*, 1014–1022.
- Galibert, L., Diemer, G.S., Liu, Z., Johnson, R.S., Smith, J.L., Walzer, T., Comeau, M.R., Rauch, C.T., Wolfson, M.F., Sorensen, R.A., et al. (2005). Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J. Biol. Chem.* *280*, 21955–21964.
- Gandhi, M., Thomson, C., Lord, D., and Enoch, S. (2010). Management of Pain in Children with Burns. *Int. J. Pediatr.* *2010*.
- Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F.J., Zal, T., and Gilliet, M. (2009). Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J. Exp. Med.* *206*, 1983–1994.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* *100*, 575–585.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71–82.

- Geissmann, F., Cameron, T.O., Sidobre, S., Manlongat, N., Kronenberg, M., Briskin, M.J., Dustin, M.L., and Littman, D.R. (2005). Intravascular immune surveillance by CXCR6⁺ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol.* 3, e113.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 327, 656–661.
- Giedrojć, J., Klimiuk, M., Janczarek, B., Zabicki, D., and Kłoczko, J. (2000). [Interaction of platelets with monocytes with regard to arachidonic acid metabolites]. *Przegl. Lek.* 57, 459–464.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23–35.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.
- Grage-Griebenow, E., Zawatzky, R., Kahlert, H., Brade, L., Flad, H., and Ernst, M. (2001). Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur. J. Immunol.* 31, 48–56.
- Gren, S.T., Rasmussen, T.B., Janciauskiene, S., Hakansson, K., Gerwien, J.G., and Grip, O. (2015). A single-cell gene-expression profile reveals inter-cellular heterogeneity within human monocyte subsets. *PLoS ONE* 10, 1–20.
- Grip, O., Bredberg, A., Lindgren, S., and Henriksson, G. (2007). Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 566–572.
- Guilliams, M., and van de Laar, L. (2015). A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System. *Front. Immunol.* 6.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578.
- Guo, R.-F., and Ward, P.A. (2005). Role of C5a in inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 821–852.
- Hachiya, T., Furukawa, R., Shiwa, Y., Ohmomo, H., Ono, K., Katsuoka, F., Nagasaki, M., Yasuda, J., Fuse, N., Kinoshita, K., et al. (2017). Genome-wide identification of inter-individually variable DNA methylation sites improves the efficacy of epigenetic association studies. *Npj Genomic Med.* 2, 11.
- Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E.C. (2008). CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 9, 1253–1260.

- Haik, J., Nardini, G., Goldman, N., Galore-Haskel, G., Harats, M., Zilinsky, I., Weissman, O., Schachter, J., Winkler, E., and Markel, G. (2015). Increased serum NKG2D-ligands and downregulation of NKG2D in peripheral blood NK cells of patients with major burns. *Oncotarget* 7, 2220–2228.
- Han, S.S., and Baker, B.L. (1964). The Ultrastructure of Megakaryocytes and Blood Platelets in the Rat Spleen. *Anat. Rec.* 149, 251–267.
- Haniffa, M., Collin, M., and Ginhoux, F. (2013). Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Adv. Immunol.* 120, 1–49.
- Hanna, R.N., Shaked, I., Hubbeling, H.G., Punt, J.A., Wu, R., Herrley, E., Zaugg, C., Pei, H., Geissmann, F., Ley, K., et al. (2012). NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ. Res.* 110, 416–427.
- Harding, S.A., Sarma, J., Josephs, D.H., Cruden, N.L., Din, J.N., Twomey, P.J., Fox, K. a. A., and Newby, D.E. (2004). Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. *Circulation* 109, 1926–1929.
- Haziot, A., Ferrero, E., Köntgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C.L., and Goyert, S.M. (1996). Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4, 407–414.
- Hedl, M., and Abraham, C. (2012). IRF5 Risk Polymorphisms Contribute to Inter-Individual Variance in Pattern-Recognition Receptor-Mediated Cytokine Secretion in Human Monocyte-Derived Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 5348–5356.
- Helft, J., Anjos-Afonso, F., Veen, A.G. van der, Chakravarty, P., Bonnet, D., and Sousa, C.R. e (2017). Dendritic Cell Lineage Potential in Human Early Hematopoietic Progenitors. *Cell Rep.* 20, 529–537.
- Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., and Josien, R. (2013). Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol.* 93, 599–609.
- Hettiaratchy, S., and Dziewulski, P. (2004). Pathophysiology and types of burns. *BMJ* 328, 1427–1429.
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 14, 821–830.
- Hijdra, D., Vorselaars, A., Grutters, J., Claessen, A., and Rijkers, G. (2012). Differential expression of TNFR1 (CD120a) and TNFR2 (CD120b) on subpopulations of human monocytes. *J. Inflamm.* 9, 38.
- Hilton, J.G., and Marullo, D.S. (1986). Effects of thermal trauma on cardiac force of contraction. *Burns. Incl. Therm. Inj.* 12, 167–171.

- Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* *431*, 1002–1007.
- Hofer, T.P., Zawada, A.M., Frankenberger, M., Skokann, K., Satz, A.A., Gesierich, W., Schuberth, M., Levin, J., Danek, A., Rotter, B., et al. (2015). slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation. *Blood* *126*, 2601–2610.
- Hoseini-Shahrestanak, S., Bazargan, N., Rahimian, L., Nemati, M., Solaymani, S., and Jafarzadeh, A. (2018). Imbalanced Expression of Th2 and Treg Cell-related Parameters in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Allergic Asthma. *Tanaffos* *17*, 1–12.
- Hotchkiss, R.S., Monneret, G., and Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 862–874.
- Howell, K., Posluszny, J., He, L.K., Szilagyi, A., Halerz, J., Gamelli, R.L., Shankar, R., and Muthu, K. (2012). High MafB expression following burn augments monocyte commitment and inhibits DC differentiation in hemopoietic progenitors. *J. Leukoc. Biol.* *91*, 69–81.
- Huang, K., Marcora, E., Pimenova, A.A., Di Narzo, A.F., Kapoor, M., Jin, S.C., Harari, O., Bertelsen, S., Fairfax, B.P., Czajkowski, J., et al. (2017). A common haplotype lowers PU.1 expression in myeloid cells and delays onset of Alzheimer’s disease. *Nat. Neurosci.* *20*, 1052–1061.
- Huang, X., Cho, S., and Spangrude, G.J. (2007). Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ.* *14*, 1851–1859.
- Huber, R., Pietsch, D., Günther, J., Welz, B., Vogt, N., and Brand, K. (2014). Regulation of monocyte differentiation by specific signaling modules and associated transcription factor networks. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 63–92.
- Hudig, D., Hunter, K.W., Diamond, W.J., and Redelman, D. (2014). Properties of human blood monocytes. II. Monocytes from healthy adults are highly heterogeneous within and among individuals. *Cytometry B Clin. Cytom.* *86*, 121–134.
- Hui, H., Fuller, K., Erber, W.N., and Linden, M.D. (2015). Measurement of monocyte-platelet aggregates by imaging flow cytometry. *Cytometry A* *87*, 273–278.
- Hume, D.A. (2012). Plenary perspective: the complexity of constitutive and inducible gene expression in mononuclear phagocytes. *J. Leukoc. Biol.* *92*, 433–444.
- Huo, Y., Schober, A., Forlow, S.B., Smith, D.F., Hyman, M.C., Jung, S., Littman, D.R., Weber, C., and Ley, K. (2003). Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* *9*, 61–67.
- Ingersoll, M., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., et al. (2010a). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* *115*, 10–20.

- Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., et al. (2010b). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* *115*, e10-19.
- Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* *5*.
- Iwasaki, H., and Akashi, K. (2007). Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* *26*, 726–740.
- Jacomy, M., Venturini, T., Heymann, S., and Bastian, M. (2014). ForceAtlas2, a continuous graph layout algorithm for handy network visualization designed for the Gephi software. *PLoS ONE* *9*, 1–12.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* *39*.
- Jantsch, J., Binger, K.J., Müller, D.N., and Titze, J. (2014). Macrophages in homeostatic immune function. *Front. Physiol.* *5*.
- Jensen, K.J., Larsen, N., Biering-Sørensen, S., Andersen, A., Eriksen, H.B., Monteiro, I., Hougaard, D., Aaby, P., Netea, M.G., Flanagan, K.L., et al. (2015). Heterologous immunological effects of early BCG vaccination in low-birth-weight infants in Guinea-Bissau: a randomized-controlled trial. *J. Infect. Dis.* *211*, 956–967.
- de Jong, E.C., Vieira, P.L., Kalinski, P., Schuitemaker, J.H.N., Tanaka, Y., Wierenga, E.A., Yazdanbakhsh, M., and Kapsenberg, M.L. (2002). Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* *168*, 1704–1709.
- de Jong, E.C., Smits, H.H., and Kapsenberg, M.L. (2005). Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunopathol.* *26*, 289–307.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., et al. (2010). Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* *207*, 1247–1260.
- Joshi, P., Hauser, C.J., Jones, Q., Kennedy, R., Thomae, K.R., and Zhou, X. (1998). Mechanism of suppression of natural killer cell activity in trauma patients. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* *101*, 241–248.
- Kataoka, K., Sato, T., Yoshimi, A., Goyama, S., Tsuruta, T., Kobayashi, H., Shimabe, M., Arai, S., Nakagawa, M., Imai, Y., et al. (2011). Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. *J. Exp. Med.* *208*, 2403–2416.

- Kato, Y., Iwama, A., Tadokoro, Y., Shimoda, K., Minoguchi, M., Akira, S., Tanaka, M., Miyajima, A., Kitamura, T., and Nakauchi, H. (2005). Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J. Exp. Med.* *202*, 169–179.
- Katoh, N. (2009). Platelets as versatile regulators of cutaneous inflammation. *J. Dermatol. Sci.* *53*, 89–95.
- Kawamura, S., Onai, N., Miya, F., Sato, T., Tsunoda, T., Kurabayashi, K., Yotsumoto, S., Kuroda, S., Takenaka, K., Akashi, K., et al. (2017). Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. *Immunity* *46*, 835–848.
- Khamri, W., Walker, M.M., Clark, P., Atherton, J.C., Thursz, M.R., Bamford, K.B., Lechler, R.I., and Lombardi, G. (2010). *Helicobacter pylori* stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4+ T lymphocytes. *Infect. Immun.* *78*, 845–853.
- Kim, O.Y., Monsel, A., Bertrand, M., Coriat, P., Cavaillon, J.-M., and Adib-Conquy, M. (2010). Differential down-regulation of HLA-DR on monocyte subpopulations during systemic inflammation. *Crit. Care Lond. Engl.* *14*, R61.
- Kirchhofer, D., Tschopp, T.B., Hadváry, P., and Baumgartner, H.R. (1994). Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor- α express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogenous fibrin deposition in a native blood flow system. Effects of thrombin inhibitors. *J. Clin. Invest.* *93*, 2073–2083.
- Kleinnijenhuis, J., Quintin, J., Preijers, F., Joosten, L.A.B., Ifrim, D.C., Saeed, S., Jacobs, C., van Loenhout, J., de Jong, D., Stunnenberg, H.G., et al. (2012). Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 17537–17542.
- Klinkhardt, U., Bauersachs, R., Adams, J., Graff, J., Lindhoff-Last, E., and Harder, S. (2003). Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* *73*, 232–241.
- Kobayashi, M., Jeschke, M.G., Shigematsu, K., Asai, A., Yoshida, S., Herndon, D.N., and Suzuki, F. (2010). M2b monocytes predominated in peripheral blood of severely burned patients. *J. Immunol.* *185*, 7174–7179.
- Koshiishi, I., Shizari, M., and Underhill, C.B. (1994). CD44 can mediate the adhesion of platelets to hyaluronan. *Blood* *84*, 390–396.
- Kovacovics, T.J., and Hartwig, J.H. (1996). Thrombin-induced GPIb-IX centralization on the platelet surface requires actin assembly and myosin II activation. *Blood* *87*, 618–629.
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* *409*, 198–201.

- Kurotaki, D., Osato, N., Nishiyama, A., Yamamoto, M., Ban, T., Sato, H., Nakabayashi, J., Umehara, M., Miyake, N., Matsumoto, N., et al. (2013). Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* *121*, 1839–1849.
- Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2009). Lung dendritic cells: targets for therapy in allergic disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 99–114.
- Lande, R., Chamilos, G., Ganguly, D., Demaria, O., Frasca, L., Durr, S., Conrad, C., Schröder, J., and Gilliet, M. (2015). Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA. *Eur. J. Immunol.* *45*, 203–213.
- Langlet, C., Tamoutounour, S., Henri, S., Luche, H., Ardouin, L., Grégoire, C., Malissen, B., and Guilliams, M. (2012). CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *J. Immunol.* *188*, 1751–1760.
- Langouche, L., Marques, M.B., Ingels, C., Gunst, J., Derde, S., Vander Perre, S., D’Hoore, A., and Van den Berghe, G. (2011). Critical illness induces alternative activation of M2 macrophages in adipose tissue. *Crit. Care* *15*, R245.
- Lauterbach, H., Bathke, B., Gilles, S., Traidl-Hoffmann, C., Lubber, C.A., Fejer, G., Freudenberg, M.A., Davey, G.M., Vremec, D., Kallies, A., et al. (2010). Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J. Exp. Med.* *207*, 2703–2717.
- Leal Rojas, I.M., Mok, W.-H., Pearson, F.E., Minoda, Y., Kenna, T.J., Barnard, R.T., and Radford, K.J. (2017). Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Promote Th1 and Th17 Effector Function in Memory CD4+ T Cells. *Front. Immunol.* *8*.
- Lee, J., Breton, G., Oliveira, T.Y.K., Zhou, Y.J., Aljoufi, A., Pühr, S., Cameron, M.J., Sékaly, R.-P., Nussenzweig, M.C., and Liu, K. (2015). Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J. Exp. Med.* *212*, 385–399.
- Li, H.S., Yang, C.Y., Nallaparaju, K.C., Zhang, H., Liu, Y.-J., Goldrath, A.W., and Watowich, S.S. (2012). The signal transducers STAT5 and STAT3 control expression of Id2 and E2-2 during dendritic cell development. *Blood* *120*, 4363–4373.
- Liao, J., Karnik, R., Gu, H., Ziller, M.J., Clement, K., Tsankov, A.M., Akopian, V., Gifford, C.A., Donaghey, J., Galonska, C., et al. (2015). Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* *47*, 469–478.
- Liaskou, E., Zimmermann, H.W., Li, K.-K., Oo, Y.H., Suresh, S., Stamataki, Z., Qureshi, O., Lalor, P.F., Shaw, J., Syn, W., et al. (2013). Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology* *57*, 385–398.
- Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.* *193*, 727–740.

- Lin, E.Y., Li, J.-F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D.A., Qian, H., Xue, X., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* *66*, 11238–11246.
- Linden, M.D., and Furman, M.I. (2006). Monocyte-Platelet Aggregates in Patients With Ischemic Heart Disease. In *Cardiovascular Biomarkers*, pp. 487–493.
- Lindmark, E., Tenno, T., and Siegbahn, A. (2000). Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 2322–2328.
- Lindstedt, M., Lundberg, K., and Borrebaeck, C.A.K. (2005). Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J. Immunol.* *175*, 4839–4846.
- Liston, A., Carr, E.J., and Linterman, M.A. (2016). Shaping Variation in the Human Immune System. *Trends Immunol.* *37*, 637–646.
- Liu, J., Hu, S., Dong, N., Sun, D., Chai, J., Zhu, J., and Sheng, Z. (2003). [Changes in the percentage of human leukocyte antigen DR in CD(+)14 monocytes in burned patients]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* *15*, 23–25.
- Livingston, D.H., Appel, S.H., Wellhausen, S.R., Sonnenfeld, G., and Polk, H.C. (1988). Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Arch. Surg.* *123*, 1309–1312.
- Loscalzo, J. (2001). Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ. Res.* *88*, 756–762.
- Loures, F.V., Röhm, M., Lee, C.K., Santos, E., Wang, J.P., Specht, C.A., Calich, V.L.G., Urban, C.F., and Levitz, S.M. (2015). Recognition of *Aspergillus fumigatus* hyphae by human plasmacytoid dendritic cells is mediated by dectin-2 and results in formation of extracellular traps. *PLoS Pathog.* *11*, e1004643.
- Lozza, L., Farinacci, M., Faé, K., Bechtle, M., Stäber, M., Dorhoi, A., Bauer, M., Ganoza, C., Weber, S., and Kaufmann, S.H.E. (2014). Crosstalk between human DC subsets promotes antibacterial activity and CD8⁺ T-cell stimulation in response to bacille Calmette-Guérin. *Eur. J. Immunol.* *44*, 80–92.
- Lukasik, M., Dworacki, G., Kufel-Grabowska, J., Watala, C., and Kozubski, W. (2012). Upregulation of CD40 ligand and enhanced monocyte-platelet aggregate formation are associated with worse clinical outcome after ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.* *107*, 346–355.
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* *209*, 1241–1253.
- MacDonald, K.P.A., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N.J. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* *100*, 4512–4520.

- Mahdavian Delavary, B., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B., and Beelen, R.H.J. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 216, 753–762.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333–3341.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6.
- McNicol, A., and Israels, S.J. (1999). Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb. Res.* 95, 1–18.
- Meredith, M.M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A.O., Schreiber, H.A., Guermonprez, P., Idoyaga, J., Cheong, C., Yao, K.-H., Niec, R.E., et al. (2012). Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btb4d) defines the classical dendritic cell lineage. *J. Exp. Med.* 209, 1153–1165.
- Metcalf, D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339, 27–30.
- Michea, P., Vargas, P., Donnadieu, M.-H., Roseblatt, M., Bono, M.R., Duménil, G., and Soumelis, V. (2013). Epithelial control of the human pDC response to extracellular bacteria. *Eur. J. Immunol.* 43, 1264–1273.
- Michelson, A.D., Barnard, M.R., Hechtman, H.B., MacGregor, H., Connolly, R.J., Loscalzo, J., and Valeri, C.R. (1996). In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11877–11882.
- Michelson, A.D., Barnard, M.R., Krueger, L.A., Valeri, C.R., and Furman, M.I. (2001). Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 104, 1533–1537.
- Moake, J.L., Turner, N.A., Stathopoulos, N.A., Nolasco, L., and Hellums, J.D. (1988). Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 71, 1366–1374.
- Mobley, J.L., Leininger, M., Madore, S., Baginski, T.J., and Renkiewicz, R. (2007). Genetic evidence of a functional monocyte dichotomy. *Inflammation* 30, 189–197.
- Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kedl, R.M., and Jenkins, M.K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27, 203–213.

- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* *136*, 2348–2357.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.
- Movahedi, K., Williams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* *111*, 4233–4244.
- Mukherjee, R., Kanti Barman, P., Kumar Thatoi, P., Tripathy, R., Kumar Das, B., and Ravindran, B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* *5*, 13886.
- Munoz, C., Carlet, J., Fitting, C., Misset, B., Blériot, J.P., and Cavaillon, J.M. (1991). Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J. Clin. Invest.* *88*, 1747–1754.
- Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* *204*, 3037–3047.
- Nair, M.G., Guild, K.J., and Artis, D. (2006). Novel effector molecules in type 2 inflammation: lessons drawn from helminth infection and allergy. *J. Immunol.* *177*, 1393–1399.
- Nair, S., Archer, G.E., and Tedder, T.F. (2012). ISOLATION AND GENERATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS. *Curr. Protoc. Immunol.* *0 7*, Unit7.32.
- Nalls, M.A., Couper, D.J., Tanaka, T., van Rooij, F.J.A., Chen, M.-H., Smith, A.V., Toniolo, D., Zakai, N.A., Yang, Q., Greinacher, A., et al. (2011). Multiple Loci Are Associated with White Blood Cell Phenotypes. *PLoS Genet.* *7*.
- Netea, M.G., Joosten, L.A.B., Latz, E., Mills, K.H.G., Natoli, G., Stunnenberg, H.G., O’Neill, L.A.J., and Xavier, R.J. (2016). Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* *352*, aaf1098.
- Nizzoli, G., Krietsch, J., Weick, A., Steinfeldt, S., Facciotti, F., Guarini, P., Bianco, A., Steckel, B., Moro, M., Crosti, M., et al. (2013). Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* *122*, 932–942.
- Nockher, W.A., and Scherberich, J.E. (1998). Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect. Immun.* *66*, 2782–2790.
- Nockher, W.A., Bergmann, L., and Scherberich, J.E. (1994). Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* *98*, 369–374.

- Noris, M., and Remuzzi, G. (2013). Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin. Nephrol.* 33, 479–492.
- Nunez Lopez, O., Cambiaso-Daniel, J., Branski, L.K., Norbury, W.B., and Herndon, D.N. (2017). Predicting and managing sepsis in burn patients: current perspectives. *Ther. Clin. Risk Manag.* 13, 1107–1117.
- Ong, S.-M., Hadadi, E., Dang, T.-M., Yeap, W.-H., Tan, C.T.-Y., Ng, T.-P., Larbi, A., and Wong, S.-C. (2018). The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. *Cell Death Dis.* 9, 266.
- O’Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098–1102.
- Ott, I., Neumann, F.J., Gawaz, M., Schmitt, M., and Schömig, A. (1996). Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 94, 1239–1246.
- Palmer, J.L., Tulley, J.M., Kovacs, E.J., Gamelli, R.L., Taniguchi, M., and Faunce, D.E. (2006). Injury-induced suppression of effector T cell immunity requires CD1d-positive APCs and CD1d-restricted NKT cells. *J. Immunol.* 177, 92–99.
- Palucka, K.A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., and Gluckman, J.C. (1998). Dendritic Cells as the Terminal Stage of Monocyte Differentiation. *J. Immunol.* 160, 4587–4595.
- Passacquale, G., Vamadevan, P., Pereira, L., Hamid, C., Corrigall, V., and Ferro, A. (2011). Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One* 6, e25595.
- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527–2534.
- Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* 214, 1913–1923.
- Pawelski, H., Lang, D., and Reuter, S. (2014). Interactions of monocytes and platelets: implication for life. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 6, 75–91.
- Piasecka, B., Duffy, D., Urrutia, A., Quach, H., Patin, E., Posseme, C., Bergstedt, J., Charbit, B., Rouilly, V., MacPherson, C.R., et al. (2018). Distinctive roles of age, sex, and genetics in shaping transcriptional variation of human immune responses to microbial challenges. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E488–E497.
- Pickl, W.F., Majdic, O., Kohl, P., Stöckl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., and Knapp, W. (1996). Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 157, 3850–3859.
- Poehlmann, H., Schefold, J.C., Zuckermann-Becker, H., Volk, H.-D., and Meisel, C. (2009). Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit. Care* 13, R119.

- Prete, F., Catucci, M., Labrada, M., Gobessi, S., Castiello, M.C., Bonomi, E., Aiuti, A., Vermi, W., Cancrini, C., Metin, A., et al. (2013). Wiskott-Aldrich syndrome protein-mediated actin dynamics control type-I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* *210*, 355–374.
- Pronk, C.J.H., Rossi, D.J., Månsson, R., Attema, J.L., Norddahl, G.L., Chan, C.K.F., Sigvardsson, M., Weissman, I.L., and Bryder, D. (2007). Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell* *1*, 428–442.
- Pruitt, B.A. (1984). The diagnosis and treatment of infection in the burn patient. *Burns. Incl. Therm. Inj.* *11*, 79–91.
- Pruitt, B.A., and McManus, A.T. (1992). The changing epidemiology of infection in burn patients. *World J. Surg.* *16*, 57–67.
- Puissant-Lubrano, B., Apoil, P.A., Guedj, K., Congy-Jolivet, N., Roubinet, F., Guyonnet, S., Sourdet, S., Nourhashemi, F., and Blancher, A. (2018). Distinct effect of age, sex, and CMV seropositivity on dendritic cells and monocytes in human blood: *Immunol. Cell Biol.* *96*, 114–120.
- Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* *141*, 39–51.
- Qiu, P., Simonds, E.F., Bendall, S.C., Gibbs, K.D., Bruggner, R. V, Linderman, M.D., Sachs, K., Nolan, G.P., and Plevritis, S.K. (2011). Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nat. Biotechnol.* *29*, 886–891.
- Rani, M., Nicholson, S.E., Zhang, Q., and Schwacha, M.G. (2017). Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation. *Burns* *43*, 297–303.
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., and Forsthuber, T.G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* *74*, 5–17.
- Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 163–183.
- van Riet, E., Everts, B., Retra, K., Phylipsen, M., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G., van der Kleij, D., Hartgers, F.C., and Yazdanbakhsh, M. (2009). Combined TLR2 and TLR4 ligation in the context of bacterial or helminth extracts in human monocyte derived dendritic cells: molecular correlates for Th1/Th2 polarization. *BMC Immunol.* *10*, 9.
- Rivera, J., Lozano, M.L., Navarro-Núñez, L., and Vicente, V. (2009). Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* *94*, 700–711.
- Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., and Kelsall, B.L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J. Exp. Med.* *209*, 139–155.
- Robbins, S.H., Walzer, T., Dembélé, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., et al. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* *9*, R17.

- Rodrick, M.L. (1999). The Effects of Traumatic Burn Injury on the Humoral Immune Response. *Sepsis* 3, 235–238.
- Roederer, M., Quaye, L., Mangino, M., Beddall, M.H., Chattopadhyay, P., Tosi, I., Napolitano, L., Terranova, M., Menni, C., Villanova, F., et al. (2016). Bioresource for Autoimmunity and Disease Pathogenesis.
- Rogacev, K.S., Seiler, S., Zawada, A.M., Reichart, B., Herath, E., Roth, D., Ulrich, C., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur. Heart J.* 32, 84–92.
- Rogacev, K.S., Zawada, A.M., Emrich, I., Seiler, S., Böhm, M., Fliser, D., Woollard, K.J., and Heine, G.H. (2014). Lower Apo A-I and lower HDL-C levels are associated with higher intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte counts that predict cardiovascular events in chronic kidney disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 2120–2127.
- Rogers, N.M., Isenberg, J.S., and Thomson, A.W. (2013). Plasmacytoid dendritic cells: no longer an enigma and now key to transplant tolerance? *Am. J. Transplant.* 13, 1125–1133.
- Romagnani, S. (1995). Biology of human TH1 and TH2 cells. *J. Clin. Immunol.* 15, 121–129.
- Rönblom, L., and Pascual, V. (2008). The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus* 17, 394–399.
- Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., and Wagner, U. (2012). The CD14^{bright}CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* 64, 671–677.
- Röszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015, 816460.
- Rowley, J.W., Oler, A.J., Tolley, N.D., Hunter, B.N., Low, E.N., Nix, D.A., Yost, C.C., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2011). Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 118, e101–e111.
- Saha, P., and Geissmann, F. (2011). Toward a functional characterization of blood monocytes. *Immunol. Cell Biol.* 89, 2–4.
- Saionji, K., and Ohsaka, A. (2001). Expansion of CD4⁺CD16⁺ blood monocytes in patients with chronic renal failure undergoing dialysis: possible involvement of macrophage colony-stimulating factor. *Acta Haematol.* 105, 21–26.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118.
- Sánchez-Torres, C., García-Romo, G.S., Cornejo-Cortés, M.A., Rivas-Carvalho, A., and Sánchez-Schmitz, G. (2001). CD16⁺ and CD16⁻ human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4⁺ T cells. *Int. Immunol.* 13, 1571–1581.

- Sawdey, M.S., and Loskutoff, D.J. (1991). Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J. Clin. Invest.* 88, 1346–1353.
- Schäkel, K., Kannagi, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., von Kietzell, M., and Rieber, E. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* 17, 289–301.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38, 970–983.
- Schmidl, C., Renner, K., Peter, K., Eder, R., Lassmann, T., Balwierz, P.J., Itoh, M., Nagao-Sato, S., Kawaji, H., Carninci, P., et al. (2014). Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. *Blood* 123, e90–e99.
- Schmidt, K., Bruchelt, G., Kistler, D., and Koslowski, L. (1983). Phagocytic activity of granulocytes and alveolar macrophages after burn injury measured by chemiluminescence. *Burns. Incl. Therm. Inj.* 10, 79–85.
- Schoppmann, S.F., Birner, P., Stöckl, J., Kalt, R., Ullrich, R., Caucig, C., Kriehuber, E., Nagy, K., Alitalo, K., and Kerjaschki, D. (2002). Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* 161, 947–956.
- Schraml, B.U., van Blijswijk, J., Zelenay, S., Whitney, P.G., Filby, A., Acton, S.E., Rogers, N.C., Moncaut, N., Carvajal, J.J., and Reis e Sousa, C. (2013). Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell* 154, 843–858.
- Schröder, C., Leitão, E., Wallner, S., Schmitz, G., Klein-Hitpass, L., Sinha, A., Jöckel, K.-H., Heilmann-Heimbach, S., Hoffmann, P., Nöthen, M.M., et al. (2017). Regions of common inter-individual DNA methylation differences in human monocytes: genetic basis and potential function. *Epigenetics Chromatin* 10, 37.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189.
- Schulz, C., Leuschen, N.V., Fröhlich, T., Lorenz, M., Pfeiler, S., Gleissner, C.A., Kremmer, E., Kessler, M., Khandoga, A.G., Engelmann, B., et al. (2010). Identification of novel downstream targets of platelet glycoprotein VI activation by differential proteome analysis: implications for thrombus formation. *Blood* 115, 4102–4110.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.-H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 209, 653–660.
- Segura, V., Valero, M.L., Cantero, L., Muñoz, J., Zarzuela, E., García, F., Aloria, K., Beaskoetxea, J., Arizmendi, J.M., Navajas, R., et al. (2018). In-Depth Proteomic Characterization of Classical and Non-Classical Monocyte Subsets. *Proteomes* 6.

Selimoglu--Buet D , Wagner-Ballon O , Saada V , Bardet V , Itzykson R , Bencheikh L , Morabito M , Met E , Debord C , Benayoun E , Nloga AM , Fenaux P , Braun T , Willekens C , Quesnel B , Adès L , Fontenay M , Rameau P , Droin N , Koscielny S, S.E. (2015). Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 156, 649–654.

Semnani, R.T., Moore, V., Bennuru, S., McDonald-Fleming, R., Ganesan, S., Cotton, R., Anuradha, R., Babu, S., and Nutman, T.B. (2014). Human monocyte subsets at homeostasis and their perturbation in numbers and function in filarial infection. *Infect. Immun.* 82, 4438–4446.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 421–452.

Serbina, N.V., Cherny, M., Shi, C., Bleau, S.A., Collins, N.H., Young, J.W., and Pamer, E.G. (2009). Distinct responses of human monocyte subsets to *Aspergillus fumigatus* conidia. *J. Immunol.* 183, 2678–2687.

Serwold, T., Ehrlich, L.I.R., and Weissman, I.L. (2009). Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood* 113, 807–815.

Shapiro, H.M. (1995). *Practical flow cytometry*, 3rd edition (Wiley-Liss).

Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–774.

Shortman, K., and Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 151–161.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.

Siedlar, M., Frankenberger, M., Ziegler-Heitbrock, L.H., and Belge, K.U. (2000). The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14⁺ CD16⁺ monocytes. *Immunobiology* 202, 11–17.

Silvano, A. (2014). Dendritic cells: phenotypic and functional heterogeneity. *Ital. J. Anat. Embryol.* 119, 304–330.

Skrzeczynska-Moncznik, J., Bzowska, M., Loseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., and Pryjma, J. (2008). Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* 67, 152–159.

Smale, S.T., Tarakhovsky, A., and Natoli, G. (2014). Chromatin contributions to the regulation of innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 489–511.

Smedman, C., Ernemar, T., Gudmundsdotter, L., Gille-Johnson, P., Somell, A., Nihlmark, K., Gårdlund, B., Andersson, J., and Paulie, S. (2012). FluoroSpot analysis of TLR-activated monocytes reveals several distinct cytokine-secreting subpopulations. *Scand. J. Immunol.* 75, 249–258.

- Soudja, S.M., Ruiz, A.L., Marie, J.C., and Lauvau, G. (2012). Inflammatory monocytes activate memory CD8⁺ T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity* 37, 549–562.
- Sprangers, S., de Vries, T.J., and Everts, V. (2016). Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J. Immunol. Res.* 2016, 1475435.
- Sreeramkumar, V., Adrover, J.M., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Rossaint, J., Bilbao, I., Náchér, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., et al. (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346, 1234–1238.
- Stahel, P.F., and Barnum, S.R. (2006). The role of the complement system in CNS inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2, 445–456.
- Stansfield, B.K., and Ingram, D. a (2015). Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin. Transl. Med.* 4, 5.
- Starck, J., Cohet, N., Gonnet, C., Sarrazin, S., Doubeikovskaia, Z., Doubeikovski, A., Verger, A., Duterque-Coquillaud, M., and Morle, F. (2003). Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1390–1402.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142–1162.
- Steinman, R.M., and Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5132–5136.
- Stephen, J., Emerson, B., Fox, K.A.A., and Dransfield, I. (2013). The uncoupling of monocyte-platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. *J. Immunol.* 191, 5677–5683.
- Stillwell, R., and Bierer, B.E. (2001). T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation. *Immunol. Res.* 24, 31–52.
- Sumagin, R., Prizant, H., Lomakina, E., Waugh, R.E., and Sarelius, I.H. (2010). LFA-1 and Mac-1 define characteristically different intraluminal crawling and emigration patterns for monocytes and neutrophils in situ. *J. Immunol.* 185, 7057–7066.
- Tacke, F., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Rooijen, N. van, Merad, M., and Randolph, G.J. (2006). Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J. Exp. Med.* 203, 583–597.
- Takeuchi, A., Itoh, Y., Takumi, A., Ishihara, C., Arase, N., Yokosuka, T., Koseki, H., Yamasaki, S., Takai, Y., Miyoshi, J., et al. (2009). CRTAM confers late-stage activation of CD8⁺ T cells to regulate retention within lymph node. *J. Immunol.* 183, 4220–4228.
- Taylor, P.R., Brown, G.D., Geldhof, A.B., Martinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2003). Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo. *Eur. J. Immunol.* 33, 2090–2097.

- Thiesen, S., Janciauskiene, S., Uronen-Hansson, H., Agace, W., Högerkorp, C.-M., Spee, P., Håkansson, K., and Grip, O. (2014). CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* *95*, 531–541.
- Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C.C., and Hanna, R.N. (2015). Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *35*, 1306–1316.
- Tiwari, V.K. (2012). Burn wound: How it differs from other wounds? *Indian J. Plast. Surg. Off. Publ. Assoc. Plast. Surg. India* *45*, 364–373.
- Todd, R.F., Nadler, L.M., and Schlossman, S.F. (1981). Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* *126*, 1435–1442.
- Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., and Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 171–180.
- Venet, F., Tissot, S., Debard, A.-L., Faudot, C., Crampé, C., Pachot, A., Ayala, A., and Monneret, G. (2007). Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit. Care Med.* *35*, 1910–1917.
- Vidovic, D., Graddis, T.J., Stepan, L.P., Zaller, D.M., and Laus, R. (2003). Specific stimulation of MHC-transgenic mouse T-cell hybridomas with xenogeneic APC. *Hum. Immunol.* *64*, 238–244.
- Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* *356*.
- Villumsen, M., Sørup, S., Jess, T., Ravn, H., Relander, T., Baker, J.L., Benn, C.S., Sørensen, T.I.A., Aaby, P., and Roth, A. (2009). Risk of lymphoma and leukaemia after bacille Calmette-Guérin and smallpox vaccination: a Danish case-cohort study. *Vaccine* *27*, 6950–6958.
- Wada, T., Kikuchi, J., Nishimura, N., Shimizu, R., Kitamura, T., and Furukawa, Y. (2009). Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *J. Biol. Chem.* *284*, 30673–30683.
- Wagner, D.D., and Burger, P.C. (2003). Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 2131–2137.
- Wagner, D.D., and Frenette, P.S. (2008). The vessel wall and its interactions. *Blood* *111*, 5271–5281.
- Wang, G.-Q., Zhang, Y., Wu, H.-Q., Zhang, W.-W., Zhang, J., Wang, G.-Y., Xiao, S.-C., and Xia, Z.-F. (2011). Reduction of CD47 on monocytes correlates with MODS in burn patients. *Burns* *37*, 94–98.
- Wang, H.-B., Wang, J.-T., Zhang, L., Geng, Z.H., Xu, W.-L., Xu, T., Huo, Y., Zhu, X., Plow, E.F., Chen, M., et al. (2007). P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat. Immunol.* *8*, 882–892.

- Waschbisch, A., Schröder, S., Schraudner, D., Sammet, L., Weksler, B., Melms, A., Pfeifenbring, S., Stadelmann, C., Schwab, S., and Linker, R.A. (2016). Pivotal Role for CD16+ Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *196*, 1558–1567.
- Weber, C., Belge, K., Hundelshausen, P. Von, Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K.S.C., and Lo, H.W. (2000). Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations Abstract : The subset of human blood monocytes expressing low levels of CD14 and high levels of. *J. Leukoc. Biol.* *67*, 699–704.
- Weber, K.S.C., Alon, R., and Klickstein, L.B. (2004). Sialylation of ICAM-2 on platelets impairs adhesion of leukocytes via LFA-1 and DC-SIGN. *Inflammation* *28*, 177–188.
- Weiss, R., Gröger, M., Rauscher, S., Fendl, B., Eichhorn, T., Fischer, M.B., Spittler, A., and Weber, V. (2018). Differential Interaction of Platelet-Derived Extracellular Vesicles with Leukocyte Subsets in Human Whole Blood. *Sci. Rep.* *8*, 6598.
- Wersto, R.P., Chrest, F.J., Leary, J.F., Morris, C., Stetler-Stevenson, M.A., and Gabrielson, E. (2001). Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis. *Commun. Clin. Cytom.* *46*, 296–306.
- Weyrich, A.S., Denis, M.M., Kuhlmann-Eyre, J.R., Spencer, E.D., Dixon, D.A., Marathe, G.K., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. (2005). Dipyridamole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates. *Circulation* *111*, 633–642.
- Williams, K.N., Szilagyi, A., He, L.-K., Conrad, P., Halerz, M., Gamelli, R.L., Shankar, R., and Muthumalaiappan, K. (2012). Dendritic cell depletion in burn patients is regulated by MafB expression. *J. Burn Care Res.* *33*, 747–758.
- Williamson, D., Pikovski, I., Cranmer, S.L., Mangin, P., Mistry, N., Domagala, T., Chehab, S., Lanza, F., Salem, H.H., and Jackson, S.P. (2002). Interaction between platelet glycoprotein Iba α and filamin-1 is essential for glycoprotein Ib/IX receptor anchorage at high shear. *J. Biol. Chem.* *277*, 2151–2159.
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., and Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* *118*, e16-31.
- Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012a). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* *53*, 41–57.
- Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012b). The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunol. Res.* *53*, 41–57.
- Wu, Q., Ren, J., Hu, D., Wu, X., Li, G., Wang, G., Gu, G., Chen, J., Li, R., Li, Y., et al. (2016). Monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates: implications in predicting septic mortality among surgical critical illness patients. *Biomarkers* *21*, 509–516.
- Wykes, M.N., and Lewin, S.R. (2018). Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 91–104.

- Xiu, F., Stanojcic, M., Wang, V., Qi, P., and Jeschke, M.G. (2016). C-C Chemokine Receptor Type 2 Expression on Monocytes Before Sepsis Onset Is Higher Than That of Postsepsis in Septic Burned Patients: A New Predictor for Sepsis in Burned Injury. *Ann. Surg.* 264, 392.
- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., DeNardo, D., Gohel, T.D., Emde, M., Schmidleithner, L., et al. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* 40, 274–288.
- Yadavalli, G.K., Auletta, J.J., Gould, M.P., Salata, R.A., Lee, J.H., and Heinzl, F.P. (2001). Deactivation of the innate cellular immune response following endotoxic and surgical injury. *Exp. Mol. Pathol.* 71, 209–221.
- Yáñez, A., and Goodridge, H.S. (2016). Interferon regulatory factor 8 and the regulation of neutrophil, monocyte, and dendritic cell production. *Curr. Opin. Hematol.* 23, 11–17.
- Yin, Z., Dai, J., Deng, J., Sheikh, F., Natalia, M., Shih, T., Lewis-Antes, A., Amrute, S.B., Garrigues, U., Doyle, S., et al. (2012). Type III IFNs are produced by and stimulate human plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 189, 2735–2745.
- Yip, C., Ignjatovic, V., Attard, C., Monagle, P., and Linden, M.D. (2013). First Report of Elevated Monocyte-Platelet Aggregates in Healthy Children. *PLoS ONE* 8, e67416.
- Yoshida, T., Ng, S.Y.-M., Zuniga-Pflucker, J.C., and Georgopoulos, K. (2006). Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat. Immunol.* 7, 382–391.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., et al. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 1, 685–697.
- Yu, C.I., Becker, C., Metang, P., Marches, F., Wang, Y., Toshiyuki, H., Banchereau, J., Merad, M., and Palucka, A.K. (2014). Human CD141+ dendritic cells induce CD4+ T cells to produce type 2 cytokines. *J. Immunol.* 193, 4335–4343.
- Yu, J., Gao, X., Chen, X., Jin, X., Zhang, N., Xue, Y., Zhou, X., Shi, K., Jin, Z., and Wu, W.W. (2016). Dynamics of monocyte surface receptors after burns: a pilot study. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 30, 749–753.
- Yuan, Y., Shen, H., Franklin, D.S., Scadden, D.T., and Cheng, T. (2004). In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat. Cell Biol.* 6, 436–442.
- Zahger, D., Fishbein, M.C., Garfinkel, L.I., Shah, P.K., Forrester, J.S., Regnstrom, J., Yano, J., and Cercek, B. (1995). VCL, an antagonist of the platelet GP1b receptor, markedly inhibits platelet adhesion and intimal thickening after balloon injury in the rat. *Circulation* 92, 1269–1273.
- Zaldivia, M.T.K., Rivera, J., Hering, D., Marusic, P., Sata, Y., Lim, B., Eikelis, N., Lee, R., Lambert, G.W., Esler, M.D., et al. (2017). Renal Denervation Reduces Monocyte Activation and

Monocyte-Platelet Aggregate Formation: An Anti-Inflammatory Effect Relevant for Cardiovascular Risk. *Hypertension* 69, 323–331.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50-61.

Zeng, H., Yücel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., and Möröy, T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 23, 4116–4125.

Zhang, J.-G., Czabotar, P.E., Policheni, A.N., Caminschi, I., Wan, S.S., Kitsoulis, S., Tullett, K.M., Robin, A.Y., Brammananth, R., van Delft, M.F., et al. (2012). The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* 36, 646–657.

Zhao, C., Zhang, H., Wong, W.-C., Sem, X., Han, H., Ong, S.-M., Tan, Y.-C., Yeap, W.-H., Gan, C.-S., Ng, K.-Q., et al. (2009). Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods. *J. Proteome Res.* 8, 4028–4038.

Zhao, C., Tan, Y.-C., Wong, W.-C., Sem, X., Zhang, H., Han, H., Ong, S.-M., Wong, K.-L., Yeap, W.-H., Sze, S.-K., et al. (2010). The CD14(+/-low)CD16(+) monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14(+)CD16(-) subset. *Cell Death Dis.* 1, e95.

Zhou, L.J., and Tedder, T.F. (1996). CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2588–2592.

Zhou, J., Feng, G., Beeson, J., Hogarth, P.M., Rogerson, S.J., Yan, Y., and Jaworowski, A. (2015). CD14(hi)CD16⁺ monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med.* 13, 154.

Zhou, X., Zhang, L., Ji, W.-J., Yuan, F., Guo, Z.-Z., Pang, B., Luo, T., Liu, X., Zhang, W.-C., Jiang, T.-M., et al. (2013). Variation in dietary salt intake induces coordinated dynamics of monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in humans: implications in end organ inflammation. *PloS One* 8, e60332.

Zhu, H., Hu, F., Sun, X., Zhang, X., Zhu, L., Liu, X., Li, X., Xu, L., Shi, L., Gan, Y., et al. (2016). CD16⁺ Monocyte Subset Was Enriched and Functionally Exacerbated in Driving T-Cell Activation and B-Cell Response in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* 7.

Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81, 584–592.

Ziegler-Heitbrock, L., and Hofer, T.P.J. (2013). Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front. Immunol.* 4, 23.

Ziegler-Heitbrock, H.W., Pechumer, H., Petersmann, I., Durieux, J.J., Vita, N., Labeta, M.O., and Ströbel, M. (1994). CD14 is expressed and functional in human B cells. *Eur. J. Immunol.* 24, 1937–1940.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74-80.

Ziegler-heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Derek, N., Leenen, P.J.M., Liu, Y., Macpherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *E-Blood* *116*, e74–e80.

Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., et al. (2012). Ly6C^{hi} monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* *37*, 1076–1090.

Zuchtriegel, G., Uhl, B., Pühr-Westerheide, D., Pörnbacher, M., Lauber, K., Krombach, F., and Reichel, C.A. (2016). Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol.* *14*, e1002459.

F. ANNEXE

Article annexe - Immunodépression des brûlés graves et infections fongiques invasives : un rôle des cellules myéloïdes suppressives

Matthieu Legrand¹, Debora Jorge Cordeiro², Quentin Ressaie^{1*}, Laurence Homyrda², Alexandre Alanio³, Shannon Cohen⁴, Maïté Chaussard¹, Blandine Denis⁵, Marc Chaouat⁶, Alexandre Mebazaa¹, Antoine Toubert², Alain Haziot², Hélène Moins-Teisserenc²

¹, Département d'anesthésie et centre de traitement des brûlés

², Service d'immunologie cellulaire

³, Laboratoire de parasitologie-mycologie

⁴, Inserm

⁵, Service des maladies infectieuses et tropicales

⁶, Service de chirurgie plastique et reconstructrice et centre de traitement des brûlés, hôpital Saint-Louis, Paris, France

*, Auteur correspondant.

Adresse e-mail : quentin.ressaire@gmail.com (Q. Ressaie)

Introduction

Les infections fongiques invasives (IFI) sont associées à une mortalité élevée en réanimation. Elles surviennent surtout en cas d'association de troubles de l'immunité et d'une rupture de la barrière cutané-muqueuse. Les patients brûlés graves apparaissent donc particulièrement à risque. Une meilleure caractérisation de leurs déficits immunitaires pourrait permettre d'identifier ceux les plus à risque et de proposer des thérapeutiques immunomodulatrices. L'objectif était de décrire le profil immunologique de patients brûlés graves ayant présenté une IFI.

Matériel et méthodes

Les patients brûlés > 20% de surface cutanée brûlée (SCB) admis entre mars et octobre 2014 ont été inclus. Prélèvements séquentiels à J0, J2, J7, J14, J28 ou jusqu'à la sortie ou le décès du patient. Les marqueurs de l'immunité innée ont été explorés en cytométrie de flux sur sang total : Natural killer (NK), Mucosal Associated Invariant T cells (MAIT), quantification des molécules HLA-DR sur les monocytes, polynucléaires neutrophiles (PNN) et sous populations monocytaires (ces dernières définies selon des marquages membranaires classiques (CD14+ CD16-), intermédiaires (CD14+ CD16+) et non classiques (CD14^{low}CD16+)). Les patients avec IFI (IFI+) ont été comparés avec ceux sans (IFI-). Résultats exprimés en médianes (25—75 percentiles). Analyse par test de ANOVA pour mesures répétées analyse post-hoc (Bonferroni) ou Mann-Whitney. $p < 0,05$ considéré comme significatif.

Résultats

26 patients ont été inclus, 7 (27%) étaient IFI+. La SCB des IFI+ était de 40 (33—85)% vs 33 (27—42)% pour les IFI- ($p = 0,14$). L'IGS 2 et l'ABSI étaient respectivement de 41 (36—49) et 9 (9—13) chez les IFI+ et 23 (17—33) et 7 (6—8) chez les IFI- ($p = 0,002$ et $p = 0,009$ respectivement). La mortalité à 90 jours était de 57% chez les IFI+ et de 11% chez les IFI-. Le compte absolu de PNN n'était pas statistiquement différent entre les deux. Le compte absolu de monocytes était plus bas à J2 chez les IFI+ ($p = 0,03$). Le nombre de site d'HLA-DR par monocyte était plus bas dès J3 chez les IFI+ et le restait par la suite ($p = 0,03$). Les cellules NK étaient plus basses chez les IFI+ à partir de J7 et les MAIT plus bas chez les IFI+ à J0 ($p = 0,01$) mais cette différence s'estompait ensuite. Une population particulièrement représentée chez les IFI+,

notamment à mucormyose (Fig. 1), possède des caractéristiques morphologiques de monocytes et exprime faiblement CD14. Elle présente cependant un profil de PNN (CD45^{low}, CD16^{hi}, CD66⁺). Ce phénotype composite est évocateur de cellules myéloïdes suppressives MDSC.

Discussion

Les brûlés graves présentent une altération profonde de leur immunité innée. Cette altération est d'autant plus marquée chez les patients IFI+. L'augmentation de cellules myéloïdes suppressives chez ces patients pourrait contribuer à l'immunosuppression favorisant l'IFI.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

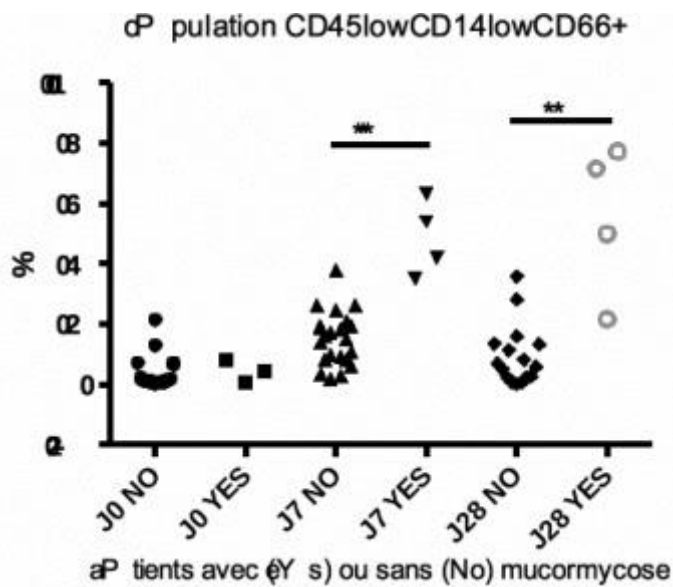


Figure 1.