



HAL
open science

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des sous-populations de monocytes dans les réponses immunitaires

Fadila Mourah

► **To cite this version:**

Fadila Mourah. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des sous-populations de monocytes dans les réponses immunitaires. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCC319 . tel-02341053

HAL Id: tel-02341053

<https://theses.hal.science/tel-02341053>

Submitted on 31 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale « Hématologie – Oncologie – Biothérapies » HOB ED561

INSERM UMRS1160 Alloimmunité – Autoimmunité - Transplantation

Doctorat Immunologie, Hématologie et Oncologie

Fadila MOURAH

**Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des
sous-populations de monocytes dans les réponses
immunitaires**

Dirigée par Alain Haziot

Présentée et soutenue publiquement à l'amphithéâtre Hayem à l'hôpital Saint-Louis

le Vendredi 29 Septembre 2017

Président :	Pr Didier Payen	Université Paris Diderot
Rapporteurs :	Pr Jean-Louis Mège	Université Aix-Marseille
	Dr Claude Lambert	Université Jean Monnet
Examineurs :	Pr Saadia Kerdine-Römer	Université Paris Sud
	Pr Sonia-Athina Karabina	Université Pierre et Marie Curie
Directeur de thèse :	Dr Alain Haziot	Université Paris Diderot

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des sous-populations de monocytes dans les réponses immunitaires

Les monocytes sont des leucocytes circulants dont la caractérisation est longtemps restée difficile. La dissection de l'ensemble de ces cellules en sous-populations fonctionnelles chez l'homme reste à ce jour insuffisante. Les monocytes sont cependant des précurseurs circulants de plusieurs populations de cellules dendritiques et de macrophages tissulaires, et occupent donc à ce titre une place prépondérante dans la mise en place des réponses immunitaires normales et pathologiques.

À l'heure actuelle, trois sous-populations sont décrites chez l'homme : les monocytes classiques $CD14^+CD16^{neg}$, les non-classiques $CD14^{dim}CD16^+$ et les intermédiaires $CD14^+CD16^+$. Fonctionnellement, ces sous-populations sont diverses et hétérogènes et dotées de propriétés pro- et anti-inflammatoires apparemment redondantes. En pathologie, une augmentation du ratio entre $CD16^+$ et $CD16^{neg}$ monocytes a été décrite en situation inflammatoire, suggérant un rôle des premières dans le développement et/ou l'amplification de l'inflammation. Parmi les monocytes non-classiques, des cellules capables de détecter des altérations de l'endothélium et ayant donc des propriétés spécifiques de surveillance du lit vasculaire ont été identifiées et caractérisées.

Dans le but d'obtenir une meilleure définition des populations monocytaires et de les subdiviser en sous-populations où l'identification des fonctions de ces cellules serait plus accessible, je me suis attachée, dans ce travail de thèse, à analyser les différentes populations de monocytes humains circulants de manière aussi exhaustive que possible et avec les outils d'analyse biologiques et informatiques actuels. Les résultats, obtenus par l'analyse en cytométrie de flux de PBMC de 28 donneurs sains après marquage des cellules par vingt anticorps dirigés contre les molécules de surface, ont révélé l'existence d'une population de monocytes de plus grande taille. Ces « large » monocytes se subdivisent également en populations $CD16^{neg}$ et $CD16^+$ (monocytes $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^+$). Les monocytes restant ou « small » se composent de $sm14^+16^{neg}$ largement majoritaires, de $sm14^+16^+$, et de $sm14^{dim}16^+$ auxquels se rajoutent des monocytes $sm14^{lo}16^{neg}$ dont nous confirmons l'existence. L'analyse de l'expression des divers marqueurs sélectionnés a été faite par des méthodes d'analyse classiques, manuelles, ainsi que par l'utilisation d'algorithmes d'analyse non-supervisée. Les

résultats ont montré les particularités d'expression propres à chaque population mais ont aussi indiqué que l'hétérogénéité phénotypique à l'intérieur de ces six populations de monocytes reste importante. Cependant, des profils d'expression qui sont partagés par plusieurs donneurs sains ont été identifiés. L'expression des molécules d'adhésion telles que CD49d, CD62L, CD162, ainsi que CD43 a été particulièrement utile pour cette identification. Quatre groupes phénotypiques majeurs ont ainsi été définis chez les 28 donneurs sains analysés.

Afin d'illustrer comment ces populations de monocytes évoluent en situation infectieuse et inflammatoire, une analyse similaire a été faite chez trois patients septiques prélevés à deux temps différents. Les résultats ont indiqué que les « large » monocytes étaient présents dans l'inflammation, avec également un ratio $CD16^+/CD16^{neg}$ modifié. L'expression de HLA-DR était, de manière inattendue, conservée dans la population $sm14^+16^+$. Enfin, l'appartenance à des groupes phénotypiques a pu être déterminée pour les patients.

Dans le but d'identifier des populations fonctionnelles des monocytes ainsi analysés, les monocytes $sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^+$, $sm14^{dim}16^+$, $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^+$ ont été purifiées à partir de trois donneurs sains, différenciés en cellules dendritiques MoDC et testés pour leur capacité à polariser des lymphocytes T allogéniques. Bien que les réponses aient été très diverses, il a été possible de relier les niveaux d'expression des cytokines produites par les T activés ($IFN\gamma$, IL-4, IL-17, IL-10, $TGF\beta$) à l'expression de certains marqueurs sur les monocytes purifiés. Ainsi, la production d'IL-4 dans les co-cultures de lymphocytes T et MoDC issues de monocytes $sm14^+16^+$ était fortement corrélée au niveau d'expression de CD43 et CD49d chez ces monocytes. L'analyse itérative des corrélations entre l'expression de CD43 et CD49d des monocytes $sm14^+16^+$ et la sécrétion d'IL-4 en co-culture MoDC – lymphocytes T a permis la purification d'une population de monocytes circulants induisant exclusivement et fortement une polarisation Th2. Ces résultats montrent l'existence de population de monocytes aux fonctions prédéfinies dès le stade circulant. Ils permettent aussi de valider une méthode efficace et d'application plus générale pour l'identification de populations fonctionnelles dans des échantillons complexes de cellules de phénotypes voisins.

Mots clefs : Monocytes, Sous-populations, Dérivé de monocytes, Cellules dendritiques, polarisation T, Sepsis, Cytokines

Phenotypical and functional characterization of monocytes subset in immune response

Monocytes are circulating leukocytes whose characterization has long been difficult. Dissection of these cells into functional subpopulations in humans remains insufficient. Monocytes are, however, circulating precursors of several populations of dendritic cells and tissue macrophages, and in this capacity play a prominent role in the development of normal and pathological immune responses.

At present, three subpopulations are described in humans: classical CD14⁺CD16^{neg}, non-classical CD14^{dim}CD16⁺ and intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes. Functionally, these subpopulations are diverse and heterogeneous and with apparently redundant pro - and anti-inflammatory properties. In pathology, an increase in the ratio of CD16⁺ monocyte to CD16^{neg} has been described in inflammatory conditions, suggesting a role of the formers in the development and amplification of the inflammation. Among the non-classical monocytes, cells that can detect changes in the endothelium and having so specific properties of monitoring the vascular bed have been identified and characterized.

In order to get a better definition of monocyte populations and break them down into subpopulations where the identification of their functions would be more accessible, I attached myself, in this thesis work, to analyse the different populations of circulating human monocytes as comprehensively as possible and with current biologic and informatics analytical tools. The analysis by flow cytometry of PBMC from 28 healthy donors after staining cells with twenty antibodies directed against cell surface molecules, revealed the existence of a population of monocytes of larger size. These 'large' monocytes were also divided into populations CD16^{neg} and CD16⁺ (monocytes la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺). The remaining monocytes or 'small' consisted of a majority of sm14⁺16^{neg}, and of sm14⁺16⁺, and sm14^{dim}16⁺ monocytes to which were added the sm14^{lo}16^{neg} monocytes, of which we confirm the existence. The analysis of expression of various selected markers was made by traditional, manual methods, as well as with the use of non-supervised analysis algorithms. The results showed the peculiarities of expression unique to each population but also indicated that the phenotypic heterogeneity within these six populations of monocytes was still important. However, expression profiles that were shared by several healthy donors have been identified. The expression of adhesion molecules such as CD49d, CD62L, CD162, as well as CD43 has been particularly useful for this identification. Four major phenotypic groups have thus been defined in the analysis of 28 healthy donors.

To illustrate how these populations of monocytes evolve during infection and inflammation, a similar analysis was made in three septic patients whose blood was drawn at

two different times. The results indicated that 'large' monocytes were present in inflammation, with also a modified CD16⁺/CD16^{neg} ratio. The expression of HLA - DR was unexpectedly preserved in the sm14⁺16⁺ population. Finally, the phenotypic group membership could be determined for patients.

In order to identify populations that are functional in monocytes analysed in this way, the sm14⁺16^{neg}, sm14⁺16⁺, sm14^{dim}16⁺, la14⁺16^{neg} and la14⁺16⁺ monocytes were purified from three healthy donors, differentiated in MoDC and tested for their ability to polarize allogeneic T lymphocytes. Although the responses have been very diverse, it was possible to connect the levels of expression of cytokines produced by the activated T cells (IFN γ , IL-4, IL-17, IL-10, TGF β) to the expression of certain markers on the purified monocytes. Thus, the production of IL-4 in co-cultures of T cells and MoDC derived from monocytes sm14⁺16⁺ was strongly correlated to the level of expression of CD43 and CD49d in these monocytes. Iterative analysis of the correlations between the expression of CD43 and CD49d in sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 secretion in co-culture MoDC - T cells enabled the purification of a population of circulating monocytes inducing exclusively and strongly a Th2 polarization. These results show the existence of a population of monocytes with predefined functions at circulating stage. They also validate an effective method for the identification of functional populations within complex samples of cells with closely related phenotypes, which has broad potential applications.

Keywords : Monocytes, Subsets, Monocytes-Derived cells, Dendritic cells, T cells polarization, Sepsis, Cytokines

À mon mari et mon fils, à mes parents, à mes frères et mes sœurs, à mes beaux-frères et mes belles-sœurs, à mes amis, à tous mes collègues et mon chef qui grâce à leur amour, leur présence et leur soutien permanent ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma famille à savoir mon mari Ramdane et mon fils Ahmed pour leur amour, leur soutien moral et physique et leur accompagnement tout au long de cette aventure. Je vous remercie surtout pour m'avoir supporté ce qui n'a pas dû être simple tous les jours car je sais que vous en avez vu de toutes les couleurs et que malgré ça j'ai toujours pu compter sur vous et m'appuyer sur vous pour en arriver là et que je ne lâche rien car vous connaissez bien plus que moi mes capacités et avez fait en sorte que je les exploite. Merci d'être toujours là quoi qu'il arrive et d'avoir cru en moi, je vous dois tout.

Mais, également mes parents Abderrahmane et Fatma pour leur soutien tout au long de ma vie et de mes années d'études et qui m'ont toujours poussé pour que j'atteigne toujours le sommet. Votre amour mais, également vos sacrifices afin que je puisse réaliser mes rêves m'ont donné la force d'arriver jusqu'ici. Vous m'avez permis grâce à votre éducation et votre soutien de toujours aller jusqu'au bout de mes aptitudes. Merci pour tout.

J'aimerais aussi remercier mes frères Moustafa et Karim ainsi que mes sœurs Souad, Dalila, Nadia et Samira pour tout ce que vous m'avez apporté à savoir votre présence, votre soutien, votre aide et votre amour qui m'ont permis de faire face à tout ce que j'ai pu rencontrer et qui m'ont ainsi permis d'élaborer ce travail. Votre aide si précieuse m'a permis d'en arriver là et de surmonter bien des obstacles. Merci pour tout.

Je tiens également à remercier mes belles-sœurs Bariza, Saliha et Khadija pour votre amour, votre soutien, votre présence et votre aide dans ma vie et de m'avoir aidé à accomplir tout ce travail. Votre présence a été pour moi une aide précieuse pour l'aboutissement de ce travail et l'envie de toujours faire plus. Merci pour tout.

Je remercie également ma belle-famille pour leur soutien. Merci pour tout.

Je remercie également mes beaux-frères Lakhdar et Nasradin pour votre soutien, votre présence et de toujours me tirer vers le haut car vous connaissez mes capacités. Merci pour tout.

Je remercie une très grande amie et qui compte beaucoup à mes yeux Vinciane et également sa maman Maryline pour votre soutien, votre aide si précieuse et votre présence permanente qui m'ont permis de tout affronter de faire face à tout et surtout de tenir le coup car vous avez toujours été là pour moi dans tous les moments de ma vie. Vous avez su trouver les mots pour m'encourager et ne m'avez jamais laissé tomber ce qui m'a permis de ne jamais abandonner. Vous avez également toujours cru en moi et en mes capacités et m'avez permis de tout affronter. Vous m'avez ainsi permis d'accomplir ce travail. Merci pour tout.

Je remercie également une très grande amie Sonia ou M « apostrophe » Barka et toute sa famille (Mokrani) pour votre présence, votre soutien et votre aide qui m'ont permis de relativiser et d'affronter n'importe quel obstacle. Soso tu as toujours été là pour moi dans tous les moments de ma vie et m'a aidé dans l'aboutissement de ce travail et tu as fait en sorte que je m'épanouisse et que je mène au mieux cette thèse que j'ai enfin accomplie. Je vous dis Merci pour tout.

Je tiens à remercier de très grandes amies Loubina, Fatma, Imane et Amna qui m'ont toujours soutenue au cours de cette thèse par votre présence, votre enthousiasme et votre soutien qui m'ont ainsi permis d'accomplir ce travail. Merci pour tout.

Je remercie également Salomé (je n'oublierais jamais Pomelo) qui as été plus qu'une amie au cours de ma thèse car tu as toujours été là pour moi-même à des milliers de kilomètres, mais également Manel, Zena, Joana, Meriem, Cindy, José, Sébastien et Sophie pour tous nos délires au cours de ces années de thèses mais également votre soutien dans tous les moments de cette thèse qui m'ont donné la force et le courage d'arriver au bout de ce travail avec la chance d'avoir ces souvenirs. Merci pour tout.

Je remercie également Nicolas pour sa patience car je sais que j'ai été très embêtante vis-à-vis de DIVA mais en tant que professionnel tu as pris le temps de toujours répondre à mes questions et m'aider tout au long de cette thèse et c'est grâce à ton soutien et ta science que j'ai pu développer mon travail et arriver à obtenir mes résultats. Tu as beaucoup contribué à l'élaboration de ce travail. Tu es un modèle et j'espère arriver un jour à ta « trempe ». Je remercie également Juliette pour sa présence, son soutien et son aide qui m'ont permis de lever la tête et de continuer d'avancer malgré tout. Je vous dis merci pour tout.

Je remercie Emmanuel pour tous ces délires passés au cours de ces années et de son professionnalisme et ton intelligence que tu as dû beaucoup mettre à mon profit. Tu as su m'aider dans n'importe quel sujet auquel je te confrontais tu as toujours su trouver réponse à tout et m'as permis de toujours me surpasser tu as toujours cru en moi et mes capacités et tu as toujours été là pour moi. Tu m'as aidé dans l'accomplissement de ce travail. Tu es aussi mon modèle et je souhaiterais arriver à ton niveau enfin il ne me reste presque plus grand-chose pour y arriver. Merci pour tout ce soutien et cette aide que tu m'as apportée.

Je remercie également Shannon pour ton aide, ton soutien et les pauses café qui m'ont droguée et ainsi permis de m'accrocher et de finir et d'accomplir ce travail. Merci pour tout.

Je remercie Safa également pour tout l'aide que tu m'as apportée et pour ta présence. Merci pour tout.

Je remercie également Julien, Amy, Karine et Lara pour votre aide et tout le soutien que j'ai pu avoir de vous et qui m'ont aidé pour l'élaboration de ce travail. Merci pour tout.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Farida pour tout ce que tu as pu m'apporter car tu as été pour moi celle qui m'a permis de toujours avoir le sourire quoi qu'il arrive et de tout surmonter et de croire en moi. Tu m'as permis d'y arriver et d'accomplir ce travail par ton aide, ton soutien et ta présence, tu m'as fait développer toutes mes capacités. Je remercie également Zohra pour tous ces bons moments car tu es celle qui enchante nos journées au laboratoire. Tu as su me donner la force de tout affronter et de croire en moi. Vous avez toutes les 2 toujours été là pour moi et avez su m'écouter et me faire prendre confiance en moi quand à bien des moments j'ai voulu tout lâcher. Je ne vous remercierai jamais assez. Je remercie également ma Marie-Christine qui a tellement fait pour moi tant professionnellement pour que tout marche pour moi mais également personnellement qui a été par sa présence un réconfort. Vous avez toutes les trois toujours été là pour moi et m'avez toujours aidé et avez grandement contribué à l'accomplissement de ce travail. Merci pour tout.

Je tiens également à remercier particulièrement Alain, Corinne, Isabelle, Catherine, François, Guylaine, Isaëlle K, Laurence, David, Macarena, Wahid, Hélène, Valérie, Bréno et Itawa pour tout ce que vous m'avez apporté par votre présence, votre soutien, votre aide, votre réconfort et surtout votre gentillesse qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui à savoir l'accomplissement de ce dur labeur qui m'a permis d'effectuer tout ce travail de thèse.

Je remercie également le personnel de la plateforme IUH, Nicolas, Christelle et Sophie pour votre aide, votre présence et votre soutien au cours de toute ma thèse car c'est grâce à vos conseils et vos aides que j'ai pu mener à bien mes expériences dans les meilleures conditions. Je remercie également Julien pour ces nombreuses aides et qui m'a à de nombreuses reprises sauvé « la vie » par sa maîtrise de l'informatique et qui lui a permis de nombreuses récupérations de mes données mais également qui m'a beaucoup aidé et m'a permis d'accomplir ce travail. Je sais que je n'ai pas forcément été simple mais je tenais vraiment à vous remercier pour tout.

Je remercie également Jacques pour ces nombreuses aides informatiques qui m'ont énormément facilité et aidé dans ce travail. Merci pour tout le temps que tu as pris afin de me donner de nombreux tuyaux au niveau informatique et qui me permettent aujourd'hui de devenir une pseudo-geek. Un grand merci pour tout.

J'ai voulu laisser le meilleur pour la fin et ainsi remercier Antoine pour m'avoir accueillie dans votre unité et d'avoir toujours une pensée pour moi et de toujours trouver les mots qui m'ont donné la force de toujours me surpasser. Merci d'être là et de m'avoir toujours aidé et soutenu au cours de ma thèse. Merci pour tout.

Je tiens à remercier Nuala de m'avoir accueilli dans votre équipe et d'avoir cru en moi et de m'avoir donné les moyens d'accomplir tout ce travail. Merci pour tout.

Je tiens à remercier M. Payen et Valérie d'avoir cru en moi et de me permettre de mener à bien mes expériences sur des patients septiques vous avez été ceux qui m'ont permis de pouvoir valider mes données sur patients et d'accomplir ce travail. Merci pour tout.

Je tiens à terminer mes remerciements avec la personne qui a été le tout premier à croire en moi et à toujours me soutenir au cours de cette thèse et qui m'a fait confiance alors que moi-même je ne le faisais pas : Alain. Vous m'avez fait confiance et vous m'avez donné les moyens d'y arriver mais également vous m'avez fait grandir afin que je me surpasse de jour en jour car vous étiez bien plus conscient que moi de mes capacités et m'avez ainsi permis d'effectuer toutes ces expériences me permettant d'obtenir ces résultats que je présente maintenant dans ce travail. Vous avez grandement ou plutôt complètement contribué à l'accomplissement de cette thèse. Je ne saurais jamais assez vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté votre aide, votre présence, votre soutien, votre gentillesse et surtout esprit de génie qui m'a permis de concevoir ce travail. Merci pour tout.

Vous avez tous toujours cru en moi et avez su me pousser quand à bien des moments j'ai voulu tout abandonner. Un GRAND MERCI à tous pour tout ce que chacun a pu m'apporter dans ma vie et au cours de cette thèse et qui m'a permis d'en arriver là. Les mots que j'ai pu écrire dans ces remerciements ne suffisent pas à vous remercier et à vous témoigner toute ma gratitude.

Table des matières

Remerciements	7
Table des matières	12
Table des illustrations et des tables.....	15
Liste des abréviations	17
Introduction	21
I. Le système immunitaire.....	22
1. L'hématopoïèse	24
2. Les cellules myéloïdes circulantes	30
A. Granulocytes Neutrophiles	30
B. Les monocytes	35
a. Historique : A la découverte des globules blancs (leucocytes)	36
b. Hétérogénéité des monocytes.....	43
i. Hétérogénéité phénotypique	44
☞ Données de la cytométrie en flux.....	44
☞ Données transcriptomiques	47
☞ Données protéomiques	49
☞ Données épigénétiques.....	49
ii. Hétérogénéité fonctionnelle.....	51
c. Les monocytes en pathologie	53
d. Les monocytes murins.....	55
e. Les cellules dérivées de monocytes	59
i. Les macrophages	62

ii. Les cellules dendritiques.....	65
C. Les cellules suppressives myéloïdes (MDSC) :	72
3. La polarisation des lymphocytes T vers les phénotypes Th1, Th2, Th17, Treg.	75
II. Inflammation	81
1. Définition et médiateurs de l'inflammation	81
a. Les protéases plasmatiques	82
b. Les amines vasoactives.....	83
c. Les médiateurs lipidiques	83
d. Les enzymes et métabolites des phagocytes	84
e. Les cytokines et les chimiokines.....	84
f. Le monoxyde d'azote (NO).....	84
2. Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique.....	86
III. Sepsis	90
1. Définitions.....	90
2. Épidémiologie.....	92
3. Physiopathologie du sepsis.....	93
<u>Objectifs</u>	<u>96</u>
<u>Articles</u>	<u>98</u>
<u>Résultats Article 1</u>	<u>99</u>
Article 1 : Identification of novel human monocyte sub-populations and of monocyte phenotypic group defined by inter-individual variations of cell surface receptor expression	101

Résultats Article 2 170

Article 2 : Identification of specific Th2-prone monocyte sub-population in humans
171

Conclusion / Perspectives 198

Références Bibliographiques..... 202

Table des illustrations et des tables

Figure 1: Facteurs de Transcription et régulateurs épigénétiques de la myélopoïèse	25
Table 1 : Rôles des Facteurs de Transcription au cours de la différenciation monocytique	28
Figure 2 : A. Les récepteurs membranaires et B. les granules cytoplasmiques des neutrophiles	32
Figure 3 La migration multidirectionnelle des neutrophiles	34
Figure 4 : Développement et différenciation des monocytes en macrophages et cellules dendritiques chez l'homme et la souris	35
Figure 5 : Séparation du sang total par du sérum albumine	38
Figure 6 : Visualisation par Illumination Darkfield (x630) de leucocytes.	39
Figure 7 : Sédimentation des érythrocytes	39
Figure 8 : Tri des leucocytes à l'aide de la méthode du Fibrinogène	40
Figure 9 : Obtention des Cellules Mononucléaires du Sang Périphérique (PBMC).	42
Figure 10 : Dot Plot CD14 vs CD16 sur des PBMC humains	44
Figure 11 : Dot Plot CD14 vs CD16 sur des PBMC humains	46
Figure 12 : Compartiments monocytaires murins	57
Table 2 : Les sous-types monocytaires chez la souris et chez l'homme	58
Figure 13 : Recrutement et différenciation des monocytes au cours de l'inflammation.	60
Figure 14 : Schéma récapitulatif de la différenciation des monocytes in vitro (ou en condition inflammatoire)	61
Figure 15 : Représentation schématique de la polarisation des macrophages en M1 et M2	64
Figure 16 : Phénotypes humain et Souris de certaines sous-populations de DC	68
Figure 17 : Origine et organisation des DC chez l'humain et la souris.	69

Figure 18 : Hypothèses actuelles sur l'origine de MDSC.	73
Figure 19 : Effets des immunosuppresseurs des MDSC	74
Figure 20 : Les molécules mises en jeu dans la synapse immunologique (T-CPA)	76
Figure 21 : Polarisation des cellules T par les cellules dendritiques après stimulation par les PRR	78
Figure 22 : Polarisation des lymphocytes T	80
Figure 23 : La cascade du complément	82
Figure 24 : Schéma récapitulatif de la réponse inflammatoire	85
Figure 25 : SIRS d'origine infectieux ou non-infectieux	87
Table 3 : qSOFA, critère des scores de défaillance d'organes	91
Figure 26 : Similarités et différences entre les 3 définitions successives du sepsis	92

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ACCP	American College of Chest Physicians
Acm	Anticorps Monoclonaux
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
Ag	Antigène
ADN	Acide DésoxiriboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BDCA	Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen
CAM	Complexe d'Attaque Membranaire
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) Receptor
CD	Cluster de Différenciation
cDC	Cellules Dendritiques Conventionnelles
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CLEC	C-Type Lectin Receptor
CLP	Progéniteurs Lymphoïdes Communs
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP	Progéniteurs Myéloïdes Communs
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
Cn / CnQ	Molécule du Complément
CSFR	Colony Stimulating Factor
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
COX	CycloOXygenase
CTL	Lymphocytes T Cytotoxiques
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) Receptor
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern

DC	Cellules Dendritiques
DNMT	ADN MéthylTransférase
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
e.g	Exempli Grata / Par Exemple
ELAM	Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule
ERK	Extracelular signal-Regulated Kinases
ESICM	European Society of Intensive Care
FcR	Récepteur au Fragment Constant des immunoglobulines
FT	Facteurs de Transcription
FSC	Forward-SCattered light
GM-CSF	Granulocyte-Monocytes Colony Stimulation Factor
G-MDSC	Granulocyte- Myeloid-Derived Suppressor Cells
GMP	Progéniteurs Granulocytes / Monocytes
GR	Galactose Receptor
HDAC	Histones Déacétylases
HDN	High Density Neutrophiles
Hi	High
HLA	Antigènes des Leucocytes Humains
IFN	Interferon
IFNR	Récepteur à l'interferon
Ig	Immunoglobulines
IL	InterLeukines
ILC	Innate Lymphoid Cells
ILR	Récepteurs aux InterLeukines
iNOS	Oxyde Nitrite induit
IRAK	Interleukin Receptor-Associated Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Imminoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
LAT	Linker of Actvation of T cells
Lo	Low
LB	Lymphocytes B
LDN	Low Density Neutrophiles
LPS	LipoPolySaccharides

LT	Lymphocytes T
LTB	Leucotriène B
M1	Macrophages de type 1
M2	Macrophages de type 2
Mac	Molécule d'adhésion
M-CSF	Monocyte-Colony Stimulating Factor
M-CSFR	Monocyte-Colony Stimulating Factor Receptor
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MDP	Progéniteurs de cellules Dendritiques / Monocytes / Macrophages
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MGG	May-Grünwald Giemsa
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
miRNA	microARN
MLR	Réaction Mix de Leucocytes
MMP	Progéniteurs Multipotents
MPS	Mononuclear Phagocyte System
MoDC	Cellules Dendritiques dérivées de Monocytes
MODS	Syndrome de Dysfonctionnement de Multiples Organes
MOF	Multiples Défaillances d'Organes
Mo-MDSC	Monocyte-Myeloid-Derived Suppressor Cells
MR	Mannose Receptor
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
Neg	Négatif
NGAL	Neutrophile Gelatinase Associated Lipocalin
NK	Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
NOX	NADPH OXydase
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Cellules Mononucléaires du Sang Périphérique
pDC	Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes
PGE	Prostaglandine E
PIRO	Prédispositions, infection et Réponse à une défaillances Organiques
PMN	PolyMorphoNucléaire
PMN-MDSC	PolyMorphoNuclear-Myeloid-Derived Suppressor Cells

PMT	Paramètres
PN	Polynucléaire Neutrophile
Pos	Positif
PRR	Pattern Recognition Receptor
qSOFA	quickSOFA
RNI	Réactif du Nitrogène
RNS	Espèces Réactifs de Nitrogène
ROI	Réactif de l'Oxygène
ROS	Espèce Réactif de l'Oxygène
sbADN	ADN simple brin
sbARN	ARN simple brin
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SCF	Facteurs de Cellules Souches
SEP	Sclérose En Plaque
SIRP	Signal Regulatory Protein
SIRS	Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique
SIS	Surgical Infection Society
SOCS	Suppressor of Cytokines Signaling
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SR	Scavenger Receptor
SSC	Size-Scattered light
SOFA	Scores d'Evaluation des Défaillances d'Organes
TCR	T Cell Receptor
Tfh	Lymphocytes T helper folliculaires
TGF	Tumor Growth Factor
Th	T helper
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	T régulateurs
XCR	Chemokine (X-C motif) Receptor

Introduction

L'objet de ce travail de thèse a consisté en une analyse approfondie d'une population de cellules du système immunitaire humain, les monocytes, afin d'en distinguer certaines particularités phénotypiques et fonctionnelles à l'état physiologique. Les altérations de certaines de ces propriétés ont été analysées en situation inflammatoire et infectieuse dans le sepsis. Dans cette introduction, je résumerai les éléments essentiels à la compréhension de ce projet concernant le développement et les fonctions des cellules immunitaires, en particuliers myéloïdes, l'inflammation, et le sepsis choisi comme modèle pour l'analyse des altérations des phénotypes monocytaires définies précédemment chez le sujet sain.

I. Le système immunitaire

Le système immunitaire a la particularité anatomique d'être un organe constitué à la fois de tissus dispersés dans l'organisme et de cellules individuelles circulantes, migratoires et ubiquitaires dans l'ensemble de l'organisme. Les tissus immunitaires assurent la production et le renouvellement des cellules (moelle osseuse) et leur instruction aux fonctions particulières, notamment pour les cellules lymphoïdes (thymus, rate, ganglions). Les cellules individuelles sont regroupées en populations suivant leur origine et leurs fonctions. Par des mécanismes biologiques complexes, elles assurent la défense de l'organisme contre l'invasion microbienne et contre certains dysfonctionnements des cellules de l'hôte. Pour ce faire, les cellules produites dans la moelle osseuse circulent dans le sang et rejoignent si nécessaire les tissus périphériques qui sont le siège de processus pathogènes.

Une protection efficace de l'organisme est assurée par quatre fonctions principales du système immunitaire :

- la reconnaissance immunologique de l'infection ou du dommage tissulaire via la détection par des cellules et récepteurs du système immunitaire
- l'activation des cellules immunitaires effectrices qui contiennent de manière localisée l'infection ou la lésion en vue de son élimination. Cette élimination est induite par l'activation de facteurs sériques comme le complément, la production de molécules effectrices par les cellules activées telles que les défensines et les anticorps, et la capacité cellulaire d'élimination des microorganismes et cellules altérées par phagocytose et cytotoxicité.
- la régulation immunitaire qui permet le contrôle de la réponse immunitaire afin de ne pas engendrer de dommage à l'organisme durant la phase d'élimination, et de favoriser les mécanismes de régénération des tissus.
- la mémoire immunologique qui permet à l'organisme de se protéger en cas de réinfection par un même pathogène avec une réponse plus rapide que suite à la première rencontre. Cette immunité peut ainsi être considérée comme une immunité protectrice.

Les réponses immunitaires se décomposent classiquement en immunité innée et adaptative, et la coopération étroite entre ces deux composantes est importante pour la mise en place de réponses immunes adaptées (Fan and Rudensky 2016).

L'immunité innée est une réponse immunitaire immédiate de l'organisme à des molécules perçues comme étrangères, que ces molécules soient exogènes ou bien endogènes mais non

exposées au système immunitaire en situation physiologique. Cette réponse ne requiert pas la génération et la sélection de récepteurs spécifiques à cet antigène et reste quasi-similaire après chaque contact avec une même molécule. Les récepteurs impliqués reconnaissent un grand nombre d'antigène dans des interactions de moyenne ou faible affinité. Ces antigènes sont des motifs structuraux (« Pathogen Associated Molecular Pattern » ou PAMP) portés par des molécules essentielles à la survie des microorganismes. Ces récepteurs, appelés « Pattern Recognition Receptor » (PRR), sont exprimés par les cellules du système immunitaire inné comprenant des cellules issues des lignées hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes, mais aussi des cellules participant aux barrières anatomiques comme les cellules épithéliales.

Les cellules myéloïdes mises en jeu au cours de ces réponses immunes sont des cellules telles que les granulocytes, les monocytes, les cellules dendritiques et les macrophages qui font partie de l'immunité innée. Ce sont des cellules capables d'ingérer par phagocytose et de détruire l'agent infectieux à l'aide de molécules toxiques et d'enzymes lytiques. De plus, ces cellules présentent des motifs structuraux issus du matériel phagocyté à leur surface par interaction avec les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).

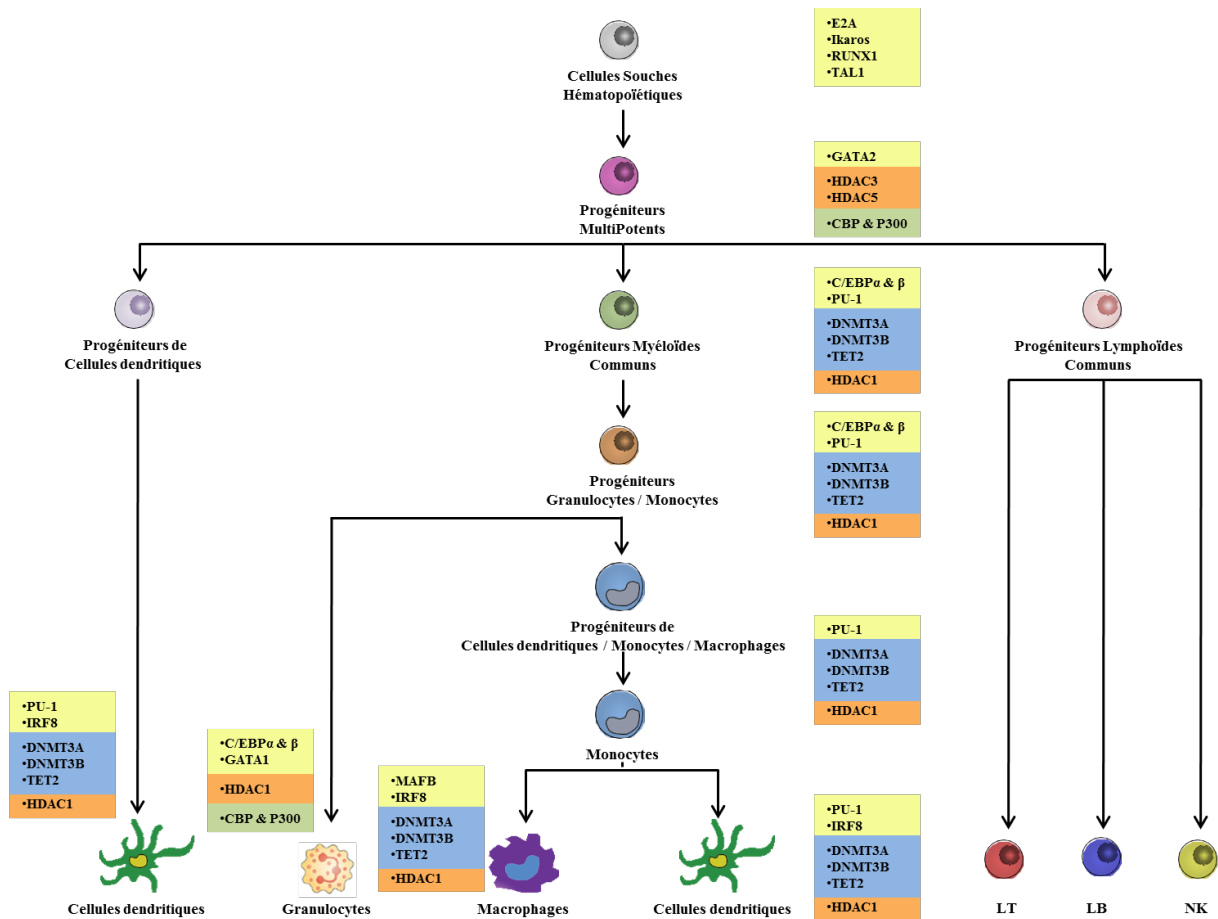
Les cellules immunitaires lymphoïde telles que les Innate Lymphoid Cells (ILC) et les lymphocytes T et B font partie de l'immunité innée ou adaptative. L'interaction entre le complexe formé par l'antigène-CMH et les récepteurs à l'antigène des lymphocytes T (TCR) codés par des gènes recombinés est au cœur de la coopération entre le système immunitaire inné et adaptatif.

L'ensemble de ces cellules proviennent de l'hématopoïèse très majoritairement dans la moelle osseuse où les précurseurs de ces cellules se multiplient et se différencient. L'hématopoïèse procède à partir de progéniteurs communs aux cellules myéloïdes et lymphoïdes, puis se divise en myélopoïèse, qui nous intéresse plus particulièrement ici, et en lymphopoïèse.

Nous présenterons dans un premier temps la différenciation myéloïde ainsi que les cellules myéloïdes effectrices et en particulier les monocytes. Dans un second temps, nous présenterons l'inflammation, en particulier l'inflammation systémique, ainsi que quelques rappels sur le sepsis.

1. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus constitutif de l'organisme qui conduit par différents mécanismes à la production ainsi qu'au renouvellement continu des cellules du sang (globules rouges, plaquettes, leucocytes comprenant les lignées lymphoïdes et myéloïdes) et de leurs dérivés dans les tissus. Ce processus physiologique permettant ainsi le renouvellement de tissus et de cellules souches hématopoïétique (CSH) est régulé de manière très fine tant qualitativement que quantitativement et est orchestré par des facteurs intrinsèques et extrinsèques provenant du microenvironnement procédant par activation ou inhibition. Au cours du développement, l'hématopoïèse humaine a lieu dans différents organes mais chez l'adulte, cette dernière a lieu dans la moelle osseuse.



*D'après "Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function",
(Álvarez-Errico et al. 2014)*

Figure 1: Facteurs de Transcription et régulateurs épigénétiques de la myélopoïèse

La différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en différentes cellules du système immunitaire est reprise ici avec indication des facteurs spécifiques de chaque type cellulaire mis en jeu à chaque étape.

Cette figure montre les différentes étapes de la différenciation myéloïde et indique les facteurs de transcription (boîtes jaunes) ainsi que les enzymes épigénétiques qui pourraient être impliquées.

Les enzymes qui jouent un rôle dans la déméthylation de l'ADN sont indiquées dans les cases bleues, les histones déacétylases (HDAC) sont identifiées dans des cases oranges et les histones acétyltransférases sont indiquées dans les cases vertes.

Les CSH de la moelle osseuse sont des cellules indifférenciées quiescentes et capable d'auto-renouvellement qui ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires formant ainsi le tissu sanguin. La CSH se différencie après une division asymétrique à savoir qu'une des cellules filles conserve sa capacité d'auto-renouvellement alors que la seconde va se différencier en fonction des facteurs cellulaires présents dans l'environnement et ainsi quitter la niche hématopoïétique pour se diriger vers un microenvironnement induisant sa différenciation finale (Knoblich 2008). Les cellules présentes dans la niche comprennent les ostéoblastes, les ostéoclastes, des cellules endothéliales, des cellules souches mésenchymateuses et des cellules du système nerveux sympathique, toutes capables de sécréter des facteurs trophiques.

L'analyse des différentes étapes de l'hématopoïèse dans les modèles animaux comme chez l'homme reste un domaine d'investigation intense source de remise en question régulière des notions connues.

Les CSH sont maintenues dans l'état de cellules souches pluripotentes en réponse à de nombreux signaux extracellulaires tels que l'angiopoiétine, la thrombopoiétine, le SCF (Stem Cell Factor) et CXCL12 (Wang and Wagers 2011) qui régulent la transcription de facteurs comme Ikaros et E2A, régulant eux-mêmes l'initiation de la différenciation vers les différents lignages (Shenghui et al. 2009). Le homing à des sites particuliers de la moelle osseuse assure le maintien de ces cellules en cellules indifférenciées. La division initiale des cellules souches se fait grâce à la stimulation de la voie de signalisation Notch (par le blocage de Numb). (Knoblich 2008). Leur expansion est régulée par l'environnement ainsi que par des facteurs de transcription régulateurs tels que Gfi1, Bmi1 qui peuvent activer la transcription de STAT5 et des membres de la famille Hox tels que Hox B4 et B6 (Mercer, Lin, and Murre 2011; Walasek, van Os, and de Haan 2012; Wang and Wagers 2011).

La différenciation des cellules souches aboutit aux Progéniteurs Multipotents (MPP) qui sont les progéniteurs communs des cellules lymphoïdes et myéloïdes mais qui perdent la capacité d'auto-renouvellement (Rosenbauer and Tenen 2007).

Ces dernières se différencient en Progéniteurs Lymphoïdes Communs (CLP) dont sont dérivés les lymphocytes (T, B et Natural Killer ou NK et autres ILC). (Rosenbauer and Tenen 2007) et en Progéniteurs Myéloïdes Communs (CMP). A leur tour, les CMP se différencient en progéniteurs d'érythrocytes et de mégakaryocytes (MEP) d'une part, et sous le contrôle des facteurs de transcription CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α) et PU.1, en progéniteurs qui donneront la myélopoïèse. Ceux-ci se distinguent entre progéniteurs de macrophages et granulocytes (GMP) qui sont à l'origine des différents granulocytes, et les progéniteurs de cellules dendritiques et de monocytes (MDP) (Rosenbauer and Tenen 2007). Il

est à noter que ces populations de précurseurs ont été identifiées sur la base de tris en fonction de molécules de surface et de tests de transfert *in vivo*. L'analyse récente des précurseurs CMP par séquençage single-cell couplée à des expériences de reconstitution a montré la forte hétérogénéité de la population CMP avec 18 sous-populations distinctes (Paul et al. 2015), suggérant un bien plus grand nombre de progéniteurs spécifiques que ceux décrits ici.

Les MDP peuvent emprunter la voie de la différenciation vers les monocytes. Peu d'informations spécifiques sont connues sur ce qui détermine l'engagement dans cette voie, ni du point de vue des molécules de surface, ni surtout du point de vue des facteurs de transcription impliqués (Terry and Miller 2014). L'invalidation d'un nombre important de facteurs de transcription, comme C/EBP α et C/EBP β , Irf8, PU.1, Egr-1, Stat3, Gfi1, ou Gata2, bloquent le développement des monocytes, mais aucun n'est spécifique de ce stade de développement et tous agissent sur d'autres branches de l'hématopoïèse (Table 1), de sorte qu'il n'est pas possible d'affirmer qu'ils ont un rôle spécifique. L'expression du récepteur pour le M-CSF (CSF1-R) est essentielle pour le développement des monocytes et est sous la dépendance des facteurs de transcription Irf8 et Klf4 (Kurotaki et al. 2013).

Rôle prédominant des facteurs de transcription au cours de la monoïose	
PU.1	→ Initiation et maintien de la monoïose
C/eBP α -p30	→ Expansion des cellules progénitrices, Différenciation en GMP
C/eBP β -LIP	→ Expansion des cellules progénitrices
STAT1/3	→ Restriction de la prolifération, Transition vers l'état de progéniteur
C/eBP α -p42	→ Restriction de la prolifération, Transition en MPP-CMP-GMP-MDP
c-Jun	→ Transition en MPP, puis CMP puis, GMP puis, MDP et en monocyte
JunB	→ Restriction de la prolifération
vDR	→ Restriction de la prolifération, Transition en MPP puis, CMP puis, GMP puis, MDP et en monocyte
IRF1/4	→ Restriction de la prolifération, Transition vers GMP puis, MDP et enfin monocytes
C/eBP β -LAP*/LAP	→ Restriction de la prolifération, transition vers GMP puis, MDP et en monocyte
IRF8	→ Restriction de la prolifération, Transition en GMP puis, MDP et en monocyte, Différenciation terminale
C/eBP ϵ	→ Différenciation terminale

*D'après, "Regulation of monocyte differentiation by specific signaling modules and associated transcription factor networks"
(Huber et al. 2014)*

Table 1 : Rôles des Facteurs de Transcription au cours de la différenciation monocytique

De nombreux facteurs de transcriptions interviennent de manière séquentielle dans le développement des cellules myéloïdes sanguines, comme résumé ici. Ils contrôlent des programmes d'expression géniques qui déterminent le destin des différents progéniteurs.

Au cours d'une inflammation, les monocytes acquièrent la capacité de subir une différenciation supplémentaire et de donner ainsi des macrophages grâce au facteur de transcription MAFB ou de donner des cellules dendritiques par le biais de l'expression de l'Irf8 (Interferon Regulatory Factor 8). En amont, Irf8 favorise également la différenciation en

monocytes par rapport à la différenciation en granulocytes (Alberto et al. 2015; Yanez and Goodridge 2016).

L'autre type cellulaire issu des MDP est la cellule dendritique. L'engagement dans cette voie est dépendant de l'expression du récepteur fms-related tyrosine kinase 3 (Flt3) (Maraskovsky et al. 1996). L'interaction de Flt3 avec son ligand Flt3L active Stat3 qui est essentiel pour cette voie (Laouar et al. 2003). D'autre part, les souris déficientes en growth factor independent 1 (Gfi1), qui est un répresseur de la transcription, ne développe pas de DC (Rathinam et al. 2005). Des progéniteurs médullaires spécifiques de chacune des populations de DC (décrites section I. 2. B. e. ii.) ont été décrits. Cependant, les facteurs impliqués agissant dans chaque voie peuvent être communs, mais intervenant dans des complexes de signalisation légèrement différents. Ainsi, les facteurs de transcription Id2 et E2-2 conditionnent l'orientation des progéniteurs vers les DC conventionnelles cDC et vers les DC plasmacytoïdes pDC, respectivement (Li et al. 2012). Cependant, le développement des DC plasmacytoïdes pDC et des DC conventionnelles de type cDC1 dépend d'IRF8, alors que celui des cDC2 dépend de IRF4 (Yamamoto et al. 2011).

Le développement des pDC dépend de l'activation de SpiB, Irf8, et Irf7 activés par E2-2 (Ghosh et al. 2010) et de l'expression du récepteur pour le M-CSF (Onai et al. 2013).

Le développement des cDC dépend aussi du zinc finger Zbtb46 qui intervient également dans la différenciation in vitro des DC dérivées de monocytes MoDC (Schraml et al. 2013). La voie cDC1 dépend des facteurs de transcription Nfil3 et Batf3 (Hildner et al. 2008), alors que pour la voie cDC2 les données manquent encore.

Les progéniteurs myéloïdes ont longtemps été considérés comme étant également à l'origine de macrophages. Cependant, l'origine embryonnaire et fœtale des macrophages résidents (voir section I. 2. B. e. i) a remis en question leur production à partir de l'hématopoïèse médullaire adulte.

L'expression de ces facteurs de transcription et leur capacité à agir sur l'expression génique est fortement dépendante de processus épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et la méthylation et acétylation d'histones (**Figure 1**). Ainsi, dans les précurseurs des monocytes humains, il a été observé que PU.1 interagissait avec des enzymes de méthylation de l'ADN telles que méthyl-cytosine dioxygénase TET2 et l'ADN méthyltransférase 3B (DNMT3B) les recrutant possiblement vers leurs cibles (de la Rica et al. 2013).

2. Les cellules myéloïdes circulantes

Dans le cadre de cette introduction, j'effectuerai une brève présentation de la biologie de certaines des principales cellules myéloïdes circulantes, à savoir les polynucléaires neutrophiles et, plus en détail, les monocytes, qui font l'objet de ce travail, ainsi que les cellules qui en sont dérivées (macrophages et MoDC). Enfin, une courte section sera consacrée aux cellules myéloïdes suppressives MDSC pour lesquelles l'intérêt est grandissant et auxquelles certaines des cellules analysées au cours de ce travail de thèse pourraient être apparentées.

A. Granulocytes Neutrophiles

Au sein des granulocytes, différents types cellulaires ont été identifiés et classés en fonction de la nature de leurs granules présents dans le cytoplasme. La coloration de ces granules à l'aide de colorant acide (à base d'éosine) ou basique (à base de bleu de méthylène comme dans la coloration de May-Grünwald Giemsa) permet de distinguer les granulocytes suivant la nature du contenu des granules. Ainsi, les granulocytes sont composées de neutrophiles (représentent 60 % des leucocytes circulants) qui sont les premières cellules à être recrutées en cas d'inflammation ou d'infection et ont une forte capacité de phagocytose ; d'éosinophiles (représentant 1% à 3% des leucocytes circulants) qui contiennent des enzymes lytiques et des substances toxiques contre les parasites dans leur cytoplasme ainsi que de l'histamine qui est un médiateur de l'inflammation ; et enfin les basophiles (représentant moins de 1% de leucocytes sanguins) qui libèrent également de l'histamine et jouent un rôle dans les réactions antiparasitaires et allergiques.

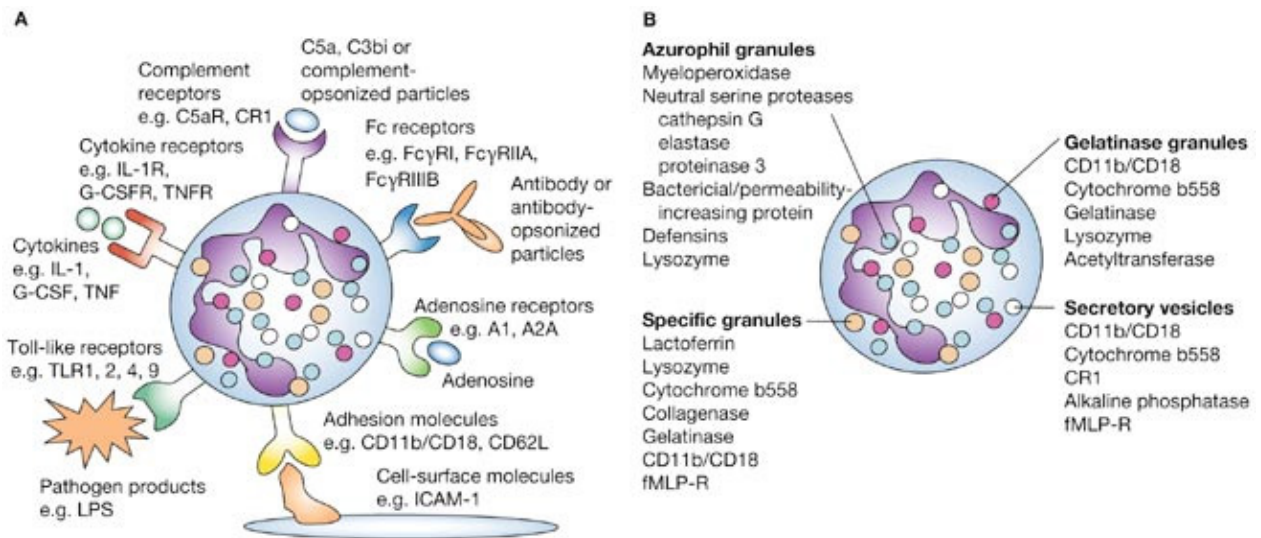
Les granulocytes ou polynucléaires neutrophiles (PN) représentent la majorité des leucocytes circulants chez un individu sain et leur diminution expose l'individu à un risque infectieux. Ces cellules migrent massivement vers le foyer inflammatoire afin d'y exercer leurs fonctions antimicrobiennes puis meurent par apoptose ou nécrose. La granulopoïèse d'urgence activée dans la moelle osseuse en cas de stimulus du système immunitaire assure une reconstitution du pool de PN qui passent dans le sang.

La rétention des neutrophiles au niveau de la moelle osseuse se fait par l'interaction coordonnée de CXCL12 avec le récepteur CXCR4, alors que leur mobilisation se fait par les ligands de CXCR2. (Eash et al. 2010; Köhler et al. 2011)

Les PN ont été décrits comme ayant une durée de vie limitée (5,4 jours) (Cartwright, Athens, and Wintrobe 1964; Pillay et al. 2010). Au cours d'une inflammation ou d'une infection, il a été observé que la durée de vie des neutrophiles était augmentée dû à une inhibition de l'apoptose cellulaire médiée entre-autre par les cytokines, les PAMPs, les DAMPs (Geering et al. 2013; Sundqvist et al. 2013)

Les PN ont des fonctions anti-bactériennes majeures qu'ils exercent par la phagocytose et par la libération de substances bactéricides contenus dans leurs granules. Ceux-ci apparaissent au cours de la différenciation terminale dans la moelle osseuse avec une apparition séquentielle des différents types de granules. Très tôt, deux types de granules ont été identifié suivant la présence ou l'absence de myéloperoxydase. (D. Bainton, Ullyot, and Farquhar 1971) Les granules peroxidase negatif, appelés spécifiques, contiennent de la lactoferrine. Par la suite, les granules positifs pour la peroxydase appelée granules azurophiles, ont été subdivisés en granules pauvres ou riches en défensines, qui sont des molécules impliquées dans les défenses anti-microbiennes. (Rice, Kinkade, and Parmeley 1986; Rice et al. 1987). L'analyse des granules azurophiles a montré, en plus de la présence de la protéine peroxydase, la présence d'autres enzymes en particulier protéolytiques telles que la protéinase 3, la cathepsine G, et la neutrophile élastase, ainsi que la protéase inactive enzymatique (CAP37 ou Heparin Binding Protein HBP) qui accroît la perméabilité de l'endothélium au cours de la diapédèse. (D. F. Bainton and Farquhar 1968a; D. F. Bainton and Farquhar 1968b; Perera et al. 2013; Ganz et al. 1985; Egesten et al. 1994; Gautam et al. 2001)

Une troisième population de granules a été identifiée par la présence de la gélatinase et appelée granule gélatinase. (Dewald, Bretz, and Baggiolini 1982). Cependant, il a été plus tard démontré qu'il y avait une co-localisation de la gélatinase avec la lipocaline, et cet ensemble appelé neutrophile gélatinase associé à la lipocaline (NGAL) est retrouvé dans les granules spécifiques. (Kjeldsen et al. 1993)



Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils forgotten mediators of inflammatory disease
(Eyles et al. 2006)

Figure 2 : A. Les récepteurs membranaires et B. les granules cytoplasmiques des neutrophiles

La figure 2A. représente les récepteurs à la surface des neutrophiles ainsi que leur ligand associé.

La figure 2B indique les différents granules que l'on retrouve dans le cytoplasme des neutrophiles.

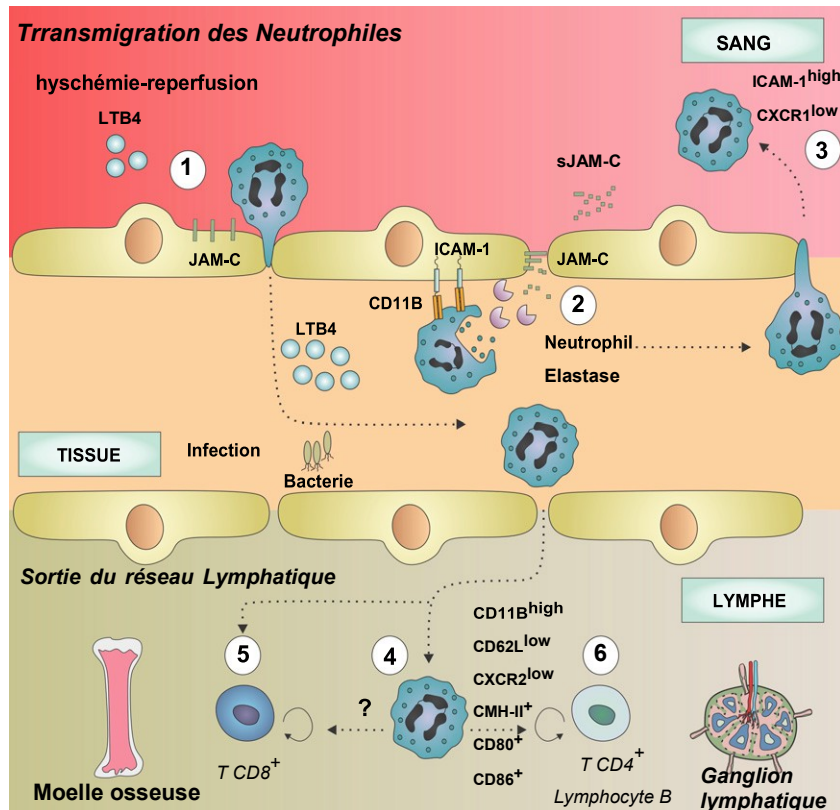
Les PN ont été anciennement considérés comme des cellules "homogènes", en différenciation terminale, sans capacité proliférative, avec une production de cytokines limitée et une activité transcriptionnelle réduite, et également avec une incapacité à retourner dans la circulation après avoir migré dans les tissus. Les travaux plus récents ont amené à réviser ces propriétés.

Les PN migrent vers le site infectieux ou inflammatoire sous l'influence de facteurs chimiotactiques comme les chimiokines produites au niveau du tissu lésé. Les neutrophiles adhèrent aux cellules endothéliales des veinules ou des capillaires par l'intermédiaire de la sélectine CD62L qui interagit avec CD62E et CD62P à la surface des cellules endothéliales elles-mêmes activées par les chimiokines produite sur le site. Cette interaction ralentit les neutrophiles qui roulent sur les cellules endothéliales activées ce qui va induire la perte du CD62L des neutrophiles (Casanova-Acebes et al. 2013; D. Zhang et al. 2015) et induire l'augmentation de l'expression de l'expression de la membrane des intégrines $\beta 2$ (CD11b/CD18). Celles-ci vont

se lier aux molécules d'adhésion ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecules) sur les cellules endothéliales, menant à l'immobilisation des PN, préalable à la sortie des vaisseaux. Les PN ainsi immobilisés se glissent par diapédèse entre les cellules de l'endothélium vers leur cible, guidés par un gradient de facteurs chimiotactiques. (Kolaczowska and Kubes 2013)

Il a également été montré que les PN pouvaient migrer en sens inverse et traverser un endothélium vers la lumière du vaisseau, en particulier dans les vaisseaux lymphatiques. Ainsi, les PN adhèrent aux cellules endothéliales via CD11b et dissocient les jonctions endothéliales par la dégranulation d'élastase. Les PN rejoignent ainsi les ganglions lymphatiques où ils se présentent sous le phénotype CD11b^{high}, CD62L^{low}, CXCR2^{low}. Ils y expriment également les molécules du CMH et les molécules de costimulation CD80 et CD86, suggérant un rôle dans présentation de l'antigène et/ou dans l'activation des lymphocytes T (Silvestre-Roig, Hidalgo, and Soehnlein 2016).

Les PN ont récemment été divisés en sous-populations, avec une population majeure de densité supérieure à celle du Ficoll (1,077) et une population mineure que l'on retrouve avec les PBMC après séparation des cellules du sang en gradient de densité. Ces populations ont été appelée « high- et low-density neutrophiles » ou HDN et LDN, respectivement (Sagiv et al. 2015a). Les LDN sont des neutrophiles matures et sont distincts des granulocytes immatures à fonction suppressive (G-MDSC) également retrouvés dans la fraction PBMC. Dans les réponses anti-tumorales, où les PN jouent un rôle de mieux en mieux reconnu (Hicks et al. 2006), les HDN ont une fonction cytotoxique envers les cellules cancéreuses alors que les LDN sont anti-inflammatoires et favorisent la progression tumorale (Sagiv et al. 2015b). Aussi, les HDN prennent les caractères de LDN en présence de TGFβ, montrant ainsi une plasticité déjà connue pour les autres cellules myéloïdes (Galli, Borregaard, and Wynn 2011).



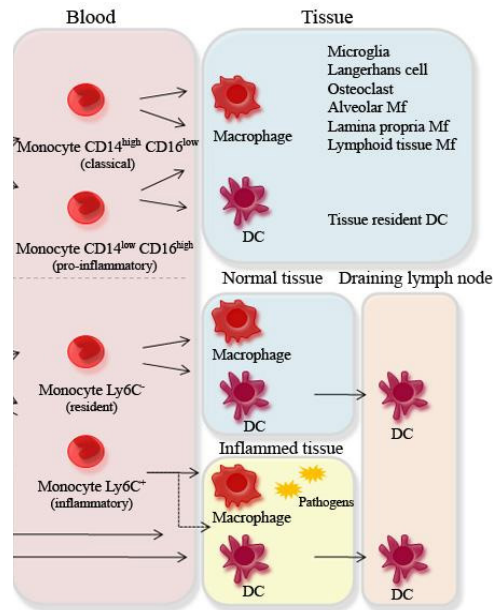
D'après "Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis",
(Silvestre-Roig, Hidalgo, and Soehnlein 2016)

Figure 3 La migration multidirectionnelle des neutrophiles

La transmigration inverse des neutrophiles de l'espace sub-endothélial vers la circulation fait suite à une lésion d'ischémie/reperfusion. Le LTB4 induit le recrutement des neutrophiles (1), l'infiltration des neutrophiles et l'interaction avec les cellules endothéliales via le CD11b et la libération de la Neutrophil Elastase qui va induire la dégradation de JAM-C (2), permettant la recirculation dans la circulation sanguine (3). Ces neutrophiles sont caractérisés par un phénotype différent exprimant $ICAM-1^{high}CXCR1^{low}$.

Au cours de l'inflammation induite par un pathogène, les neutrophiles infiltrés ont la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes et ont un phénotype activé $CD11b^{high}$, $CD62L^{lo}$, $CXCR2^{lo}$ et également $CMH-II^{+}CD86^{+}CD80^{+}$ dans les ganglions lymphatiques (4). Ce qui suggère une capacité à influencer sur les réponses T ou B (6). Les neutrophiles migrant vers la moelle osseuse induisent une réponse antivirale dépendante des cellules $T CD8^{+}$ (5).

B. Les monocytes



D'après Smiljanovic B., 2011, adapté des schémas de (Gordon and Taylor 2005; Swirski 2010; Geissmann et al. 2010)

Figure 4 : Développement et différenciation des monocytes en macrophages et cellules dendritiques chez l'homme et la souris

Les monocytes circulants constituent 2 à 5 % des leucocytes sanguins chez les humains. Leur durée de vie dans la circulation est de 2 à 3 jours. Comme vu plus haut, ces cellules proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et elles quittent ce site sous l'effet de chimiotactisme impliquant leur récepteur CCR2. Les monocytes transigent dans le sang, rejoignent des sites de stockage des monocytes comme la rate, et éventuellement infiltrent les tissus où ils se différencient en cellules effectrices. (**Figure 4**)

La différenciation se fait en cellules dendritiques, surtout en conditions inflammatoire, en macrophages, et en monocytes activés. La capacité des monocytes à se différencier en de nombreux autres types cellulaires montrent d'une part la plasticité de ces cellules mais aussi qu'ils jouent un rôle important dans nombre de processus biologiques. De ce fait, les monocytes sont considérés comme des cellules importantes du système immunitaire car elles sont capables de faire le lien entre l'immunité innée et adaptative.

a. Historique : À la découverte des globules blancs (leucocytes)

L'étude des monocytes forme le cœur de ce travail de thèse et il est important de rappeler les étapes qui ont permis de définir ces cellules et de les isoler pour pouvoir analyser leurs fonctions.

Nous connaissons de nos jours l'importance de ces globules blancs appelés maintenant leucocytes. Ils n'ont cependant été identifiés pour la première fois qu'en 1843, soit 185 ans après les globules rouges. Cette découverte ainsi que la première description de ces cellules a été le fruit des études menées simultanément par Gabriel Andral et William Addison (Hajdu 2003). Parallèlement à cette découverte Andral et Addison observèrent indépendamment des altérations de ces globules blancs au cours de maladies. L'identification de nouvelles populations de cellules sanguines jouant peut-être un rôle en pathologie stimula la recherche pour comprendre leurs fonctions.

À la fin du XIX^{ème} siècle, l'étude de ces cellules bénéficia de la convergence de plusieurs lignes de recherches. Ainsi, Louis Pasteur établit une approche scientifique de la vaccination, ce qui permit de définir l'immunologie comme science de la défense de l'organisme contre des agressions externes à l'hôte. Le biologiste russe Elie Metchnikoff (1845-1916) découvrit la « phagocytose » qui est la capacité d'une cellule à ingérer des corps étrangers ou des cellules exogènes. Cette propriété s'avéra ensuite comme une caractéristique majeure de la majorité des globules blancs ce qui établit les bases de l'immunité cellulaire en complément de l'immunité humorale qui commençait à être décrite en particulier par Paul Ehrlich. Le prix Nobel de médecine et physiologie de 1908 attribué à Ehrlich et Metchnikoff consacra le partage de l'immunologie entre ces deux branches qui évoluèrent en immunologie non-spécifique ou innée et immunologie spécifique ou adaptative. Ce n'est que plus récemment, au cours des 20 dernières années que la coopération entre ces deux types de réponses immunitaires fut clairement mise en évidence.

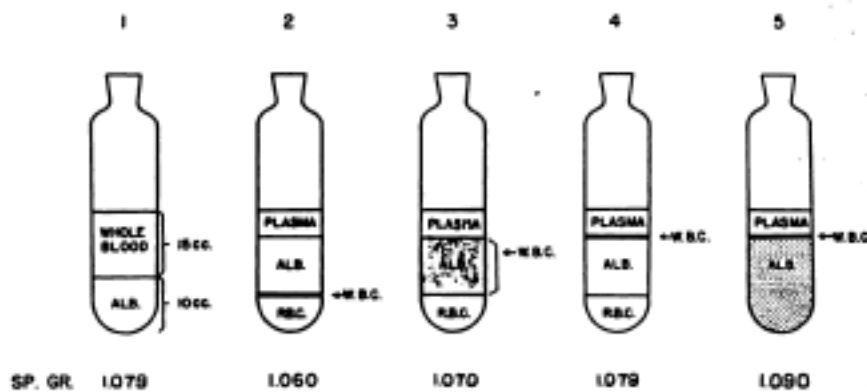
Suite à la découverte des leucocytes par Gabriel Andral et William Addison en 1843 de nombreuses méthodes ont été développées afin de pouvoir obtenir ces cellules sous forme purifiée.

Une première méthode testée par Szilar en 1926 a consisté à séparer les leucocytes des érythrocytes par hémolyse en utilisant des acides (Szilard 1926). Une variante de cette méthode utilisant de la saponine fut développée par Enders en 1930 (Enders 1930) Cette dernière permit l'obtention de leucocytes mais avec de fortes contaminations d'érythrocytes et avec un rendement très faible. Ces études ont cependant permis le début d'investigations biochimiques des leucocytes.

Les limites de l'hémolyse ont mené d'autres investigateurs à développer des méthodes basées sur la sédimentation différentielle des cellules. Ainsi, la séparation des leucocytes et érythrocytes a été tentée par une méthode de sédimentation dans des tubes cylindriques par Westergren. Cette méthode consistait initialement à centrifuger le mélange sang total + sodium citrate dans un tube afin de mesurer la sédimentation des érythrocytes. Les globules blancs ainsi obtenus étaient contaminés par des érythrocytes. Par la suite, Wintrobe en 1935 a essayé le même principe de séparation mais en diluant le sang total dans une mixture d'oxalate contenant de l'ammonium oxalate ainsi que du potassium oxalate. Cette méthode s'est montrée moins efficace que celle de Westergren.

Continuant dans cette voie, d'autres études ont été menées en 1937 par Fleischmann (W. Fleischmann 1937) et par Larizza (Larizza 1937) et permirent l'obtention, après centrifugation d'un cylindre en verre contenant le sang total dilué dans du citrate, de 2 phases comprenant les érythrocytes en bas, le plasma en haut et un "anneau" contenant les leucocytes. L'analyse de cet anneau montre une contamination érythrocytaire et un très faible taux de leucocytes récupéré.

Cependant, ces méthodes restaient insuffisantes pour certains et de nouvelles approches ont été proposées pour améliorer le rendement en leucocytes et pour réduire la contamination de la fraction leucocytaire. C'est ainsi qu'a été développée en 1947 une méthode de sédimentation par densité, optimisée par l'utilisation de solution de densité différentes. Ainsi, le sang total a été dilué avec une solution de densité 1.079 à base de d'albumine sérique et de NaCl. Après centrifugation, le sang ainsi dilué formait 3 phases avec les globules rouges au fond du tube, surmontés de l'albumine et du plasma tout en haut du tube. Entre la phase albumine et plasma se trouvait un anneau contenant les globules blancs avec un meilleur rendement que dans les expériences précédentes ainsi que beaucoup moins de contamination (**Figure 5**). (Vallee, Hughes, and Gibson 1947)



“A method for the separation of leukocytes from whole blood by flotation on serum albumin”

(Vallee, Hughes, and Gibson 1947)

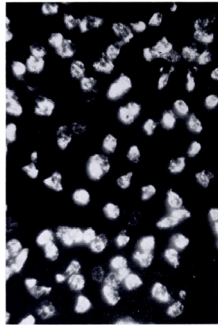
Figure 5 : Séparation du sang total par du sérum albumine

Le premier tube correspond à l'apparence du tube après dépôt du sang total sur l'albumine à une densité de 1.079.

Les autres correspondent à des tests avec différentes densités afin de déterminer la meilleure manière d'obtenir les leucocytes.

Ainsi par cette méthode il a été déterminé qu'à la densité de 1.079 les leucocytes étaient facilement identifiables et que de plus, il y avait moins de contaminations (d'érythrocytes). Ces dernières se trouvent à l'interphase entre l'albumine et le plasma (**Figure 5** essais 3).

Simultanément, des travaux pour essayer d'obtenir une sédimentation plus rapide et d'isoler les polymorphonucléaires ont été menées en 1949 par une méthode qui consistait à ajouter du fibrinogène ainsi que de l'héparine au sang total pour obtenir les leucocytes dans le plasma et avoir une sédimentation des érythrocytes au bout d'une heure. La séparation des leucocytes du plasma est faite par adhérence sur une lame, car après lavage seul les cellules adhérentes (appelées poly-morphonucléaires) vont rester fixée à la lame (**Figure 6**). (Minor and Burnett 1948)



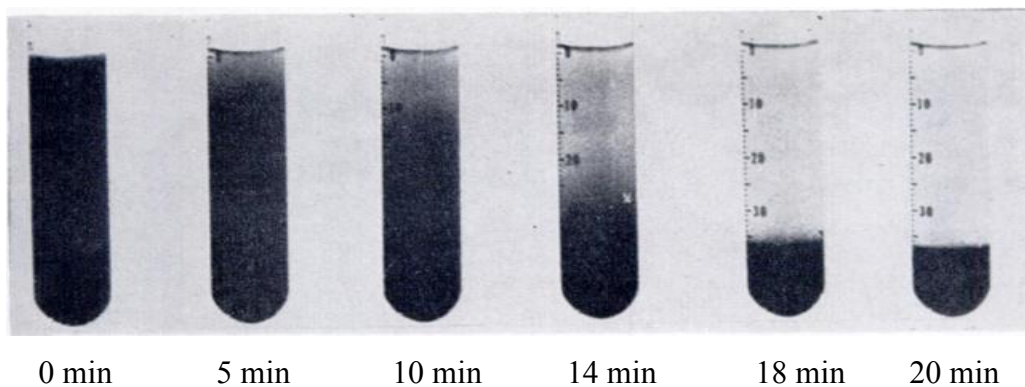
“A method for obtaining living leukocytes from human peripheral blood by acceleration of erythrocyte sedimentation”

(Minor and Burnett 1948)

Figure 6 : Visualisation par Illumination Darkfield (x630) de leucocytes.

Visualisation de des Polymorphonucléaires triées à partir de sang périphérique humain.

Dans la même optique, pour obtenir une séparation rapide de leucocytes purs, des études ont été effectuées en 1955 en associant la phyto-hémagglutinine au dextran ou au fibrinogène permettant ainsi la sédimentation et l'agglutination des érythrocytes après centrifugation à 200g (**Figure 7 & 8**). La contamination par les globules rouges était diminuée par cette technique. (Skoog and Beck 1955)

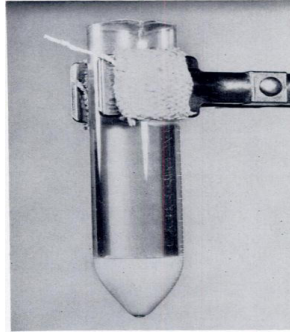


D'après “Studies on the Fibrinogen, Dextran and Phytohemagglutinin Methods of Isolating Leukocytes”

(Skoog and Beck 1955)

Figure 7 : Sédimentation des érythrocytes

La sédimentation se fait grâce à la dilution du sang total dans du Dextran avec 2 volumes de Dextran pour 1 volume de sang.



“Studies on the Fibrinogen, Dextran and Phytohemagglutinin Methods of Isolating Leukocytes”

(Skoog and Beck 1955)

Figure 8 : Tri des leucocytes à l'aide de la méthode du Fibrinogène

Dans cette expérience, cette technique a été utilisée dans du sang de patient atteint de leucémie.

Dès lors, la méthode de séparation rapide par l'ajout d'un agent permettant l'agrégation des érythrocytes restera la plus utilisée. Ainsi, cette méthode a été utilisée par Arne Bøyum en 1964 qui, par tests de différents composants, a mis au point plusieurs méthodes de séparation par :

- Ficoll¹ (densité 1.09) + EDTA (anti-coagulant) avec une séparation par densité au bout de 40 minutes maximum ainsi qu'un rendement de 50 à 60% de leucocytes et très peu de globules rouges contaminants. Le sang est récupéré dans un anticoagulant qui est l'héparine
- Isopaque² + Dextran avec une séparation entre 10 et 60 minutes et un rendement de 30 à 50%
- Isopaque + Ficoll avec un rendement de 40 à 60 % en leucocytes

Et enfin,

- EDTA + Dextran avec une séparation entre 20 et 60 minutes et un rendement de 60 à 80% de leucocytes.

¹ Ficoll permet de réaliser un gradient de densité des composés du sang afin d'obtenir les leucocytes

² Isopaque est utilisé car à forte concentration, il a une viscosité faible et il a également une faible activité osmotique

Avec ces techniques, une faible contamination par les globules rouges a été observée. (A Bøyum 1964)

L'obtention ainsi de leucocytes sans contaminants permis de faire une analyse plus poussée des constituants des globules blancs, et en particulier des monocytes.

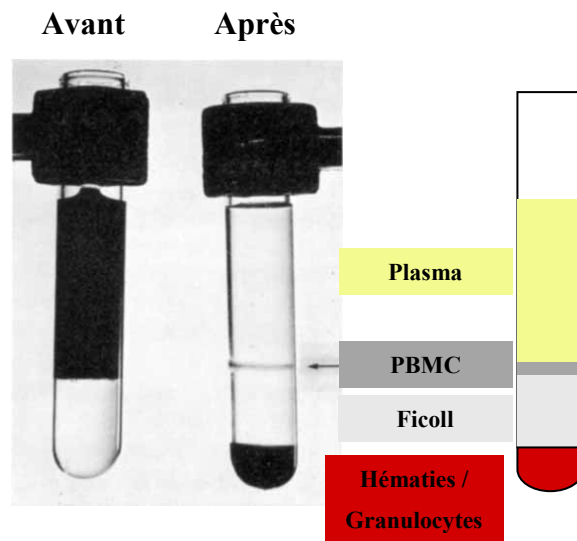
Ainsi en 1958 Wachstein développa une méthode appelée "non-specific esterase" qui initialement a permis de reconnaître les monocytes et par élimination les lymphocytes déposés sur une lame. Par cette méthode, le monocyte reconnaît un substrat l' α -naphthyl-butyrates et l'hydrolyse ce qui va former un précipité rouge dans les monocytes permettant ainsi leur reconnaissance. (Wachstein and Wolf 1958)

Aussi, l'identification et l'analyse des monocytes est devenue possible par une méthode d'adhérence *in vitro* sur plaque (Van furth and Cohn 1968). Les cellules ayant la capacité d'adhérence au verre ainsi que la capacité de phagocytose sont ainsi appelées phagocytes mononucléaires.

La suite des avancées dans ce domaine a été de séparer les granulocytes, des lymphocytes et des monocytes. Pour ce faire, le sang total récupéré dans de l'EDTA utilisé comme anticoagulant est dilué dans du NaCl et ce mélange est déposé délicatement dans un tube contenant un mélange d'Isopaque et de Ficoll (densité 1,077). Après centrifugation de ce tube à 400 g pendant 40 minutes à 20°C ou 800 g pendant 15 minutes, l'anneau situé entre le Ficoll et le plasma contient les cellules « mononucléaires » (**Figure 9**). Afin d'obtenir les monocytes et les lymphocytes seuls, les cellules sont déposées sur une plaque et les cellules adhérentes à la plaque sont des monocytes alors que les cellules restantes dans le surnageant sont les lymphocytes. (Arne Bøyum 1974).

Cette mise au point a permis de séparer les cellules « mononucléaires » dans d'autres espèces comme chez le cheval (Bruyninckx and Blancquaert 1983) avec une fraction de cellules mononucléaires similaires à celles obtenues chez l'humain.

Centrifugation



D'après "Separation of Blood Leucocytes, Granulocytes and Lymphocytes"

(Arne Bøyum 1974)

Figure 9 : Obtention des Cellules Mononucléaires du Sang Périphérique (PBMC).

Une dilution du sang dans 0.9% NaCl (6ml) dans un volume final de 8ml est déposé sur 3ml de Ficoll-Isopaque. Une centrifugation de 40 minutes à 400g à 20°C a permis d'obtenir cette séparation et ainsi de pouvoir récolter les PBMC.

C'est donc à partir de ce moment que les monocytes sont séparés des autres cellules et peuvent ainsi être analysés chez l'humain.

C'est donc à partir du développement de ce protocole de séparation que les monocytes sont séparés des autres cellules et peuvent ainsi être analysés chez l'humain. Ainsi, il a été observé une augmentation des monocytes chez des patients ayant des maladies inflammatoires (lupus érythémateux). (Horwitz et al. 1977)

b. Hétérogénéité des monocytes

Les perfectionnements apportés aux techniques de séparation en gradients de densité (séparation sur gradients discontinus, nouvelles solutions colloïdales comme le Percoll) ainsi que l'utilisation de l'élutriation ont permis de purifier les monocytes en différentes fractions suivant leur densité et leur taille. Les fractions ainsi obtenues étaient ensuite testées pour les différentes fonctions connues caractéristiques des monocytes, telles que par exemple l'expression d'estérases, la phagocytose de particules inertes ou biologiques, l'activité chimiotactique, la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC), l'activation de lymphocytes T. Les résultats de ces travaux, résumés par Grage-Griebenow et al (Grage-Griebenow, Flad, and Ernst 2001)) ont permis de définir différentes populations de monocytes humains circulants. Une difficulté majeure avec ces résultats venait de l'absence de standardisation ou de consensus sur les méthodes, souvent complexes et délicates, de purification des monocytes entre les laboratoires impliqués dans ces recherches. En l'absence de possibilité de reproductibilité des résultats, la comparaison entre les sous-populations décrites n'était pas possible. De plus, ces méthodes généraient des sous-populations substantiellement contaminées de lymphocytes, cellules NK et étaient peu résolutive entre les sous-populations de monocytes elles-mêmes, ce qui compliquait considérablement la définition fonctionnelle des populations purifiées.

Les avancées technologiques, avec le développement de la cytométrie en flux et des anticorps monoclonaux (Acm), ont été décisives pour permettre une meilleure définition des monocytes et ont confirmé leur hétérogénéité. En effet, bien que la purification des PBMC en gradient de densité fournissait une fraction de leucocytes très majoritairement constituée de lymphocytes, le développement des monoclonaux spécifiques pour les lymphocytes (CD2, CD3, CD4, CD8, et Ig de surface) et pour la fraction adhérente des PBMC a permis d'identifier CD14 comme un marqueur des monocytes (Todd et al. 1981). Dans les PBMC, l'expression de CD14 n'est pas exclusivement limitée aux monocytes, avec une fraction des lymphocytes B pouvant l'exprimer aussi (L Ziegler-Heitbrock et al. 1994). Cependant les deux types cellulaires diffèrent suffisamment par ailleurs (taille, morphologie, molécules de surface) pour pouvoir les distinguer facilement.

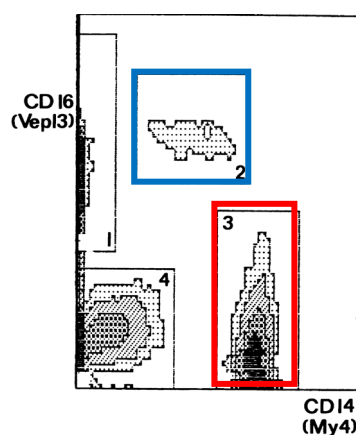
i. Hétérogénéité phénotypique

∞ Données de la cytométrie en flux

La première description fiable et aisément vérifiable de l'hétérogénéité des monocytes humains fut celle de Passlick et al. en 1989 qui montra qu'une petite fraction (moins de 10%) des cellules exprimaient CD16, qui est un des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines G (IgG) aussi nommé FcγRIII. De plus, les monocytes CD16⁺ avait une expression variable de CD14 allant d'une intensité forte à faible (Passlick, Flieger, and Ziegler-Heitbrock 1989). Ainsi, deux sous-populations de monocytes ont été identifiées :

- les monocytes CD14⁺⁺CD16⁻ (**Figure 10, population 3**)

- les monocytes CD14⁺CD16⁺ (**Figure 10, population 2**) qui en plus de l'expression de CD16 étaient définis comme des cellules de plus petite taille avec une expression des molécules de classe II très forte. Fonctionnellement, ces monocytes étaient moins adhérents au plastique et avait une moindre capacité de phagocytose.



*Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood
(Passlick, Flieger, and Ziegler-Heitbrock 1989)*

Figure 10 : Dot Plot CD14 vs CD16 sur des PBMC humains

Identification de deux sous-populations de monocytes l'une classique CD14⁺⁺CD16⁻ et l'autre non classique CD14⁺CD16⁺ par marquage à l'aide d'Anticorps Monoclonaux (Acm) couplés à des marqueurs fluorescents.

La terminologie adoptée par la suite identifia ces deux sous-populations en monocytes "classiques" pour les cellules CD14⁺⁺CD16⁻ et "non-classiques" pour les CD14⁺CD16⁺ (**Figure 10**).

D'autres combinaisons de marqueurs furent utilisées pour analyser l'hétérogénéité des monocytes.

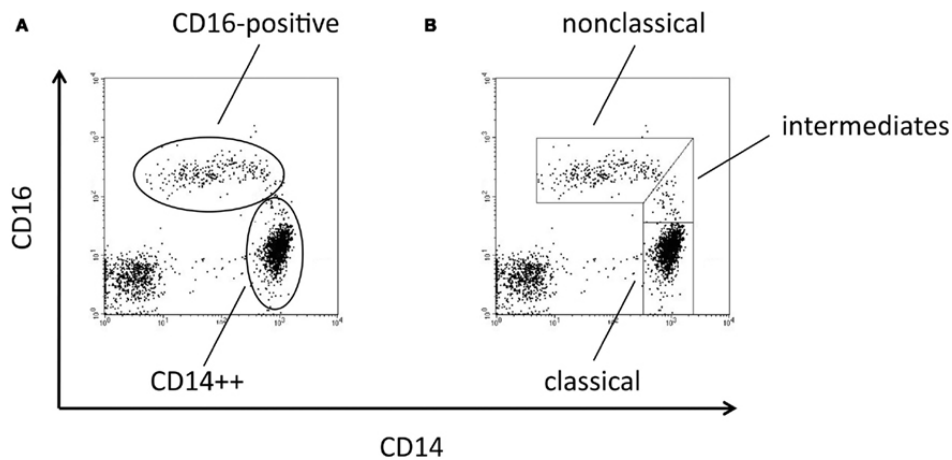
Ainsi, l'expression du récepteur de haute affinité pour le fragment Fc des IgG CD64 (FcγR1) permet également de définir deux populations de monocytes humains aux fonctions différentes (Grage-griebenow et al. 1993). Les monocytes CD64^{neg}, correspondant à 10% des monocytes totaux, possédaient une plus forte capacité de présentation de l'antigène aux lymphocytes T, et de production plus forte d'interférons de type I en présence de virus.

De même, l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 permet également de définir deux sous-populations de monocytes humains, bien que cette distinction n'ait été basée que sur des niveaux relatifs d'expression avec des cellules CCR2^{hi}CX3CR1^{lo} et CCR2^{lo}CX3CR1^{hi} (Geissmann, Jung, and Littman 2003). De même, il a été montré que les monocytes CD16⁺ migraient à travers une monocouche de cellules endothéliales en réponse à la fractalkine via CX3CR1 alors que les monocytes CD16^{neg} étaient sensibles dans le même test à MCP-1 (CCL2) via CCR2 (Weber et al. 2000; Ancuta et al. 2003).

L'avantage de la classification suivant CD14 et CD16 vint du fait que les cellules dendritiques circulantes humaines, qui sont présentes dans les PBMC, n'expriment pas CD14 alors qu'elles contaminaient les populations purifiées sur la base de CD64 ou des récepteurs aux chimiokines, entachant ainsi l'interprétation des analyses fonctionnelles des sous-populations obtenues.

La classification des monocytes suivant l'expression de CD14 et CD16 s'est plus récemment enrichie par la reconnaissance de l'hétérogénéité des monocytes CD16⁺. En distinguant ceux dont l'expression de CD14 est forte de ceux où elle est faible, il fut montré une différence de réactivité avec l'AcM M-DC8 qui reconnaît le motif 6-sulfo N-acetyllactosamine (6-sulfo LacNAc, slan), une glycosylation particulière de PSGL-1 (P selectin glycoprotein ligand 1, CD162) (Schakel et al. 2002). slan est fortement exprimé chez les monocytes CD14^{low}CD16⁺, mais pas chez les CD14⁺CD16⁺ (de Baey et al. 2001; Siedlar et al. 2000). Les propriétés fonctionnelles de ces monocytes CD14⁺CD16⁺ et leur présence accrue au cours de l'inflammation comme décrit plus bas conduit à les individualiser sous le nom de

monocytes intermédiaires, alors que les monocytes non-classiques furent plus strictement définis comme $CD14^{low}CD16^{+}$ (**Figure 11**) (Ziegler-heitbrock et al. 2010).



Toward a refined definition of monocyte subsets

(Loems Ziegler-Heitbrock and Hofer 2013)

Figure 11 : Dot Plot CD14 vs CD16 sur des PBMC humains

Nouvelle nomenclature avec individualisation de la sous-population de monocytes $CD14^{+}CD16^{+}$ en sous-population $CD14^{+}CD16^{+}$ dite intermédiaire et en $CD14^{low}CD16^{+}$ dite non-classique. La population classique reste inchangée $CD14^{+}CD16^{+}$.

Les progrès continus de l'instrumentation et de l'analyse de données en cytométrie en flux permirent l'analyse des monocytes humains directement dans le sang sans avoir à purifier les PBMC au préalable. Les résultats obtenus en sang total ont largement confirmé ceux obtenus sur cellules préparées par séparation en gradient de densité malgré quelques différences qui ne modifient pas substantiellement l'interprétation des résultats (Wong et al. 2012). Si l'analyse en sang total peut être préférable dans les études sur patients en raison de la faible taille de l'échantillon nécessaire, de la facilité de préparation des échantillons, et de la faible manipulation des cellules réduisant ainsi le risque de modification des cellules, l'analyse sur PBMC est incontournable si l'objectif inclut la purification des cellules identifiées au cours de l'analyse pour pouvoir mieux les caractériser (par ex. leur transcriptome) et pour étudier les fonctions.

Récemment, Thomas et al. ont analysé l'expression de 36 marqueurs sur des PBMC par la technique CyTOF, combinant cytométrie de flux et spectroscopie de masse, afin d'identifier de

nouveaux marqueurs spécifiques des trois sous-populations de monocytes (Thomas et al. 2017). Quatre marqueurs (CCR2, CD36, CD11c, et HLA-DR) en plus de CD14 et CD16 discriminaient les sous-populations, avec CCR2^{low} et CD36^{low} pour les monocytes non-classiques, CD11c^{low} et HLA-DR^{low} pour les monocytes classiques, et une expression forte des quatre marqueurs pour les monocytes intermédiaires. Il faut cependant noter que CD14 et CD16 restaient de manière très marquée les molécules dont l'expression discriminait le mieux entre les sous-populations. De plus, les profils d'expression de CCR2 et de CD36 étaient largement superposables à celui de CD14, réduisant leur intérêt dans l'analyse.

∞ **Données transcriptomiques**

Les premières analyses transcriptomiques des populations de monocytes ont comparé les expressions géniques chez les monocytes CD16^{neg} et CD16⁺.

Ainsi, Mobley et al. en 2007 ont étudié ces différences par microarray (Affymetrix). Pour cela, les PBMC ont été déplétés de leurs lymphocytes T et B, et NK afin d'enrichir en monocytes, puis une séparation suivant l'expression du CD16 a été faite afin d'obtenir les monocytes CD16^{neg} et CD16⁺. Leurs résultats ont montré la présence de 15 gènes surexprimés (+ 2 fois) chez les monocytes CD14⁺⁺CD16^{neg} avec, par exemple, une forte expression du CD14, du CCR2 ainsi que du CSF3R (qui est le récepteur au GM-CSF) alors que 19 gènes avaient une expression forte chez les monocytes CD14⁺CD16⁺ tel que le CD16, le CX3CR1, le CSF1R, le M-CSF et certaines molécules du complément (C1QA, C1QB et C3). (Mobley et al. 2007)

D'autres études transcriptomiques ont été menées par Zhao et al. en 2009 également par analyse en microarray (Illumina BeadArray). Les populations analysées ont été purifiées à partir de PBMC par tri magnétique CD16 après déplétion en cellules NK et PMN (CD56 et CD15, respectivement) pour les monocytes CD16⁺ et par tri magnétique CD14 sur la fraction CD16^{neg}. Alternativement, les monocytes purifiés par tri magnétique CD14 à partir des PBMC ont été ensuite triés en monocytes CD16⁺ et CD16^{neg} en cytométrie en flux. Ainsi, 521 gènes différemment exprimés ($\pm 1,5$ fois) ont été identifiés avec 305 gènes caractérisant la population CD14⁺CD16^{neg} et 216 gènes pour la population CD14⁺CD16⁺. En particulier, une surexpression des gènes participant à la phagocytose a été retrouvée dans les populations CD14⁺CD16⁺ alors

que dans les populations CD14⁺CD16^{neg} une surexpression des gènes jouant un rôle dans les réponses anti-microbiennes a été identifiée. (Zhao et al. 2009)

En parallèle à cette dernière étude, une autre équipe celle d'Ancuta a par contre effectué une déplétion par sélection négative au préalable, en marquant tous les PBMC exceptés les monocytes puis ils ont fait un marquage CD16 pour séparer les CD14⁺CD16⁺ des CD14⁺CD16⁻ et ainsi faire une étude transcriptomique par Affymetrix. Ils ont pu par cette méthode obtenir la définition de 361 gènes permettant de différencier les CD14⁺CD16⁺ des CD14⁺CD16⁻. Ainsi, 172 gènes identifiés pour les CD14⁺CD16⁺ et 189 pour la population CD14⁺CD16⁻. De plus il a été observé que 61 gènes avec 20 transcripts ont été uprégulés dans les CD14⁺CD16⁺ et 31 dans les CD14⁺CD16⁻. (Ancuta et al. 2009)

Les résultats des équipes de Zhao et d'Ancuta convergent sur certains points comme par exemple l'expression forte de CSFR1 dans la population CD14⁺CD16⁺, ainsi que celle de l'IL-12RB1 (qui reconnaît l'IL-12 produite par les cellules activées en réponse à une infection) dans cette même population.

L'émergence de la population intermédiaire de monocytes a mené des investigateurs à reprendre l'analyse transcriptomique des monocytes. Ainsi, Cros et al. ont montré une proximité entre les populations de monocytes intermédiaires et classiques alors que les non-classiques semblent éloignés. (Cros et al. 2010)

A l'inverse, deux études indépendantes révélèrent que les sous-populations de monocytes non-classiques et intermédiaires étaient étroitement liées alors que la population classique serait plus distante. (Wong et al. 2011; Zawada et al. 2011)

Ces derniers résultats ont été confirmés par une étude de microarray sur du sang de primates Rhésus (Kim et al. 2010) où sont identifiés trois populations de monocytes homologues aux populations humaines.

L'analyse de l'expression de 662 microARN (miRNA) a identifié des profils caractéristiques pour chaque sous-populations de monocytes, avec l'expression de certains miRNA très fortement augmentés dans une population seulement (miR-150-5p pour les classiques, miR-6087 et miR-493-5p pour les intermédiaires, et miR-4772-5p et miR-876-5p

pour les non-classiques) (Zawada et al. 2017). Cependant, la comparaison de l'expression de miRNA de chaque sous-population aux deux autres indiquait que l'expression de seulement 11 miRNAs variait entre les monocytes intermédiaires et le reste des monocytes, alors qu'à l'inverse les variations d'expression dans les monocytes classiques et non-classiques comparées au reste des monocytes affectaient 123 et 69 miRNAs, respectivement. Etant donné le rôle important des miRNAs dans le contrôle de l'expression génique, l'expression de la quasi-totalité des miRNAs d'expression monocyttaire dans les monocytes intermédiaires renforce le caractère médian de cette sous-population.

↻ Données protéomiques

Une analyse protéomique a montré que sur les 1006 protéines analysées, 235 différaient entre les populations de monocytes avec 123 caractérisant la population CD14⁺CD16⁺ et 112 particulières à la population CD14⁺CD16⁻. Cette étude retrouva une surexpression des gènes participant à la phagocytose dans la population CD14⁺CD16⁺ alors que dans la population CD14⁺CD16^{neg} est identifiée une surexpression des gènes jouant un rôle dans les réponses anti-microbiennes. (Zhao et al. 2009)

↻ Données épigénétiques

Les analyses de la transcription des promoteurs et enhanceurs dans les trois sous-populations de monocytes, ainsi que l'identification des sites de fixation des histones méthylées et acétylées ont identifié, par les deux approches, des profils particuliers à chacune des populations (Schmidl et al. 2014). En particulier, les monocytes intermédiaires présentaient des profils qui les distinguaient clairement des deux autres populations, établissant leur individualité au niveau de la structure chromatinienne. Les particularités du contrôle de la transcription de plusieurs gènes importants (CD14, CSF1R) dans les trois sous-populations de monocytes ont également pu être établies. Plus récemment, les profils de méthylation de l'ADN ont été aussi analysés dans les sous-populations de monocytes (Zawada et al. 2016). Un nombre important de locus était hypométhylé chez les monocytes intermédiaires comparés aux monocytes non-classiques et

surtout aux classiques. Les gènes concernés sont impliqués entre autres dans la différenciation cellulaire, le trafic intracellulaire, et le métabolisme lipidique.

ii. Hétérogénéité fonctionnelle

L'hétérogénéité phénotypique des monocytes peut servir de base pour tenter d'attribuer les diverses fonctions de ces leucocytes à des sous-groupes définis. Ceci a été tenté en analysant les fonctions des sous-populations purifiées. Alternativement, les fonctions de sous-groupes de cellules ont été déterminées dans des populations brutes comme par exemple en déterminant l'expression intracellulaire de cytokines parmi les monocytes marqués dans un échantillon de sang total. Concernant l'analyse des fonctions des monocytes CD16⁺, seules les études les plus récentes faisant la distinction entre les monocytes CD16⁺ non-classiques et intermédiaires seront considérées (**Figure 11**).

Dans la littérature, l'analyse des réponses fonctionnelles des sous-populations de monocytes humains est marquée par une grande hétérogénéité des résultats. Les résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la diversité des méthodes utilisées pour purifier les monocytes, l'absence de standardisation dans le traitement des échantillons et l'usage de différents anticoagulants, la comparaison entre monocytes purifiés et non purifiés testés en sang total, les différences de gating dans l'identification des sous-populations en l'absence de critères unanimement reconnus, ou peut-être encore d'autres facteurs indépendants des différences de techniques entre laboratoires et qui sont à identifier. Ainsi, l'analyse des réponses aux agonistes des TLR a montré que les monocytes non-classiques étaient les principaux producteurs de TNF et IL-1beta évalués en intracellulaire après stimulation en sang total (Mukherjee, Barman, et al. 2015; Belge et al. 2002) ou après purification (Wong et al. 2011). Cependant, d'autres ont trouvé l'inverse (Cros et al. 2010; Hadadi et al. 2016) avec également une faible expression de CCL2, IL-8, et IL-6 (Cros et al. 2010) et identifient les monocytes intermédiaires comme les plus répondeurs (Cros et al. 2010; Rossol et al. 2012). Enfin, pour Boyette et al., ce sont les monocytes classiques qui expriment le plus fortement TNF, IL-1b et IL-6 (Boyette et al. 2017). Par ailleurs, suivant les auteurs, la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est essentiellement produite par les monocytes intermédiaires (Mukherjee, Kanti Barman, et al. 2015; Skrzeczynska-Moncznik et al. 2008) ou bien par les monocytes classiques (Cros et al. 2010; Wong et al. 2011; Smedman et al. 2012) et est faiblement induite chez les monocytes non-classiques (Cros et al. 2010).

La production de radicaux de l'oxygène par les sous-populations de monocytes a peu été explorée. Selon Cros et al., elle serait comparable pour les monocytes classiques et intermédiaires et faible pour les non-classiques (Cros et al. 2010).

La phagocytose de billes de latex a été décrite comme plus importante avec les monocytes classiques et intermédiaires (Mukherjee, Barman, et al. 2015; Cros et al. 2010)

c. Les monocytes en pathologie

La description des monocytes CD16⁺ a ouvert la voie à l'analyse des populations de monocytes chez les patients et il est apparu dans de très nombreux travaux que ces derniers étaient présents dans le sang en proportion augmentée dans de nombreuses pathologies à composante inflammatoire telles que l'infection et les maladies auto-immunes (Wong et al. 2012). Ces observations ont conféré aux monocytes CD16⁺ la dénomination de monocytes inflammatoires, bien que les propriétés intrinsèques de ces cellules ne justifiaient pas cette désignation de manière claire. Ainsi, dans l'érysipèle, les monocytes CD16⁺ en expansion dans le sang étaient réfractaires à la stimulation par l'acide lipoteichoïque contrairement aux monocytes classiques CD16^{neg} (Horelt et al. 2002; Loems Ziegler-Heitbrock 2007).

De nombreux travaux ont été effectués avant la distinction entre monocytes intermédiaires et non-classiques parmi les cellules CD16⁺ augmentées, ce qui relativise la portée de ces observations au vu des fonctions différentes des deux sous-populations.

La signification de cette augmentation de la fraction de monocytes CD16⁺ dans le sang reste incertaine.

Ainsi, dans le sepsis, l'augmentation de la proportion de monocytes CD16⁺ a été montrée depuis 1993 (Fingerle et al. 1993). De manière plus précise, il a été ensuite montré que la proportion de monocytes intermédiaires triplait dans le sepsis avec une tendance à la baisse pour les non-classiques (Poehlmann et al. 2009), et ceci était plus net chez les patients avec hémocultures positives. Plus récemment, ce sont les deux populations intermédiaires et non-classiques qui ont été retrouvées en expansion chez des patients septiques (Mukherjee, Kanti Barman, et al. 2015), avec cependant un profil atypique non-clarifié pour les monocytes non-classiques. D'autres travaux ont montré que CD16, qui est exprimé sur les monocytes intermédiaires, régulait la voie de signalisation dépendant de TRIF après stimulation de TLR4 en activant à la fois les promoteurs et les inhibiteurs de cette signalisation (Shalova et al. 2012).

Dans les maladies auto-immunes, comme l'arthrite rhumatoïde, le lupus et la sclérose en plaque, les monocytes CD16⁺ sont également préférentiellement augmentés (Wong et al. 2012).

Dans l'arthrite rhumatoïde, une augmentation du pourcentage des monocytes intermédiaires mais pas des non-classiques a été observée (Rossol et al. 2012). Les monocytes intermédiaires de patients produisaient plus de TNF et d'IL-1 β que les autres populations de monocytes, et

induisaient en co-culture un plus fort taux de lymphocytes CD4⁺ sécrétant de l'IL-17 (Rossol et al. 2012). Sous traitement, l'augmentation du pourcentage de monocytes intermédiaires n'était plus retrouvée (Amoruso et al. 2016).

Dans le lupus, bien que l'augmentation des monocytes CD16⁺ soit retrouvée dans les différents travaux, des résultats discordants ont été trouvés sur la nature des cellules CD16⁺ en cause. Mukherjee et al. montrent une augmentation du pourcentage de monocytes non-classiques dans une petite cohorte de 10 patients (Mukherjee, Barman, et al. 2015) alors qu'une autre étude récente identifie les monocytes intermédiaires comme les cellules principalement augmentées, avec un accroissement moindre des monocytes non-classiques dans une analyse portant sur 62 patients (Zhu et al. 2016). Dans cette même étude, les monocytes CD16⁺ pris dans leur ensemble induisaient une plus forte polarisation Th17 de cellules T CD4⁺ autologues chez les patients en comparaison avec les monocytes classiques.

A l'inverse, le pourcentage de monocytes CD16⁺ était diminué dans la sclérose en plaque (SEP) dans une cohorte de 40 patients en forme récurrente-rémittente et en l'absence de traitement (Waschbisch et al. 2017). La diminution concernait à la fois les monocytes intermédiaires et non-classiques et était absente chez les patients traités quel que soit le traitement (interféron- β , Natalizumab, ou Fingolimod). Dans le liquide céphalo-rachidien, alors que les monocytes étaient très majoritairement de type intermédiaires chez les patients témoins (affections neurologiques non-inflammatoires), les monocytes CD16^{neg} dominaient chez les patients SEP récurrents-rémittents. Des travaux plus anciens avaient aussi retrouvé une absence d'altération quantitative des populations monocytaires dans la SEP traitée par interféron- β (Bergh, Dayyani, and Ziegler-Heitbrock 2004).

Ces travaux effectués sur des patients présentant diverses maladies auto-immunes montrent que les populations de monocytes sont variablement affectées dans ce type de pathologies. La propension des monocytes CD16⁺ et particulièrement les monocytes intermédiaires à promouvoir les réponses Th17 est cependant retrouvée à la fois dans l'arthrite rhumatoïde et dans le lupus érythémateux. Ceci peut suggérer un rôle pro-inflammatoire de ces cellules dans la progression de ces maladies. Des travaux recherchant plus spécifiquement la présence des monocytes dans les tissus atteints et les fonctions associées précisera le rôle de ces cellules dans ces pathologies.

d. Les monocytes murins

Chez la souris les monocytes sont distingués des autres leucocytes par l'expression du CD115 (le récepteur au M-CSF), de l'intégrine CD11b ainsi que du marqueur macrophagique F4/80.

Tout comme les monocytes humains, les monocytes murins sont hétérogènes. Actuellement, deux sous-populations ont été identifiées selon le niveau d'expression de Ly6C qui correspond à un épitope de l'antigène de différenciation myéloïde Gr1 des granulocytes et monocytes. Les monocytes Ly6C^{neg/low} et Ly6C^{+high} diffèrent aussi pour l'expression de récepteurs aux chimiokines avec une prédominance de l'expression de CX3CR1 et CCR2, respectivement, dans les sous-populations. L'expression de CD14 sur les monocytes de souris est faible ou négative (Haziot et al. 1996). Les populations Ly6C^{neg/low} et Ly6C^{+high} bien qu'étant chacune fortement hétérogène (expression de récepteurs aux chimiokines, de molécules d'adhésion ...), présentent des convergences fonctionnelles.

✦ *Les monocytes Ly6C^{+high}*

Cette sous-population de monocytes représente 2 à 5% des leucocytes circulants chez la souris à l'état basal. Elles sont plus extensivement caractérisées par le phénotype CCR2^{high} CX3CR1^{low} CD62L⁺ (**Table 2**). (Serbina et al. 2008)

Ces cellules sont connues pour être recrutées au cours de l'inflammation, participent à la défense contre l'infection bactérienne, parasitaire et fongique, et jouent un rôle dans la présentation antigénique. Dans l'inflammation cutanée, les monocytes Ly6C^{+high} migrent à partir de la peau vers les ganglions afférents de manière CCR2-dépendante (Geissmann, Jung, and Littman 2003; Serbina et al. 2008; Jakubzick et al. 2008; Palframan et al. 2001).

En condition inflammatoire, ces cellules sont des précurseurs de macrophages et de cellules dendritiques et elles sont recrutées via le CCR2 ainsi que le CD62L. (Serbina et al. 2008; Geissmann, Jung, and Littman 2003; Narni-Mancinelli et al. 2007). Chez les souris déficientes pour CCR2, une forte diminution du recrutement de ces monocytes vers les sites inflammatoires a démontré le rôle important de ce récepteur dans le chimiotactisme de ces cellules. (Kurihara et al. 1997; Kuziel et al. 1997). De plus, ces cellules sont identifiées comme des monocytes inflammatoires de par leur production de TNF α et de ROS.

✦ *Les monocytes Ly6C^{neg/low}*

Cette sous-population de monocytes est légèrement moins abondante dans le sang et a également été distinguée phénotypiquement des monocytes Ly6C^{+/high} par l'expression des récepteurs aux chimiokines et molécules d'adhésion avec pour phénotype CCR2^{low} CX3CR1^{high} et CD62L^{neg}. Elles expriment aussi fortement LFA-1 (**Table 2**). (Geissmann, Jung, and Littman 2003; Palframan et al. 2001)

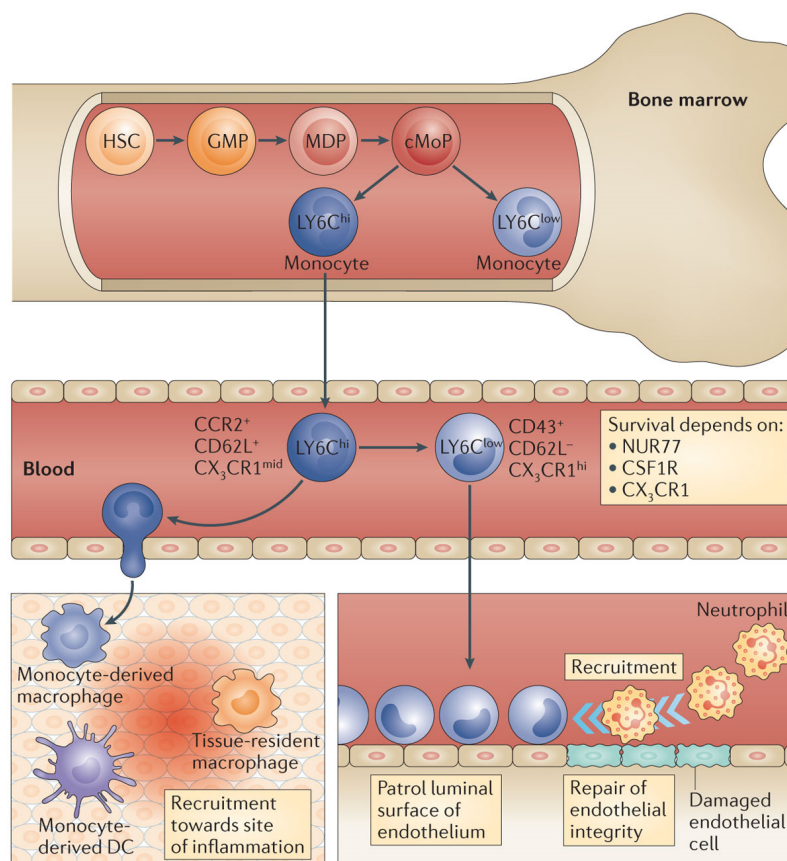
La présence de ces cellules dans les tissus au cours de l'inflammation a également été montrée mais également à l'état basal ce qui a motivé la dénomination de « monocytes résidents ». Dans les tissus, au cours de l'inflammation, les monocytes Ly6C^{neg/low} sont capables de se différencier en macrophages et de jouer un rôle dans la réparation tissulaire (Geissmann, Jung, and Littman 2003; Sunderkötter et al. 2004)

L'utilisation des techniques d'analyse in vivo en microscopie intravitale a permis de montrer que cette population avait la capacité d'adhérer le long de la surface luminaire des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et qu'elle était ainsi recrutée rapidement dans les tissus suite à un stimulus. Ces monocytes sont ainsi décrits comme des sentinelles patrouillant en permanence la vasculature via l'adhésion à l'endothélium par une interaction mettant en jeu LFA-1 et CX3CR1. Suite à une stimulation, ces cellules produisent des cytokines ainsi que des chimiokines permettant l'initiation des réponses inflammatoires via le recrutement d'autres cellules immunitaires. (Auffray and Geissmann 2007; Umehara et al. 2004; Lesnik, Haskell, and Charo 2003)

Dans des expériences de transferts adoptifs, la population Ly6C^{hi}, recrutée dans la cavité péritonéale au cours d'une péritonite expérimentale, était retrouvée dans différents organes (rate, foie, poumons ...) de la souris receveuse avec un phénotype Ly6C^{lo}, suggérant un phénomène de conversion entre les sous-populations (**Figure 12**) (Geissmann et al. 2010).

L'analyse de l'expression génique des sous-populations de monocytes chez la souris a été faite en parallèle à des monocytes humains afin de déterminer le niveau de similarité entre les sous-populations. Les monocytes Ly6C^{hi} étaient plus proches des monocytes CD14⁺CD16^{neg} que des monocytes CD14⁺CD16⁺ et CD14^{dim}CD16⁺, et inversement pour les monocytes Ly6C^{low}. Cependant, des différences majeures affectant près de la moitié des transcrits entre populations humaines et murines ne permet pas d'affirmer avec confiance qu'il s'agit de populations homologues entre les espèces (Ingersoll et al. 2010), même si ce raccourci est souvent pris dans la littérature. De plus, l'obtention de monocytes circulants murins est

limitée par leur faible nombre et l'essentiel des données expérimentales *in vitro* chez la souris est dérivé de monocytes médullaires et spléniques. Dans ces conditions, l'extrapolation des données du modèle murin à l'homme ne peut être faite qu'avec grande précaution. La recherche sur les fonctions des monocytes reste en attente de critères fiables permettant d'identifier des populations homologues entre espèces. À ce jour, l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1 reste probablement le meilleur guide, bien qu'imparfait du fait de chevauchements importants des niveaux d'expression entre sous-populations (**Table 2**).



Monocytes and macrophages- developmental pathways and tissue homeostasis

(Ginhoux and Jung 2014)

Figure 12 : Compartiments monocytaires murins

Migration et recrutement des monocytes à partir de la moelle osseuse vers le site inflammatoire via la circulation sanguine par l'intermédiaire de molécules d'adhésion (CD62L, CD43 ...) et par chimiotactisme via la reconnaissance de chimiokines (CX3CR1 ...)

Espèce	Souris		Humain		
Sous-populations de monocytes	Ly6Chigh	Ly6Clow	Classique	Intermédiaire	Non-classique
Marqueurs	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{hi}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{lo}	CD14 ⁺ CD16 ^{neg}	CD14 ⁺ CD16 ⁺	CD14 ^{lo} CD16 ⁺
Récepteurs aux chimiokines	CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{lo}	CCR2 ^{lo} CX3CR1 ^{hi}	CCR2 ⁺	CCR2 ⁺	CCR2 ^{neg}

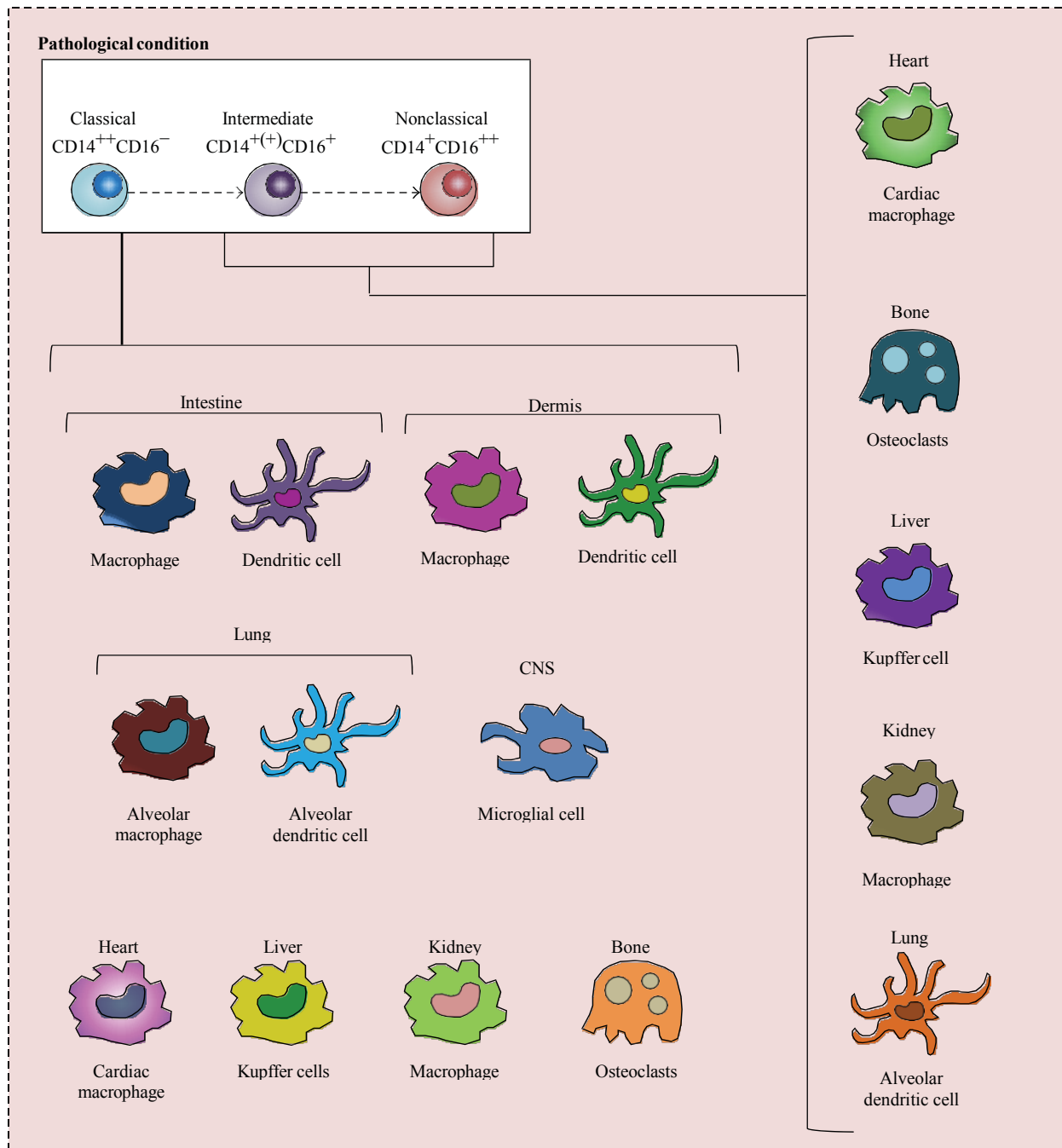
Adapté de (Wong et al. 2012; Tacke and Randolph 2006; Sprangers, Vries, and Everts 2016)

Table 2 : Les sous-types monocytaires chez la souris et chez l'homme

Caractérisation phénotypique des sous-populations de monocytes chez l'homme et la souris par identification de marqueurs spécifiques ainsi que des récepteurs aux chimiokines.

e. Les cellules dérivées de monocytes

La conception longtemps dominante d'un « mononuclear phagocyte system (MPS) » entièrement dérivé de cellules de la moelle osseuse par l'intermédiaire des monocytes (Van furth and Cohn 1968) a été invalidée par nombre de résultats expérimentaux sur les cellules myéloïdes résidentes des tissus (Hashimoto et al. 2013). Ainsi, les macrophages et les cellules dendritiques ne sont pas tous dérivés de monocytes. Aussi, les caractéristiques des macrophages et cellules dendritiques effectivement dérivés de monocytes ont été précisées (**Figure 14**). Les deux sections suivantes adressent brièvement ces questions.



D'après "Monocyte Heterogeneity : Consequences for Monocytes-Derived Immune Cells"

(Sprangers, Vries, and Everts 2016)

Figure 13 : Recrutement et différenciation des monocytes au cours de l'inflammation.

Un modèle a été proposé dans lequel les sous-populations de monocytes contribueraient au cours de l'inflammation à augmenter les cellules immunes matures.

Les cellules matures tissulaires ne sont à l'état « normal » pas maintenues par les monocytes, et les cellules produites au cours de l'inflammation diffèrent de celles produites à l'état d'équilibre.

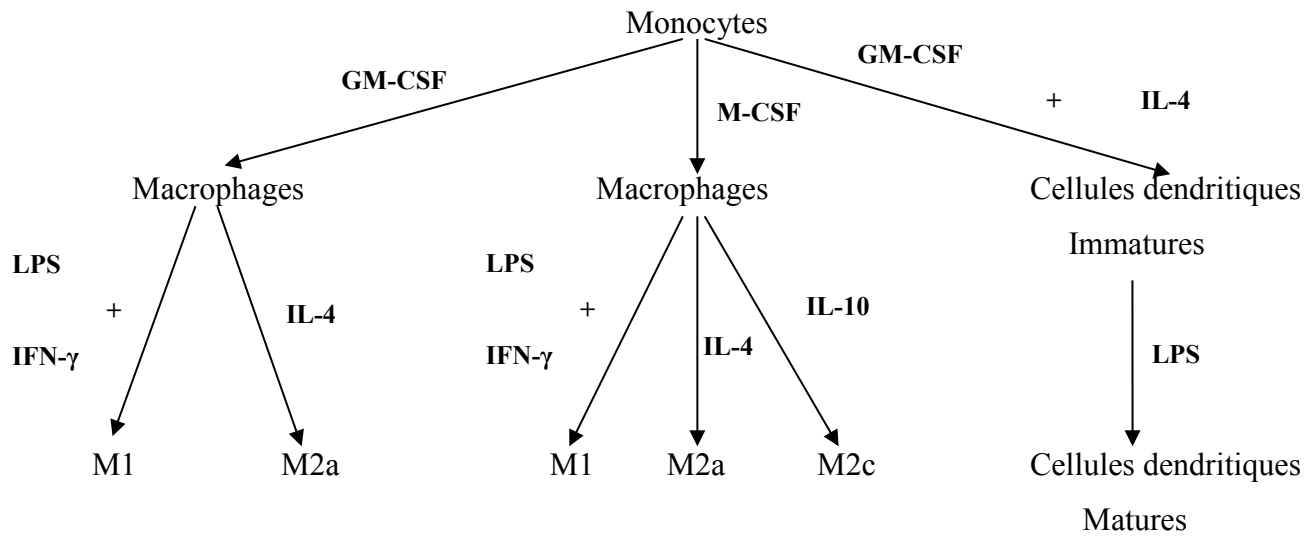


Figure 14 : Schéma récapitulatif de la différenciation des monocytes *in vitro* (ou en condition inflammatoire)

*Différenciation des Monocytes en différents types cellulaires après stimulation *in vitro* en cellules dendritiques et macrophages.*

i. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules myéloïdes retrouvées dans tous les tissus de l'organisme. Ils assurent des fonctions de soutien et de maintien de l'homéostasie à l'état basal comme en situation inflammatoire (Wynn, Chawla, and Pollard 2013). Ainsi, à l'initiation de l'inflammation, les macrophages ont la capacité de détecter et de répondre à un agent infectieux menant à son élimination. Dans un deuxième temps, les macrophages participent à la réduction de l'état inflammatoire et à la réparation des lésions tissulaires. Il n'est pas résolu si ces différentes fonctions sont effectuées par transformation des cellules *in vivo* en réponse à différents microenvironnements, reflétant la plasticité observée *in vitro*, ou si différents types de macrophages interviennent. (Biswas and Mantovani 2010; Stout and Suttles 2004; Gordon and Taylor 2005)

Les travaux récents sur l'ontogénie des macrophages ont profondément modifié les connaissances sur les précurseurs et l'origine des cellules présentes dans les tissus (Ginhoux and Williams 2016). Ainsi, chez l'adulte, les macrophages du système nerveux (ou microglie) et les cellules de Langerhans de l'épiderme sont dérivés de cellules se différenciant dans le sac vitellin au stade embryonnaire (Chorro et al. 2009). Après colonisation des tissus destinés à former ces organes, ces cellules s'y maintiennent par auto-renouvellement tout au cours de la vie de l'individu, un mécanisme dépendant du facteur de transcription Gata6 (Rosas et al. 2014). Les macrophages du foie (cellules de Kupfer) et ceux du poumon (macrophages alvéolaires et pleuraux) ont également une origine fœtale mais à partir de cellules différenciées au cours de l'hématopoïèse primitive dans le foie fœtal. Ces cellules se maintiennent dans les tissus également par auto-renouvellement. Cependant, suite à la perte des cellules de Kupfer au cours d'une infection par *L. monocytogenes*, une restauration de cellules de Kupfer à partir de monocytes sanguins a été observée, et les macrophages formés à partir des monocytes infiltrés prenaient le caractère de cellules de Kupfer résidentes (Blériot et al. 2015). A l'inverse, les macrophages d'autres tissus comme l'intestin, le cœur et le derme proviennent de la différenciation de cellules dans la moelle osseuse et sont en permanence remplacés à partir des monocytes circulants. *In situ*, ces macrophages dérivés de monocytes pourraient être éduqués pour faire fonction de macrophages résidents (Zigmond and Jung 2013).

Ainsi, à l'état de base comme au cours de l'inflammation, les monocytes peuvent être à l'origine de macrophages inflammatoires ou résidents, mais ceci semble être dépendant du tissu concerné et du microenvironnement induit par certains types d'inflammation. La détermination

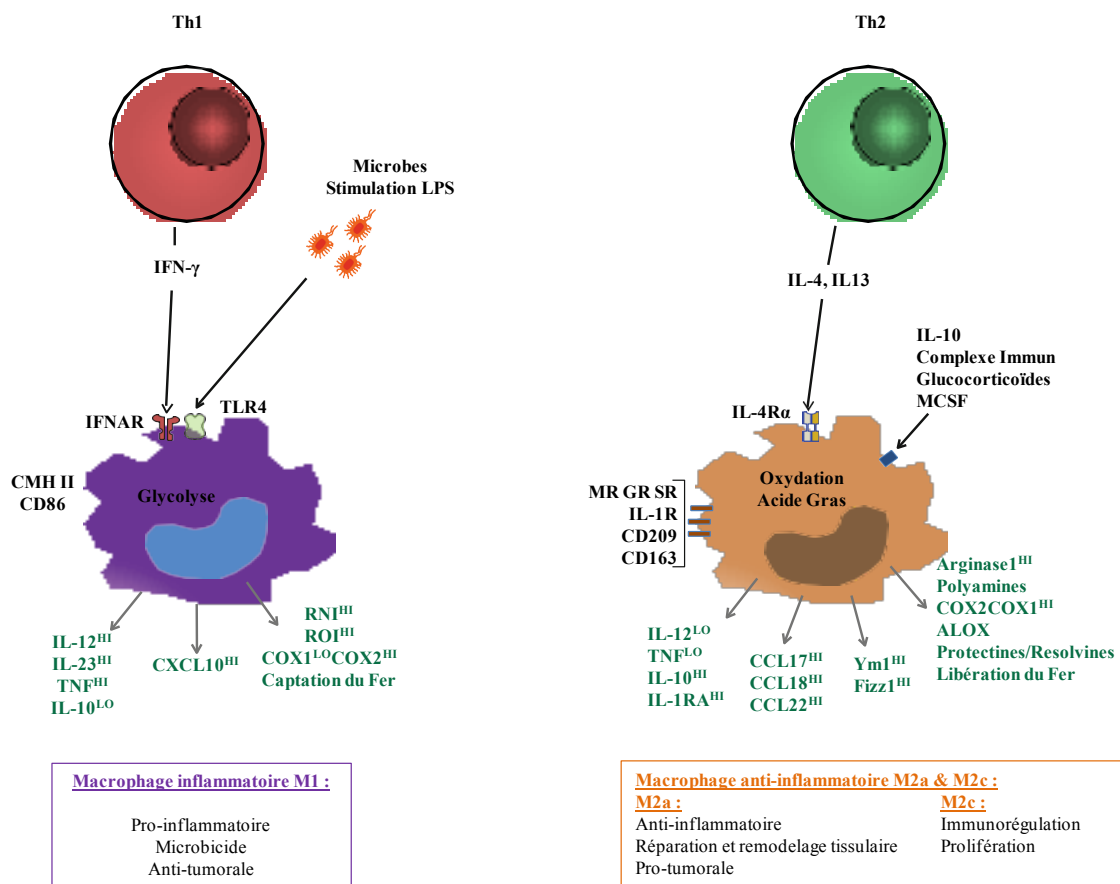
de la spécificité tissulaire des macrophages est sous la dépendance de remaniements de la chromatine, via la méthylation d'histones, positionnant des amplificateurs (« enhancers ») de la transcription à disposition de promoteurs de gènes impliqués dans le phénotype tissulaire (Lavin et al. 2014). Ainsi, dans des souris irradiées et reconstituées par greffe de moelle osseuse, les nouveaux macrophages générés dans les différents tissus possédaient un « paysage d'amplificateurs » similaires à ceux des macrophages résidents des tissus correspondants. De même, des macrophages péritonéaux transplantés dans le poumon adoptent le paysage d'amplificateurs du tissu d'accueil. D'autres ont montré que le phénotype acquis était stable sur la durée de la vie de la souris (Suzuki et al. 2014). Cependant, d'autres travaux ont indiqué qu'un pré-conditionnement des monocytes par les cellules NK dans la moelle osseuse au cours de leur développement précédait les étapes de différenciation en macrophages dans les tissus (Askenase et al. 2015). L'ensemble de ces résultats apporte un éclairage sur les mécanismes à la base de la plasticité fonctionnelle des monocytes et macrophages (Álvarez-Errico et al. 2014).

Les états d'activation des macrophages ont été dénommés M1 et M2 (alternatif) suivant leur capacité à induire la polarisation de lymphocytes vers les voies Th1 et Th2, respectivement (**Figure 15**) (C. D. Mills et al. 2000). Définis essentiellement *in vitro*, la correspondance avec les macrophages analysés *in vivo* reste incertaine (Ka et al. 2014). Les macrophages présentant les états d'activation M1 et M2 diffèrent substantiellement dans leurs fonctions. Les macrophages M1 acquièrent une activité antimicrobienne et anti tumorale (Gordon and Martinez 2010; Sica and Mantovani 2012). Ainsi il a été décrit que l'activation par le LPS via TLR4 sur les macrophages, en particulier quand elle est combinée à l'exposition à l'interferon γ (IFN γ) produit par les lymphocytes de type NK va polariser le macrophage en type M1 doté d'une réponse pro-inflammatoire. (**Figure 15**) (Schroder et al. 2004; Adams and Hamilton 1984). La régulation de cette réponse se fait par les macrophages qui possèdent des propriétés immuno-régulatrices permettant la résolution de l'inflammation. (Serhan et al. 2007)

La polarisation des macrophages en M2 se fait par la reconnaissance de multiple signaux générés au cours des réponses immunitaires de type 2 (où dominant IL-4 et IL-13) (**Figure 15**). Ces facteurs, reconnus par des récepteurs comme l'IL-4R α , renforce chez ces macrophages l'activité phagocytaire et induisent une réponse anti-inflammatoire. Cette dernière est associée à des fonctions de réparation et de remodelage tissulaire, d'immuno-régulation mais aussi de promotion de la prolifération des cellules tumorales. (Biswas and Mantovani 2010; Gordon and Martinez 2010; Mantovani et al. 2002; Mantovani 2008; Pollard 2009)

D'autres signaux tels que l'IL-10, les glucocorticoïdes, les cellules apoptotiques et les complexes immuns, peuvent activer les macrophages et induire une réponse immunosuppressive et de réparation tissulaire (**Figure 15**).

Des études transcriptomiques ont montré que l'état d'activation de ces macrophages dépendait de l'expression de facteurs de transcription. La polarisation de macrophage vers le type M1 était induite par le facteur de transcription IRF5 sous la dépendance de STAT1 tandis que pour induire la polarisation M2 ce sont STAT6 et IRF4 qui sont mis en jeu. (Lawrence and Natoli 2011)



D'après "Macrophage polarization and plasticity in health and disease"

(Biswas et al. 2012)

Figure 15 : Représentation schématique de la polarisation des macrophages en M1 et M2

Les signaux de polarisation moléculaire, métabolique et fonctionnelle des macrophages sont indiqués (SR = Récepteur Scavenger, MR = Récepteur au Mannose, GR = Récepteur au Galactose).

ii. Les cellules dendritiques

Dans ce travail, l'analyse fonctionnelle des monocytes humains a été faite en étudiant les propriétés des cellules dendritiques qui en étaient dérivées *in vitro*. Un rappel des données sur ces cellules s'impose, en particuliers sur les cellules dendritiques humaines.

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules polyvalentes du système immunitaire de par leur capacité à répondre aux activateurs de l'immunité innée et à initier la réponse immunitaire adaptative. Ce sont en effet les cellules présentatrice de l'antigène les mieux capables d'activer les lymphocytes T naïfs.

La première identification des cellules dendritique a été faite en 1973 par Steinman et Cohn chez la souris. À cette époque, l'identification a été basée sur la morphologie des cellules qui permettait de les différencier des macrophages. (R. Steinman and Cohn 1973)

À la suite de cette découverte, il a été montré que ces cellules, mises en co-culture avec des lymphocytes T, induisaient une réponse plus forte des lymphocytes qu'avec tout autre leucocyte testé. (R. M. Steinman and Witmer 1978)

La caractérisation de ces cellules s'est poursuivie avec le développement des techniques d'études, et le rôle des cellules dendritiques dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives s'est précisé avec la description de la régulation de l'expression des molécules du CMH, de la capacité des cellules à migrer vers les organes lymphoïdes secondaire et à y activer les lymphocytes. (Steinman RM 2010; Heath and Carbone 2009; Merad et al. 2013; R. M. Steinman and Banchereau 2007)

Les cellules dendritiques humaines accessibles à l'analyse et l'expérimentation sont essentiellement les DC du sang et de la peau. Dans le sang, deux populations ont initialement été décrites. En 1997, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ont été identifiées pour la première fois chez l'homme, dans le sang périphérique mais également au niveau des organes lymphoïdes secondaire. Le nom plasmacytoïde provient du fait qu'elles ressemblent à la fois aux lymphocytes T (elles sont CD4⁺ CD45RA⁺) mais également aux plasmocytes par leur morphologie. (Grouard et al. 1997; Olweus et al. 1997)

Par extension, les DC restantes du sang ont été appelée DC myéloïdes, puis DC conventionnelles (cDC).

Parmi les cDC du sang périphérique humain, deux sous-populations CD1c/BDCA-1 et CD141/BDCA-3 ont été définies (Ziegler-heitbrock et al. 2010; Muzlifah Haniffa et al. 2012)

✓ Les cellules dendritiques CD141⁺/BDCA3⁺ (**Figure 16**) conventionnelles appelées cDC1. (Guilliams et al. 2014) Elles sont caractérisées par le fait qu'elles ont une très faible ou absence d'expression de CD14, CD1c, CD11c, CD11b et CD172 α mais, elles expriment le CD370 (Clec9A/DNGR-1), le récepteur à chimiokine XCR1, le TNF- α et l'IFN- λ . Elles initient une réponse T CD8⁺ restreinte aux molécules du CMH de classe I et en réponse à l'interaction CD283/TLR3. (Schlitzer, MCGovern, and Ginhoux 2015; Ziegler-heitbrock et al. 2010; Muzlifah Haniffa, Bigley, and Collin 2015)

Après leur passage dans les tissus, les cellules dendritiques conventionnelles CD141^{hi} sont localisées au niveau des organes lymphoïdes (amygdales, rate et moelle osseuse) (Jongbloed et al. 2010; Mittag et al. 2011; Poulin et al. 2010; Segura et al. 2012) et des organes non lymphoïdes (peau, poumon et foie). (Muzlifah Haniffa et al. 2012) Elles ont la capacité d'induire la mort cellulaire via le CLEC9A, de reconnaître les acides nucléiques viraux via TLR3 et TLR8 et de cross-présenter l'antigène aux lymphocytes T. (Muzlifah Haniffa et al. 2012; Jongbloed et al. 2010)

La population murine équivalente est la CD8 α ⁺CD205. (Croizat et al. 2010; Poulin et al. 2010)

✓ Les cellules dendritiques myéloïdes CD1c⁺/BDCA1⁺ (**Figure 16**) appelées cellules dendritiques CD1c⁺ conventionnelles ou cDC2 sont présentes dans le sang et les organes non-lymphoïdes (peau, foie, poumons...) et dans les organes lymphoïdes (rate et ganglions). Elles expriment tous les TLR de 1 à 10 et jouent un rôle important dans le transport et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4 naïfs. Elles ont cependant une faible capacité de cross-présentation aux lymphocytes T CD8. (M Haniffa et al. 2009; Muzlifah Haniffa et al. 2012; Bachem et al. 2010; Guilliams et al. 2014) Elles expriment également fortement les molécules CD11c et CD172 α (SIRP α), produisent des cytokines pro-inflammatoires et migrent au niveau des ganglions lymphatiques afin d'initier une réponse T CD4⁺ efficace. (Reynolds and Haniffa 2015; Schlitzer, MCGovern, and Ginhoux 2015) Cette population correspond à la population CD8 α ⁻CD11b⁺ murines.





Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (**Figure 16**) sont également identifiables par leurs marqueurs exprimés à la surface cellulaire, en particuliers les molécules BDCA-2 et BDCA-4 qui servent à les identifier. (A. Dzionek et al. 2000; A. Dzionek et al. 2002; a Dzionek et al. 2001). Les pDC expriment aussi le CD123 (la chaîne α du récepteur à l'IL-3) mais pas le CD11c (A. Dzionek et al. 2000). Ces cellules correspondent à environ 50% des DC circulantes chez l'homme. Après migration dans les tissus, elles sont localisées au niveau des zones T des tissus lymphoïdes, de l'endothélium des veinules et au niveau des zones extra-folliculaire riches en cellules T au niveau des amygdales. (Cox et al. 2005; Grouard et al. 1997)

Elles expriment TLR7 et TLR9 qui reconnaissent respectivement les ARN simple brin et ADN des virus et leur activation via ces récepteurs induit fortement la sécrétion de l'IFN- α (Merad et al. 2013) ainsi que la polarisation des lymphocytes T CD4 en Th1, Th2 ou Treg. (Rissoan et al. 1999; Gilliet, Cao, and Liu 2008; Ito et al. 2007)

Chez la souris cette population est CD11c⁺ B220⁺ CD45RA⁺ siglec-H⁺ et Ly49Q. (J. Zhang et al. 2006; Omatsu et al. 2005)

Dans les tissus, les cellules de Langherans sont CD1a⁺Langerin⁺CD11c^{lo} et sont localisées au niveau de l'épiderme supra-basal. Elles ne migrent pas au niveau du tissu lymphoïde et lors d'un dommage au niveau de la peau, elles sont capables d'identifier la nature du stimulus et d'adapter la réponse inflammatoire correspondante. (Nikolaus Romani, Brunner, and Stingl 2012). Les cellules dendritiques CD14⁺ (ou « dermales ») sont localisées au niveau des organes lymphoïdes et non-lymphoïdes. Cette population a pour phénotype CD14⁺ CD11c^{hi} CMH-II^{hi} mais exprime en plus des marqueurs spécifiques des monocytes et macrophages tels que le CD11b ou encore le CX3CR1 (M Haniffa et al. 2009; Ochoa et al. 2008). Elles sont considérées comme peu matures (elles n'expriment pas le marqueur de maturation CD83) et de plus, elles ne sont pas capables d'activer les lymphocytes T naïfs (faible expression de CD80 et CD86) comparé aux cellules dendritiques CD1c⁺ (Penel-Sotirakis et al. 2012). Par contre, des études ont montré que ce type cellulaire jouait un rôle important dans la formation des cellules T helpers folliculaires Tfh (Matthews et al. 2012) En particulier, ces cellules sécrètent de l'IL-10 et de l'IL-6 induisant une réponse Treg et Tfh. (Chu et al. 2012; Klechevsky et al. 2008; McGovern et al. 2014)

Les DC CD14⁺ sont celles qui fonctionnellement ressemblent le plus aux MoDC *in vitro* (**Figure 16**).

 <p> CD45⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ BTLA⁺⁺ FLT3⁺⁺ XCR1⁺ CLEC9A⁺ CADM1/NECL2⁺ TLR3⁺ CD26⁺ CD14⁻ CCR7⁺ CD141⁺ Langerin⁺ CD8⁺ (LT) CD103⁺ (NLT) CD205⁺ CD4⁺ </p>	 <p> CD45⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ BTLA⁺ FLT3⁺ CD11b⁺ CX3CR1⁺ CD172/SIRPα⁺ CD14⁻ CCR7⁺ CD1c⁺ CD1a⁺ (skin) CD1b⁺ CLEC7A⁺ CLEC6A⁺ CD4⁺ CD24⁺ </p>	 <p> CD45⁺ MHCII⁺ CD45RA⁺ CD123/IL-3R⁺ BTLA⁺⁺ CD4⁺ CD14⁻ CD303⁺ CD304⁺ SiglecH⁺ Bst2⁺ Ly6C⁺ </p>	 <p> CD45⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ CD11b⁺ CD172/SIRPα⁺ Langerin⁺ EpCAM⁺ CCR7⁺ E-Cadherin⁺ CD1c⁺ CD1a⁺⁺ F4/80⁺ CD205⁺ </p>
<p>DC CD141⁺ humaines DC CD8⁺CD103⁺ Souris</p>	<p>DC CD1c⁺ humaines DC CD4⁺CD11b⁺ Souris</p>	<p>pDC Humaines pDC Murines</p>	<p>LC humaines LC Souris</p>

D'après "Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse"

(Muzlifah Haniffa, Collin, and Ginhoux 2013)

Figure 16 : Phénotypes humain et Souris de certaines sous-populations de DC

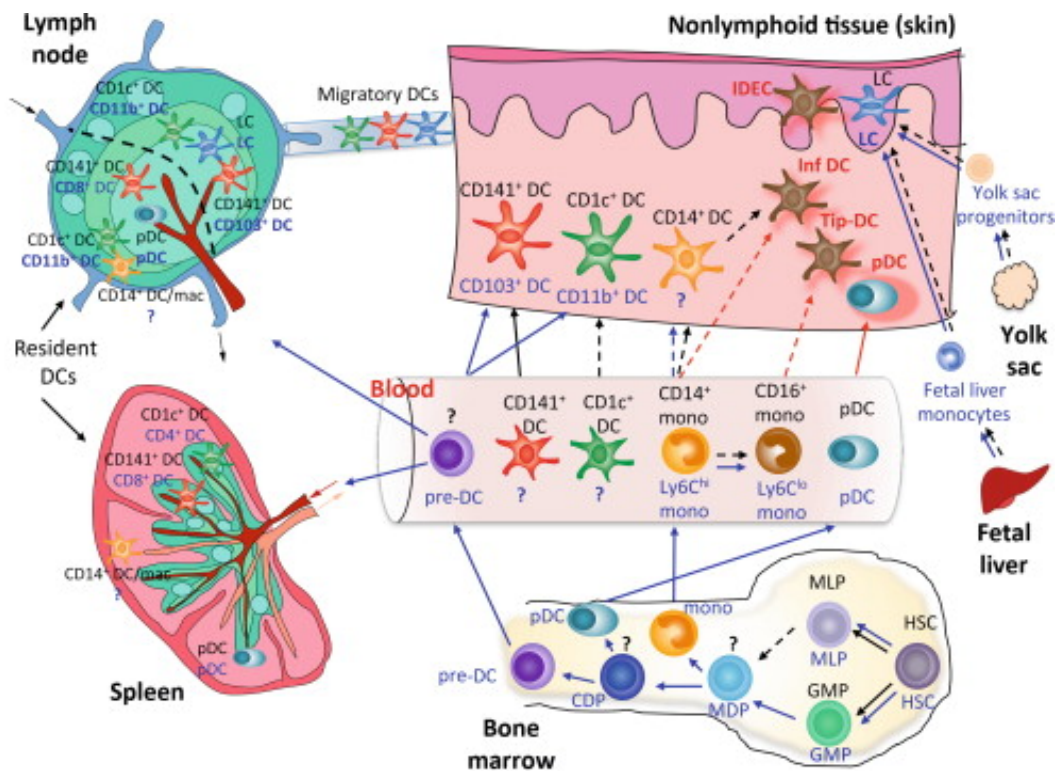
Les molécules en rouge correspondent à celles retrouvées dans les deux espèces, en noir celles uniquement retrouvées chez l'humain et en bleu celles retrouvées uniquement chez la souris. (LC = Cellules de Langherans)

Les cellules dendritiques immatures fonctionnent comme patrouilleurs et sentinelles jusqu'à leur activation par un stimulus inflammatoire qui transforme la présentation de l'antigène d'un mode tolérogène à un mode immunogène. Cette transformation affecte toutes les étapes de la présentation depuis le traitement de l'antigène et sa mise en complexe avec les molécules du CMH sous forme de peptide lié jusqu'à la nature et la concentration des molécules de surface en interaction avec le lymphocyte T. (R. M. Steinman and Banchereau 2007)

Les cellules dendritiques matures ont une activité phagocytaire réduite, une augmentation de l'expression de CMH, des molécules de co-stimulation et elles sécrètent de grandes quantités de cytokines. (Cella et al. 1996; Cella et al. 1997; Schnurr et al. 2000). Ces cellules matures

vont migrer par chimiotactismes vers les organes lymphoïdes où se fait l’initiation de la réponse immunitaire adaptative. (Sozzani et al. 2000; Randolph 2001; Villadangos and Schnorrer 2007)

Comme décrit plus haut (Section I. 1.), les DC circulantes sont générées au cours de l’hématopoïèse à partir de progéniteurs propres à la lignée dendritique et distincts des progéniteurs de monocytes. Une question qui se pose est de savoir quelles sont les différences entre les *bona fide* cellules dendritiques et celles dérivées de monocytes (**Figure 17**).



D'après "Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse" (Muzlifah Haniffa, Collin, and Ginhoux 2013)

Figure 17 : Origine et organisation des DC chez l'humain et la souris.

Les précurseurs, monocytes et DC sont notés en noir pour l'humain et les homologues murins sont en bleu. L'origine et la relation entre les espèces sont marquées par des flèches noires pour les humains et bleues pour tout ce qui est murin.

Les modifications qui ont lieu au cours de l'inflammation sont indiquées en rouge.

✦ *Cellules Dendritiques dérivés de Monocytes (MoDC) :*

Les recherches sur les cellules dendritiques humaines sont difficiles à mener en raison de la faible accessibilité des cellules. En effet, les DC ne représentent que moins de 1% des PBMC. Ces cellules occupant une place centrale dans l'initiation des réponses immunitaires, une source de DC disponible *in vitro* a donc été activement recherchée.

Des résultats chez la souris ont indiqués que les monocytes pouvaient se différencier en cellules dendritiques en condition inflammatoire *ex vivo* en mettant en culture des cellules de moelle osseuse stimulée avec du GM-CSF (Kayo Inaba et al. 1992; K Inaba et al. 1993; Caux et al. 1992). Dans cette même voie, la différenciation de cellules dendritiques a été obtenue par Caux et al. à partir de précurseurs CD34⁺ de sang de cordon mis en culture avec du GM-CSF avec maturation des DC obtenues par du TNF- α (Caux et al. 1992). Plus tard, Sallusto et Lanzavecchia ont réussi à produire des DC *in vitro* à partir de PBMC humains adultes en présence de GM-CSF (Sallusto and Lanzavecchia 1994) et la maturation de ces cellules immatures était obtenue par culture en présence de TNF- α . Cependant, les DC obtenues avaient une faible capacité de stimulation ainsi qu'une incapacité à présenter l'antigène soluble (Sallusto and Lanzavecchia 1994). Par contre, la combinaison de GM-CSF et d'IL-4 induisait des DC de phénotype comparable aux cellules dendritiques du sang périphérique (morphologie/migration, phénotype et forte stimulation des cellules T naïves) après maturation par l'ajout de TNF- α . (Sallusto and Lanzavecchia 1994; N Romani et al. 1994; Chapuis et al. 1997)

Cependant, il a été observé que la maturation des MoDC à l'aide du TNF- α réduisait la réponse allogénique au cours d'une MLR (Mixed Leukocyte Reaction), ce qui n'était pas le cas en utilisant le lipopolysaccharide des bactéries Gram^{neg} (LPS) pour induire la maturation (Sallusto and Lanzavecchia 1994; Pickl et al. 1996; Palucka et al. 1998; Matteo Rigolin et al. 1999).

La différenciation de MoDC à partir des sous-populations de monocytes CD16⁻ et CD16⁺ a été analysée (Crawford et al. 1999; de Baey et al. 2001; Sánchez-Torres et al. 2001). Les résultats ont montré que la population CD16⁻ générait après différenciation des MoDC matures (par TNF α) capables d'internaliser des antigènes solubles, et de stimuler une réponse T allogénique ou autologue. Les MoDC issues de monocytes CD16⁺ exprimaient plus fortement les marqueurs CD86, CD11a et CD11c et plus faiblement CD1a et CD32 comparées

aux MoDC CD16⁻. La maturation de ces cellules avec du LPS induisait chez les MoDC issues de monocytes CD16⁻ une augmentation de l'expression de l'ARNm IL12-p40 et une sécrétion importante d'IL12-p70 comparé au CD16⁺ chez qui par contre une augmentation l'ARNm du TGF-β10 était trouvée (Sánchez-Torres et al. 2001). Plus récemment, la différenciation de monocytes classiques, intermédiaires et non-classiques en DC a été analysée, et dans ce travail, seuls les monocytes classiques ont généré des DC identifiables par leur phénotype et leur fonction en MLR (Boyette et al. 2017). Les différences entre ces résultats trouvent probablement leur origine dans des méthodes distinctes de purification des monocytes.

Les MoDC ont été extensivement caractérisées. Il a été démontré que les MoDC exprimaient CD11c, CD1a, FcγRII, CD40, B7, I-CAM-1, qu'elles exprimaient fortement le CMH de classe II et qu'elles étaient négatives pour le CD14. (León et al. 2004). Les cellules dendritiques différenciées uniquement en présence de GM-CSF présentait une hétérogénéité des populations de CD11c⁺ obtenues (Helft et al. 2015). Les études transcriptomiques ont indiqué que ces cellules exprimaient les facteurs de transcription IRF4 (Lehtonen et al. 2005) et ZBTB46 et L-MYC (Satpathy et al. 2012; KC et al. 2014).

Les MoDC ont également été produites et analysées chez la souris et elles ont le phénotype CD11b⁺CCR2⁺Ly6C⁺ (Serbina, Kuziel, et al. 2003; Hespel and Moser 2012). Elles produisent des cytokines inflammatoires comme IL-12 et TNF-α (**Figure 17**) (Serbina, Salazar-Mather, et al. 2003; Zhan et al. 2010) qui induisent une différenciation Th1 (León, López-Bravo, and Ardavin 2007), elles activent les lymphocytes T mémoires (Wakim 2008), sont capable de cross-présentation (Cheong et al. 2010), et peuvent également générer une réponse Th17 (**Figure 17**) (Yi et al. 2012; Segura et al. 2013). Toujours chez la souris, il a été observé que les monocytes Ly-6C^{hi} TREML4 peuvent se différencier en MoDC Zbtb46⁺ après différenciation en présence de GM-CSF et d'IL-4, et l'expression de Zbtb46⁺ est nécessaire à la capacité de cross-priming des lymphocytes T CD8⁺. L'analyse transcriptomique de ces MoDC a permis d'observer une induction de Irf4 est associée à la fonction de cross-présentation. (Briseño et al. 2016)

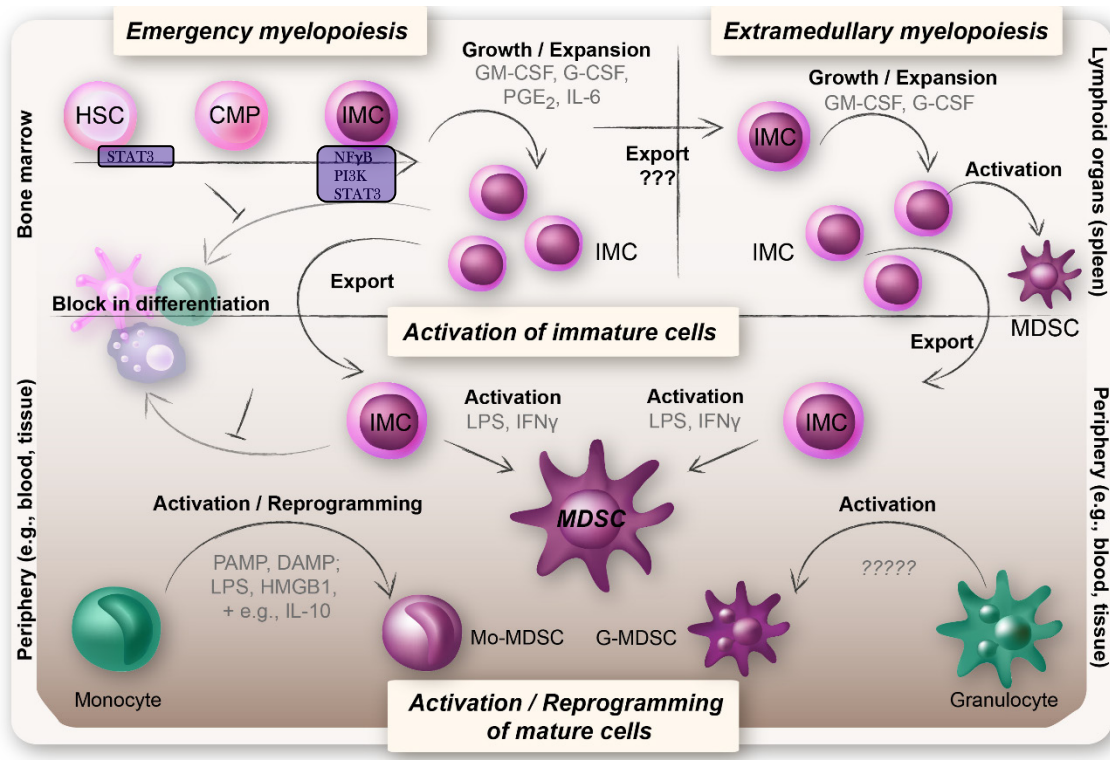
C. Les cellules suppressives myéloïdes (MDSC) :

Bien que décrites initialement comme des cellules myéloïdes apparaissant dans le cancer et possédant des fonctions suppressives, les MDSC ont été identifiées dans de nombreuses pathologies (infectieuses, auto-immunes), mais aussi chez le sujet sain (Solito et al. 2014). Leur définition est difficile en raison de l'absence jusqu'à présent de marqueur spécifique et du fait que des fonctions suppressives sont aussi présentes chez les autres cellules myéloïdes (macrophages, DC, neutrophiles) en situation pathologique (Bronte et al. 2016). Leur apparition en plus grand nombre dans la circulation résulterait d'effets indirects de la tumeur ou du site inflammatoire sur la myélopoïèse à partir des Progéniteurs Myéloïdes Communs CMP (Marvel and Gabrilovich 2015) avec des facteurs tels que GM-CSF, IL-6, et PGE₂ stimulant l'accumulation de cellules myéloïdes immatures. Celles-ci se caractérisent par une augmentation de la survie, de la prolifération et une diminution de l'apoptose et de la différenciation (**Figure 18**) (Millrud, Bergenfelz, and Leandersson 2016). Ces cellules mûrissent dans le sang ou dans les tissus sous l'effet d'activateurs comme LPS ou IFN γ (Gabrilovich and Nagaraj 2009; P. Cheng et al. 2008) mettant en jeu par NF κ B, PI3K et des STAT. (Bergenfelz et al. 2015; Biswas and Lopez-Collazo 2009; Németh et al. 2009) L'activation s'accompagne d'une augmentation de la production d'arginine-1, d'iNOS et de l'expression de cytokines immunospressives. (Millrud, Bergenfelz, and Leandersson 2016)

. Les différentes lignées myéloïdes sont affectées et on retrouve ainsi des MDSC de plusieurs types (Movahedi et al. 2008; J.-I. Youn et al. 2008) :

- ✓ Les M-MDSC ou Mo-MDSC (Monocytiques) correspondant aux MDSC CD14⁺ avec le phénotype CD11b⁺ HLA-DR^{neg} CD15^{neg}
- ✓ Les PMN-MDSC ou G-MDSC (PolyMorpho-Nucléaires ou Granulocytiques) correspondant aux MDSC CD15⁺ CD66⁺ de phénotype CD11b⁺ CD14^{neg} (Je-In Youn et al. 2012; Rodriguez et al. 2009)

Il existe à l'intérieur de chacune de ces catégories une hétérogénéité importante phénotypique, morphologique, fonctionnelle et dans leur rôle au cours d'une réponse (Solito et al. 2014; Marvel and Gabrilovich 2015).



D'après, "On the origin of myeloid-derived suppressor cells"

(Millrud, Bergenfelz, and Leandersson 2016)

Figure 18 : Hypothèses actuelles sur l'origine de MDSC.

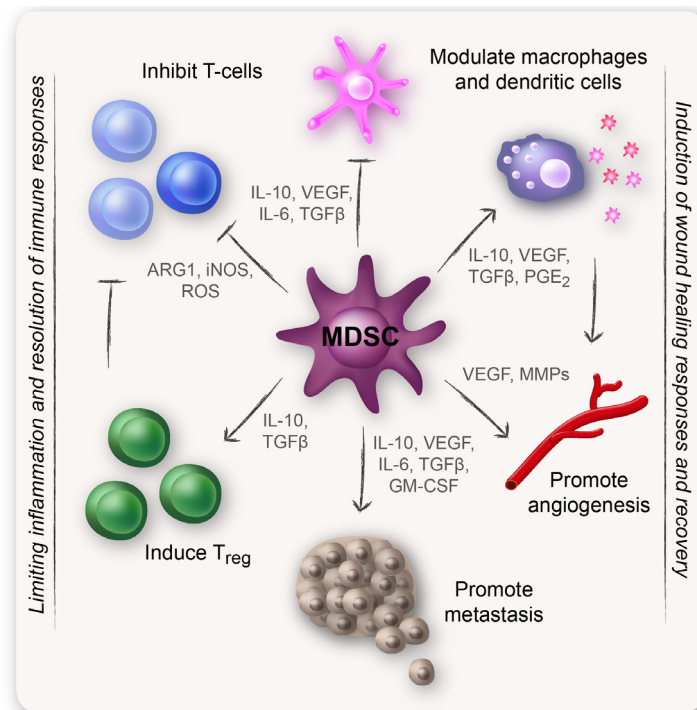
Des cellules myéloïdes immatures s'accumulent dans la moelle osseuse sous l'effet de facteurs de croissance et de cytokines, et passent dans le sang, colonisant éventuellement des organes lymphoïdes secondaires.

En présence de stimulation inflammatoire, elles sont activées et se différencient en MDSC fonctionnellement actives.

Une conversion des monocytes périphériques en MDSC a été proposée mais ce phénomène reste à démontrer formellement (Bergenfelz et al. 2015). *In vitro*, la capacité de reprogrammation de cellules dendritiques et de monocytes en MDSC au contact de cellules tumorales a été montrée et dépend de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de PGE₂ (Obermajer et al. 2011; Mao et al. 2013; Rodrigues et al. 2010). Des résultats similaires ont été obtenus en présence de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B et la reprogrammation dépendait de l'axe ERK/IL-6/STAT3 (**Figure 18**) (Fang et al. 2015).

Les MDSC exercent leurs effets suppresseurs essentiellement sur les lymphocytes T suivant plusieurs mécanismes et ces mécanismes diffèrent suivant le type de MDSC (**Figure**

19). Les MDSC déplètent le milieu environnant en acides aminés nécessaires à la prolifération des lymphocytes T. Ainsi l'arginine est consommée par l'arginase 1 exprimée par les MDSC, et la cystéine est accumulée et séquestrée par les cellules. Il en résulte un défaut d'expression de la chaîne zeta de CD3 et une inhibition de la prolifération des lymphocytes T activés (Rodriguez et al. 2004; Srivastava et al. 2010). La production de peroxyde d'hydrogène par l'expression d'iNOS et de la NADPH oxydase, respectivement, inhibe la signalisation par le récepteur de l'IL-2 et la production d'interféron-gamma par les lymphocytes T activés (Mazzoni et al. 2002; Schmielau and Finn 2001). Les MDSC expriment à leur surface l'enzyme ADAM17 (disintegrin and metalloproteinase domain containing protein 17) qui induit le shedding de la sélectine CD62L à partir de la surface des lymphocytes T naïfs, prévenant ainsi leur capacité à rejoindre les ganglions lymphatiques (Schmielau and Finn 2001). Enfin, les MDSC favorisent le développement de T régulatrices naturelles ou induites par la sécrétion de TGF β et d'IL-10 (B. Huang et al. 2006). Les MDSC agissent également indirectement sur l'orientation de la réponse immunitaire en induisant la conversion des acteurs des réponses de type 1 comme les macrophages M1 en effecteurs de réponses de type 2 (**Figure 19**) (Sinha et al. 2007).



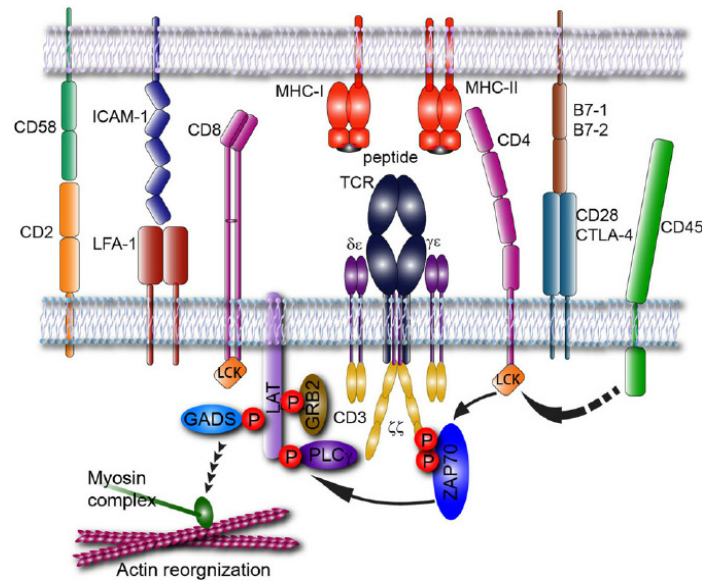
“On the origin of myeloid-derived suppressor cells”

(Millrud, Bergenfelz, and Leandersson 2016)

Figure 19 : Effets des immunosuppresseurs des MDSC

3. La polarisation des lymphocytes T vers les phénotypes Th1, Th2, Th17, Treg

Au-delà de leur fonction dans l'élimination des agents pathogènes, les récepteurs de l'immunité innée que sont les Pattern Recognition Receptor (PRR) activent dans certaines cellules une signalisation qui modifie le phénotype de la cellule et lui permettent d'interagir avec les lymphocytes T. Ces modifications comprennent l'augmentation de l'expression des molécules du CMH, qui présentent les antigènes en surface cellulaire, des molécules de co-stimulation, et la sécrétion de cytokines ciblant les lymphocytes T. Parmi ces cellules présentatrices de l'antigène (CPA), on retrouve les monocytes et les cellules qui en sont dérivées, les macrophages, et les cellules dendritiques. Ces dernières ont la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles activent la réponse adaptative par leur interaction avec les lymphocytes T CD4⁺. Cette activation induit la multiplication clonale des lymphocytes T CD4⁺ qui reconnaissent l'antigène via leur TCR, et leur différenciation en cellules effectrices qui participent à l'élimination des cellules infectées et des pathogènes. La synapse immunologique (SI) correspond à la région d'interaction entre les CPA et les lymphocytes T et elle se caractérise par un remodelage du cytosquelette des lymphocytes T qui conduit à la polarisation de nombreuses structures de la cellule vers la CPA (**Figure 20**).



T cell antigen recognition at the cell membrane

(J. Huang, Meyer, and Zhu 2012)

Figure 20 : Les molécules mises en jeu dans la synapse immunologique (T-CPA)

Le TCR reconnaît l'antigène présenté par la molécule du CMH. La présence des co-récepteurs et des molécules accessoires à la membrane des cellules vont stabiliser l'interaction et la réponse intracellulaire induit l'activation et la polarisation T.

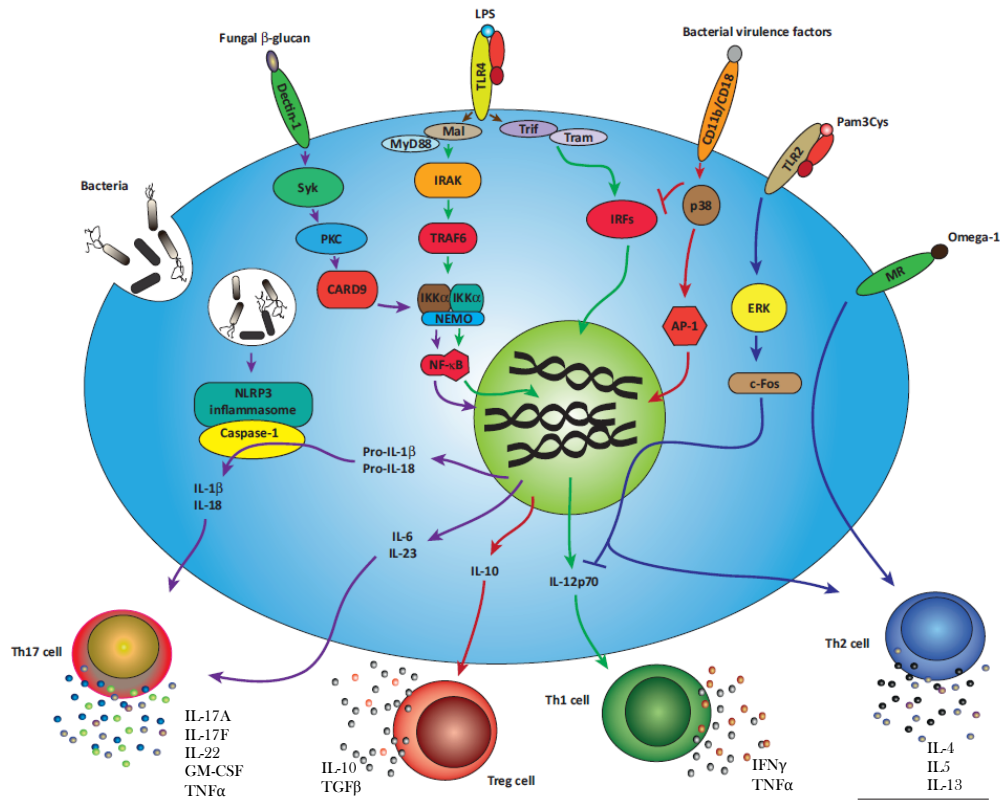
Les molécules de co-stimulation à la surface des lymphocytes sont LFA-1, CD28 / CTLA-4, et CD2 reconnaissant respectivement sur les cellules dendritiques les molécules ICAM-1, B7-1 / B7-2 et CD58. CD45, par son domaine intracellulaire, active Lck puis ZAP70.

Cette reconnaissance de l'antigène par le TCR qui correspond au premier signal, va induire une cascade de signalisation via les protéines kinases de la famille des Src et Tyk. Les kinases de la famille Src telles que Lck et Fyn induisent la phosphorylation des complexes TCR-CD3 (**Figure 20**). (Salmond et al. 2009). Ces derniers contiennent des motifs d'activation ITAM (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motifs) dont la phosphorylation va induire le recrutement des kinases de la famille Syk telles que ZAP-70 via leur domaine SH2 (**Figure 20**). (Au-Yeung et al. 2009). Ces dernières sont phosphorylées et recrutent et phosphorylent deux protéines LAT et SLP-76 formant ainsi le signalosome qui va induire la libération de Ca^{2+} de sites de stockage comme le reticulum endoplasmique. L'augmentation du Ca^{2+} intracytoplasmique induit une cascade de réactions aboutissant à une réorganisation du cytosquelette et à la polarisation des organelles cellulaires vers la CPA.

La formation de la synapse immunologique est induite par la réorientation du Centre Organisateur des Microtubules (MTOC) qui résulte de la reconnaissance de l'antigène par le TCR. (A. Kupfer and Dennert 1984; Sancho et al. 2002; Martin-Cofreces et al. 2006; Gomez et al. 2007). Il s'ensuit une réorientation du Golgi et des vésicules sécrétoires au niveau de la synapse permettant le relargage contrôlé de cytokines issues de lymphocytes (a Kupfer, Mosmann, and Kupfer 1991; Huse et al. 2006).

En parallèle, une induction des MAP Kinases a lieu régulant l'activation de facteurs de transcription qui induisent une prolifération et une différenciation des lymphocytes T ainsi que la production de cytokines. (Navarro and Cantrell 2014)

À la fin de l'inflammation, une partie de ces cellules va mourir par apoptose et le reste va constituer un pool de lymphocytes mémoires (qui seront activés rapidement et de façon plus efficaces lors d'une seconde présentation de cet antigène spécifique).



D’après “Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation”

(Walsh and Mills 2013)

Figure 21 : Polarisation des cellules T par les cellules dendritiques après stimulation par les PRR

Suivant les PRR stimulés dans les cellules dendritiques, les voies de signalisations induites sont différentes, ce qui conditionne le type de polarisation des lymphocytes T. Ainsi, les lymphocytes T adaptent leur réponse à différents stimuli.

Suite à l’interaction MHC-TCR et aux signaux d’activation cellulaire détaillés plus haut, une phase d’amplification de la réponse se développe. Elle mène les lymphocytes T CD4+ activés, appelés T helper (Th), à sécréter différentes cytokines qui conditionnent le type de réponse spécialisée mis en place pour contrôler les perturbations qui ont initié la réponse immunitaire (**Figure 21**). Cette phase est dépendante de l’expression de facteurs de transcription spécifiques à chacune des réponses et induisant l’inhibition des autres types de réponses (**Figure 22**).

Parmi les différents types de cellules Th, les Th1 permettent de lutter contre des pathogènes à multiplication intracellulaire (mycobactéries..) par la sécrétion de l'IFN γ . L'IFN γ potentialise les fonctions phagocytaires et bactéricides des neutrophiles et des macrophages. Ils permettent également de jouer un rôle central dans l'éradication des virus en contribuant à la différenciation des lymphocytes T CD8+ cytotoxique (CTL).

Les lymphocytes T helper Th2 sécrètent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, qui jouent un rôle important dans la protection contre les pathogènes muqueux. Les lymphocytes T Th2 jouent un rôle également dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes qui sécrètent des immunoglobulines (Ig) dont l'action est d'éliminer des pathogènes.

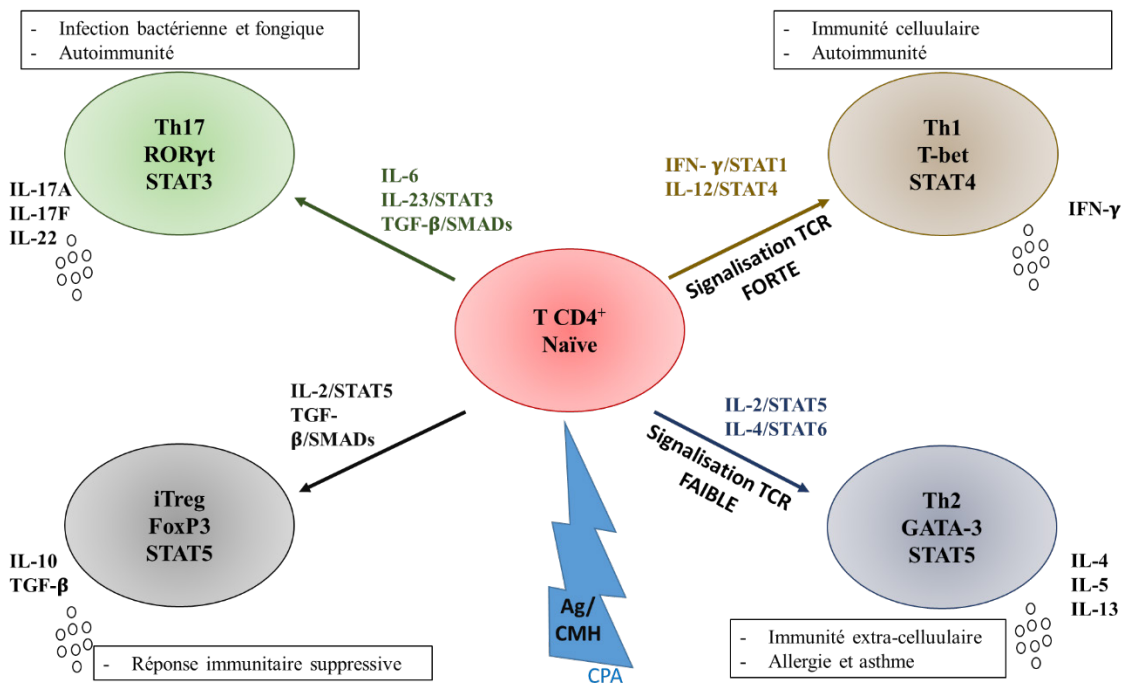
Les lymphocytes T Th17, produisant l'IL-17, jouent également un rôle important dans les défenses contre les bactéries mais également contre les infections fongiques par la mobilisation et l'activation des phagocytes.

Spécifiquement, les facteurs intervenant dans la polarisation vers les différents types de réponses (**Figure 22**) comprennent (Yamane and Paul 2013) :

- Pour la polarisation Th1, une forte signalisation du TCR (Constant and Bottomly 1997; Jorritsma, Brogdon, and Bottomly 2003) qui induit une inhibition de la polarisation Th2 (Yamane and Paul 2013). L'IL-12, produite par la CPA, induit via l'IL-12R et STAT4 l'expression du facteur de transcription T-bet.
- La polarisation Th2 est induite par une faible signalisation du TCR (Constant and Bottomly 1997; Jorritsma, Brogdon, and Bottomly 2003), ce qui augmente la production d'IL-4 par la cellule T et induit l'expression du facteur de transcription GATA-3. La sécrétion transitoire d'IL-2 et l'activation de STAT5 via l'IL2R mènent à l'augmentation de l'expression de la chaîne alpha de l'IL-4R et à la différenciation en Th2 (Yamane, Zhu, and Paul 2005; Liao et al. 2008)
- La polarisation Th17 (Bettelli et al. 2008; Dong 2008) dépend d'une forte signalisation du TCR et de la présence de TGF- β et d'IL-6. Ceci induit via STAT3 l'expression facteur de transcription spécifique des Th17, ROR γ t, et la sécrétion de l'IL-17a et F, et de l'IL-21. La forte signalisation du TCR bloque les voies de signalisation IL-2/STAT5 et favorise la polarisation Th17 en bloquant les voies Th2 et iTreg (Yamane, Zhu, and Paul 2005; Lee et

al. 1999). La polarisation Th17 est auto-amplifiée par l'IL-21 et stabilisée médiée par l'IL-23.

- La polarisation iTreg résulte de l'action combinée de TGF- β et de l'IL-2 avec expression du facteur de transcription FoxP3. L'IL-2 est induite par une signalisation faible du TCR et bloque la différenciation Th17 via STAT5 (Yamane, Zhu, and Paul 2005; Lee et al. 1999)



D'après "Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets" (Yamane and Paul 2013)

Figure 22 : Polarisation des lymphocytes T

Schéma résumant les différentes polarisations des T CD4⁺ naïves mettant en jeu des cytokines, des facteurs de transcription ainsi que des facteurs de croissance.

À la fin de l'inflammation, une partie de ces cellules va mourir par apoptose et le reste va constituer un pool de lymphocytes mémoires (qui seront activés rapidement et de façon plus efficace lors d'une seconde présentation du même antigène).

II. Inflammation

1. Définition et médiateurs de l'inflammation

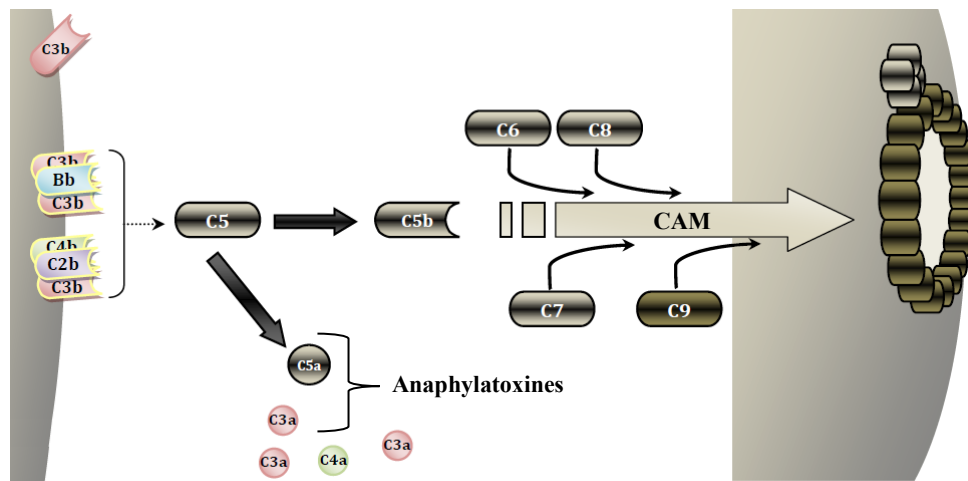
L'inflammation correspond de façon très générale à l'ensemble des événements qui sont mis en place suite à une agression de l'organisme (infection, traumatisme, effets de produits chimiques, rayonnement etc....) et qui visent à rétablir un fonctionnement normal des tissus. Cette réponse est initiée par la reconnaissance de produits exogènes ou endogènes dont la perception signale un stress tissulaire. Les Pattern Recognition Receptors (PRR), dont l'expression ne se limite pas aux cellules du système immunitaire, jouent un rôle important dans le déclenchement de cette réponse.

L'inflammation se manifeste classiquement par 4 signes principaux qui sont la rougeur, la chaleur, la tuméfaction et la douleur. Elle met initialement en jeu différents facteurs présents dans le sang circulant tel que diverses protéases ou le système du complément et des facteurs produits par des cellules résidentes (mastocytes et polynucléaires basophiles) capables de réponse rapide par dégranulation de molécules stockées. Ces facteurs, à leur tour, ont la capacité d'activer différents systèmes incluant les réponses immunitaires qui elles-mêmes vont amplifier les réponses initiales. L'inflammation comprend ainsi de nombreuses boucles d'auto-amplification et la production concomitante de facteurs anti-inflammatoires (antagonistes, destruction des produits actifs) est cruciale pour permettre un retour à l'état physiologique. En effet, idéalement, cette réponse élimine l'agent pathogène et permet la réparation des tissus lésés. Cependant, en l'absence de contrôle efficace, l'évolution vers la chronicité ou l'inflammation systémique est possible.

De nombreux médiateurs plasmatiques ou cellulaires interviennent dans l'initiation et le déroulement des différentes formes que peut prendre la réponse inflammatoire.

a. Les protéases plasmatiques

Le système du complément est un ensemble de neuf protéines plasmatiques (C1 à 9) qui aboutissent à la création d'un Complexe d'Attaque Membranaire (CAM) permettant la lyse du pathogène (**Figure 22**). Des inhibiteurs de la formation du CAM sont présents à la surface des cellules de l'hôte. Cette cascade est déclenchée par la fixation de complexes immuns (Antigène - Anticorps) sur la fraction C1, et par les endotoxines. Les fractions produites au cours de l'activation du complément ont-elles-mêmes des fonctions puissantes. Ainsi, C3a et C5a appelées anaphylatoxines, vont jouer un rôle dans la perméabilité vasculaire, le chimiotactisme des cellules de l'immunité, l'opsonisation des pathogènes favorisant la phagocytose, et la libération de l'histamine par les mastocytes (**Figure 22**).



D'après "<http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-prr.html>"

(Matthieu Simon)

Figure 23 : La cascade du complément

Les facteurs de la coagulation jouent un rôle dans l'inflammation car la transformation du fibrinogène plasmatique en fibrine et la fibrinolyse qui s'en suit amplifient l'inflammation par vasodilatation et chimiotactisme pour les PN. De plus, le facteur XII est activé par les complexes immuns et les corps insolubles et il active le complément et le système des kinines.

Les kinines, dérivées du kininogène plasmatique, dont l'action est initiée par divers activateurs (protéases de tissus lésés, histamine, facteur XII...) sont de puissants vasodilatateurs et accroissent la perméabilité vasculaire. Leur durée de vie est réduite par dégradation rapide.

b. Les amines vasoactives

Elles sont présentes au niveau des granules cytoplasmiques des polynucléaires et des mastocytes où elles sont stockées et prêtes à la libération immédiate dans le milieu extracellulaire sous l'effet d'un traumatisme, de toxines, ou de la présence d'autres facteurs de l'inflammation (facteurs du complément C3a et C5a, contenu des granules de polynucléaires, cytokines). L'histamine, relarguée par les mastocytes, a une forte action sur la perméabilité vasculaire et le chimiotactisme des éosinophiles. La sérotonine libérée au cours de l'agrégation plaquettaire a des effets vasoconstricteurs.

c. Les médiateurs lipidiques

Les dérivés de l'acide arachidonique : l'acide arachidonique, généré à partir de la lyse des phospholipides des membranes cellulaires par des lipases comme la phospholipase A2, est métabolisé par :

- la cyclo-oxygénase qui génère les prostaglandines (vasodilatateurs, chimiotactiques), le thromboxane A2 (agrégant plaquettaire, vasoconstricteur), la prostacycline (anti-agrégant plaquettaire, vasodilatateur)
- la lipo-oxygénase qui génère les leucotriènes (chimiotactiques, accroissent la perméabilité vasculaire)

Le facteur d'activation plaquettaire (PAF) : également formé à partir des phospholipides membranaires par les PN, les basophiles, les monocytes, les plaquettes et qui agit sur la perméabilité vasculaire, l'agrégation plaquettaire, le chimiotactisme des leucocytes.

d. Les enzymes et métabolites des phagocytes

Les enzymes lysosomiales présentes dans les granules des polynucléaires se retrouvent dans le milieu extracellulaire suite à la lyse des cellules. Il s'agit de nombreuses enzymes telles que la myéloperoxydase, des peptidases, phospholipases, collagénase, etc.. Certaines enzymes peuvent, dans une certaine mesure, être neutralisées par des protéines plasmatiques comme l'alpha1-antitrypsine et la β 2-macroglobuline.

Les radicaux libres de l'oxygène, générés par les phagocytes, ont des effets cytotoxiques qui n'épargnent pas les cellules de l'hôte comme les cellules endothéliales. Ils activent aussi la phospholipase A2 et par là mènent à la production de médiateurs lipidiques de l'inflammation.

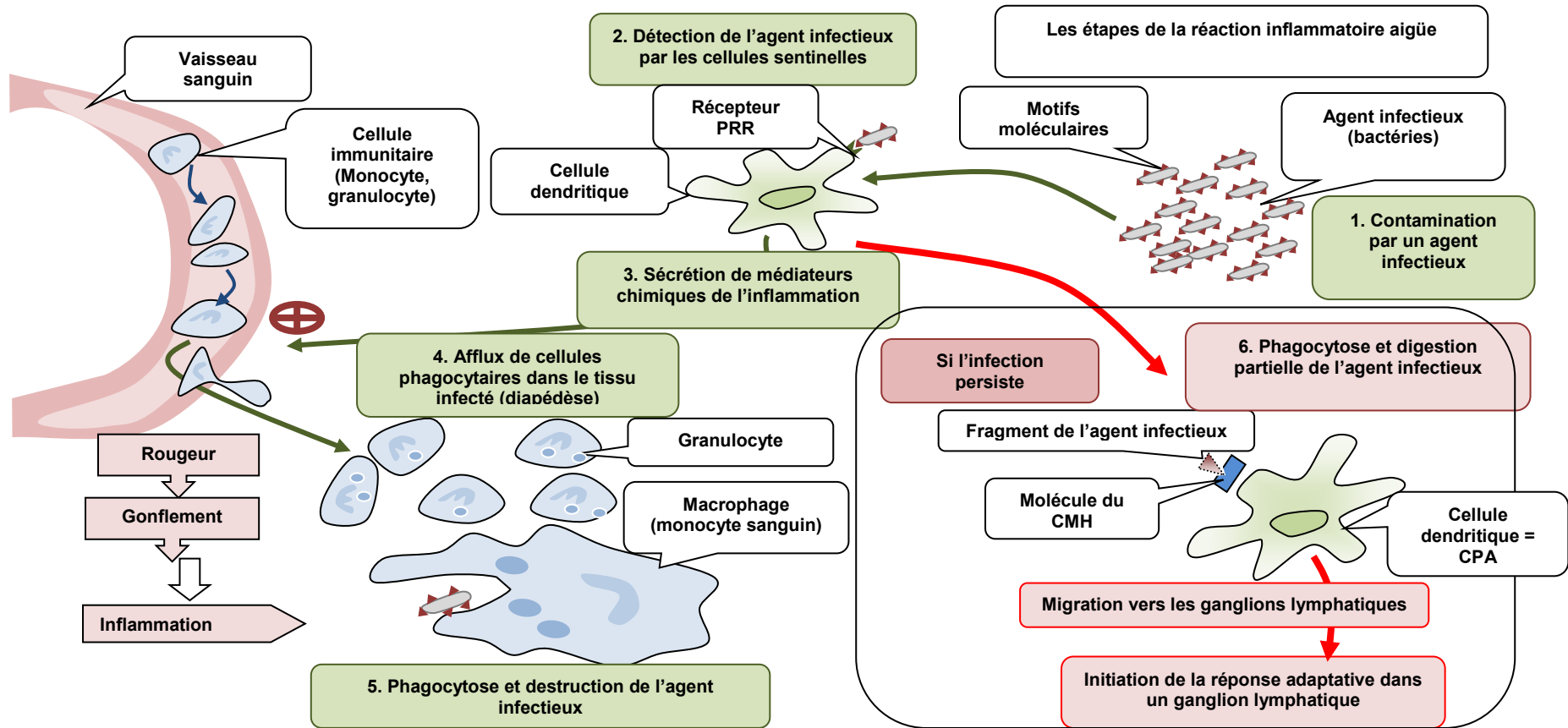
e. Les cytokines et les chimiokines

Les cytokines sont des médiateurs solubles qui sont libérés par diverses cellules et jouent un rôle soit autocrine (sur les cellules qui les ont produites) soit paracrine (sur des cellules voisines), soit systémique quand elles sont produites en grande quantité. Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-1alpha et β , l'IL-6 ont des effets activateurs sur les réponses immunitaires, l'augmentation de la température corporelle et la baisse de l'activité physique, la stimulation de la myélopoïèse, la synthèse de protéines de phase aigüe, et agissent sur la microcirculation et la perfusion tissulaire. Les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 s'opposent à ces effets.

La famille des chimiokines comme l'IL-8, le MCP-1 agissent sur le chimiotactisme des cellules de l'immunité avec une spécificité cellulaire propre à chaque chimiokine.

f. Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote, produit par les cellules exprimant les différentes formes de l'enzyme NO synthase (NOS) comme les macrophages et les cellules endothéliales, induit la dilatation des vaisseaux ainsi que la lyse des cellules infectées.



D'après <https://svtlyceedevienne.wordpress.com/theme-3-a-corps-et-sante/chapitre-1-la-reaction-inflammatoire-un-exemple-de-reponse-innee/>

(Fabrice Morales)

Figure 24 : Schéma récapitulatif de la réponse inflammatoire

La reconnaissance d'un pathogène déclenche des activations cellulaires qui vont induire la sécrétion de médiateurs de l'inflammation et l'activation des réponses immunitaires adaptatives.

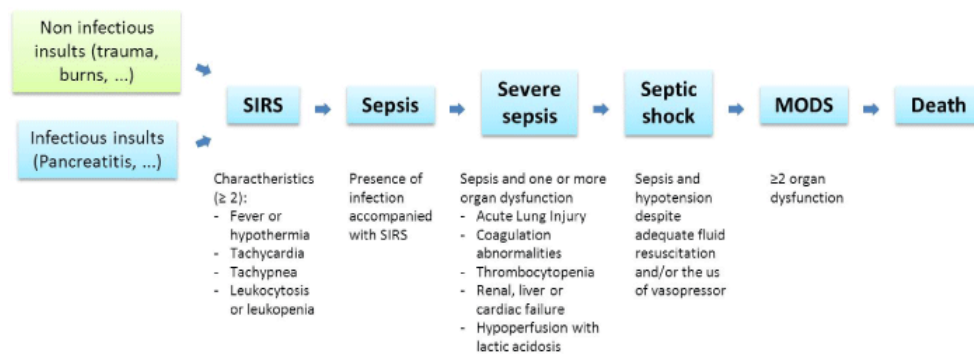
2. Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

La notion de syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) a été introduite en 1991 à la conférence " American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) " comme une expression clinique de la réponse de l'hôte à l'inflammation. (Rc Bone et al. 1992). Le SIRS visait à permettre de définir les paramètres cliniques à suivre afin d'identifier précocement les patients à risque d'évolution vers le sepsis. Cette définition ambitionnait aussi de mieux grouper les patients entrant dans les essais cliniques. Bien que la définition clinique du SIRS soit très générale et présente chez la très grande majorité des patients admis en soins intensifs (2 signes parmi hyper/hypothermie, tachycardie, tachypnée, leucocytose/leucopénie), la présence de 3 ou 4 signes de SIRS est associée à l'infection chez les patients admis et à la susceptibilité au sepsis sévère chez tous les patients admis (**Figure 24**) (Sprung et al. 2006). Cependant, Kaukonen et al. ont montré que jusqu'à 12% des sepsis sévères pouvaient avoir moins de 2 signes de SIRS (Kaukonen et al. 2015). La trop grande généralité des signes et les résultats conflictuels obtenus dans les différents centres ont mené à l'abandon du SIRS comme partie intégrante des critères de définition du sepsis (Singer et al. 2016). Cependant, le SIRS reste intéressant comme modèle pour définir les éléments constitutifs d'un syndrome d'inflammation systémique quelle qu'en soit l'étiologie ou l'évolution. Les échecs de plusieurs essais cliniques sur le sepsis (glucocorticoïdes (R. C. Bone et al. 1987), l'utilisation d'anticorps anti-endotoxines (Ziegler et al. 1991) ou anti-cytokines (Fisher et al. 1994) ont mené à considérer la réponse de l'hôte dans sa complexité à la fois pro- et anti-inflammatoire et à prendre en compte les effets néfastes de son dérèglement.

Ainsi, initialement, la physiopathologie du SIRS comprenait 5 étapes de gravité croissante (RC Bone 1996) :

- **Etape 1:** la réaction inflammatoire à un stress tissulaire se développe, mettant en jeu les médiateurs décrits plus haut, avec ses phases pro-inflammatoire d'élimination et anti-inflammatoire de contrôle menant à un retour à l'homéostasie
- **Etape 2 :** les défenses locales s'avèrent insuffisantes ; l'amplification de la réponse pro-inflammatoire mène à un recrutement augmenté de cellules, et au passage des médiateurs de l'inflammation dans la circulation ; la réponse anti-inflammatoire parvient cependant à contrôler la réaction, menant à un retour à l'homéostasie

- **Etape 3** : le passage des médiateurs de l'inflammation dans la circulation est massif et/ou la réponse anti-inflammatoire ne parvient pas à contrôler la réaction ; des défaillances d'organes à distance du site inflammatoire se développent ; l'anti-inflammation devient également excessive et systémique
- **Etape 4** : l'immunosuppression domine, au risque de surinfections ; la survie de l'individu est en jeu
- **Etape 5** : stade final des multiples défaillances d'organes ; l'équilibre entre pro-inflammation et anti-inflammation est rompu ; les patients se répartissent entre des états d'hyper-inflammation ou d'anti-inflammation profonde et immunodépression, ou bien oscillent entre ces deux états



<http://www.omicsonline.org/articles-images/2161-0398-5-183-g001.html>

Figure 25 : SIRS d'origine infectieux ou non-infectieux

Un SIRS peut être d'origine non-infectieuse (traumatisme, brûlure ...) ou infectieuse. Un SIRS accompagné d'une infection était considéré comme un sepsis. Un sepsis accompagné d'une défaillance d'organes évolue en sepsis sévère puis en choc septique. Si au moins deux organes sont défaillants, le pronostic vital est en jeu.

De nombreux travaux ont rapporté qu'au cours du SIRS, il était possible d'observer dans la circulation un fort taux de médiateurs de l'inflammation comme l'IL-6 (Taniguchi et al. 1999), le CD14 soluble, l'ELAM-1 soluble, le MIP-1 (Stoiser et al. 1998), la phospholipase A2 extracellulaire (Mayer et al. 2002) et la protéine C-réactive (Takala et al. 1999), témoignant d'un possible passage systémique de médiateurs physiologiquement tissulaires.

Cependant cette vision d'un organisme progressivement envahi par les réponses pro- et anti-inflammatoires générées au niveau du site lésé s'accordait mal avec d'autres résultats montrant que les cellules et tissus de la périphérie étaient la source de fortes réponses anti-inflammatoires. Munford et Pugin proposent alors de reconsidérer l'état inflammatoire systémique en le divisant en compartiments (Munford and Pugin 2001), avec une réponse pro-inflammatoire dominante au site initial, et une réponse anti-inflammatoire partout ailleurs dans l'organisme, visant à protéger les organes périphériques des effets délétères d'une inflammation excessive. Les complications de l'état inflammatoire systémique proviendraient alors d'une incapacité de l'anti-inflammation systémique à contenir l'inflammation locale (état pro-inflammatoire) ou d'une anti-inflammation périphérique excessive (état d'immunodépression) avec risque infectieux majeur. Suivant ce modèle, il devenait légitime de considérer des traitements immunostimulants (comme l'interferon-gamma) pour contrer l'anti-inflammation et l'immunodépression, ce qui était inconcevable avec la vision précédente de « tempête cytokinique » pro-inflammatoire.

Ce modèle d'inflammation compartimentalisée dans l'organisme a été complété et étendu avec l'addition d'une composante temporelle qui tient compte de l'observation de l'évolution clinique et biologique des patients. Dans la synthèse récente de Hotchkiss, Monneret et Payen (R. S. Hotchkiss, Monneret, and Payen 2013), la réponse inflammatoire dominante serait initialement pro-inflammatoire et d'intensité variable suivant l'état et l'âge du patient, la nature et le site de l'agression, et cette phase serait d'une durée courte (48 – 72 heures). Ensuite, une phase d'anti-inflammation s'installerait progressivement et la durée et l'intensité de cette phase déterminerait l'importance de l'immunodépression et de la susceptibilité à l'infection. Ce modèle implique la nécessité d'une surveillance immunitaire des patients afin de déterminer leur état inflammatoire et ajuster en conséquence la thérapie vers l'immunosuppression ou l'immunostimulation (R. Hotchkiss, Monneret, and Payen 2013).

Le monocyte sanguin est une source importante d'information concernant l'état immunologique du patient. En effet, il a été observé que l'expression de la molécules HLA de classe II, HLA-DR, est profondément abaissée chez les monocytes circulants de patients polytraumatisés ou souffrant d'infection post-chirurgicale (Hershman et al. 1990; Cheadle et al. 1991). Ceci a été retrouvé dans un grand nombre d'affections associées au SIRS comme dans le sepsis, chez les grands brûlés, dans les suites de chirurgie abdominale, ou dans l'accident vasculaire cérébral, et l'intensité de la baisse de l'expression reflète celle de

l'immunodépression présente chez le patient (Monneret et al. 2006). La dynamique de la récupération de l'expression de l'HLA-DR sur les monocytes a été associée à l'évolution clinique du patient (Payen et al. 2009). Certaines fonctions ex vivo de monocytes de patients sont fortement déprimées, comme la réponse aux agonistes des TLR, la capacité d'activation des lymphocytes T (Volk, Reinke, and Docke 2000), et la capacité de différenciation en cellules dendritiques induisant des réponses Th1 (Faivre et al. 2012)s. Ainsi, les monocytes de patients inflammatoires présentent des phénotypes de cellules reprogrammées par les médiateurs de l'inflammation présents lors de l'hématopoïèse et/ou dans le plasma où elles évoluent, avec un niveau d'expression d'HLA-DR sensible à l'accumulation des effets de ces médiateurs.

III. Sepsis

1. Définitions

La définition du sepsis a fortement évolué au cours des 25 dernières années, reflétant les difficultés qui se posent d'une part dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires menant à cet état, d'autre part dans l'identification de signes cliniques et biologiques objectifs et reconnus par l'ensemble des centres de soins intensifs permettant de poser le diagnostic, particulièrement au stade précoce de l'affection.

Ainsi, la première définition consensuelle du sepsis en 1991 fut de le considérer comme un SIRS associé à une infection (RC Bone 1995) avec un continuum de gravité croissante incluant SIRS, sepsis, sepsis sévère et choc septique suivant la présence de dysfonctionnement d'organe et d'hypotension réfractaire. Cette définition fut complétée en 2001 par l'ajout de critères permettant de diagnostiquer précocement le sepsis par une méthode "plus standardisée", en particulier par l'introduction de scores (SOFA) (Ferreira 2001).

Considérant les critères cliniques du SIRS comme trop vagues, l'accent sur l'inflammation comme trop important, et critiquant l'approche graduelle du SIRS au choc septique, une nouvelle définition fut proposée en 2016 suivant laquelle le sepsis est un dysfonctionnement d'organe engageant le pronostic vital, causé par un dysfonctionnement de la réponse de l'hôte à l'infection (Singer et al. 2016). Une nouvelle définition du score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) permet d'affirmer la défaillance d'organes (**Table 3**).

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
Pao ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular					
MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b	
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

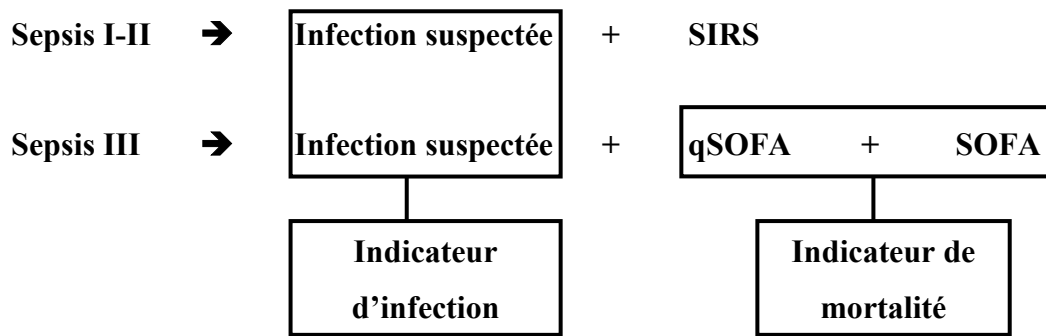
The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)

(Singer et al. 2016)

Table 3 : qSOFA, critère des scores de défaillance d'organes

Ces nouvelles définitions impliquent plusieurs choses (**Figure 25**) :

- ✓ Sepsis implique défaillance d'organes
- ✓ SOFA plus discriminant que SRIS mais les prélèvements pour évaluer ce score prennent un certain temps
- ✓ SOFA est plutôt un indicateur de risque de décès et non de diagnostic du sepsis proprement dit.



*Résumé de la définition du sepsis de 1991 à 2016 <https://emcrit.org/pulmcrit/problems-sepsis-3-definition/>
(Consensus Definitions for Sepsis Josh Farkas)*

Figure 26 : Similarités et différences entre les 3 définitions successives du sepsis

*Le sepsis de type I et II était défini comme l'association d'une infection à un SIRS.
Le sepsis de type III est plus difficile à définir et l'association d'une infection suspectée à un $qSOFA > 2$ peut indiquer un possible sepsis.*

Un des buts visés est de prendre en compte les manifestations du sepsis pas seulement dans leur dimension inflammatoire, mais dans une approche multi-systèmes incluant les aspects cardiovasculaires, neurologiques, hormonaux, bioénergétiques, métaboliques et coagulatoires.

2. Épidémiologie

L'épidémiologie du sepsis est compliquée par le report incomplet des cas et les incertitudes évoquées plus haut sur sa définition. Les données récentes recueillies entre 2004 et 2009 indiquent une incidence entre 300 et 1 000 cas pour 100 000 habitants aux USA (DF et al. 2013). Ceci rejoint en partie des études précédentes trouvant une incidence proche de 300 cas pour 100 000 sur des périodes plus anciennes entre 1980 et 2000 (Angus et al. 2001; Martin et al. 2003). La mortalité liée au sepsis était de 17-26 % dans les études récentes (C. Fleischmann et al. 2016), une baisse sensible par rapport aux années précédentes. Parmi les facteurs de risque, on retrouve l'âge et les maladies chroniques associées à une baisse des fonctions immunitaires comme le cancer ou le diabète (Alberti et al. 2002)

3. Physiopathologie du sepsis

Comme décrit plus haut, la compréhension actuelle du sepsis a évolué pour considérer que les dysfonctionnements immuno-inflammatoires, bien que considérables, ne pouvaient expliquer à eux seuls les difficultés de l'organisme à revenir à l'homéostasie, et que d'autres perturbations, en particulier métaboliques, intervenaient défavorablement (van der Poll et al. 2017).

Dans le sepsis, les réponses inflammatoires et immunologiques inadaptées sont consécutives à une infection. Celle-ci initie dans l'organisme l'activation de nombreux types cellulaires via des Pattern Recognition Receptors parmi lesquels les Toll-like Receptors TLR jouent un rôle majeur. Ces récepteurs, au nombre de 10 chez l'homme (TLR1 à 10), dont les gènes sont présents dans la lignée germinale, reconnaissent des motifs qui sont conservés chez les micro-organismes en raison de leur importance pour la survie de ces espèces. Des constituants de tous les types microbiens (virus, bactéries, levures, champignons et parasites) sont ciblés par les TLR. L'analyse de la structure des différents TLR a montré une organisation des Leucine Rich Repeats de la structure primaire en forme de fer à cheval sans site particulier dédié à l'interaction avec les différents ligands. Ainsi, le LPS des bactéries Gram^{neg}, complexé à l'adaptateur MD2, interagit avec TLR4 via sa face concave. A l'inverse, l'hétéro-dimère TLR2-TLR1 reconnaît les lipoprotéines bactériennes par sa face convexe. L'ARN double brin, un intermédiaire de la synthèse des acides nucléiques de nombreux virus, interagit avec les extrémités N- et C-terminales du fer à cheval de la structure de TLR3 ce qui détermine la longueur minimale du brin reconnu à 40 bp. Cette versatilité dans l'interaction avec les composés microbiens permet à cette structure de base des 10 TLR la reconnaissance d'un nombre étendu de composants de structures diverses. L'interaction avec le ligand mène à la dimérisation des domaines intra-cytoplasmiques des TLR, ce qui initie une cascade de réactions de signalisation impliquant l'adaptateur MyD88, les kinases IRAK1 et 4, la molécule TRAF6, l'ensemble se complexant en un signalosome qui recrute d'une part la molécule Ikk menant à la translocation de NFkappaB dans le noyau, et qui d'autre part active les MAP kinases. TLR3 active une voie distincte dépendante de l'adaptateur TRIF au lieu de MyD88, et TLR4 active séquentiellement les deux voies. Ces événements activent un programme génique de production massive de médiateurs de l'inflammation (voir section II. 1.) qui amplifie la réponse initiale, recrute d'autres types cellulaires sur le site, potentialise les fonctions (phagocytose, cytotoxicité) des cellules présentes, et, pour les cellules dendritiques, engage les réponses

spécifiques de l'immunité adaptative (voir section I. 3.). La réponse inflammatoire est contrôlée, comme vu plus haut, par la production concomitante de médiateurs puissamment anti-inflammatoires comme l'IL-10. Le contrôle est également intrinsèque aux cellules avec de nombreux régulateurs de la voie de signalisation des TLR (l'analogue IRAK-M sans activité kinase, ubiquitinylation par SOCS, phosphatase SHP-1, régulation transcriptionnelle par le miRNA 155). L'activation de l'ensemble de ces mécanismes de contrôle culmine dans un état transitoire de tolérance des cellules, comme le monocyte, envers l'agoniste des TLR rencontré, avec un certain degré de réactions croisées envers les autres agonistes (Ertel et al. 1995; Munoz et al. 1991). Des dérèglements de ces mécanismes de contrôles ont été retrouvés dans le sepsis, menant à l'hyper-inflammation par production et activation excessive de médiateurs (voir section I.1) et à l'immunosuppression profonde par reprogrammation cellulaire sur le site inflammatoire et à distance dans le sang et dans la moelle (Poehlmann et al. 2009; Lukaszewicz et al. 2009).

La réponse immunitaire est impactée au cours du sepsis à d'autres niveaux que l'immunité innée. Ainsi, les fonctions des cellules dendritiques sont affectées dans leur capacité à initier des réponses Th1, comme le suggère la déviation fonctionnelle de MoDC produites à partir de monocytes de patients septiques vers les polarisations Th2, Treg ou l'anergie des lymphocytes CD4⁺ (Faivre et al. 2012). D'autre part, une apoptose massive des lymphocytes CD4⁺, épargnant les Treg (Monneret et al. 2006), CD8⁺, et des lymphocytes B est observée aux stades précoces du sepsis (Boomer et al. 2011a; Felmet et al. 2005). Les cellules T CD4⁺ restantes expriment fortement PD1, réduisant leur capacité de réponse (Boomer et al. 2011b). Une réponse neurologique parasympathique via le nerf vague résulte en la libération de noradrénaline dans la rate, conditionnant une production d'acétyl-choline par des lymphocytes T CD4 qui elle-même inhibe l'activité des macrophages M1 (**Figure 26**) (Andersson and Tracey 2012).

Les perturbations métaboliques au cours du sepsis, connues depuis longtemps, sont aujourd'hui mieux reconnues pour leurs effets sur l'inflammation et le système immunitaire (O'Neill, Kishton, and Rathmell 2016). La transition entre phosphorylation oxydative, forte productrice d'ATP, et glycolyse aérobie, qui génère des substrats pour la synthèse de macromolécules au dépens de la production d'ATP, est un phénomène normal en situation de stress et connue comme « effet Warburg » (Heiden et al. 2009). Cette transition mène à une réponse inflammatoire par l'effet du succinate accumulé qui stabilise le facteur de transcription HIF1alpha, favorisant ainsi la production d'IL-1 β (Tannahill et al. 2013). De plus, la mitochondrie oxyde le succinate, augmente son potentiel de membrane et libère des dérivés

actifs de l'oxygène (ROS) qui activent les macrophages (E. L. Mills et al. 2016). Cependant, dans l'activation via les TLR, seul le LPS induit cette transition, alors que les ligands des autres TLR induisent une augmentation de la consommation d'oxygène à la fois par phosphorylation oxydative et par la glycolyse aérobie qui pourrait satisfaire les besoins accrus en énergie en début d'infection (Lachmandas et al. 2016). Ces évolutions métaboliques normales, qui peuvent prendre place aux stades initiaux de l'infection et de l'inflammation, peuvent être perturbées de plusieurs manières dans le sepsis. Chez les monocytes de patients septiques, une paralysie à la fois des voies métaboliques de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse aérobie a été décrite, corrélant avec l'état d'immunoparalysie (S.-C. Cheng et al. 2016). Cette inhibition métabolique pourrait entraver l'évolution vers les étapes de réparation et de régénération des tissus (**Figure 26**).

Objectifs

Au départ du projet, les données de la littérature révèlent une hétérogénéité importante des sous-populations de monocytes humains, à savoir :

- une grande hétérogénéité phénotypique à l'intérieur des sous-populations
- surtout, une hétérogénéité fonctionnelle avec des chevauchements importants entre les fonctions attribuées aux sous-populations (e.g. la population de monocytes classique CD14⁺⁺CD16^{neg} est décrite comme ayant une activité antimicrobienne et de phagocytose tout comme la population intermédiaire CD14⁺⁺CD16⁺). (Zhao et al. 2009; Ancuta et al. 2009)
- de plus, les fonctions décrites dans les différents laboratoires pour les 3 sous-populations de monocytes étaient variables et ne concordaient pas

Ainsi mon premier objectif au cours de cette thèse a été d'analyser plus finement les monocytes humains et de chercher à obtenir dans un premier temps une caractérisation phénotypique des sous-populations de monocytes. Utilisant les techniques actuelles d'analyse, cette étude prévoyait d'être aussi exhaustive que possible afin de pouvoir décrire des populations quelle que soit leur taille. Les monocytes sont des acteurs essentiels des réponses inflammatoires et l'évolution des phénotypes au cours de l'inflammation a été recherchée par l'analyse de cellules de patients septiques.

Les résultats obtenus, permettant de distinguer de nouvelles sous-populations de monocytes, ont permis d'aborder dans un second temps l'analyse des fonctions des sous-populations de monocytes sous un angle nouveau. La fonction analysée est celle de la polarisation des lymphocytes T après différenciation des monocytes en MoDC suivant un protocole standardisé et pratiqué dans le laboratoire. Les données obtenues ont nécessité le développement et l'utilisation de diverses méthodes d'analyses pour pouvoir être pleinement interprétées. En particulier, des recherches de corrélations sur un volume important de données,

couplées aux analyses phénotypiques de la première partie du projet, ont été fructueuses avec l'identification d'une petite sous-population fonctionnellement restreinte aux réponses Th2.

Articles

Résultats Article 1

Les monocytes humains sont classifiés comme classiques $CD14^+CD16^{neg}$, non-classiques $CD14^{dim}CD16^+$ et intermédiaires $CD14^+CD16^+$ et jouent un rôle important dans les réponses inflammatoires et immunitaires. Cette classification est cependant limitée par sa faible capacité à prédire les fonctions des monocytes qui font partie des 3 groupes.

Afin de progresser dans l'identification de populations fonctionnelles de monocytes, nous avons cherché à mieux disséquer phénotypiquement l'ensemble des monocytes humains. Pour cela, nous avons analysé en cytométrie de flux l'expression de 17 marqueurs sur des échantillons de PBMC de 28 donneurs sains.

Nos résultats nous ont permis d'identifier une nouvelle population de monocyte que nous avons appelé « large monocytes » composée de 2 sous-populations de monocytes $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^{neg}$, et distincte de la « small monocytes » comprenant $sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^{neg}$ et $sm14^{dim}16^+$. Ces populations ont été caractérisées phénotypiquement par l'analyse des molécules de surfaces (récepteurs à chimiokines, FcR, molécules jouant un rôle dans la présentation antigénique et molécules d'adhésion).

Les analyses multidimensionnelles des données de 28 donneurs ont permis de préciser les phénotypes de chacune des sous-populations, qui gardent cependant un fort niveau d'hétérogénéité. Cependant, les analyses ont montré que cette hétérogénéité pouvait être rapportée à l'existence de groupes phénotypiques retrouvés chez des donneurs non-apparentés, en utilisant en particulier les variations inter-individuelles dans l'expression des molécules d'adhésion.

Les monocytes jouent un rôle important dans les pathologies inflammatoires et sont modifiées au cours de ces dernières. Pour déterminer l'évolution phénotypique des sous-populations identifiées chez le sujet sain, nous avons étudié l'expression des mêmes marqueurs sur 3 patients septiques à 2 temps différents (post-admission et 2-4 jours plus tard). Les sous-populations nouvellement décrites (« large ») ont également été retrouvées chez les patients septiques et leur ratio $CD16^+/CD16^{neg}$ est altéré de manière similaire aux autres monocytes. La baisse classique de l'expression de HLA-DR était très hétérogène parmi les sous-populations de monocytes, avec quasi-conservation de l'expression chez les $sm14^+16^+$. Enfin,

l'appartenance à un groupe phénotypique a pu être établie pour les patients, et le phénotype en cause est conservé au cours de la réponse inflammatoire.

Ces résultats apportent un éclairage sur la diversité des populations de monocytes humains et affine la définition de ces populations, ce qui est une étape importante pour l'analyse des fonctions associées.

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

Article 1 : Identification of novel human monocyte sub-populations and of monocyte phenotypic group defined by inter-individual variations of cell surface receptor expression

F. Mourah¹, S. Cohen¹, A.C. Lukaszewicz¹, V. Faivre¹, D. Egaut², D. Charron², D. Payen¹, N. Mooney¹, and A. Haziot¹

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

², INSERM U940, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Submitted, 2017

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 and recruitment in inflammatory and infectious conditions, the particular functions related to these subsets has 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 in multicolor flow cytometry in PBMC samples obtained from 28 control donors. With the aim to describe monocyte populations as exhaustively as possible, data acquisition was tailored to also 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 multi-dimensional analysis confirmed the existence of large monocytes and revealed inter-individual variations that were grouped in 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 inflammatory and infectious conditions we similarly analyzed monocytes in septic patients at two time points, admission and 2-4 days later. The novel large monocyte population was also present in patients and its CD14/CD16 ratio was equally altered as in small monocytes. Belonging to a phenotypic group was readily determined in patients 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. Patterns of combined expression of HLA-DR, CD86, and of the scavenger receptor CD163 in $sm14^+16^+$ monocytes was associated with the evolution of HLA-DR expression in monocytes, which is a marker of immune dysfunction in sepsis. 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.

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 break up in 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 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 analyses of monocytes phenotypes and functions recognized the heterogeneity of these sub-populations. 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). This additional subset of human monocytes was later identified as "intermediate" with strong CD14 and CD16 expressions (CD14⁺CD16⁺ cells). Evidence for this third subset was confirmed in transcriptome analysis.

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.

Despite progresses in phenotypic analysis, immune functions associated with monocyte subpopulations in steady-state remained ill-defined. Marked functional redundancies between the sub-populations were found, and contradicting results in the literature added to the puzzling difficulties in assigning functions to specific populations. Thus, intermediate monocytes were described as the major source of pro-inflammatory cytokines upon stimulation. In contrast, non-classical monocytes were also described as the most inflammatory monocytes. Similarly, anti-inflammatory cytokine secretion was alternatively found high in intermediate or in classical monocytes.

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, 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. Alternatively, given the extensive phenotypic heterogeneity within CD16⁺ monocyte subpopulations, cells may collectively converge to exert a same function through cell plasticity. A third possibility is that discrete monocyte subsets within the subpopulations as documented by single cell gene expression are active in different tissues and pathological settings.

In this study, we 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 donors. Modification and stability of monocyte populations and their phenotypes during inflammation were documented in septic patients in time-course analyses of blood samples. Results identified novel populations of monocytes with unique morphologic and phenotypic characteristics. Monocyte populations displayed heterogeneous phenotypes among healthy donors that could however be resolved into phenotypic groups based on inter-individual variations of expression. In inflammatory conditions, monocyte populations related to that found in controls were recognized, and phenotype alterations were identified. Phenotypic group belonging appeared to withstand changes induced by inflammation.

Materials and Methods

Donors and patients

Blood samples from 28 healthy Caucasian donors (Table I) were obtained from the local blood bank (Etablissement Français du Sang at Saint-Louis Hospital, Paris, France).

Blood samples from three septic patients (Table II) were collected at the Intensive Care Unit, Lariboisière Hospital, Paris, France. The study was approved by the Assistance Publique Hôpitaux de Paris Cochin Hospital Ethics Committee (3 CCPPRB 2061). In this study, blood collected for 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 blood remainders.

However, 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 veinous 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 .

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 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) 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 III 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. The concentrations of MAb used were determined in preliminary titration experiments. Cells were then washed one time in PBS/10 % HABS (5 min, 300 x g, 4°C), and one time in 1ml of PBS supplemented with EDTA (0.5 mM) (5 min, 300 x 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 (CST) 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 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 (BD) and manually checked and adjusted.

Data was analyzed in different ways as described below.

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

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: $MFI = MFI_{MAb} - MFI_{Ig}$

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 rate of cells that were positive for a marker in a population. MFI and percentage of positivity were written as subscript and superscript, respectively ($X_{MFI}^{\text{percent pos}}$), 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. 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.

Unsupervised multidimensional analysis was performed using two independent algorithms. FLOCK (FLOW cytometry Clustering without K) available via the Web platform Immport at (<https://import.niaid.nih.gov/importWeb/home/home.do?loginType=full>) is an unsupervised data analysis tool that accepts FlowJo datasets and determines the number of unique populations in high dimensional flow data. It identifies automatically clusters of cell populations and compares populations across multiple samples.

SPADE (Spanning tree Progression of Density normalized Events) 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 then working 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) 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). Cells 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 the 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).

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).

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). The necessary primers and probes (Applied Biosystems) to qPCR use the Taqman technology, or probe hydrolysis, and were labeled at 5'-end by FAM fluorophore and a NFQ quencer at 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: CCTTTGCCGATCCGCGCCCGTCCA; 18S: CCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA.

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

RESULTS

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 I) 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 and to recent guidelines that have been proposed to define monocytes, $CD14$ 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 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. 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 (Figure 1 E, F, G, H), 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 this cell cluster and were named $sm14^+16^{neg}$. Populations of $CD14^+/CD16^+$ cells named $sm14^+16^+$, and of $CD14^{dim}/CD16^+$ cells 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 of small monocytes.

Large monocytes (Figure 1J) were divided in two populations, a $CD14^+/CD16^{neg}$ population representing of large monocytes and named $la14^+16^{neg}$, and a $CD14^+/CD16^+$ population 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, six populations of monocytes were distinguished here (Figures 1 I and J) according to lineage selection, SSC and FSC light scattering, and the level of CD14 and CD16 expression.

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 I). 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 and immunoglobulin superfamily CD7 molecule were also determined. Results shown in figure 2 are presented as bubbles which size corresponds to the percentage of positive cells and the color reflects the MFI according to a heatmap scale of colors. Marker expression for each of the six monocyte populations is presented in individual panels (Figure 2 A to F). The results confirm the widely shown preferential expression of CCR2 and CX3CR1 in CD16^{neg} (Figure 2 A, B, F) and CD16⁺ (Figure 2 C, D, E) monocytes, respectively. In all donors a large percentage of monocyte 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 2 A and B), higher intensity of expression of adhesion molecules CD49d, CD162, and CD62L in la14+16⁺ compared to sm14+16⁺ (Figure 2 D and E). A globally lower expression of most markers characterized sm14^{dim}16^{neg} monocytes (Figure 2 F). Individual variation between donors was however one of the salient feature of the analysis of expression for many of the 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 2 A), 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 in sm14 monocytes 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 markers expression when cell numbers were too low. Among large monocytes, la14+16^{neg} monocytes (n=28) (Figure 2 B) were distinct from their CD16^{neg} counterpart sm14+16^{neg} monocytes (Figure 2 A) 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^{hi}_{bri/med}, CD43^{hi}_{med/dim} phenotype (n=10), and a CD49d^{hi}_{bri}, CD43^{int}_{dim} phenotype (n=3), and were named OP-10, OP-11, and OP-12, respectively. In 7 donors, atypical profiles with CD43^{hi}_{bri} (n=2), CD43^{neg} (n=3), and CD49d^{int/hi}_{med/dim}, CD43^{int/hi}_{dim} (n=2) were found.

In $sm14^{+}16^{+}$ monocytes (Figure 2 C), 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 2 D) differed from $sm14^{+}16^{+}$ monocytes (Figure 2 C) 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.

Less individual variability with respect to adhesion molecules was detected in $sm14^{dim}16^{+}$ monocytes (n=23) (Figure 2 E). 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 $CD49d_{int}^{hi}$, $CD162_{bri/int}^{hi}$ together with lower expression of CX3CR1.

The $sm14^{dim}16^{neg}$ monocyte population (Figure 2 F) 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 2 E) 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 concerted profile of gene expression. In an attempt to further define monocyte phenotypes across the sub-populations, we set 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 sub-populations that are more likely to be associated in a whole monocyte population. 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 (1, 2, 11, 12, and 21). Monocyte phenotype II was associated with no profile in $la14^+16^{neg}$ 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 sub-populations, 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 sub-population $sm14^{dim}16^{neg}$ whereas no other donor had distinctive profiles in this sub-population. Monocyte phenotype IV was much less defined and included profiles OP-03 and -12 found in 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 reinforce the notion that monocyte expression of adhesion molecules shapes the phenotypes of these cells in subsets within subpopulations. However, beside 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 had to be analyzed with computational methods able to detect shared profiles of expression present in groups of cells. These methods allow automated unbiased analysis of data in an unsupervised manner. Among the many tools now available for this task, we selected two clusterization algorithms, FLOCK, a density based clustering method, and SPADE, a hierarchical analysis generating branched tree structure of related cells.

Identification of clusters of defined phenotypes within monocyte populations

FLOCK analysis

We initially used FLOCK to look for new populations of monocytes defined by morphology and the expression of cell surface molecules that we have analyzed. This algorithm identifies clusters of cells that share combinations of morphological characteristics together with levels of expression of cell surface markers. Morphological characteristics are based on side SSC-A, -H, and -W and forward FSC-A, -H, and -W light scatters. Both morphology and expression levels (lineage markers CD3, CD19, and NKp46/CD335, and 17 cell surface molecules as listed in Table III) were ranked on a 4-point grading scale (negative, low, positive, high) and to each identified cell cluster corresponded a combination of grades defining its phenotype. Numerous populations were thus revealed among labeled PBMC (Figure 4). To restrict the analysis of results to monocyte populations, only cells positive for CD14 expression and with FSC/SSC profiles consistent with this cell type are presented.

We first looked for clusters corresponding to classical, non-classical, and intermediate monocyte subpopulations. Surprisingly, FLOCK did not identify clusters that would match these phenotypes and that would be present in all the 28 donors analyzed. Actually, none of the clusters identified by FLOCK was found in all donors. Six populations of monocytes were defined (FL-1 to -6) and their characteristics are listed in Table IV. FSC-A/SSC-A and CD14/CD16 profiles of these 6 populations are shown in Figure 4. It should be noted that

assignment of negative/low/positive/high grades by FLOCK was based on relative expression with respect to all cells present in the sample. Therefore, when significant numbers of events with high or positive expression were present in one sample, cells that may be less positive would be identified by FLOCK as low or negative. For this reason, only expressions labeled by FLOCK as positive or high were included in this analysis. One exception was made for CD16 which expression in CD14-positive cells is well documented and for which negative/low grades attributed by FLOCK were interpreted according to the corresponding CD14/CD16 dot plots.

Flock-identified populations FL-2, -3, and -6 had unambiguously distinct phenotypes (Table IV).

FL-2 included a population of $sm14^{dim}16^{+}$ monocytes which phenotype as determined by FLOCK (Table IV) was compatible with a consensus phenotype for these cells as determined in Figure 2 E. Accordingly, donors positive for FL-2 (n=15) were equally distributed in the 3 subgroups described in Figure 2 E.

FL-3 (n=4) was included in $sm14^{dim}CD16^{neg}$ monocytes and FL-3⁺ donors were also present in all three subgroups of $sm14^{dim}CD16^{neg}$ monocytes defined in Figure 2F. The phenotype as determined by FLOCK was poor with positivity for markers usually positive in this subpopulation (HLA-DR, CD86, CD162, and CD49d).

FL-6, present in small $CD16^{neg}$ monocytes, was found in one donor only (donor 10) and was thus of limited interest at this point.

Populations FL-1, -4, and -5 included $CD16^{+}$ and $CD16^{neg}$ monocytes and had overlapping phenotypes but could however be distinguished on the basis of expression of single or combinations of characters (Table IV). FL-1 and FL-4 were found within either small or large monocytes, respectively, whereas FL-5 included both small and large monocytes (Figure 3). In addition, FL-4 differed from FL-1 in that it expressed CD64, HLA-DR, and CD163. FL-1 and FL-5 were distinguished by positive expression of CD163 in FL-5. Finally, FL-4 population consistently expressed CD64, CD86 and HLA-DR, and was highly positive for CD162, in contrast to FL-5.

Overall, FLOCK analysis found new populations (FL-2 and FL-3) within already described monocyte subpopulation, particularly within $CD14^{dim}$ populations. Importantly, FLOCK pointed to the presence of three monocyte populations (FL-1, FL-4, and FL-5) encompassing the CD16 divide.

SPADE analysis

To further try to 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. 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 5). 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 (Figure 5). Interestingly, monocyte populations were resolved in two distinct tree patterns, SP-1 and SP-2, in our donors (Figure 5). 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 (Figure 5). 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, 8, 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 again, as with FLOCK results, suggested that individual variations between donors may shape the make-up of monocyte populations.

viSNE analysis

An interesting feature of SPADE, as proposed in the CYTOBANK platform, comes from the possibility to analyze any branch of the generated tree 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. This allows visualization of multidimensional data in simple 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 III).

Each set of data can be visualized in different ways depending on which markers are chosen in x and y axis and which additional marker is selected for MFI color-coded representation.

Multiple populations of monocytes were then detected. Strikingly, although these populations varied among donors, common patterns clearly distinguishable in groups of unrelated donors were identified. Dot plots representing CD49d/CD43/CD62L expression in small monocytes were particularly informative (Figure 6). In sm14⁺16⁺ monocytes we identified 3 subpopulations that were present in 9 donors. Although viSNE positioned cells in the dot plot according to expression of all markers in the test tube (CD14, CD16, CD62L, CD162, CD49d, CD43, CD56), populations will be identified for simplicity according to the markers used as axes in the dot plot (here CD49d, CD43, CD62L). 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, 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 often 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.

From these results, it appeared that numerous populations of monocytes could be distinguished and were shared between donors. However, 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 complicate the definition of monocytes subsets and overseeing 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.

Profiles of expression of transcription factors in human monocyte subpopulations

To refine 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 . 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 .

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

As shown in Figure 8, 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 . 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 7) that are likely to correspond to nonclassical monocytes . 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 7). 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 .

PU.1 was, as expected, expressed by all populations of monocytes studied (Figure 7). 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 gene 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.

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 II. 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).

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 8. Small and large monocytes were unambiguously identified at D0 (Figure 8 A) and were present in

the same proportions as in controls in all 3 patients. At D2-4 (Figure 8 B), monocytes appeared morphologically smaller, and small and large monocytes could still be distinguished although some level of overlap was present. SGC population was increased in comparison to controls at D0, but returned to close to normal at D2-4. CD14/CD16 dot plots indicated that both small and large monocytes consisted of CD16^{neg} and CD16⁺ populations. A shift toward lower CD14 expression in both small and large monocytes was found at D0 and faded by 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.

Markers' expression in monocyte subpopulations

Expression of cell surface molecules included in our platform for monocyte phenotype analysis is shown in Figure 10 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 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} monocytes. Other markers such as CD43 and CD163 were normally expressed in patients. On the other hand, CD64, when expressed, was found with MFI higher than in control sm14^{dim}16⁺ and sm14^{dim} monocytes. HLA-DR has been of particular interest in septic patients since its lower expression in monocytes correlated with reduced cell functions and was associated with increased susceptibility to infection. HLA-DR expression was as expected lower in some monocyte populations, but unexpectedly MFI and percent of positive cells were conserved in sm14⁺16⁺ and la14⁺16⁺ monocytes (Figure 9 C and D). 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) and 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 9). 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 these were patients with infection and systemic inflammation. Changes in expression clearly affected different markers in the patients (Figure 9). This may not be surprising as patients were heterogeneous with respect to the time of sepsis onset at admission, the type of infection, and co-morbidities. Since decreased HLA-DR expression has been correlated with monocyte functions, 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 sustained deterioration of monocyte functions in UEM, worsening functions in patient EUI, and a trend toward recovery of functions in patient ITB. Other variations, 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 $sm14^+16^+$ cells. Notable variations of expression in ITB patient were found in CD86 going along with increasing HLA-DR expression.

Interestingly, FcR CD32 expression was highly variable and diverse in all monocyte populations in all 3 patients, emphasizing the need to carefully analyze receptor expression in subpopulations which potentially exert different functions.

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

FLOCK analysis

Three populations of monocytes were individualized in patients' samples by FLOCK when analysis was performed with the same caveat put forward in the FLOCK analysis of control donors regarding the interpretation of negative expression of a marker as assigned by FLOCK. One population, FL-Pat1, encompassed small and large monocytes that were CD16^{neg} (sm14⁺16^{neg}, sm14^{dim}16^{neg}, and la14⁺16^{neg}) (Figure 10). It was detected in patients UEM at D0, EUI at D0 and D2-4, and was not found in patient ITB samples. Its phenotype as determined by FLOCK was CD64⁺CX3CR1⁺CD86⁺ and it appeared to have similarities to population FL-1 described in control donors (Figure 4 A). A second population FL-Pat2 shown in Figure 10 was detected by FLOCK and was included in small CD16⁺ monocytes (sm14⁺16⁺ and sm14^{dim}16⁺), was present in the same samples as FL-Pat1, and had a CD16^{+/bri}CD64⁺CX3CR1⁺CD86⁺CD62L⁺CD162⁺CD49d⁺ phenotype. It may correspond to the FL-2 population identified in healthy donors. Finally, a third population (Figure 10) FL-Pat3 was found mostly within small monocytes and partially overlapped with large monocytes that were most proximal to small monocytes. FL-Pat3 was CD16^{neg} and was therefore included in sm14⁺16^{neg}, sm14^{dim}16^{neg}, and partially in la14⁺16^{neg}. It was identified in all 3 patients in samples UEM D2-4, EUI D0, and in ITB D0 and D2-4 and its phenotype was CX3CR1⁺CD86⁺CD62L⁺CD162⁺CD49d⁺. FL-Pat3 had no similarities to FLOCK populations described in control donors.

SPADE analysis

Unsupervised SPADE analysis of PBMC from each patient at two time points was performed with the data files from a same patient analyzed in a single run. This allowed to build a patient specific tree and to compare related clusters (Figure 11). 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 5 A), while ITB's was comparable to control donors #2 (Figure 5 B), which was unique in our panel of control donors.

viSNE analysis

Analysis of the expression of markers in monocytes sub-populations as defined in the SPADE tree showed that, based on the expression of CD43, CD49d, and CD62L, patient ITB (Figure 11 E and F) had a profile similar to phenotypic group a (Figure 6 A). 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.

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 (Table VI A) most of markers expression alterations were concentrated to sm14⁺16⁺ monocytes although their HLA-DR expression was almost completely conserved. In these monocytes, the expressions of several receptors, such as CD32, CD64, and CD43, were increased at D0 and D2-4 whereas CD86 expression was decreased at both time points. CD163 expression was modified in that high expression was detected in cells regardless of their HLA-DR and CD86 expression at D0. On the contrary, high CD163 expression at D2-4 was restricted to sm14⁺16⁺ monocytes with the lowest CD86 expression.

Differences of expression between patient EUI (Table VI B) 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 and expression of several receptors (such as CD14, CD16, CD64, CCR2, CCR5)

was altered in that expression was concentrated in cells with different phenotypes compared to controls.

In ITB patient samples (Table VI C), 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 affecting mostly CD16, CD162, and CD43 expressions. Noticeable changes affected CD16 expression, which was reduced in the two monocyte populations at both time points and CD162, which expression was decreased in $sm14^+16^+$ monocytes only. CD43 expression was reduced in $sm14^{dim}16^+$ monocytes and also in $la14^+16^{neg}$ and in $la14^+16^+$ monocytes.

Variations of expression between time points D0 and D2-4 (Table VI A, B, C) 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. HLA-DR/CD86/CD163 profiles were modified in $sm14^+16^+$ monocytes in all three patients. Although variations were not identical in all patients, patterns of expression were shared at different time points. In patient UEM (Figure 14 A), at D0 the profile of expression was similar to that of control donors with profile b. At D2-4, the $HLA-DR^{dim} / CD86^{dim} / CD163^+$ population was still present; however, the second $CD163^+$ population was scattered in the midst of $HLA-DR^+/CD86^+ sm14^+16^+$ monocytes (Figure 14 A). In patient EUI, $CD163^+$ cells also expressed strongly HLA-DR at D0, but were $HLA-DR^{dim}$ at D2-4 (Figure 14 B). In patient ITB, the HLA-DR/CD86/CD163 profile at D0 included two $CD163^+$ populations, whereas at D2-4 the $HLA-DR^{dim} / CD86^{dim} / CD163^+$ monocyte population was not found anymore (Figure 14 C). Since HLA-DR expression is considered as a marker for monocyte functional status, variations of expression of other functional receptors in cells with normal or altered expression of HLA-DR may impact on their role in inflammatory conditions. Overall, in $sm14^+16^+$ monocytes, CD163 expression was found, as in control donors, in $HLA-DR^+$ and $HLA-DR^{dim}$ cells in patients UEM and ITB at D0, but diverged in the two patients at D2-4. That is, CD163 was expressed in $HLA-DR^{dim}$ cells in patient UEM and in $HLA-DR^+$ in patient ITB. This latter pattern was present in patient EUI at D0 and evolved to CD163 expression in $HLA-DR^{dim}$ cells at D2-4 which was also found in patient UEM at D2-4. How changes in CD163 expression in $sm14^+16^+$

monocytes with varying levels of expression of HLA-DR and CD86 correlate with monocyte functions in sepsis will have to be determined.

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. 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. 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 5-10% 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 into "classical", "intermediate" and "non-classical" subpopulation 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. Within these six monocyte populations, analysis of expression of 15 additional myeloid markers (such as FcRs, chemokine receptors, antigen presentation molecules, adhesion molecules) showed profiles of expression characteristic of each population. However, the heterogeneity of these populations was also apparent. 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 sub-population level. It showed the distinctive expression of markers in each sub-population with, however, profiles defining subsets OP-01 to OP-51 in each subpopulation among our panel of 28 healthy donors. Combinations of these profiles were found to preferentially associate in donors, defining signatures of markers expression that characterized the whole monocyte population present in a donor. Automated unsupervised analysis 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. A similar analysis of samples from septic patients at day 0 and day 2-4 post admission showed that group belonging was maintained in inflammatory conditions. In septic patients, all six populations of monocytes were identified and increased frequency of CD16⁺ monocytes was present in small and large monocytes. Surprisingly, sm14⁺16⁺ monocytes had conserved expression of HLA-DR although its expression 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.

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 1). 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 7). In addition, SPADE hierarchical trees for each donor obtained with no manual intervention in the analysis also individualized large monocytes as clusters. Expression of ... in clusters corresponding to large and small monocytes differed ... viSNE profiles were equally different (Show them in results)

Some of the inter-individual variations in monocyte phenotypes were shared between healthy donors. This was seen in the analysis of subpopulation phenotypes as well as in unsupervised algorithm based analysis by FLOCK and by SPADE and viSNE. The

phenotypic groups thus defined were however not precisely equivalent in terms of donor inclusion although some level of overlap was found. Since donors were grouped according to their profile in each subpopulation and searches for groups in subpopulations were made independently, differences between groups defined at a subpopulation level may understandably differ from those defined by analysis of expression of all markers in individual donors as in FLOCK and SPADE/viSNE analyses. FLOCK analysis was limited because of the inability to exclude lineage positive cells ($CD3^+$, $CD19^+$, $NKp46^+$) in the final analysis and would benefit from prior purification of monocytes. Nonetheless, FLOCK identified profiles unique to some donors. Grouping according to the SPADE/viSNE analysis appeared as the most robust and reliable method to identify patterns of expression shared by individual donors. Analysis relied on the expression of all markers in a given individual and viSNE visualization of data is based on resolution of multidimensional data in simple three dimensional plots. Gating in SPADE trees allowed to restrict the analysis to monocytes. The ability to determine the phenotypic group of septic patients using viSNE further showed the strength of this method. 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 are stable in each individual.

Different methods of analysis (manual and automated) generated different sets of groups based on inter-individual variations in healthy donors. This may not be surprising given that the manual method dealt with characteristics of whole sub-populations in contrast to analysis at the single cell level allowed by computerized methods of analysis. Difference in sub-groups of donors identified by the two automated methods (FLOCK and SPADE/viSNE) may stem from alternative methodology used by the algorithm to cluster cells. FLOCK searched for related cells (density clusters) for the expression of markers within all cells in the PBMC population. It turned out to be useful in defining cell clusters beyond the CD14/CD16 based classification. In contrast, SPADE relates cells in a hierarchical way with respect to markers expression, a process more akin to human performed analysis. Thus, confirmation in an unbiased manner of the existence of small and large monocyte populations was supportive of manually generated analysis. Combined to viSNE visualization of single cell expression of markers in small and large monocyte sub-populations, it allowed to defined profiles in sub-groups of cells independently of the MFI of the population and the frequency of cells of interest in the population. 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. Determining how each

classification of donors is biologically relevant and in which context will have to be determined.

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*. 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. 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 monocytes subsets may involve responsiveness to various mediators as proposed via distinct patterns of expression of receptors and signaling molecules. Functional consequences of decreased or sustained HLA-DR expression remain to be fully explored. *Ex vivo* studies indicated that although HLA-DR expression was returning to normal *in vitro* after culture in conventional culture medium, cell functions were durably altered with defects in T lymphocyte activation and induction of regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines. 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 sub-populations 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 sub-populations, and pointing to the relatedness of phenotypes detected in unrelated donors. A better dissection of human monocyte populations will help determining the unique function of specific subsets.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. N. Dulphy for extensive et continuous help in the operation of the BD FACSCANTO, and Dr. E. Clave and C. Douay for expert assistance in setting the qRT-PCR protocols. 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. 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. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3536
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. doi:10.1084/jem.20022156
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. doi:10.1182/blood-2010-02-258558
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. doi:10.1182/blood-2010-12-326355
7. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14 ++CD16 + monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011;118. doi:10.1182/blood-2011-01-326827
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*. Elsevier GmbH.; 2013;218: 169–174. doi:10.1016/j.imbio.2012.02.013
9. Schmidl C, Renner K, Peter K, Eder R, Lassmann T, Balwierz PJ, et al. Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. *Blood*. 2016;123: 90–100. doi:10.1182/blood-2013-02-484188.
10. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19: 71–82. doi:10.1016/S1074-7613(03)00174-2
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 Abstract : The subset of human blood monocytes expressing low levels of CD14 and high levels of. *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. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1<48::AID-IMMU48>3.0.CO;2-5
13. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity.* 2010;33: 375–386. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012
14. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol.* 2008;67: 152–159. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
15. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep. Nature Publishing Group;* 2015;5: 13886. doi:10.1038/srep13886
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. doi:10.1128/IAI.01973-14
17. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14 brightCD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* 2012;64: 671–677. doi:10.1002/art.33418
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. doi:10.1007/s12026-012-8297-3
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. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02641.x
20. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007;81: 584–92. doi:10.1189/jlb.0806510
21. Stansfield BK, Ingram D a. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Transl Med.* 2015;4: 5. doi:10.1186/s40169-014-0040-3
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. doi:10.1371/journal.pone.0144351

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. doi:10.1371/journal.pone.0047209
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. doi:10.1002/cyto.1171
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. doi:10.1136/qshc.2004.010033
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. doi:10.1371/journal.pone.0098679
27. Qian Y, Wei C, Lee FEH, Campbell J, Halliley J, Lee JA, et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2010;78: 69–82. doi:10.1002/cyto.b.20554
28. 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*. Nature Publishing Group; 2011;29: 886–891. doi:10.1038/nbt.1991
29. 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*. Nature Publishing Group; 2013;31: 545–552. doi:10.1038/nbt.2594
30. 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. doi:10.1038/35051594
31. 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. doi:10.4049/jimmunol.178.12.8183
32. Stillwell R, Bierer BE. T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation. *Immunol Res*. 2001;24: 31–52. doi:10.1385/IR:24:1:31

33. 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. doi:10.1038/nmeth.2365
34. 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*. Elsevier Inc.; 2014;40: 274–288. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.006
35. 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. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253377
36. 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. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7742552>
37. 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. doi:10.1182/blood-2009-07-235028.differential
38. 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. doi:10.1172/JCI115493
39. 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. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03287.x
40. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2013;13: 862–874. doi:10.1038/nri3552
41. 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 SE. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015;156: 649–654. doi:10.1182/blood
42. 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. doi:10.1186/cc8959

Figures legends

Figure 1 : Gating strategy and identification of monocyte sub-populations.

PBMC were separated and stained with antibodies directed at various cell surface molecules (Table III). 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 sub-populations 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 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 : sm14⁺16^{neg} (A), la14⁺16^{neg} (B), sm14⁺16⁺ (C), la14⁺16⁺ (D), sm14^{dim}16⁺ (E) and sm14^{dim}16^{neg} (F). In each sub-population, donors were grouped according to similar expression of markers as noted at the top of the figures and recapitulated with the OP nomenclature at the bottom of the figures.

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

To determine which phenotypic profiles found in sub-populations of monocytes are 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.

Figure 4 : Identification of monocyte clusters in healthy donors using Flock

PBMC were isolated and stained as described in Figure 2 and monocytes sub-populations were identified according to dot plot SSC-A vs. FSC-A (morphology profile) and CD14 vs. CD16 expression using FLOCK. Six profiles were identified and are presented here: FL-1 with donor 11 (A), FL-2 with donor 17 (B), FL-3 with donor 19 (C), FL-4 with donor 15 (D), FL-5 with donor 3 (E) and FL-6 with donor 10 (F).

Figure 5 : Identification of small and large monocytes using unsupervised analysis tool SPADE

PBMC were isolated and stained as described in Figure 2 and a hierarchy of related monocyte phenotype was determined by SPADE. Identification of two groups of SPADE profile SP-1 and SP-2 is represented here : SP-1 with donor 13 (A), SP-2 with donor 4 (B) and uncategorized donor 2 (C).

Figure 6 : viSNE profile of monocytes sm14⁺16⁺

Small and large monocyte 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. Profiles shown in A, C, D, E, and F correspond to monocyte sub-populations a, b, c, d, e identified in Table V. Panel B shows a schematic representation of monocyte populations identified in profile a (A) and that were found in various combinations in profiles b, c, d, and e.

Figure 7 : Differential expression of selected transcription factors in monocyte sub-populations.

PBMC were isolated, stained, analysed as described in Figure 1, and sub-populations 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ Mann-Whitney U test)

Figure 8 : Gating strategy and identification of monocyte sub-populations in septic patients.

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

Figure 9 : Phenotypes of sub-populations 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. Monocyte subsets analyzed in each panel are noted in the graph.

Figure 10 : Identification of monocyte clusters in septic patients using Flock

PBMC were isolated and stained as described in Figure 2 and monocytes sub-populations were identified according to dot plot SSC-A vs. FSC-A (morphology profile) and CD14 vs. CD16 expression using FLOCK. Three profiles were identified in patients and are presented here: FL-Pat1 (A), FL-Pat2 (B), FL-Pat3 (C).

Figure 11 : 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 SP-Pat1 D0 (A), SP-Pat1 D2-4 (B), SP-Pat2 D0 (C), SP-Pat2 D2-4 (D), SP-Pat3 D0 (E) and SP-Pat3 D2-4 (F).

Figure 12 : 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. Patients UEM D0 and D2-4 (A+), EUI D0 and D2-4 (B) and ITB D0 and D2-4(C).

Figure 13 : 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 all markers in the tube test (Table III) by sm14+16+ monocytes was represented through dot plot profiles of HLA-DR, CD86 and CD163. Patients UEM D0 and D2-4 (A+), EUI D0 and D2-4 (B) and ITB D0 and D2-4(C).

Donor ID	Age (years)	Sex (M / F)	Monocyte fraction (%)^a	Monocyte counts (x10⁹/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 I : 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 (x10⁹/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 II : Biological and clinical characteristics of septic patients^a, numbers express the percentage in PBMC

Marker	Clone	Isotypes	Clone	Label	Marker Supplier	Isotypes 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 III : List of antibodies used. Mab were from mouse unless specified.

FLOCK Populations	Number of Donors	Phenotype	Monocytes sub-population
FL-1	11	CD14 ⁺ CD16 ^{+/neg} CD64 ^{+/neg} CX3CR1 ⁺ CD86 ⁺ HLA-DR ^{lo} CD62L ⁺ CD162 ⁺ CD49d ⁺	sm14 ⁺ 16 ^{neg} sm14 ^{lo} 16 ^{neg} sm14 ⁺ 16 ⁺
FL-2	15	CD14 ^{lo} CD16 ⁺ CX3CR1 ⁺ CD86 ⁺ HLA-DR ⁺ CD162 ⁺ CD49d ⁺	sm14 ^{lo} 16 ^{neg} sm14 ⁺ 16 ⁺
FL-3	4	CD14 ^{lo} CD16 ^{lo/neg} CX3CR1 ⁺ CD162 ⁺ CD49d ⁺ HLA-DR ⁺ CD86 ⁺	sm14 ^{lo} 16 ^{neg}
FL-4	9	CD14 ⁺ CD16 ^{+/neg} CD64 ⁺ CX3CR1 ⁺ CD86 ⁺ HLA-DR ⁺ CD163 ⁺ CD62L ⁺ CD162 ^{hi} CD49d ⁺	la
FL-5	13	CD14 ⁺ CD16 ^{+/neg} CX3CR1 ⁺ CD163 ⁺ CD62 ⁺ CD162 ⁺ CD49d ⁺	sm and la
FL-6	1	CD14 ⁺ CD16 ^{neg} CD86 ⁺ CD163 ⁺ CD62L ⁺ CD162 ⁺ CD49d ⁺	sm14 ⁺ 16 ^{neg} and sm14 ^{lo} 16 ^{neg} and CD16 ^{neg}

Table IV : Identification of six monocytes sub-populations by FLOCK analysis

viSNE Profile	Number of Donors	Phenotype	Monocytes sub-population
a	9	CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD62L ⁺ CD49d ⁺ CD43 ⁺	sm14 ⁺ 16 ⁺
b	5	CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD62L ⁺ CD49d ⁺ CD43 ⁺	sm14 ⁺ 16 ⁺
		CD14 ^{lo} CD16 ⁺ CX3CR1 ⁺ CD32 ⁺ CD64 ⁺	sm14 ^{lo} 16 ⁺
c	4	CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD62L ⁺ CD49d ⁺ CD43 ⁺	sm14 ⁺ 16 ⁺
		CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD80 ⁺ CD86 ⁺ HLA-DR ⁺	sm14 ⁺ 16 ⁺
		CD14 ⁺ CD16 ^{neg} CD62L ⁺ CD162 ⁺ CD49d ⁺ CD43 ⁺	sm14 ⁺ 16 ^{neg}
d	4	CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD62L ⁺ CD49d ⁺ CD43 ⁺	sm14 ⁺ 16 ⁺

Table V : Identification of four monocytes sub-populations by viSNE analysis

Summary of Pat1 UEM D0 and D2-4 compared to viSNE profile b												
	sm14 ⁺ 16 ^{neg}		sm14 ⁺ 16 ⁺		sm14 ^{dim} 16 ⁺		sm14 ^{dim} 16 ^{neg}		la14 ⁺ 16 ^{neg}		la14 ⁺ 16 ⁺	
	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4
CD32	↗	↗	↗	↗								
CX3CR1												
HLA-DR	↘	↘					↘	↘	↘	↘		
CD86			↘	↘	↘	↘			↘			
CD43			↗	↗	↗	↗	↗	↗				
CD49d					↘				↘	↘		↗
CD14	M	M		↗	M	M						
CD16					↘						↗	↗
CCR2												
CD163			M	M	M	↘						
CD162				M			M	M				
CD7			↗	↗								
CD56			↗	↗								
CCR5						↗						↘
CD64			↗	↗								
CD80	M		M	↗								↘
CD62L												M

Table VI.A : Phenotypic changes in monocytes sub-populations from septic patients compared to healthy donors as analyzed in viSNE

	Summary of Pat2 EUI D0 and D2-4 compared to viSNE profile b											
	sm14 ⁺ 16 ^{neg}		sm14 ⁺ 16 ⁺		sm14 ^{dim} 16 ⁺		sm14 ^{dim} 16 ^{neg}		la14 ⁺ 16 ^{neg}		la14 ⁺ 16 ⁺	
	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4
CD32									↘	↘		
CX3CR1												
HLA-DR	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘
CD86												
CD43												
CD49d	↘	↘					↘	↘	↘	↘	↘	↘
CD14	M	M	M	M					↘	↘	↘	↘
CD16			↗	↗	↗	↗					↗	↗
CCR2			M									
CD163			?								↘	
CD162								M	↘	↘		
CD7												
CD56												
CCR5			↗	↗			M					
CD64	↘		↗	↗	↗							
CD80		↘	M	M		M						
CD62L	M					↘	M	M		M		

Table VI.B : Phenotypic changes in monocytes sub-populations from septic patients compared to healthy donors as analyzed in viSNE

	Summary of Pat3 ITB D0 and D2-4 compared to viSNE profile a											
	sm14 ⁺ 16 ^{neg}		sm14 ⁺ 16 ⁺		sm14 ^{dim} 16 ⁺		sm14 ^{dim} 16 ^{neg}		la14 ⁺ 16 ^{neg}		la14 ⁺ 16 ⁺	
	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4	D0	D2-4
CD32												
CX3CR1												
HLA-DR	↘	↘	±↘	±↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	±↘	±↘
CD86									±↘	±↘	±↘	±↘
CD43					↘	↘			↘	↘	↘	↘
CD49d											↘	
CD14	M	M										
CD16			↘	↘	↘	↘						
CCR2			M	M	↘	↘						
CD163					M	M						
CD162			↘	↘								
CD7												
CD56												
CCR5												
CD64					M		M	M				
CD80									↘	↘		
CD62L												

Table VI.C : Phenotypic changes in monocytes sub-populations from septic patients compared to healthy donors as analyzed in viSNE

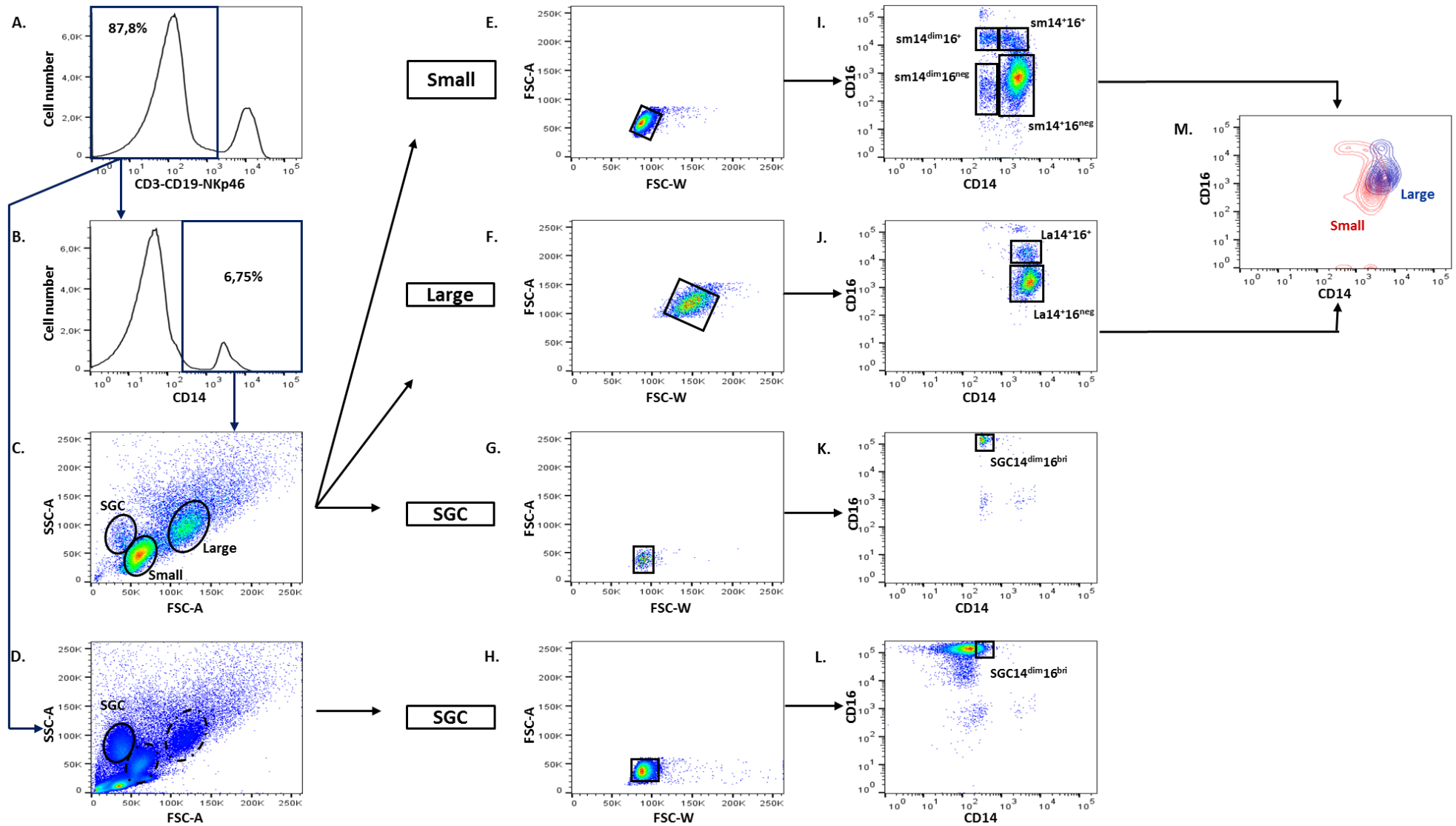


Figure 1 : Gating strategy and identification of monocyte sub-populations.

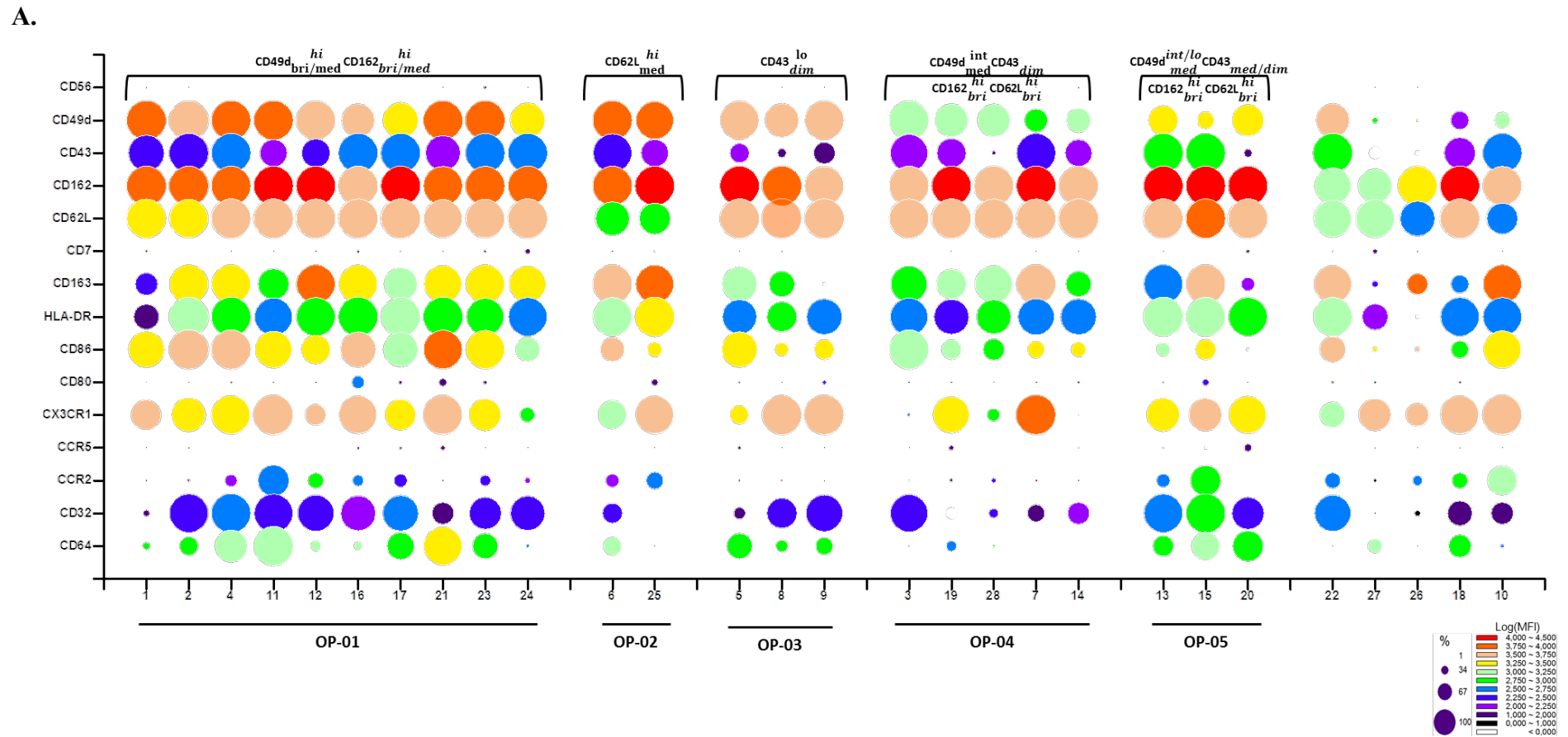


Figure 2 : Phenotypes of $sm14^{+}16^{neg}$ sub-population of monocytes as analyzed with our typing platform.

B.

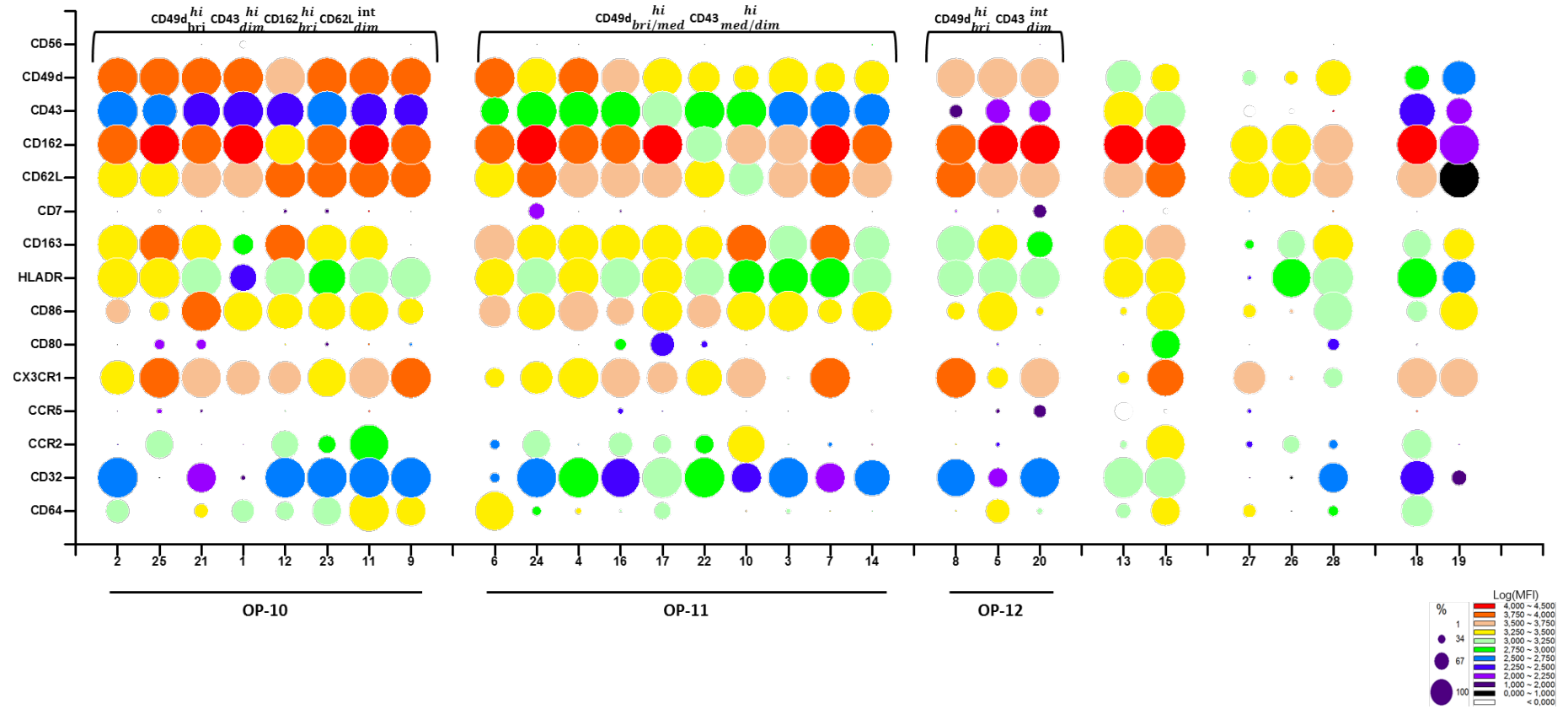


Figure 2 : Phenotypes of Ia14⁺16^{neg} sub-population of monocytes as analyzed with our typing platform.

C.

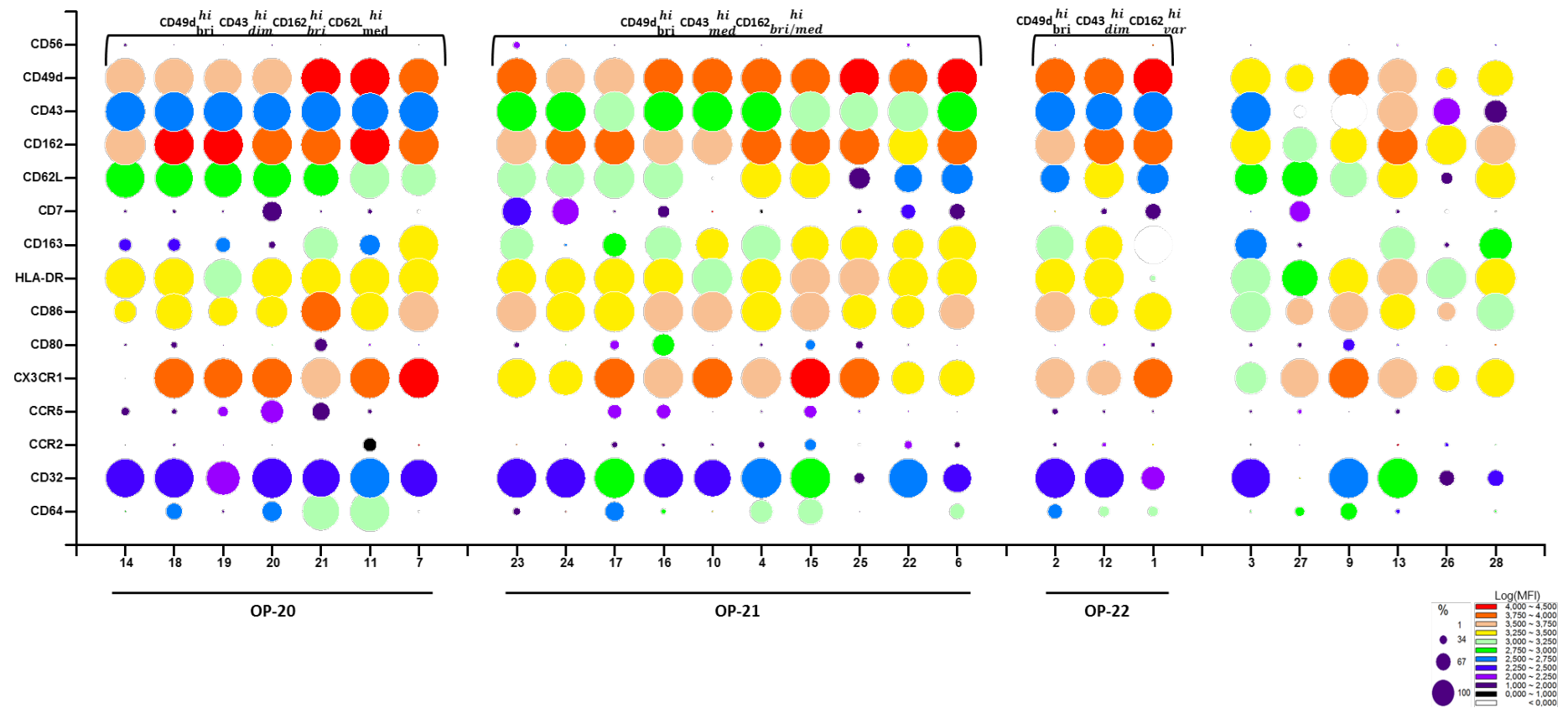


Figure 2 : Phenotypes of sm14⁺16⁺ sub-population of monocytes as analyzed with our typing platform.

D.

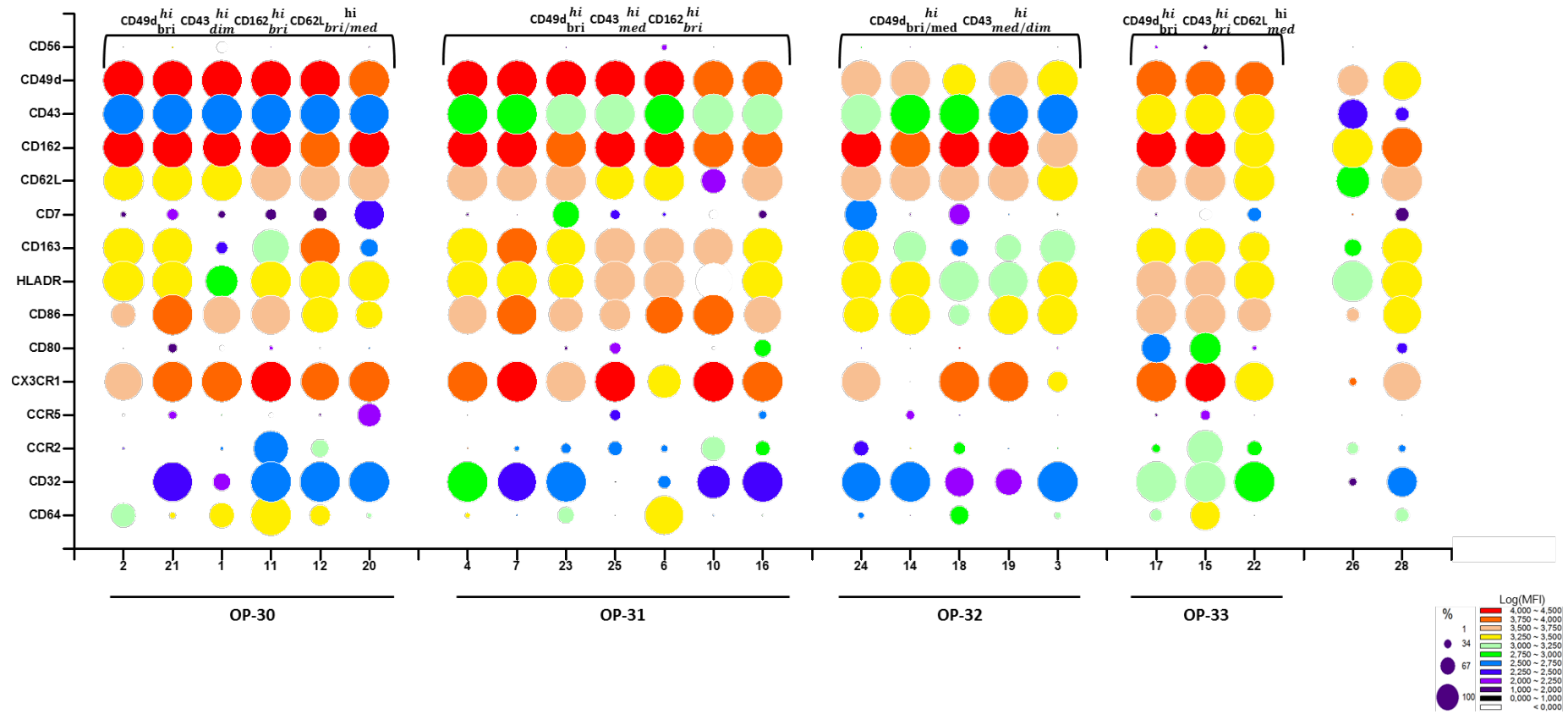


Figure 2 : Phenotypes of Ia14+16+ sub-population of monocytes as analyzed with our typing platform.

E.

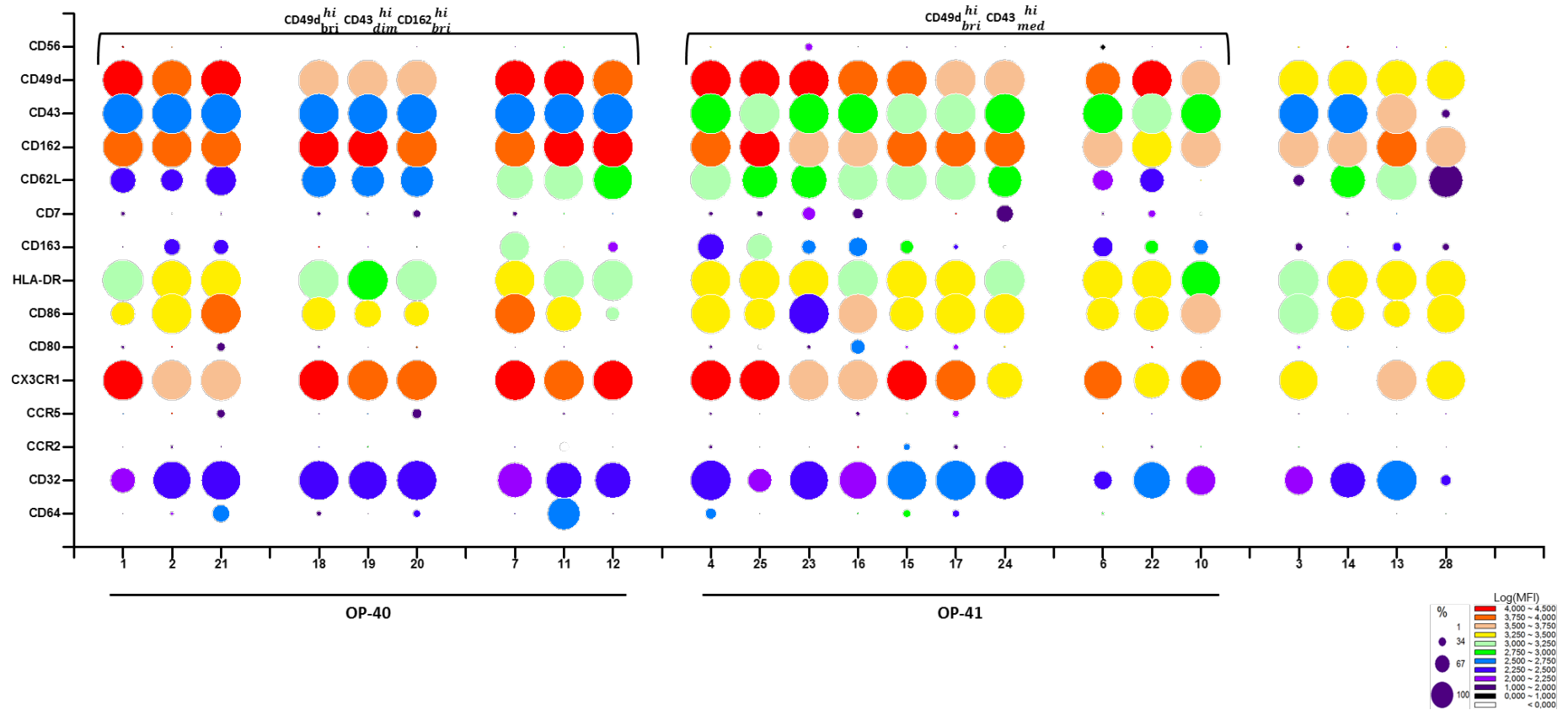


Figure 2 : Phenotypes of sm14^{dim}16⁺ sub-population of monocytes as analyzed with our typing platform.

F.

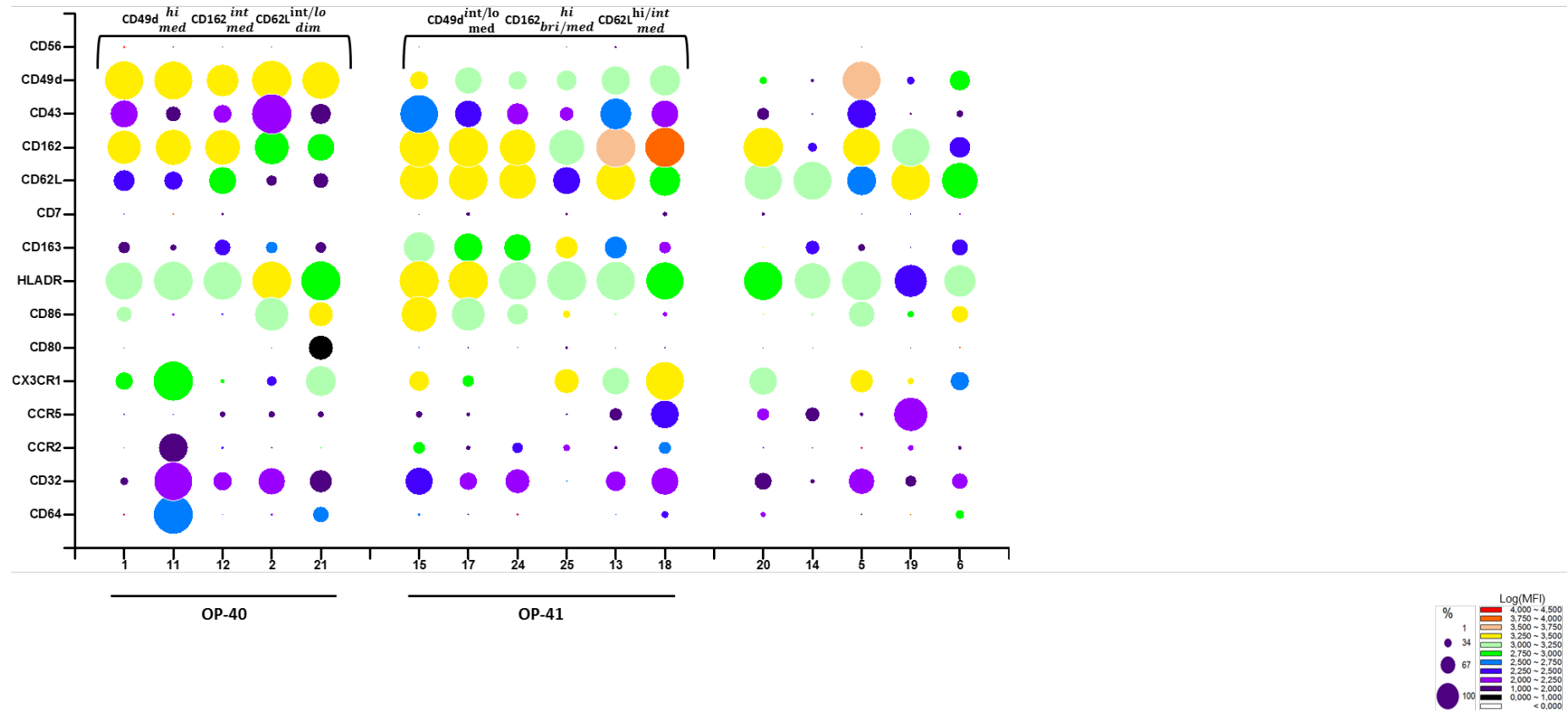


Figure 2 : Phenotypes of sm14^{dim}16^{neg} sub-population of monocytes as analyzed with our typing platform.

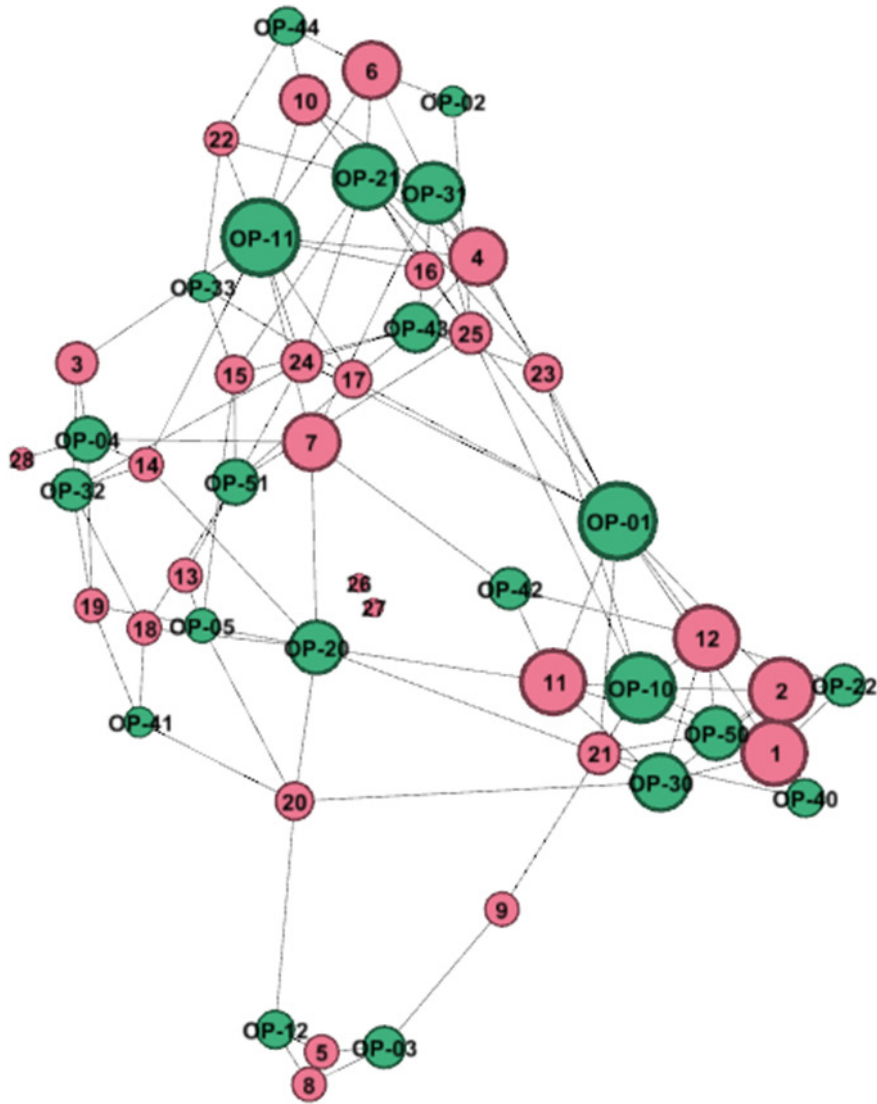


Figure 3 : Connectivity map between donors and defined phenotypic profiles.

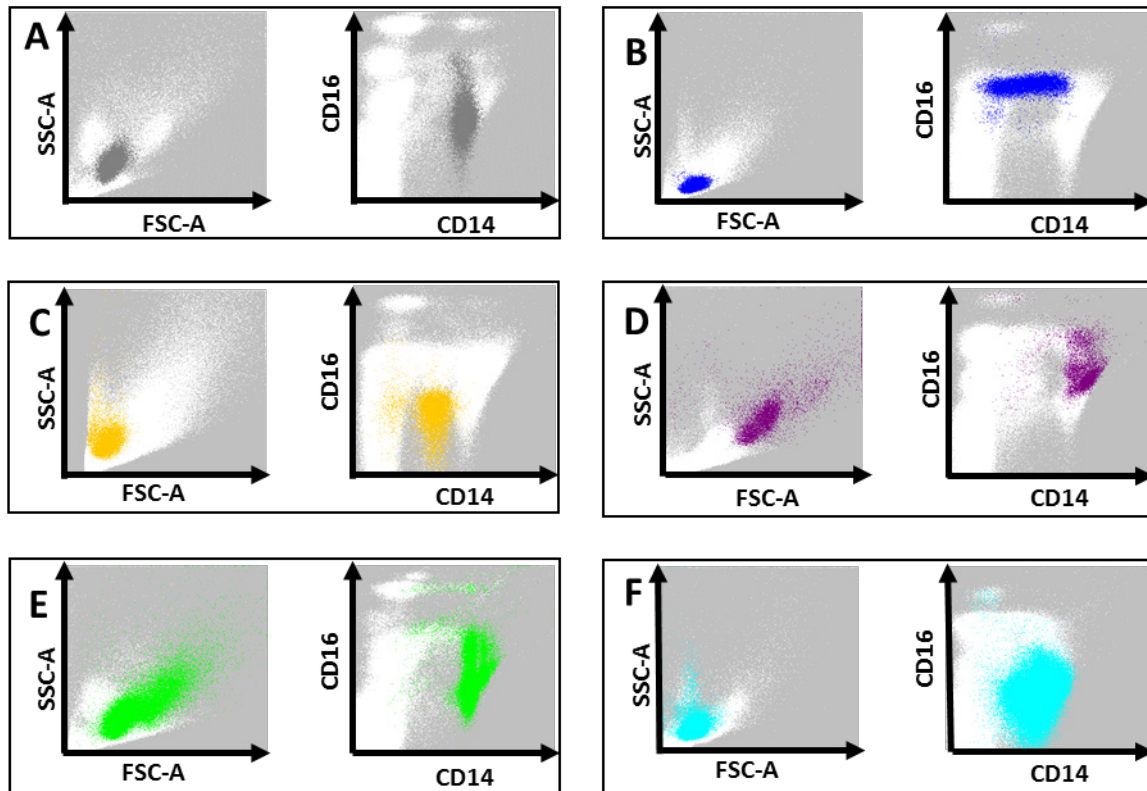


Figure 4 : Identification of monocyte clusters in healthy donors using Flock

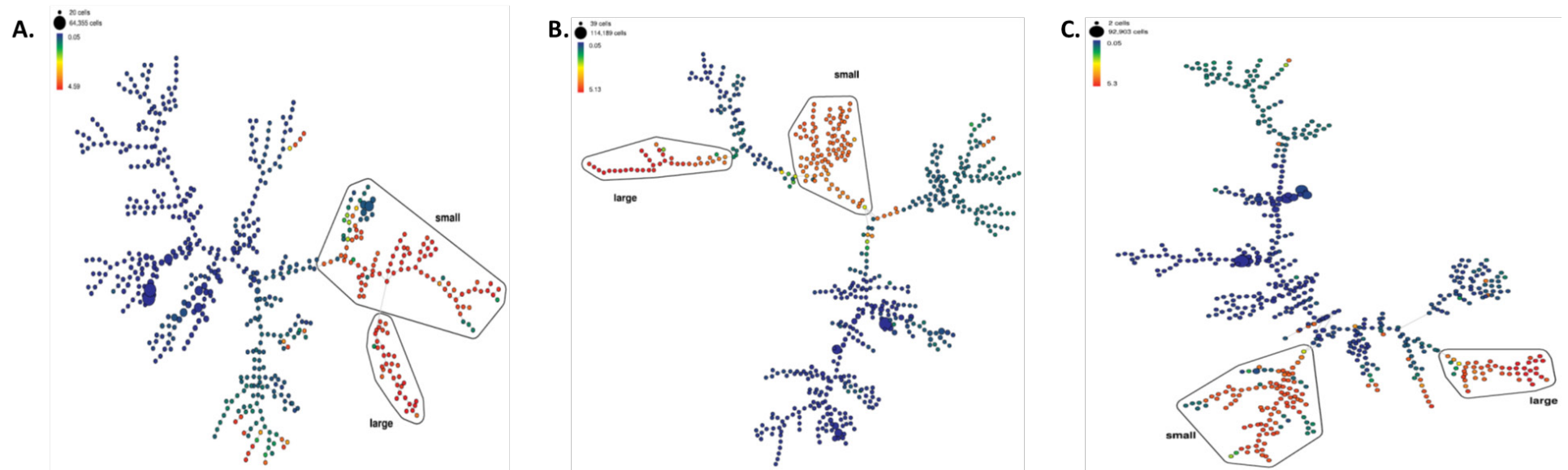


Figure 5 : Identification of small and large monocytes using unsupervised analysis tool SPADE

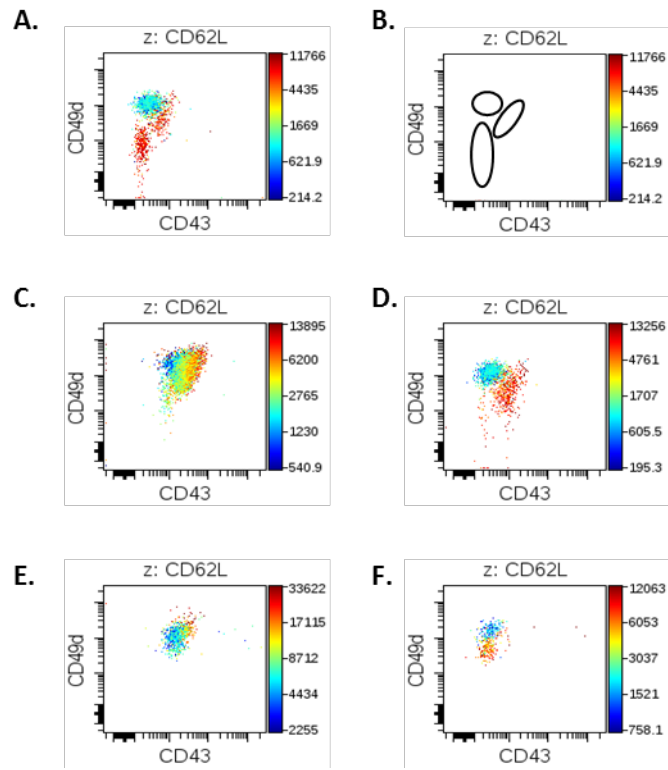


Figure 6 : viSNE profile of monocytes sm14+16+

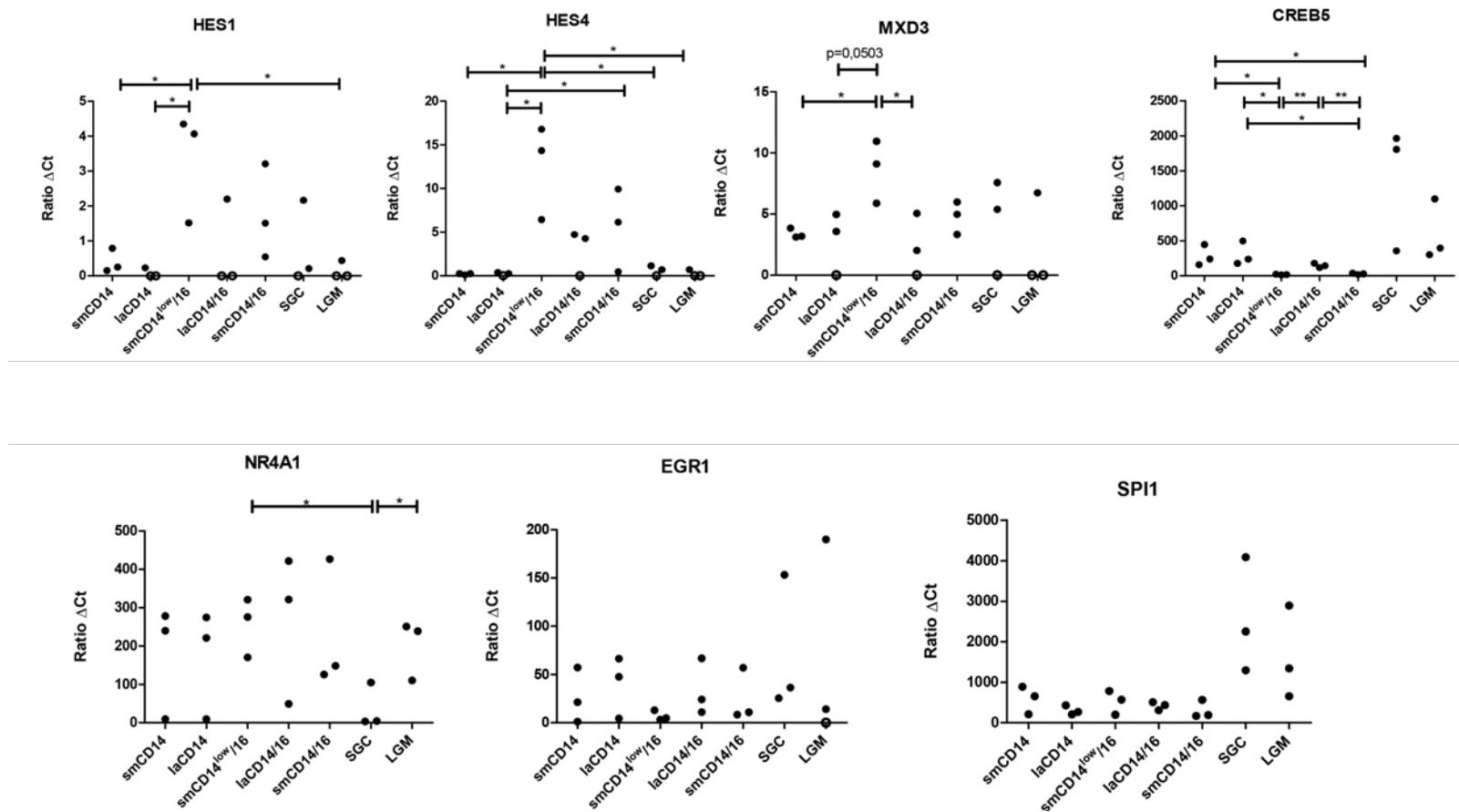


Figure 7 : Differential expression of selected transcription factors in monocyte sub-populations

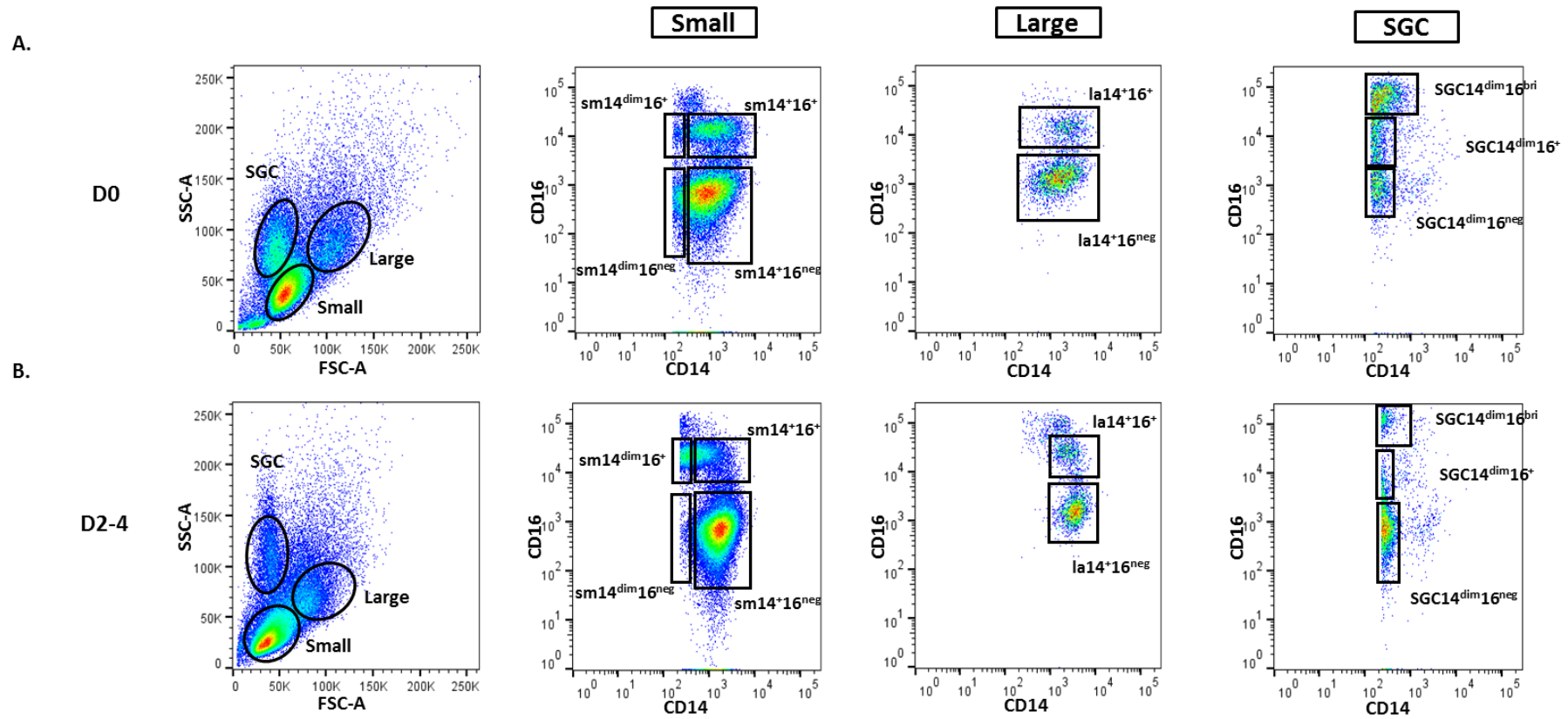


Figure 8 : Gating strategy and identification of monocyte sub-populations in septic patients.

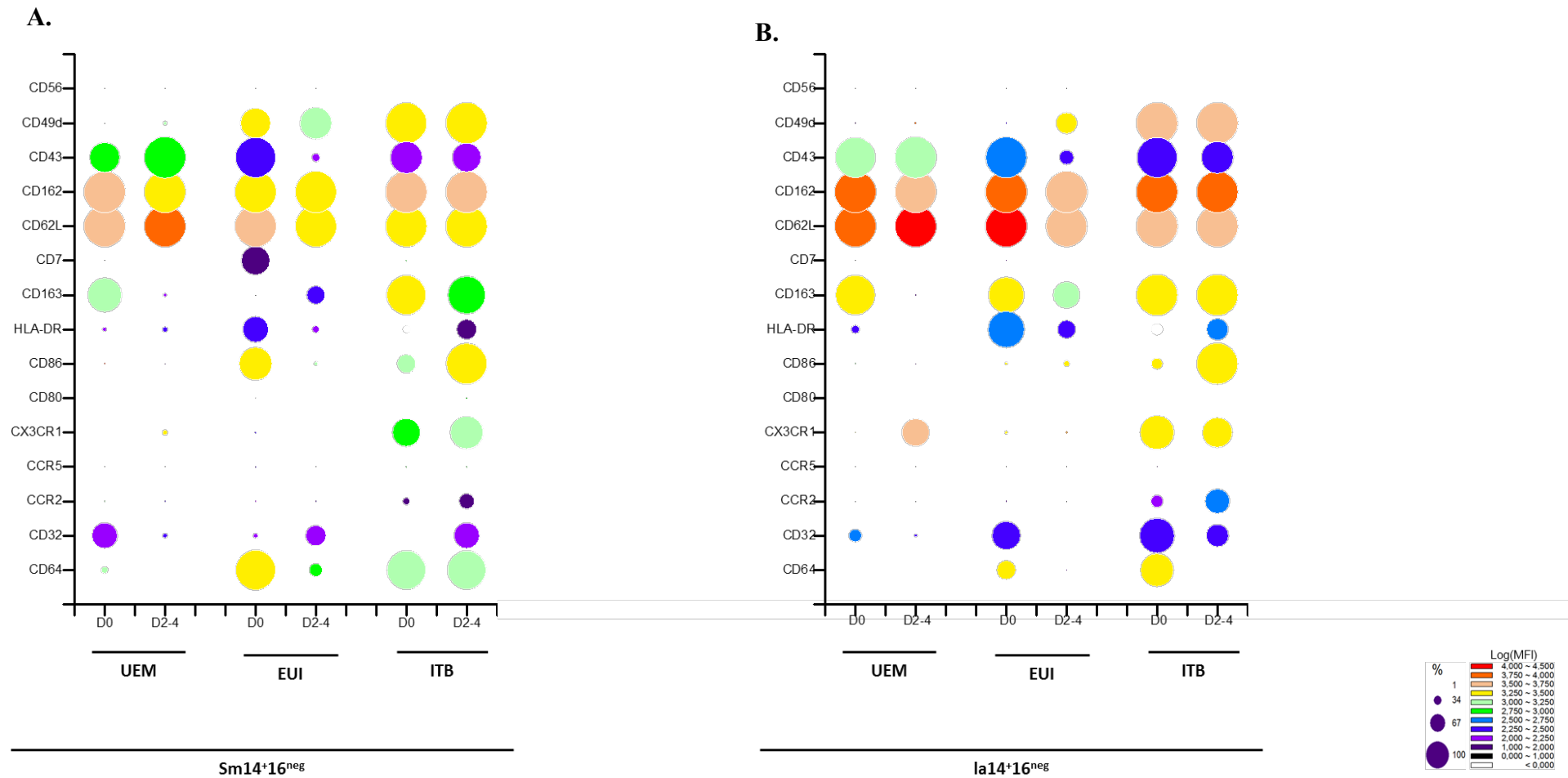


Figure 9 : Phenotypes of sub-populations of monocytes in septic patients as analyzed with our typing platform.

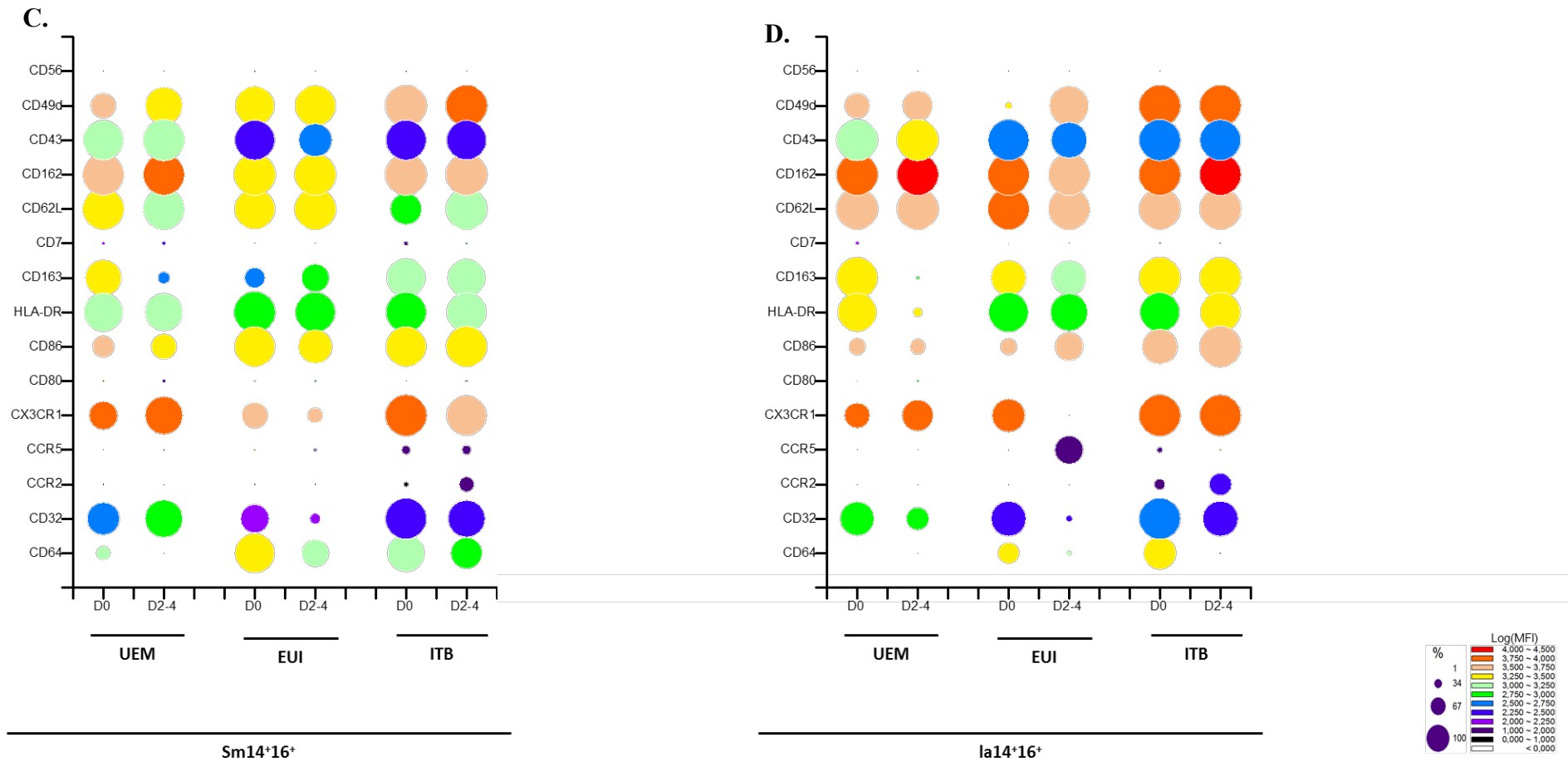


Figure 9 : Phenotypes of sub-populations of monocytes in septic patients as analyzed with our typing platform.

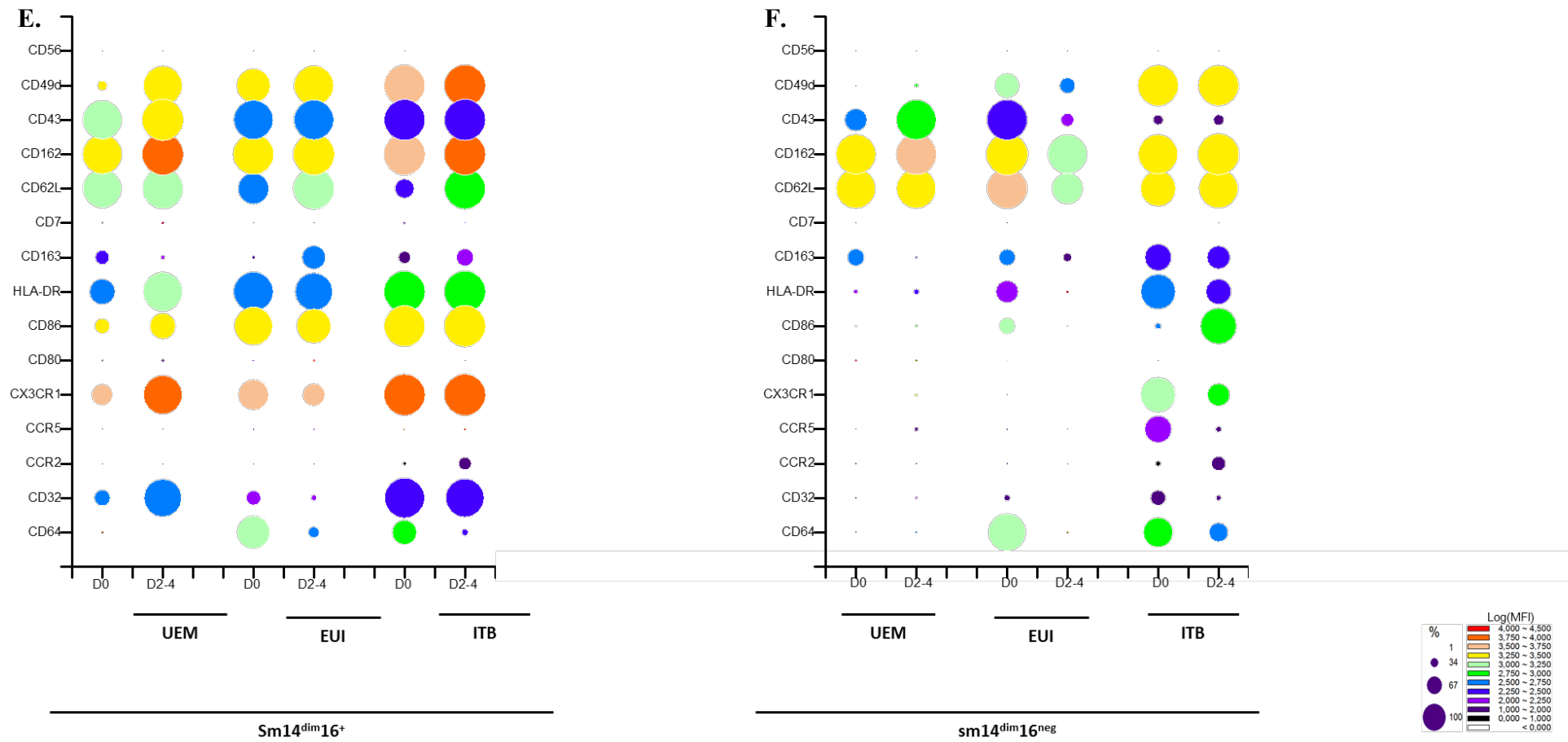


Figure 9 : Phenotypes of sub-populations of monocytes in septic patients as analyzed with our typing platform.

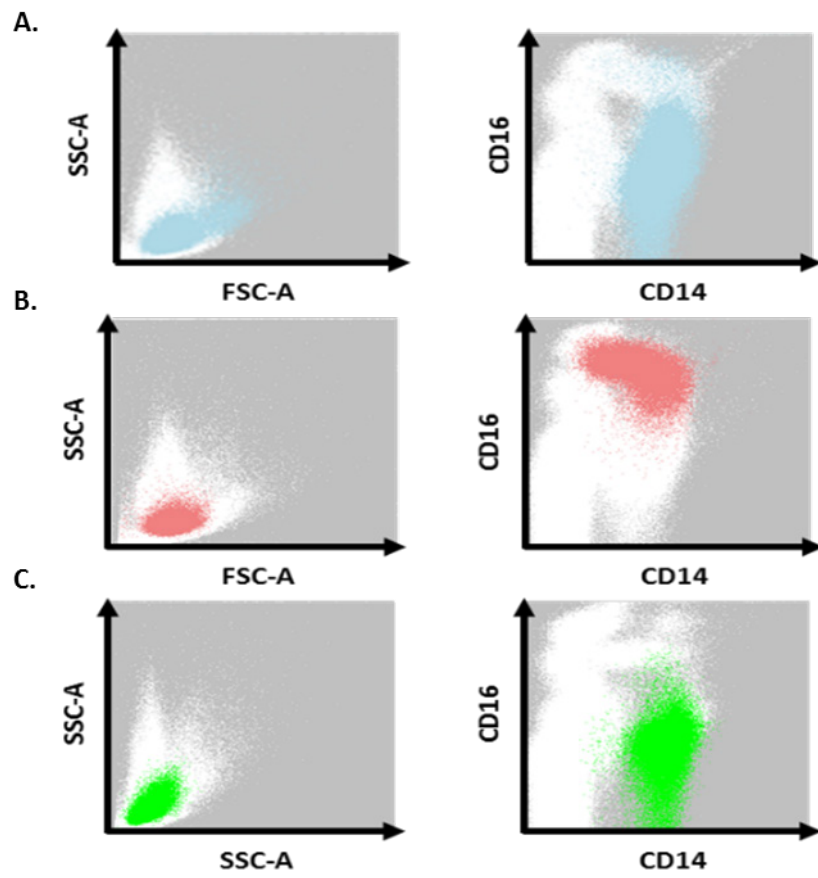


Figure10 : Identification of monocyte clusters in septic patients using Flock

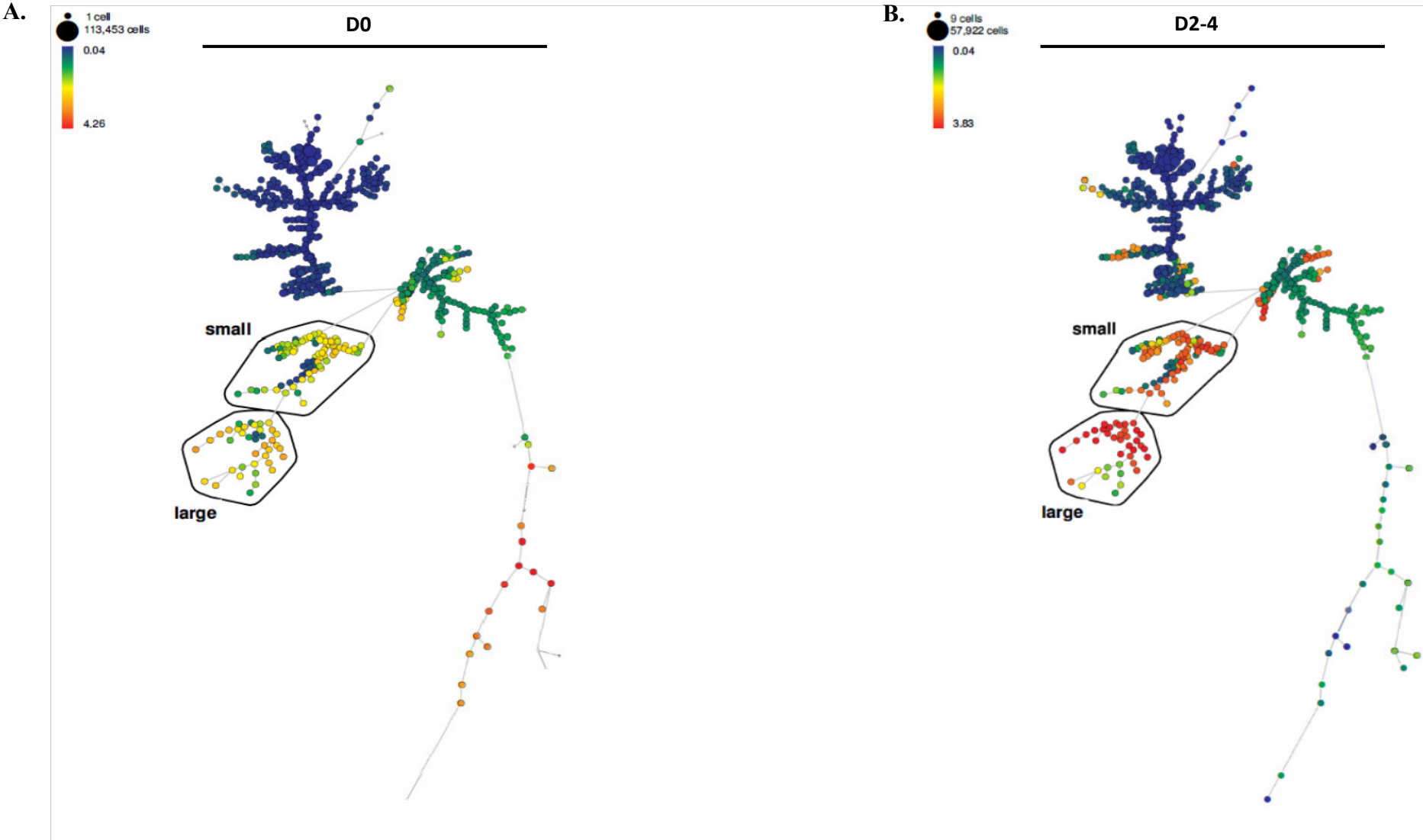


Figure 11 : Identification of SPADE monocyte tree profiles in septic patient

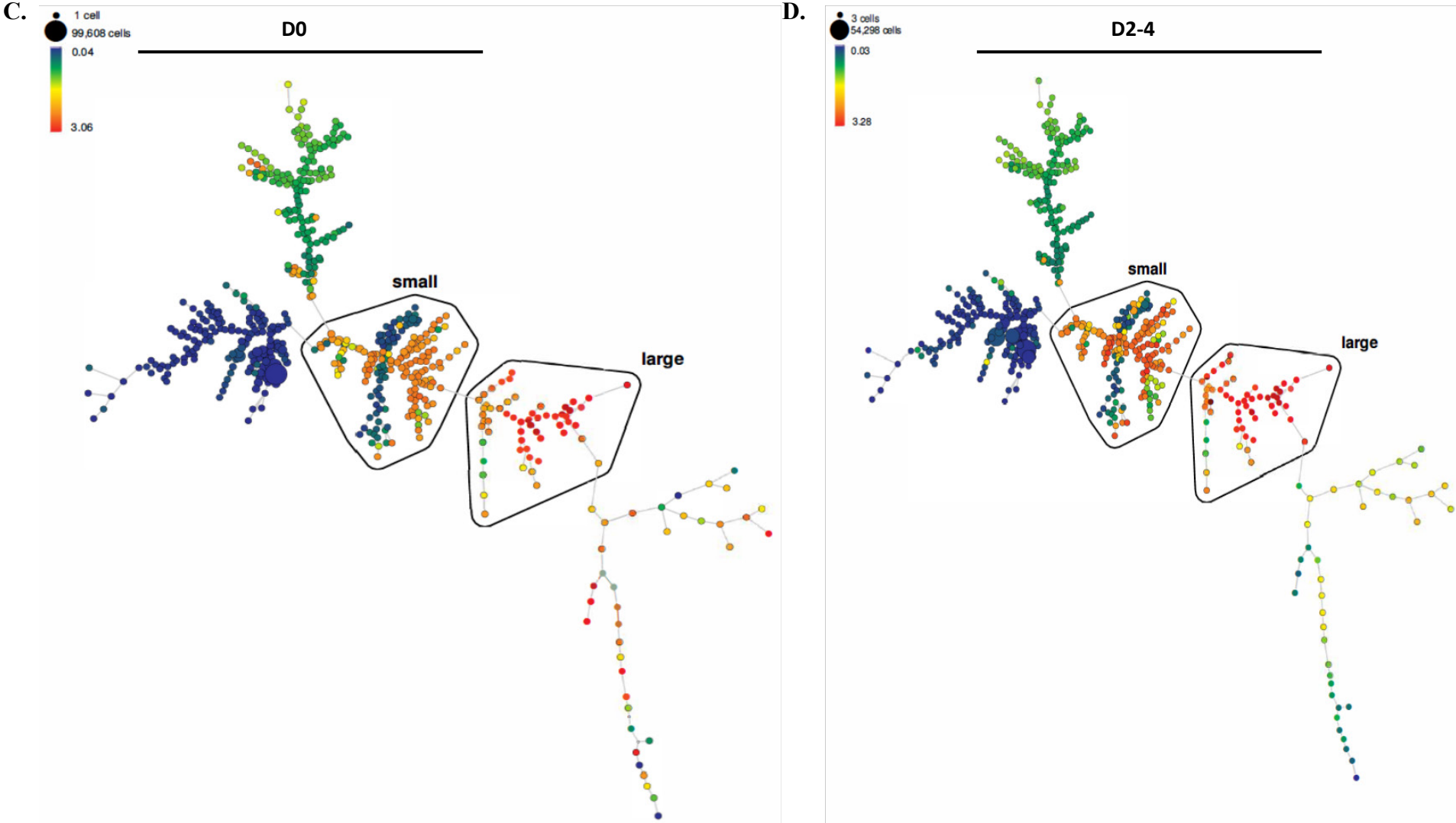


Figure 11 : Identification of SPADE monocyte tree profiles in septic patient

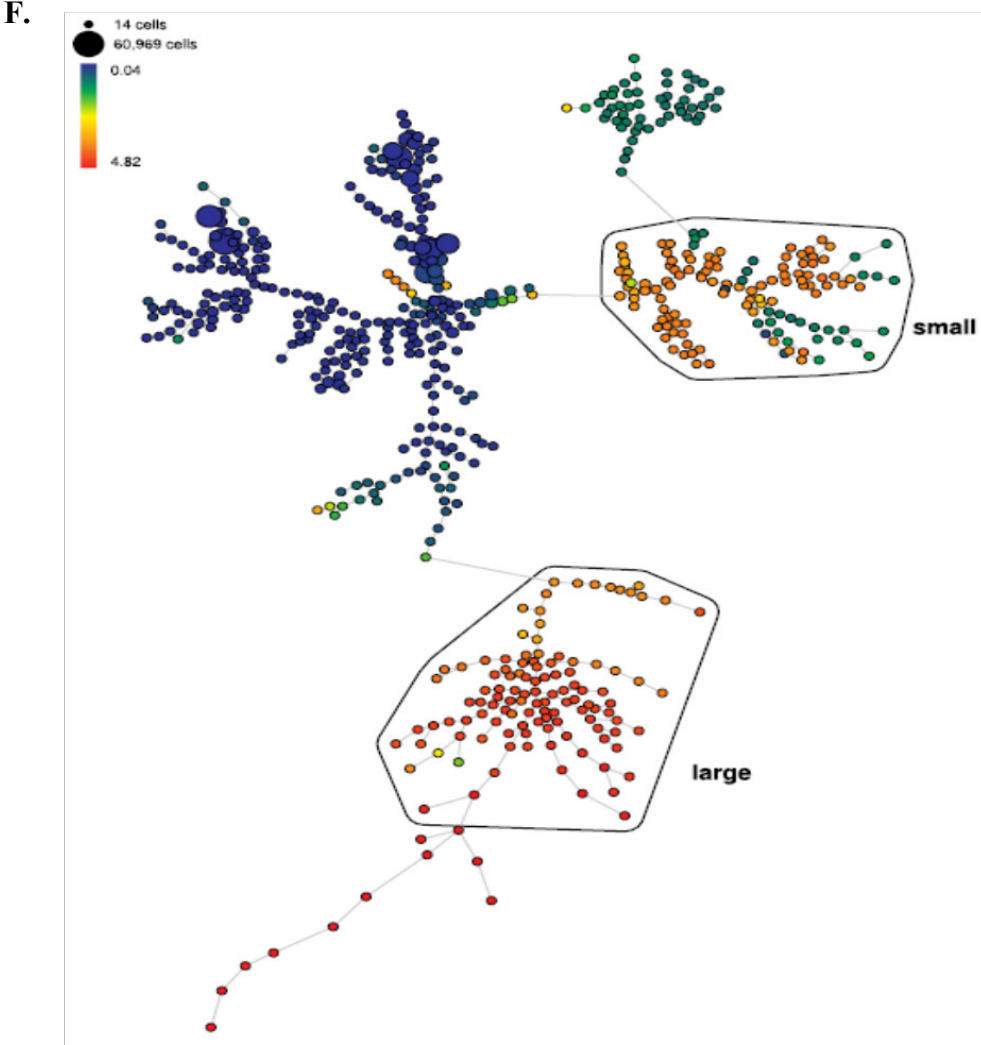
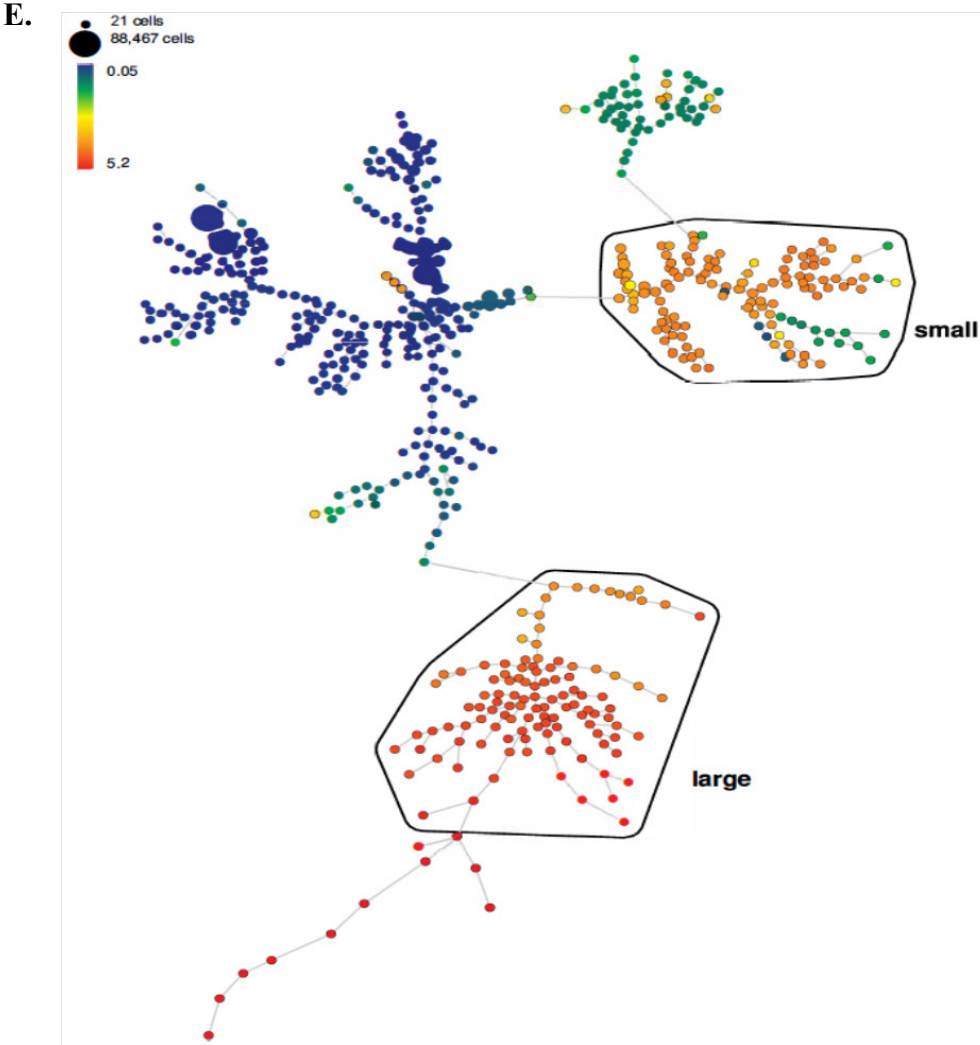


Figure 11 : Identification of SPADE monocyte tree profiles in septic patient

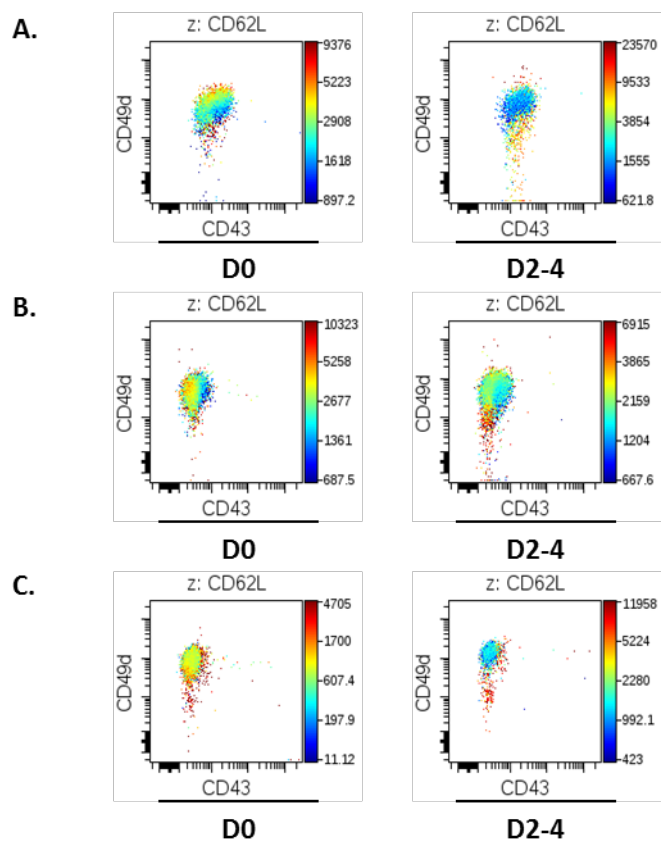


Figure 12 : viSNE profile of monocytes sm14+16+ in septic patients

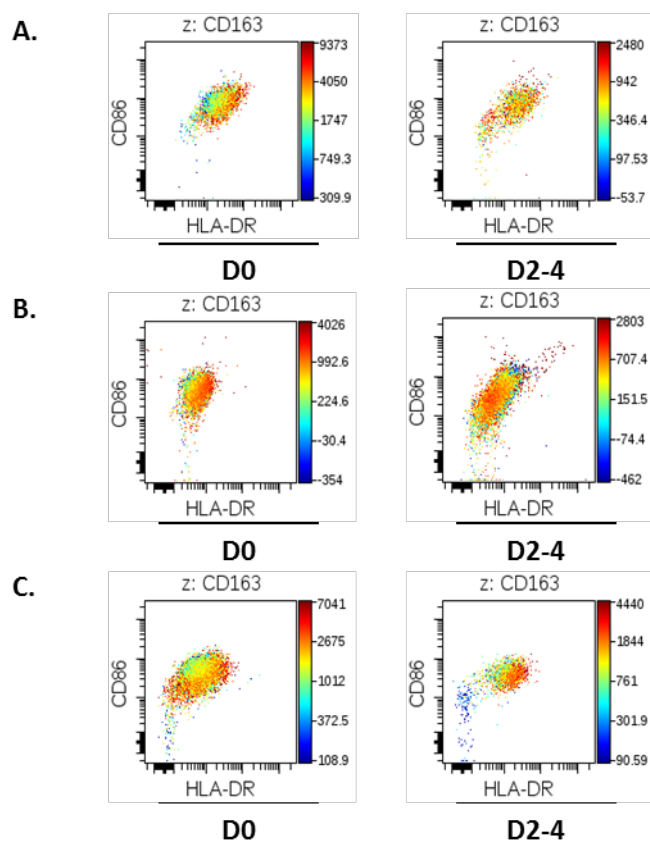


Figure 13: viSNE profiles via representation of HLA-DR, CD86 and CD163 expression in $sm14^+16^+$ monocytes from septic patients.

Résultats Article 2

L'analyse récente des monocytes humains a permis l'identification de nouvelles populations à l'intérieur de deux grands groupes de monocytes appelés « small » et « large » avec 4 sous-populations $sm14^+16^{neg}$, $sm14^+16^+$, $sm14^{dim}16^+$ et $sm14^{dim}16^{neg}$ (cette dernière inconstamment retrouvée chez les donneurs), et 2 sous-population $la14^+16^{neg}$ et $la14^+16^{neg}$ (F. Mourah, 2017, soumis)

Afin de déterminer les fonctions de ces sous-populations, les monocytes de trois donneurs sains ont été marqués avec l'ensemble des anticorps de notre plateforme de typage, et les sous-populations ont été purifiées par tri en cytométrie de flux, différenciées en cellules dendritique (MoDC), et mises en co-culture avec des lymphocytes T allogéniques. L'analyse de la polarisation de ces lymphocytes T a été faite par l'analyse des cytokines produites (IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10 et TGF- β). Les résultats ont montré une grande hétérogénéité des réponses chez les trois différents donneurs. Cependant, la recherche de corrélation entre les concentrations de cytokines induites et l'expression de marqueurs des monocytes ont permis d'établir un lien fort entre l'IL-4 et l'expression de CD43 et de CD49d chez les monocytes $sm14^+16^+$. Ainsi, cette corrélation suggérait que des monocytes de phénotype particulier se différencient en MoDC aux propriétés distinctes des autres MoDC et engagent la polarisation des lymphocytes T dans une voie déterminée. Un travail ultérieur dans le laboratoire (S. Cohen) a montré la validité de cette corrélation par la purification séquentielle de populations enrichies en potentiel de polarisation Th2, en progressant par une recherche itérative de corrélations entre sous-populations et réponse cytokinique. L'obtention d'une population $CD49d^{dim/neg} CD43^{dim}$ possédant tout le potentiel Th2 des monocytes $sm14^+16^+$ et n'induisant pas d'autre polarisation montre l'existence de monocytes aux fonctions immunitaires dédiées dès le stade circulant.

Article 2 : Identification of specific Th2-prone monocyte sub-population in humans

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

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

², INSERM U940, 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 sub-population 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 sub-populations 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 sub-populations 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 (Mourah, 2017, 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 homolog sub-populations 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 (Mourah, 2017, 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.

Results

We have recently identified novel human monocyte subsets by flow cytometry based on light scattering properties and CD14 and CD16 expression (Mourah et al. 2017, submitted). A total of six monocyte sub-populations 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 sub-populations, we analyzed the ability of the five commonly found monocyte subsets to polarize allogenic T cells in co-cultures. Monocyte sub-populations 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 sub-population 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 sub-populations 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 1 A, 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 1 B). 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 6 A). 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 6 A), and correlations between cell numbers in the gate and normalized IL-4 concentrations were searched. As shown in Figure 6 C, 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 7

A). Derived mature MoDC were co-cultured with allogeneic T cells and cell culture supernatants were assayed for cytokines. As seen in Figure 7 B, 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 7 B), 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 small CD14⁺ CD16⁺ monocytes (Mourah et al., 2017, 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 small CD14⁺ CD16⁺ 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 small CD14⁺ CD16⁺ monocytes was present in this population. small CD14⁺ CD16⁺ 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 sub-population 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 sub-population 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 (Mourah, 2017, submitted). However, several populations with heterogeneous cell composition could easily be generated from a single sample by combinatorial mixing of sorted sub-populations.

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.

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 (Mourah F 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 (Mourah F et al. , submitted). Data were analyzed using Diva (BD) and Flow Jo (*Treestar, Ashland, OR*).

Cell sorting

Monocyte sub-populations 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 (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.

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*).

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 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. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004
2. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol*. 2014;5: 1–22. doi:10.3389/fimmu.2014.00514
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: 41–57. doi:10.1007/s12026-012-8297-3
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. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012
5. Alonso MN, Wong MT, Zhang AL, Winer D, Suhoski MM, Tolentino LL, et al. Th1, Th2, and Th 17 cells instruct monocytes to differentiate into specialized dendritic cell subsets. *Blood*. 2011;118: 3311–3320. doi:10.1182/blood-2011-03-341065.
6. Kool M, Hammad H, Lambrecht B. Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity. *F1000 Biol Rep*. 2012;4: 6. doi:10.3410/B4-6
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. doi:10.1084/jem.20042311
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. doi:10.1111/imr.12032

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. doi:10.1189/jlb.0604325
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. doi:10.4049/jimmunol.179.6.3515
11. Etzrodt M, Ende M, Schroeder T. Quantitative single-cell approaches to stem cell research. *Cell Stem Cell.* Elsevier Inc.; 2014;15: 546–558. doi:10.1016/j.stem.2014.10.015
12. Buchholz VR, Schumacher TNM, Busch DH. T Cell Fate at the Single-Cell Level. *Annu Rev Immunol.* 2016;34: 65–92. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112014
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. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.016
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. doi:10.1371/journal.pone.0047209

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 sub-populations were analyzed as described (Mourah F., 2017, 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 sub-populations were analyzed as described (Mourah F., 2017, 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 sub-populations were analyzed as described (Mourah F., 2017, 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 sub-populations were analyzed as described (Mourah F., 2017, 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 sub-populations were analyzed as described (Mourah F., 2017, 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 allogenic 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 sub-populations were analyzed as described (Mourah F., 2017, 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 allogenic 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 Interferongamma 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.

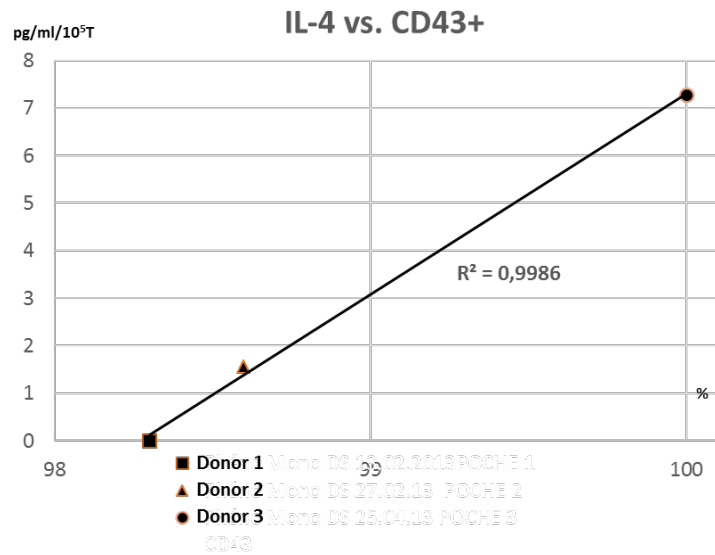
Donor ID	Sample Date	AGE (years)	SEX (M / F)	% MONO	MONO (x10⁹/L)
1	2013/02/14	52	F	10,1	0,5
2	2013/02/28	26	M	6,8	0,3
3	2013/04/25	65	M	3,7	0,1
4	2015/02/12	53	M	6,2	0,3
5	2015/02/16	61	F	5,7	0,3
6	205/02/19	32	F	3,8	0,2
7	2015/11/23	34	F	5	0,2
8	2016/01/13	41	F	N/A	N/A
9	2016/03/10	62	F	15,2	1,1

Table I. Characteristics of blood donors.

Marker	Clone	Isotypes	Clone	Label	Marker Supplier	Isotypes 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.

A.



B.

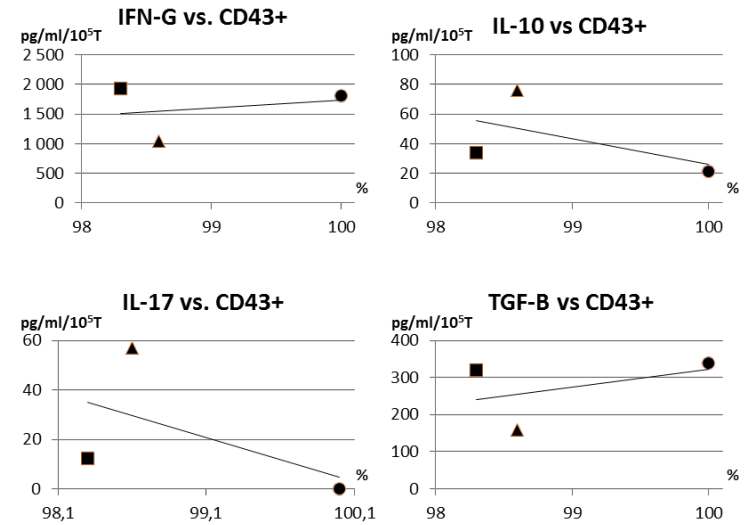
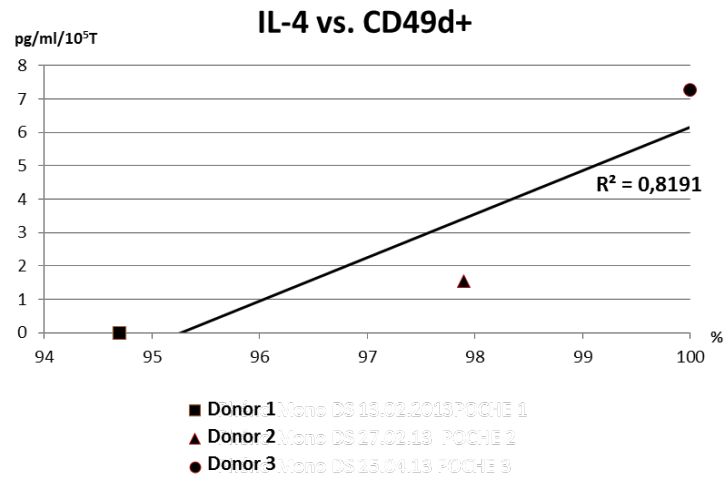


Figure 1. Correlations between CD43 expression in sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells

A.



B.

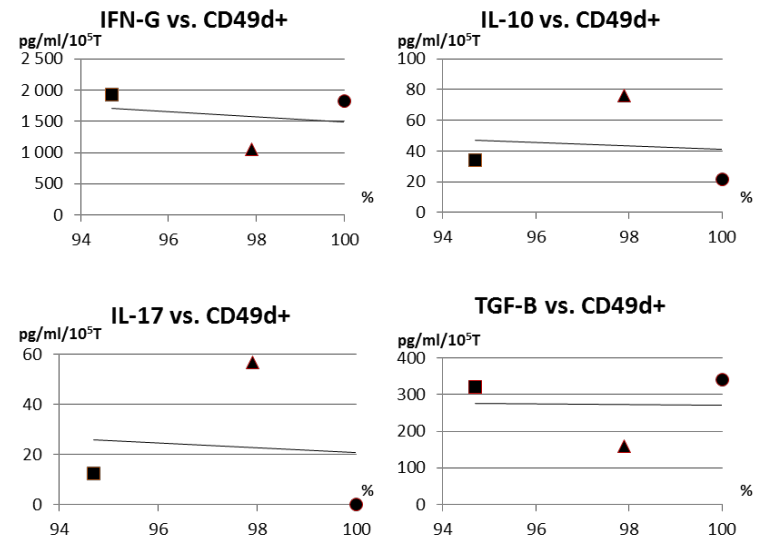


Figure 2. Correlations between CD49d expression in sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells

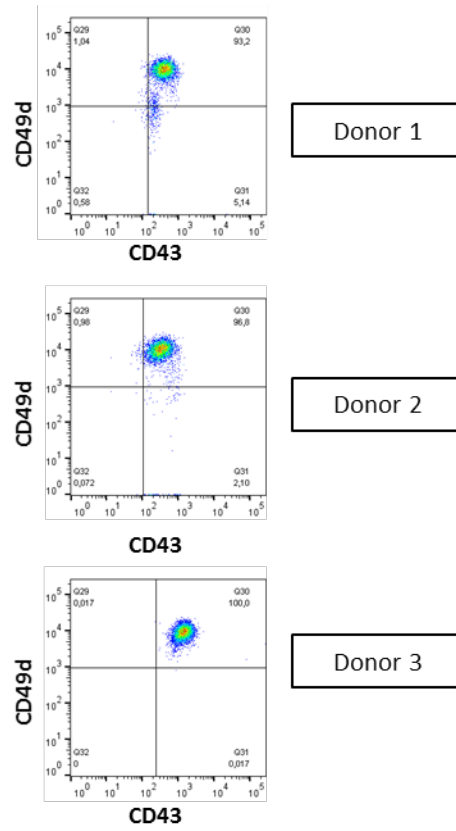


Figure 3. Profiles of expression of CD43 and CD49d in healthy donors 1, 2, and 3

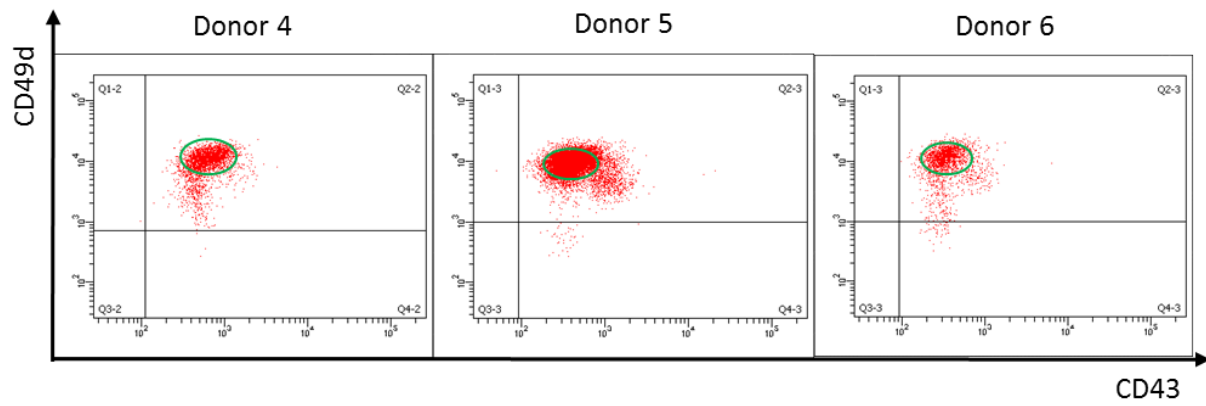


Figure 4. Profiles of expression of CD43 and CD49d in healthy donors 4, 5, and 6

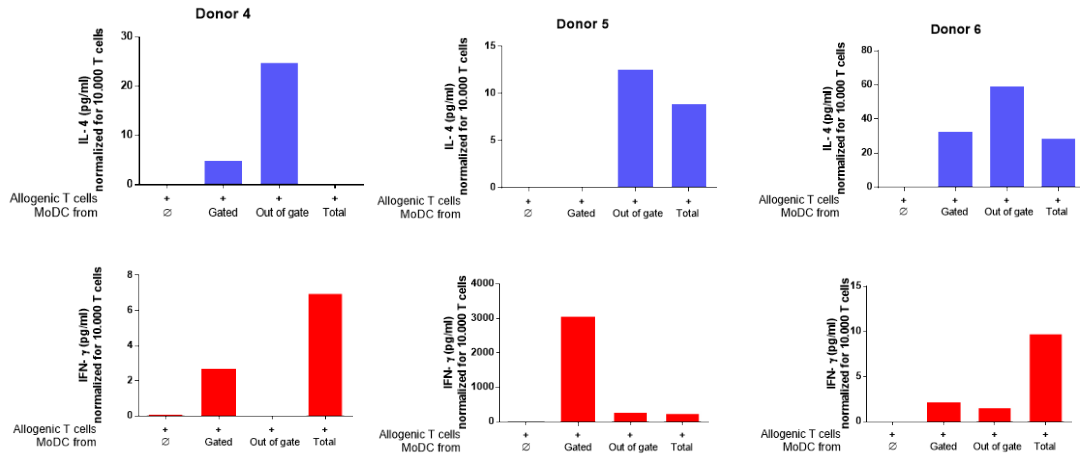


Figure 5. Cytokine production in allogeneic MLR between MoDC derived from different monocyte fractions and T cells

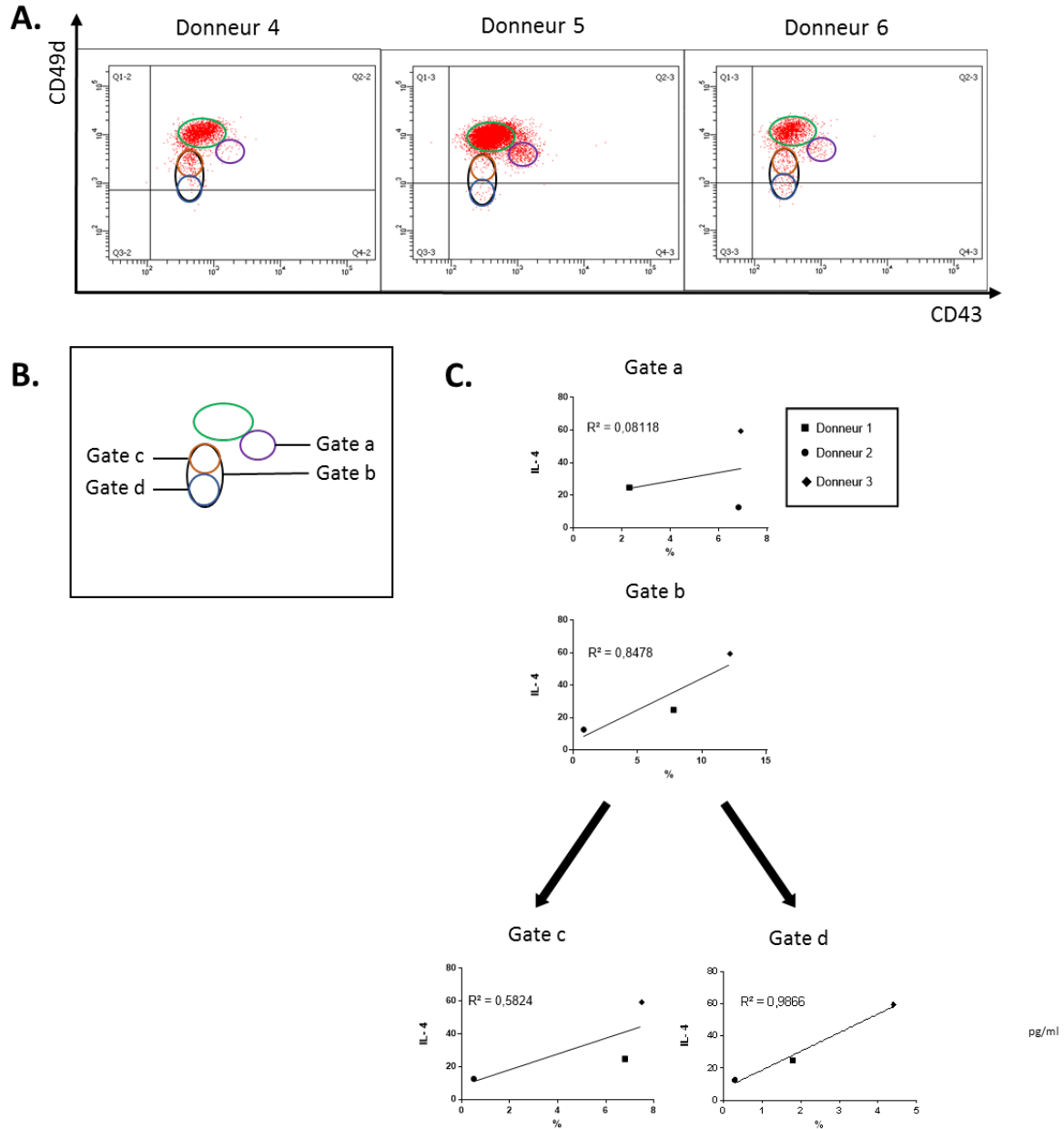


Figure 6. Correlations between CD43 and CD49d expression in fractions of sm14⁺16⁺ monocytes and IL-4 production in allogeneic MLR between MoDC and T cells

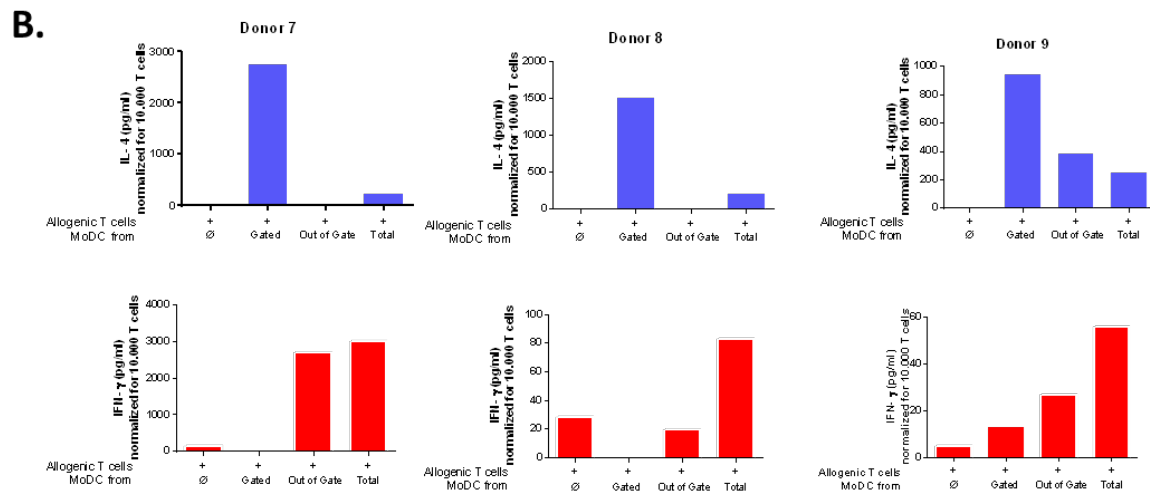
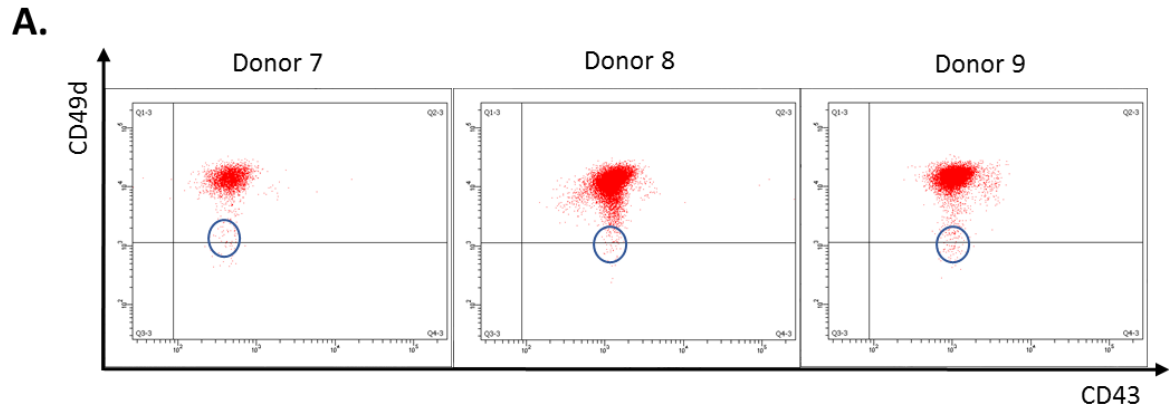


Figure 7. Cytokine production in allogeneic MLR between MoDC derived from small CD14⁺ CD16⁺ CD43^{low} CD49d^{low/neg} monocytes and T cells

Conclusion / Perspectives

Cette thèse a permis d'identifier de nouvelles populations de monocytes : les « large » la14+16neg et la14+16+, mais également de mieux caractériser la population « small » (sm14+16^{neg}, sm14+16+, sm14^{dim}16+, et sm14^{dim}16^{neg}). Cette nouvelle nomenclature des monocytes vise à mieux rendre compte de leur hétérogénéité.

Conscients de l'importance fonctionnelle que peuvent avoir de petites populations de cellules dans le système immunitaire, une des priorités de ce travail a été de faire une analyse aussi exhaustive que possible de l'ensemble des monocytes. Ceci est rendu possible par la capacité accrue des moyens informatiques actuellement couplés aux cytomètres de flux. Cela nécessita aussi la préparation d'échantillons sanguins de taille suffisante pour disposer d'un grand nombre de monocytes.

Ce souci d'exhaustivité implique aussi de prévenir la perte sélective de populations de monocytes par les effets de méthodes de séparation. Ainsi, les méthodes basées sur le tri magnétique furent testées et abandonnées en raison des faibles rendements pour certaines populations de monocytes. De plus, ces méthodes introduisent le risque d'activation indésirable chez des cellules dont une caractéristique principale est la phagocytose.

Enfin, les monocytes présentent une surface « réactive », avec l'expression forte de récepteurs pour le fragment conservé des Ig (FcR CD16, CD32 et CD64) et de récepteurs pour les sucres complexes, qui lie facilement les anticorps utilisés pour les marquages de surface. Pour réduire ces réactivités non-spécifiques, de nombreux essais furent nécessaires pour mettre au point un protocole optimisé pour ce type cellulaire. Ce protocole fut suffisamment robuste pour obtenir des résultats reproductibles chez l'humain en condition normale ou pathologique.

L'acquisition d'un grand nombre d'évènements en cytométrie de flux (1×10^6 par échantillon), pour analyser 6 sous-populations de monocytes marqués avec 17 anticorps et le tout dans une cohorte de 28 donneurs, génère une quantité de données considérable dont l'exploitation devient un projet en soi. Une analyse manuelle de l'expression des marqueurs au niveau des sous-populations de monocytes a été faite par analyse à l'aide des logiciels Flow-Jo et OriginPro et a mis en évidence le caractère unique des profils d'expression pour chacune des sous-populations. De manière importante, elle a aussi permis de reconnaître les profils d'expression conservés entre donneurs non-apparentés, mettant en lumière un niveau encore

méconnu de la complexité phénotypique des monocytes humains. Les conséquences fonctionnelles associées à l'existence de ces groupes phénotypiques restent à déterminer.

Des outils informatiques déjà disponibles (FLOCK, SPADE, viSNE) pour l'analyse automatique des données ont été également utilisés. En plus de l'automatisme, leur usage permet d'éviter le biais éventuel de l'analyse manuelle, à savoir une composante subjective dans le fenêtrage des populations de cellules. L'utilisation de ces logiciels dans ce travail a ainsi confirmé les conclusions de l'analyse manuelle sur l'existence de la population de « large » monocytes. Les conclusions de ces analyses vont également dans le sens de l'existence de groupes phénotypiques parmi les donneurs. L'utilisation généralisée de ces logiciels permet d'envisager à terme des analyses de laboratoire à laboratoire qui soient plus comparables qu'elles ne le sont aujourd'hui.

Si l'identification de groupes phénotypiques a été possible en utilisant différentes méthodes d'analyse (Flow Jo/OriginPro, FLOCK, SPADE, viSNE), les groupes eux-mêmes n'étaient pas entièrement superposables d'une méthode à l'autre. Il est cependant intéressant de constater des recouvrements importants entre les résultats de différentes méthodes (Flow Jo/OriginPro et viSNE), une méthode manuelle et l'autre non-supervisée. Par ailleurs, des groupes assez distincts ont émergé suivant la méthode utilisée. Une interprétation pourrait venir du constat d'une grande intrication des phénotypes identifiables parmi les donneurs. Le phénotype monocyttaire d'un individu pourrait ainsi être constitué de multiples facettes, ou modules, et ces éléments constitutifs seraient variablement partagés dans la population. Chaque méthode d'analyse identifierait préférentiellement certains des modules phénotypiques partagés. Déterminer l'impact fonctionnel de ces derniers serait une tâche passionnante, à défaut d'être aisée.

L'analyse de monocytes de patients septiques a montré une conservation générale des caractéristiques nouvellement définies ici pour les monocytes d'individus sains, à savoir la présence de « large » monocytes, et l'appartenance à des groupes phénotypiques, et ceci en dépit de fortes perturbations de l'expression de plusieurs marqueurs. La faisabilité de l'analyse approfondie des monocytes chez ces quelques patients a été montrée et permet d'envisager dans le futur des possibilités d'analyses à but diagnostique et pronostic.

L'identification de nouvelles populations de monocytes a permis d'envisager l'analyse de leurs fonctions sur des bases nouvelles. Le choix a été fait d'analyser les propriétés des cellules dendritiques issues de ces sous-populations en raison du lien important entre monocytes et développement de la réponse immunitaire adaptative en conditions inflammatoires, et de la maîtrise de protocoles fiables et reconnus pour obtenir ces cellules dendritiques. Les résultats

obtenus en terme de polarisation de lymphocytes T allogéniques furent d'une grande variabilité. Cependant, instruits des variations importantes des phénotypes de monocytes de différents donneurs lors de l'étude des sous-populations, rechercher un lien entre ces deux variabilités s'imposa. L'existence de quelques liens montre la faisabilité d'une telle approche de prospection sur de grands ensembles de données. L'utilisation itérative de cette approche facilite grandement le choix des cibles à analyser expérimentalement en réduisant le nombre. Cette approche analytique peut trouver de nombreuses applications scientifiques et médicales.

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 comme des cellules de l'immunité innée sans prédétermination et s'orientant vers des fonctions dictées par l'environnement. Bien que ce dernier aspect de la biologie de monocytes ait été maintes fois montré dans différents modèles *in vitro* comme *in vivo*, les résultats présentés dans ce travail suggèrent que tous les monocytes ne suivraient pas ce schéma de spécialisation fonctionnelle. Certaines populations de monocytes pourraient donc suivre une voie de développement, intra-médullaire ou sanguine, les engageant dans un programme d'expression génique aboutissant à une fonction immunitaire déterminée. Alternativement, l'ensemble des monocytes présenteraient une propension au développement vers une fonction déterminée mais qui serait contrecarrée dans les conditions fortement orientées des modèles *in vitro* et *in vivo*. La réponse des monocytes orientés vers Th2 identifiés ici pourrait être analysée dans des conditions différentes de celles utilisées (comme par exemple avec un stimulus de maturation différent du LPS, comme du poly(I:C) ou un anti-CD40) et une déviation par rapport aux réponses Th2 serait recherchée.

Le travail présenté montre la recherche de corrélations entre les cytokines produites en MLR et le phénotype des monocytes utilisés. Une recherche semblable pourrait être faite entre la réponse cytokinique et le phénotype des MoDC générés à partir des monocytes. Dans ce modèle *in vitro*, les MoDC sont les cellules effectivement en contact avec les cellules T allogéniques et l'identification des phénotypes de DC impliqués dans la polarisation T est une question importante. Dans la continuité de cette étude nous sommes en train de rechercher de telles corrélations sur les mêmes échantillons qui ont permis l'identification de la population de monocytes. Les premiers résultats montrent l'existence de corrélations. Les MoDC identifiées devront être purifiées pour une identification positive de leurs fonctions.

Il serait également intéressant de trier les MoDC en CD1a⁺ et CD1a⁻ car ces dernières, isolées de patients septiques, contribuent aux réponses régulatrices analysées *ex vivo* (Faivre et

al. 2012). Il serait de plus intéressant d'identifier les monocytes à l'origine de ces MoDC CD1a- et d'analyser les conditions de leur génération.

L'analyse des fonctions des monocytes pourrait être faite par différenciation en macrophages. Des protocoles standardisés de différenciation ont été récemment proposés (Murray et al. 2014) afin d'obtenir des populations caractérisables en différents M1 et différents M2. Des premières mises au point ont été menées au cours de ce travail de thèse et une telle analyse pourrait permettre d'identifier des populations de monocytes à l'origine de fonctions macrophagiques spécifiques.

Ainsi un autre type cellulaire a été mis en évidence au cours de la caractérisation des monocytes, à savoir les SGC (Small Granular Cells) (Figure 1 de l'Article 1). Le phénotype de ces cellules $CD14^{low/neg} HLA-DR^{neg}$ évoque la possibilité d'une analogie avec les MDSC. Ces populations se trouvent également augmentées chez les patients septiques que nous avons analysés. Une caractérisation fonctionnelle sera nécessaire pour déterminer la nature de ces cellules.

L'identification de nouvelles sous-populations de monocytes doit être confirmée en sang total avec un minimum de manipulation des cellules, et leur phénotype pourrait être précisé dans ces conditions plus proches de celles de la circulation sanguine.

de ces cellules dans la circulation en présence de toutes les autres cellules contenues dans la circulation sanguine.

En conclusion, ce travail de thèse a été riche en expériences, en mises aux points, en résultats et surtout il fut riche en enseignements de toute part. Partie des monocytes tels que décrits dans la littérature, j'ai pu un peu plus « creuser » avec la volonté de découvrir et de mettre un peu plus de piment dans l'analyse de ce type cellulaire qui ne se développe pas aussi bien et aussi vite que pour d'autres cellules de l'immunité.

Il y a eu également notre acharnement et notre volonté de faire les expériences les plus rigoureuses possibles, ce qui a contribué à ces découvertes et à l'apport de notre petite pierre à cet immense édifice qu'est la biologie des monocytes.

Références Bibliographiques

- Adams, Dolph O, and Thomas A Hamilton. 1984. “The Cell Biology of Macrophage Activation.” *Annual Review of Immunology* 2 (1). Annual Reviews: 283–318. doi:10.1146/annurev.iy.02.040184.001435.
- Alberti, Corinne, Christian Brun-Buisson, Hilmar Burchardi, Claudio Martin, Sergey Goodman, Antonio Artigas, Alberto Sicignano, et al. 2002. “Epidemiology of Sepsis and Infection in ICU Patients from an International Multicentre Cohort Study.” *Intensive Care Medicine* 28 (2): 108–21. doi:10.1007/s00134-001-1143-z.
- Alberto, Y, Madelena Y Ng, Nargess Hassanzadeh-kiabi, and Helen S Goodridge. 2015. “IRF8 Acts in Lineage-Committed rather than Oligopotent Progenitors to Control Neutrophil vs Monocyte Production.” *Blood* 125 (9): 1452–59. doi:10.1182/blood-2014-09-600833.The.
- Álvarez-Errico, Damiana, Roser Vento-Tormo, Michael Sieweke, and Esteban Ballestar. 2014. “Epigenetic Control of Myeloid Cell Differentiation, Identity and Function.” *Nature Reviews Immunology* 15 (1). Nature Publishing Group: 7–17. doi:10.1038/nri3777.
- Amoruso, Angela, Daniele Sola, Luca Rossi, Joyce Afrakoma Obeng, Luigia Grazia Fresu, Pier Paolo Sainaghi, Mario Pirisi, and Sandra Brunelleschi. 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.” *Pharmacological Research* 107. Elsevier Ltd: 308–14. doi:10.1016/j.phrs.2016.03.034.
- Ancuta, Petronela, Kuang-Yu Liu, Vikas Misra, Vanessa Sue Wacleche, Annie Gosselin, Xiaobo Zhou, and Dana Gabuzda. 2009. “Transcriptional Profiling Reveals Developmental Relationship and Distinct Biological Functions of CD16+ and CD16-Monocyte Subsets.” *BMC Genomics* 10: 403. doi:10.1186/1471-2164-10-403.
- Ancuta, Petronela, Ravi Rao, Ashlee Moses, Andrew Mehle, Sunil K Shaw, F William Luscinskas, and Dana Gabuzda. 2003. “Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes.” *The Journal of Experimental Medicine* 197 (12): 1701–7. doi:10.1084/jem.20022156.
- Andersson, Ulf, and Kevin J Tracey. 2012. “Reflex Principles of Immunological Homeostasis.”

- Annu Rev Immunol*, no. 30: 313–35. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075015.Reflex.
- Angus, D C, W T Linde-Zwirble, J Lidicker, G Clermont, J Carcillo, and M R Pinsky. 2001. “Epidemiology of Severe Sepsis in the United States: Analysis of Incidence, Outcome, and Associated Costs of Care.” *Critical Care Medicine* 29 (7): 1303–10. doi:10.1097/00003246-200107000-00002.
- Askenase, Michael H., Seong Ji Han, Allyson L. Byrd, Denise MoraisdaFonseca, Nicolas Bouladoux, Christoph Wilhelm, Joanne E. Konkel, et al. 2015. “Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection.” *Immunity* 42 (6). Elsevier Inc.: 1130–42. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.011.
- Au-Yeung, Byron B, Sebastian Deindl, Lih-Yun Hsu, Emil H Palacios, Susan E Levin, John Kuriyan, and Arthur Weiss. 2009. “The Structure, Regulation, and Function of ZAP-70.” *Immunological Reviews* 228 (1): 41–57. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00753.x.
- Auffray, C, and F Geissmann. 2007. “Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior.” *Science* 317 (August): 1766–69. doi:10.1126/science.1225053.
- Bachem, Annabell, Steffen Güttler, Evelyn Hartung, Frédéric Ebstein, Michael Schaefer, Astrid Tannert, Abdulgabar Salama, et al. 2010. “Superior Antigen Cross-Presentation and XCR1 Expression Define Human CD11c+CD141+ Cells as Homologues of Mouse CD8+ Dendritic Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1273–81. doi:10.1084/jem.20100348.
- Bainton, D. F., and M. G. Farquhar. 1968a. “Differences in Enzyme Content of Azurophil and Specific Granules of Polymorphonuclear Leukocytes. I. Histochemical Staining of Bone Marrow Smears.” *Journal of Cell Biology* 39 (2): 286–98. doi:10.1083/jcb.39.2.299.
- . 1968b. “Differences in Enzyme Content of Azurophil and Specific Granules of Polymorphonuclear Leukocytes. II. Cytochemistry and Electron Microscopy of Bone Marrow Cells.” *Journal of Cell Biology* 39 (2): 299–317. doi:10.1083/jcb.39.2.299.
- Bainton, DF, JL Ulliyot, and MG Farquhar. 1971. “The Development of Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocytes in Human Bone Marrow” 134: 907–34.
- Belge, Kai-Uwe, Farshid Dayyani, Alexia Horelt, Maciej Siedlar, Marion Frankenberger,

- Bernhard Frankenberger, Terje Espevik, and Löms Ziegler-Heitbrock. 2002. “The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168 (7): 3536–42. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3536.
- Bergenfelz, Caroline, Anna Maria Larsson, Kristoffer Von Stedingk, Sofia Gruvberger-Saal, Kristina Aaltonen, Sara Jansson, Helena Jernström, et al. 2015. “Systemic Monocytic-MDSCs Are Generated from Monocytes and Correlate with Disease Progression in Breast Cancer Patients.” *PLoS ONE* 10 (5). doi:10.1371/journal.pone.0127028.
- Bergh, F. Then, Farshid Dayyani, and Loems Ziegler-Heitbrock. 2004. “Impact of Type-I-Interferon on Monocyte Subsets and Their Differentiation to Dendritic Cells: An in Vivo and Ex Vivo Study in Multiple Sclerosis Patients Treated with Interferon-Beta.” *Journal of Neuroimmunology* 146 (1–2): 176–88. doi:10.1016/j.jneuroim.2003.10.037.
- Betтели, Estelle, Thomas Korn, Mohamed Oukka, and Vijay K Kuchroo. 2008. “Induction and Effector Functions of T(H)17 Cells.” *Nature*. doi:10.1038/nature07036.
- Biswas, Subhra K., Manesh Chittezhath, Irina N. Shalova, and Jyue Yuan Lim. 2012. “Macrophage Polarization and Plasticity in Health and Disease.” *Immunologic Research* 53 (1–3): 11–24. doi:10.1007/s12026-012-8291-9.
- Biswas, Subhra K., and Eduardo Lopez-Collazo. 2009. “Endotoxin Tolerance: New Mechanisms, Molecules and Clinical Significance.” *Trends in Immunology* 30 (10): 475–87. doi:10.1016/j.it.2009.07.009.
- Biswas, Subhra K., and Alberto Mantovani. 2010. “Macrophage Plasticity and Interaction with Lymphocyte Subsets : Cancer as a Paradigm.” *Nature Immunology* 11 (10). Nature Publishing Group: 889–96. doi:10.1038/ni.1937.
- Blériot, Camille, Théo Dupuis, Grégory Jouvion, Gérard Eberl, Olivier Disson, and Marc Lecuit. 2015. “Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection.” *Immunity* 42 (1): 145–58. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.020.
- Bone, RC. 1995. “Sepsis, Sepsis Syndrome, and the Systemic Inflammatory Response Syndrome (Sirs): Gulliver in Laputa.” *JAMA* 273 (2): 155–56. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1995.03520260077036>.

- . 1996. “Immunologic Dissonance: A Continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (Sirs) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (Mods).” *Annals of Internal Medicine* 125 (8): 680–87. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-125-8-199610150-00009>.
- Bone, Rc, Ra Balk, Fb Cerra, Rp Dellinger, Am Fein, Wa Knaus, Rmh Schein, and Wj Sibbald. 1992. “American College of Chest Physician/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis.” *Chest* 101: 1644–55.
- Bone, Roger C, Charles J Fisher, Terry P Clemmer, Gus J Slotman, Craig A Metz, and Robert A Balk. 1987. “A Controlled Clinical Trial of High-Dose Methylprednisolone in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock.” *New England Journal of Medicine* 317 (11). Massachusetts Medical Society: 653–58. doi:10.1056/NEJM198709103171101.
- Boomer, Jonathan S, Kathleen To, Kathy C Chang, Osamu Takasu, Dale F Osborne, Andrew H Walton, Traci L Bricker, et al. 2011a. “Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure.” *Jama* 306 (23): 2594–2605. doi:10.1001/jama.2011.1829.
- . 2011b. “Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure.” *Jama* 306 (23): 2594–2605. doi:10.1001/jama.2011.1829.
- Boyette, Lisa B, Camila Macedo, Kevin Hadi, Beth D Elinoff, and John T Walters. 2017. “Phenotype , Function , and Differentiation Potential of Human Monocyte Subsets.”
- Bøyum, A. 1964. “Separation of White Blood Cells.” *Nature* 204: 793–94. <http://www.nature.com/nature/journal/v204/n4960/abs/204793a0.html>.
- Bøyum, Arne. 1974. “Separation of Blood Leucocytes, Granulocytes and Lymphocytes.” *Tissue Antigens* 4 (3): 269–74. doi:10.1111/j.1399-0039.1974.tb00252.x.
- Briseño, Carlos G., Malay Haldar, Nicole M. Kretzer, Xiaodi Wu, Derek J. Theisen, K. C. Wumesh, Vivek Durai, et al. 2016. “Distinct Transcriptional Programs Control Cross-Priming in Classical and Monocyte-Derived Dendritic Cells.” *Cell Reports* 15 (11): 2462–74. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.025.
- Bronte, Vincenzo, Sven Brandau, Shu-Hsia Chen, Mario P Colombo, Alan B Frey, Tim F Greten, Susanna Mandruzzato, et al. 2016. “Recommendations for Myeloid-Derived

- Suppressor Cell Nomenclature and Characterization Standards.” *Nature Communications* 7. Nature Publishing Group: 12150. doi:10.1038/ncomms12150.
- Bruyninckx, Walter J, and Anne-marie B Blancquaert. 1983. “Isolation of Horse Mononuclear Cells, Especially of Monocytes, on Isopaque-Ficoll Neutral Density Gradient.” *Veterinary Immunology and Immunopathology* 4: 493–504.
- Cartwright, GE, JW Athens, and MM Wintrobe. 1964. “The Kinetics of Granulopoiesis in Normal Man.” *Blood* 24 (6): 780–803.
- Casanova-Acebes, María, Christophe Pitaval, Linnea A. Weiss, César Nombela-Arrieta, Raphaël Chèvre, Noelia A-González, Yuya Kunisaki, et al. 2013. “Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance.” *Cell* 153 (5): 1025–35. doi:10.1016/j.cell.2013.04.040.
- Caux, C, C Dezutter-Dambuyant, D Schmitt, and J Banchereau. 1992. “GM-CSF and TNF-Alpha Cooperate in the Generation of Dendritic Langerhans Cells.” *Nature* 360: 258–61. doi:10.1038/355242a0.
- Cella, Marina, Anneke Engering, Valerie Pinet, Jean Pieters, and Antonio Lanzavecchia. 1997. “Inflammatory Stimuli Induce Accumulation of MHC Class II Complexes on Dendritic Cells.” *Nature* 388 (6644): 782–87. doi:10.1038/42030.
- Cella, Marina, D Scheidegger, K Palmer-Lehmann, P Lane, A Lanzavecchia, and G Alber. 1996. “Ligation of CD40 on Dendritic Cells Triggers Production of High Levels of Interleukin-12 and Enhances T Cell Stimulatory Capacity: T-T Help via APC Activation.” *J. Exp. Med* 184 (4): 747–52. doi:10.1084/jem.20142182.
- Chapuis, Françoise, Michelle Rosenzweig, Micael Yagello, Marianne Ekman, Peter Biberfeld, and Jean Claude Gluckman. 1997. “Differentiation of Human Dendritic Cells from Monocytes in Vitro.” *European Journal of Immunology* 27 (2): 431–41. doi:10.1002/eji.1830270213.
- Cheadle, William G., Michael J. Hershman, Samuel R. Wellhausen, and Hiram C. Polk. 1991. “HLA-DR Antigen Expression on Peripheral Blood Monocytes Correlates with Surgical Infection.” *The American Journal of Surgery*. doi:10.1016/0002-9610(91)91247-G.
- Cheng, Pingyan, Cesar a Corzo, Noreen Luetke, Bin Yu, Srinivas Nagaraj, Marilyn M Bui, Myrna Ortiz, et al. 2008. “Inhibition of Dendritic Cell Differentiation and Accumulation

- of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer Is Regulated by S100A9 Protein.” *The Journal of Experimental Medicine* 205 (10): 2235–49. doi:10.1084/jem.20080132.
- Cheng, Shih-Chin, Brendon P Scicluna, Rob J W Arts, Mark S Gresnigt, Ekta Lachmandas, Evangelos J Giamarellos-Bourboulis, Matthijs Kox, et al. 2016. “Broad Defects in the Energy Metabolism of Leukocytes Underlie Immunoparalysis in Sepsis.” *Nature Immunology*. doi:10.1038/ni.3398.
- Cheong, Cheolho, Ines Matos, Jae-hoon Choi, Durga Bhavani Dandamudi, M Paula Longhi, Kate L Jeffrey, Robert M Anthony, et al. 2010. “Microbial Stimulation Fully Differentiates Monocytes to DC-SIGN/CD209(+) Dendritic Cells for Immune T Cell Areas.” *Cell* 143 (3): 416–29. doi:10.1016/j.cell.2010.09.039.Microbial.
- Chorro, Laurent, Aurélien Sarde, Mei Li, Kevin J Woollard, Pierre Chambon, Bernard Malissen, Adrien Kissenpfennig, Jean-Baptiste Barbaroux, Richard Groves, and Frédéric Geissmann. 2009. “Langerhans Cell (LC) Proliferation Mediates Neonatal Development, Homeostasis, and Inflammation-Associated Expansion of the Epidermal LC Network.” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 3089–3100. doi:10.1084/jem.20091586.
- Chu, Chung-Ching, Niwa Ali, Panagiotis Karagiannis, Paola Di Meglio, Ania Skowera, Luca Napolitano, Guillermo Barinaga, et al. 2012. “Resident CD141 (BDCA3)+ Dendritic Cells in Human Skin Produce IL-10 and Induce Regulatory T Cells That Suppress Skin Inflammation.” *The Journal of Experimental Medicine* 209 (5): 935–45. doi:10.1084/jem.20112583.
- Constant, Stephanie L, and Kim Bottomly. 1997. “INDUCTION OF TH1 AND TH2 CD4+ T CELL RESPONSES:The Alternative Approaches.” *Annual Review of Immunology* 15 (1). Annual Reviews: 297–322. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.297.
- Cox, Karina, Margaret North, Michael Burke, Hemant Singhal, Sophie Renton, Nayef Aqel, Sabita Islam, and Stella C Knight. 2005. “Plasmacytoid Dendritic Cells (PDC) Are the Major DC Subset Innately Producing Cytokines in Human Lymph Nodes.” *Journal of Leukocyte Biology* 78 (5): 1142–52. doi:10.1189/jlb.1103532.
- Crawford, K, D Gabuzda, V Pantazopoulos, J Xu, C Clement, E Reinherz, and C a Alper. 1999. “Circulating CD2+ Monocytes Are Dendritic Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (11): 5920–28.

- Cros, Jérôme, Nicolas Cagnard, Kevin Woollard, Natacha Patey, Shen Ying Zhang, Brigitte Senechal, Anne Puel, et al. 2010. “Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors.” *Immunity* 33 (3): 375–86. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012.
- Crozat, Karine, Rachel Guiton, Martin Williams, Sandrine Henri, Thomas Baranek, Isabelle Schwartz-Cornil, Bernard Malissen, and Marc Dalod. 2010. “Comparative Genomics as a Tool to Reveal Functional Equivalences between Human and Mouse Dendritic Cell Subsets.” *Immunological Reviews* 234 (1): 177–98. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00868.x.
- de Baey, a, I Mende, G Riethmueller, and P a Baeuerle. 2001. “Phenotype and Function of Human Dendritic Cells Derived from M-DC8(+) Monocytes.” *European Journal of Immunology* 31 (6): 1646–55. doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1646::AID-IMMU1646>3.0.CO;2-X.
- de la Rica, Lorenzo, Javier Rodríguez-Ubreva, Mireia García, Abul B M M K Islam, José M Urquiza, Henar Hernando, Jesper Christensen, Kristian Helin, Carmen Gómez-Vaquero, and Esteban Ballestar. 2013. “PU.1 Target Genes Undergo Tet2-Coupled Demethylation and DNMT3b-Mediated Methylation in Monocyte-to-Osteoclast Differentiation.” *Genome Biology* 14 (9): R99. doi:10.1186/gb-2013-14-9-r99.
- Dewald, B., U. Bretz, and M. Baggiolini. 1982. “Release of Gelatinase from a Novel Secretory Compartment of Human Neutrophils.” *Journal of Clinical Investigation* 70 (3): 518–25.
- DF, Gaieski, Edwards JM, Kallan MJ, and Carr BG. 2013. “Benchmarking the Incidence and Mortality of Severe Sepsis in the United States.” *Crit Care Med.* 41 (5): 1167–74.
- Dong, Chen. 2008. “TH17 Cells in Development: An Updated View of Their Molecular Identity and Genetic Programming.” *Nature Reviews. Immunology.* doi:10.1038/nri2295.
- Dzionek, a, Y Sohma, J Nagafune, M Cella, M Colonna, F Facchetti, G Günther, et al. 2001. “BDCA-2, a Novel Plasmacytoid Dendritic Cell-Specific Type II C-Type Lectin, Mediates Antigen Capture and Is a Potent Inhibitor of Interferon Alpha/beta Induction.” *The Journal of Experimental Medicine* 194 (12): 1823–34. doi:10.1084/jem.194.12.1823.
- Dzionek, Andrzej, Anja Fuchs, Petra Schmidt, Sabine Cremer, Monika Zysk, Stefan Miltenyi, David W Buck, and Jürgen Schmitz. 2000. “BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three

- Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood.” *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 165 (11): 6037–46. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6037.
- Dzionic, Andrzej, Yoshimasa Inagaki, Katsuya Okawa, Jun Nagafune, Jürgen Röck, Yoshiaki Sohma, Gregor Winkels, Monika Zysk, Yasunori Yamaguchi, and Jürgen Schmitz. 2002. “Plasmacytoid Dendritic Cells: From Specific Surface Markers to Specific Cellular Functions.” *Human Immunology* 63 (12): 1133–48. doi:10.1016/S0198-8859(02)00752-8.
- Eash, Kyle J., Adam M. Greenbaum, Priya K. Gopalan, and Daniel C. Link. 2010. “CXCR2 and CXCR4 Antagonistically Regulate Neutrophil Trafficking from Murine Bone Marrow.” *Journal of Clinical Investigation* 120 (7): 2423–31. doi:10.1172/JCI41649.
- Egesten, a, J Breton-Gorius, J Guichard, U Gullberg, and I Olsson. 1994. “The Heterogeneity of Azurophil Granules in Neutrophil Promyelocytes: Immunogold Localization of Myeloperoxidase, Cathepsin G, Elastase, Proteinase 3, and Bactericidal/permeability Increasing Protein.” *Blood* 83 (10): 2985–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8180395>.
- Enders, G. 1930. “Beobachtungen, Betreffend Die Elektrische Leitfähigkeit Der Farblosen Blutkörperchen.” *Ztschrift. F. Biol* 90 (63).
- Ertel, W, J P Kremer, J Kenney, U Steckholzer, D Jarrar, O Trentz, and F W Schildberg. 1995. “Downregulation of Proinflammatory Cytokine Release in Whole Blood from Septic Patients.” *Blood* 85 (5): 1341–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7858264>.
- Eyles, Jo L, Andrew W Roberts, Donald Metcalf, and Ian P Wicks. 2006. “Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Neutrophils--Forgotten Mediators of Inflammatory Disease.” *Nature Clinical Practice. Rheumatology* 2 (9): 500–510. doi:10.1038/ncprheum0291.
- Faivre, Valérie, Anne Claire Lukaszewicz, Arnaud Alves, Dominique Charron, Didier Payen, and Alain Haziot. 2012. “Human Monocytes Differentiate into Dendritic Cells Subsets That Induce Anergic and Regulatory T Cells in Sepsis.” *PLoS ONE* 7 (10). doi:10.1371/journal.pone.0047209.
- Fan, Xiyang, and Alexander Y. Rudensky. 2016. “Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes.” *Cell* 164 (6). Elsevier Inc.: 1198–1211. doi:10.1016/j.cell.2016.02.048.
- Fang, Z., J. Li, X. Yu, D. Zhang, G. Ren, B. Shi, C. Wang, et al. 2015. “Polarization of

- Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells by Hepatitis B Surface Antigen Is Mediated via ERK/IL-6/STAT3 Signaling Feedback and Restrains the Activation of T Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection.” *The Journal of Immunology* 195 (10): 4873–83. doi:10.4049/jimmunol.1501362.
- Felmet, K. A., M. W. Hall, R. S. B. Clark, R. Jaffe, and J. A. Carcillo. 2005. “Prolonged Lymphopenia, Lymphoid Depletion, and Hypoprolactinemia in Children with Nosocomial Sepsis and Multiple Organ Failure.” *The Journal of Immunology* 174 (6): 3765–72. doi:10.4049/jimmunol.174.6.3765.
- Ferreira, Flavio Lopes. 2001. “Serial Evaluation of the SOFA Score to Predict Outcome in Critically Ill Patients.” *October* 286 (14): 1754–58. doi:10.1001/jama.286.14.1754.
- Fingerle, By Gunter, Almuth Pforte, Bernward Passlick, Matthias Blumenstein, Marion Strobel, and H W Lams Ziegler-heitbrock. 1993. “The Novel Subset of CD14+/CD16+ Blood Monocytes Is Expanded in Sepsis Patients.” *Blood* 82 (10): 3170–76.
- Fisher, C J Jr, G J Slotman, S M Opal, J P Pribble, R C Bone, G Emmanuel, D Ng, D C Bloedow, and M A Catalano. 1994. “Initial Evaluation of Human Recombinant Interleukin-1 Receptor Antagonist in the Treatment of Sepsis Syndrome: A Randomized, Open-Label, Placebo-Controlled Multicenter Trial.” *Critical Care Medicine* 22 (1). United States: 12–21.
- Fleischmann, Carolin, Andre Scherag, Neill K.J. Adhikari, Christiane S. Hartog, Thomas Tsaganos, Peter Schlattmann, Derek C. Angus, and Konrad Reinhart. 2016. “Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-Treated Sepsis Current Estimates and Limitations.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (3): 259–72. doi:10.1164/rccm.201504-0781OC.
- Fleischmann, W. 1937. “Methoden Zur Untersuchung Des Stoffwechsels von Leukocyten Und Thrombocyten.” *Abderhalden’s Handbuch Der Biologischen Arbeitsmethoden* 13 (4): 87.
- Gabrilovich, Dmitry I, and Srinivas Nagaraj. 2009. “Myeloid-Derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System.” *Nature Reviews. Immunology* 9 (3): 162–74. doi:10.1038/nri2506.
- Galli, Stephen J, Niels Borregaard, and Thomas A Wynn. 2011. “Phenotypic and Functional Plasticity of Cells of Innate Immunity: Macrophages, Mast Cells and Neutrophils.” *Nature*

- Publishing Group* 12 (11). Nature Publishing Group: 1035–44. doi:10.1038/ni.2109.
- Ganz, Tomas, Michael E Selsted, Dorothy Szklarek, Sylvia S L Harwig, Kathleen Daher, Dorothy F Bainton, and Robert I Lehrer. 1985. “Defensins - Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils.” *The Journal of Clinical Investigation* 76: 1427–35.
- Gautam, N, a M Olofsson, H Herwald, L F Iversen, E Lundgren-Akerlund, P Hedqvist, K E Arfors, H Flodgaard, and L Lindbom. 2001. “Heparin-Binding Protein (HBP/CAP37): A Missing Link in Neutrophil-Evoked Alteration of Vascular Permeability.” *Nature Immunology* 7: 1123–27. doi:10.1038/nm1001-1123.
- Geering, Barbara, Christina Stoeckle, Sébastien Conus, and Hans Uwe Simon. 2013. “Living and Dying for Inflammation: Neutrophils, Eosinophils, Basophils.” *Trends in Immunology* 34 (8): 398–409. doi:10.1016/j.it.2013.04.002.
- Geissmann, Frederic, Steffen Jung, and Dan R. Littman. 2003. “Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties.” *Immunity* 19 (1): 71–82. doi:10.1016/S1074-7613(03)00174-2.
- Geissmann, Frederic, Markus G Manz, Steffen Jung, Michael H Sieweke, and Klaus Ley. 2010. “Development of Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells.” *Science* 327 (5966): 656–61. doi:10.1126/science.1178331.Development.
- Ghosh, Hiya S., Babacar Cisse, Anna Bunin, Kanako L. Lewis, and Boris Reizis. 2010. “Continuous Expression of the Transcription Factor E2-2 Maintains the Cell Fate of Mature Plasmacytoid Dendritic Cells.” *Immunity* 33 (6). Elsevier Inc.: 905–16. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.023.
- Gilliet, Michel, Wei Cao, and Yong-Jun Liu. 2008. “Plasmacytoid Dendritic Cells: Sensing Nucleic Acids in Viral Infection and Autoimmune Diseases.” *Nature Reviews Immunology* 8 (8): 594–606. doi:10.1038/nri2358.
- Ginhoux, Florent, and Martin Williams. 2016. “Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis.” *Immunity* 44 (3). Elsevier Inc.: 439–49. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.024.
- Ginhoux, Florent, and Steffen Jung. 2014. “Monocytes and Macrophages: Developmental Pathways and Tissue Homeostasis.” *Nature Reviews Immunology* 14 (6). Nature Research: 392–404. doi:10.1038/nri3671.

- Gomez, Timothy S., Karan Kumar, Ricardo B. Medeiros, Yoji Shimizu, Paul Leibson J., and Daniel D. Billadeau. 2007. “Formins Regulate the Arp2/3-Independent Polarization of the MTOC to the Immunological Synapse.” *Immunity* 26 (2): 177–90. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Gordon, Siamon, and Fernando O. Martinez. 2010. “Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions.” *Immunity* 32 (5). Elsevier Inc.: 593–604. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007.
- Gordon, Siamon, and Philip R Taylor. 2005. “Monocyte and Macrophage Heterogeneity.” *Nature Reviews. Immunology* 5 (12): 953–64. doi:10.1038/nri1733.
- Grage-Griebenow, E, HD Flad, and M Ernst. 2001. “Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets.” *Journal of Leukocyte Biology* 69 (1): 11–20.
- Grage-griebenow, Evelin, Dirk Loremen, Rudolf Fettinga, Forschungsinstitut Borstel, Fcy I-positive Cd, and Fcy I-negative Cd-. 1993. “Phenotypical and Functional Characterization of Fcy Receptor I (CD64) -Negative Monocytes , a Minor Human Monocyte Subpopulation with High Accessory and Antiviral Activity.” *European Journal of Immunology* 23: 3126–35.
- Grouard, G, M C Risoan, L Filgueira, I Durand, J Banchereau, and Y J Liu. 1997. “The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic Cells with Interleukin (IL)-3 and CD40-Ligand.” *The Journal of Experimental Medicine* 185 (6): 1101–11. doi:10.1084/jem.185.6.1101.
- Guilliams, Martin, Florent Ginhoux, Claudia Jakubzick, Shalin H Naik, Nobuyuki Onai, Barbara U Schraml, Elodie Segura, Roxane Tussiwand, and Simon Yona. 2014. “Dendritic Cells, Monocytes and Macrophages: A Unified Nomenclature Based on Ontogeny.” *Nature Reviews Immunology* 14 (8). Nature Publishing Group: 571–78. doi:10.1038/nri3712.
- Hadadi, Eva, Biyan Zhang, Kajus Baidžajevs, Nurhashikin Yusof, Kia Joo Puan, Siew Min Ong, Wei Hseun Yeap, et al. 2016. “Differential IL-1 β Secretion by Monocyte Subsets Is Regulated by Hsp27 through Modulating mRNA Stability.” *Scientific Reports* 6 (1). Nature Publishing Group: 39035. doi:10.1038/srep39035.
- Hajdu, Steven I. 2003. “A Note from History: The Discovery of Blood Cells.” *Annals of*

Clinical and Laboratories Science 33 (2): 237–38.

- Haniffa, M, F Ginhoux, X Wang, V Bigley, M Abel, I Dimmick, S Bullock, et al. 2009. “Differential Rates of Replacement of Human Dermal Dendritic Cells and Macrophages during Hematopoietic Stem Cell Transplantation.” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (2): 371–85. doi:10.1084/jem.20081633.
- Haniffa, Muzlifah, Venetia Bigley, and Matthew Collin. 2015. “Human Mononuclear Phagocyte System Reunited.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 41. Elsevier Ltd: 59–69. doi:10.1016/j.semcdb.2015.05.004.
- Haniffa, Muzlifah, Matthew Collin, and Florent Ginhoux. 2013. *Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse. Advances in Immunology*. 1sted. Vol. 120. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-417028-5.00001-6.
- Haniffa, Muzlifah, Amanda Shin, Venetia Bigley, Naomi McGovern, Pearline Teo, Peter See, Pavandip Singh Wasan, et al. 2012. “Human Tissues Contain CD141 Hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103 + Nonlymphoid Dendritic Cells.” *Immunity* 37 (1): 60–73. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012.
- Hashimoto, Daigo, Andrew Chow, Clara Noizat, Pearline Teo, Mary Beth Beasley, Marylene Leboeuf, Christian D. Becker, et al. 2013. “Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes.” *Immunity* 38 (4): 792–804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004.
- Haziot, Alain, Enza Ferrero, Frank Köntgen, Naoki Hijiya, Shunsuke Yamamoto, Jack Silver, Colin L. Stewart, and Sanna M. Goyert. 1996. “Resistance to Endotoxin Shock and Reduced Dissemination of Gram-Negative Bacteria in CD14-Deficient Mice.” *Immunity* 4 (4): 407–14. doi:10.1016/S1074-7613(00)80254-X.
- Heath, W R, and F R Carbone. 2009. “Dendritic Cell Subsets in Primary and Secondary T Cell Responses at Body Surfaces.” *Nat Immunol* 10 (12): 1237–44. doi:10.1038/ni.1822.
- Heiden, Matthew G Vander, Lewis C Cantley, Craig B Thompson, Proliferating Mammalian, Cells Exhibit, and Anabolic Metabolism. 2009. “Understanding the Warburg Effect : Cell Proliferation.” *Science* 324 (May): 1029. doi:10.1126/science.1160809.
- Helft, Julie, Jan Böttcher, Probir Chakravarty, Santiago Zelenay, Jatta Huotari, Barbara U. Schraml, Delphine Goubau, and Caetano Reis e Sousa. 2015. “GM-CSF Mouse Bone

- Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells.” *Immunity* 42 (6): 1197–1211. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.018.
- Hershman, M. J., W. G. Cheadle, S. R. Wellhausen, P. F. Davidson, and H. C. Polk. 1990. “Monocyte HLA-DR Antigen Expression Characterizes Clinical Outcome in the Trauma Patient.” *British Journal of Surgery* 77 (2): 204–7. doi:10.1002/bjs.1800770225.
- Hespel, Cindy, and Muriel Moser. 2012. “Role of Inflammatory Dendritic Cells in Innate and Adaptive Immunity.” *European Journal of Immunology* 42 (10): 2535–43. doi:10.1002/eji.201242480.
- Hicks, Amy M, Gregory Riedlinger, Mark C Willingham, Martha A Alexander-Miller, C von Kap-Herr, Mark J Pettenati, Anne M Sanders, et al. 2006. “Transferable Anticancer Innate Immunity in Spontaneous Regression/complete Resistance Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (20): 7753–58. doi:10.1073/pnas.0602382103.
- Hildner, K, B T Edelson, W E Purtha, M Diamond, H Matsushita, M Kohyama, B Calderon, et al. 2008. “Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity.” *Science* 322 (5904): 1097–1100. doi:10.1126/science.1164206.
- Horelt, Alexia, Kai Uwe Belge, Birgit Steppich, Jörg Prinz, and Löms Ziegler-Heitbrock. 2002. “The CD14+CD16+ Monocytes in Erysipelas Are Expanded and Show Reduced Cytokine Production.” *European Journal of Immunology* 32 (5): 1319–27. doi:10.1002/1521-4141(200205)32:5<1319::AID-IMMU1319>3.0.CO;2-2.
- Horwitz, D a, a C Allison, P Ward, and N Kight. 1977. “Identification of Human Mononuclear Leucocyte Populations by Esterase Staining.” *Clinical and Experimental Immunology* 30: 289–98.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1541110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hotchkiss, Richard S., Guillaume Monneret, and Didier Payen. 2013. “Sepsis-Induced Immunosuppression: From Cellular Dysfunctions to Immunotherapy.” *Nature Reviews Immunology* 13 (12). Nature Publishing Group: 862–74. doi:10.1038/nri3552.

- Hotchkiss, RS, G Monneret, and D Payen. 2013. “Immunosuppression in Sepsis: A Novel Understanding of the Disorder and a New Therapeutic Approach.” *Lancet Infectious Diseases* 13 (3): 260–68. doi:10.1016/S1473-3099(13)70001-X.Immunosuppression.
- Huang, Bo, Ping Ying Pan, Qingsheng Li, Alice I. Sato, David E. Levy, Jonathan Bromberg, Celia M. Divino, and Shu Hsia Chen. 2006. “Gr-1+CD115+ Immature Myeloid Suppressor Cells Mediate the Development of Tumor-Induced T Regulatory Cells and T-Cell Anergy in Tumor-Bearing Host.” *Cancer Research* 66 (2): 1123–31. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1299.
- Huang, Jun, Christina Meyer, and Cheng Zhu. 2012. “T Cell Antigen Recognition at the Cell Membrane.” *Molecular Immunology* 52 (3–4): 155–64. doi:10.1016/j.molimm.2012.05.004.
- Huber, René, Daniel Pietsch, Johannes Günther, Bastian Welz, Nico Vogt, and Korbinian Brand. 2014. “Regulation of Monocyte Differentiation by Specific Signaling Modules and Associated Transcription Factor Networks.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (1): 63–92. doi:10.1007/s00018-013-1322-4.
- Huse, Morgan, Björn F Lillemeier, Michael S Kuhns, Daniel S Chen, and Mark M Davis. 2006. “T Cells Use Two Directionally Distinct Pathways for Cytokine Secretion.” *Nature Immunology* 7 (3): 247–55. doi:10.1038/ni1304.
- Inaba, K, M Inaba, M Deguchi, K Hagi, R Yasumizu, S Ikehara, S Muramatsu, and R M Steinman. 1993. “Granulocytes, Macrophages, and Dendritic Cells Arise from a Common Major Histocompatibility Complex Class II-Negative Progenitor in Mouse Bone Marrow.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (7): 3038–42. doi:10.1073/pnas.90.7.3038.
- Inaba, Kayo, Muneo Inaba, Nikolaus Romani, Hideki Aya, Masachi Deguchi, Susumu Ikehara, Shigeru Muramatsu, and Ralph M. Steinman. 1992. “Generation of Large Numbers of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow Cultures Supplemented with Granulocyte/macrophage Colony-Stimulating Factor.” *The Journal of Experimental Medicine* 176 (6): 1693–1702. doi:10.1084/jem.176.6.1693.
- Ingersoll, Ma, Rainer Spanbroek, Claudio Lottaz, E Gautier, M Frankenberger, R Hoffmann, R Lang, et al. 2010. “Comparison of Gene Expression Profiles between Human and Mouse Monocyte Subsets.” *Blood* 115 (3): 10–20. doi:10.1182/blood-2009-07-

235028.differential.

- Ito, Yoshinori, Ayako Demachi-Okamura, Rieko Ohta, Yoshiki Akatsuka, Keiko Nishida, Kunio Tsujimura, Yasuo Morishima, Toshitada Takahashi, and Kiyotaka Kuzushima. 2007. “Full-Length EBNA1 mRNA-Transduced Dendritic Cells Stimulate Cytotoxic T Lymphocytes Recognizing a Novel HLA-Cw*0303- and -Cw*0304-Restricted Epitope on EBNA1-Expressing Cells.” *Journal of General Virology* 88 (3): 770–80. doi:10.1099/vir.0.82519-0.
- Jakubzick, Claudia, Frank Tacke, Florent Ginhoux, Amy J. Wagers, Nico van Rooijen, Matthias Mack, Miriam Merad, and Gwendalyn J. Randolph. 2008. “Blood Monocyte Subsets Differentially Give Rise to CD103+ and CD103- Pulmonary Dendritic Cell Populations.” *Journal of Immunology* 180 (5): 3019–27. doi:10.4049/jimmunol.180.5.3019.
- Jongbloed, Sarah L, Andrew J Kassianos, Kylie J McDonald, Georgina J Clark, Xinsheng Ju, Catherine E Angel, Chun-Jen J Chen, et al. 2010. “Human CD141+ (BDCA-3)+ Dendritic Cells (DCs) Represent a Unique Myeloid DC Subset That Cross-Presents Necrotic Cell Antigens.” *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1247–60. doi:10.1084/jem.20092140.
- Jorritsma, Patricia J, Jennifer L Brogdon, and Kim Bottomly. 2003. “Role of TCR-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in the Regulation of Early IL-4 Expression in Naive CD4+ T Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (5): 2427–34. doi:10.4049/jimmunol.170.5.2427.
- Ka, Mignane B, Aurélie Daumas, Julien Textoris, and Jean-Louis Mege. 2014. “Phenotypic Diversity and Emerging New Tools to Study Macrophage Activation in Bacterial Infectious Diseases.” *Frontiers in Immunology* 5 (October): 500. doi:10.3389/fimmu.2014.00500.
- Kaukonen, Kirsi-Maija, Michael Bailey, David Pilcher, D. Jamie Cooper, and Rinaldo Bellomo. 2015. “Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis.” *Nejm* 372 (17): 1629–38. doi:10.1056/NEJMoa1415236.
- KC, Wumesh, Ansuman T Satpathy, Aaron S Rapaport, Carlos G Briseño, Xiaodi Wu, Jörn C Albring, Emilie V Russler-Germain, et al. 2014. “L-Myc Expression by Dendritic Cells Is Required for Optimal T-Cell Priming.” *Nature* 507 (7491): 243–47. doi:10.1038/nature12967.

- Kim, Woong-Ki, Yue Sun, Hien Do, Patrick Autissier, Elkan F Halpern, Michael Piatak, Jeffrey D Lifson, Tricia H Burdo, Michael S McGrath, and Kenneth Williams. 2010. “Monocyte Heterogeneity Underlying Phenotypic Changes in Monocytes according to SIV Disease Stage.” *Journal of Leukocyte Biology* 87 (4): 557–67. doi:10.1189/jlb.0209082.
- Kjeldsen, L, A H Johnsen, H Sengeløv, and N Borregaard. 1993. “Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (14): 10425–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683678>.
- Klechevsky, Eynav, Rimpei Morita, Maochang Liu, Yanying Cao, Luann Thompson-snipes, Francine Briere, Damien Chaussabel, et al. 2008. “Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells.” *Immunity* 29 (3): 497–510. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.013.Functional.
- Knoblich, Juergen A. 2008. “Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division.” *Cell* 132 (4): 583–97. doi:10.1016/j.cell.2008.02.007.
- Köhler, Anja, Katia De Filippo, Mike Hasenberg, Cindy Van Den Brandt, Emma Nye, Martin P. Hosking, Thomas E. Lane, et al. 2011. “G-CSF-Mediated Thrombopoietin Release Triggers Neutrophil Motility and Mobilization from Bone Marrow via Induction of Cxcr2 Ligands.” *Blood* 117 (16): 4349–57. doi:10.1182/blood-2010-09-308387.
- Kolaczowska, Elzbieta, and Paul Kubes. 2013. “Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation.” *Nature Reviews. Immunology* 13 (3). Nature Publishing Group: 159–75. doi:10.1038/nri3399.
- Kupfer, a, T R Mosmann, and H Kupfer. 1991. “Polarized Expression of Cytokines in Cell Conjugates of Helper T Cells and Splenic B Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (February): 775–79. doi:10.1073/pnas.88.3.775.
- Kupfer, Abraham, and G Dennert. 1984. “Reorientation of the Microtubule-Organizing Center and the Golgi Apparatus in Cloned Cytotoxic Lymphocytes Triggered by Binding to Lysable Target Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* 133 (5): 2762–66. <http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/133/5/2762%5Cnpapers://97385964-6ca2-4a97-a2c2-50e6f3185c2f/Paper/p640>.

- Kurihara, By Takao, Glenn Warr, James Loy, and Rodrigo Bravo. 1997. “Mice Lacking the CCR2 Chemokine Receptor.” *J Exp Med* 186 (10): 1757–62.
- Kurotaki, Daisuke, Naoki Osato, Akira Nishiyama, Michio Yamamoto, Tatsuma Ban, Hideaki Sato, Marina Umehara, et al. 2013. “Essential Role of the IRF8-KLF4 Transcription Factor Cascade in Murine Monocyte Differentiation Regular Article Essential Role of the IRF8-KLF4 Transcription Factor Cascade in Murine Monocyte Differentiation” 121 (10): 1839–49. doi:10.1182/blood-2012-06-437863.
- Kuziel, W a, S J Morgan, T C Dawson, S Griffin, O Smithies, K Ley, and N Maeda. 1997. “Severe Reduction in Leukocyte Adhesion and Monocyte Extravasation in Mice Deficient in CC Chemokine Receptor 2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (22): 12053–58. doi:10.1073/pnas.94.22.12053.
- Lachmandas, Ekta, Lily Boutens, Jacqueline M. Ratter, Anneke Hijmans, Guido J. Hooiveld, Leo A. B. Joosten, Richard J. Rodenburg, et al. 2016. “Microbial Stimulation of Different Toll-like Receptor Signalling Pathways Induces Diverse Metabolic Programmes in Human Monocytes.” *Nature Microbiology*. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.246.
- Laouar, Yasmina, Thomas Welte, Xin Yuan Fu, and Richard A. Flavell. 2003. “STAT3 Is Required for Flt3L-Dependent Dendritic Cell Differentiation.” *Immunity* 19 (6): 903–12. doi:10.1016/S1074-7613(03)00332-7.
- Larizza, P. 1937. “Beitrag Zur Kenntnis Der Chemischen Zusammensetzung Der Weissen Blutzellen Des Menschlichen Blutes.” *Ztschrift. F. D. Ges. Exper. Med.* 101 (615).
- Lavin, Yonit, Deborah Winter, Ronnie Blecher-Gonen, Eyal David, Hadas Keren-Shaul, Miriam Merad, Steffen Jung, and Ido Amit. 2014. “Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment.” *Cell* 159 (6). Elsevier Inc.: 1312–26. doi:10.1016/j.cell.2014.11.018.
- Lawrence, Toby, and Gioacchino Natoli. 2011. “Transcriptional Regulation of Macrophage Polarization: Enabling Diversity with Identity.” *Nature Reviews Immunology* 11 (11). Nature Publishing Group: 750–61. doi:10.1038/nri3088.
- Lee, I H, W P Li, K B Hisert, and L B Ivashkiv. 1999. “Inhibition of Interleukin 2 Signaling and Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)5 Activation during T Cell Receptor-Mediated Feedback Inhibition of T Cell Expansion.” *J Exp Med* 190 (9): 1263–

74.

- Lehtonen, Anne, Ville Veckman, Tuomas Nikula, Riitta Lahesmaa, Leena Kinnunen, Sampsa Matikainen, and Ilkka Julkunen. 2005. "Differential Expression of IFN Regulatory Factor 4 Gene in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Macrophages." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (10): 6570–79. doi:10.4049/jimmunol.175.10.6570.
- León, Beatriz, María López-Bravo, and Carlos Ardavín. 2007. "Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania." *Immunity* 26 (4): 519–31. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.017.
- León, Beatriz, Gloria Martínez Del Hoyo, Verónica Parrillas, Héctor Hernández Vargas, Paloma Sánchez-Mateos, Natividad Longo, María López-Bravo, and Carlos Ardavín. 2004. "Dendritic Cell Differentiation Potential of Mouse Monocytes: Monocytes Represent Immediate Precursors of CD8- and CD8+ Splenic Dendritic Cells." *Blood* 103 (7): 2668–76. doi:10.1182/blood-2003-01-0286.
- Lesnik, Philippe, Christopher A Haskell, and Israel F Charo. 2003. "Decreased Atherosclerosis in CX 3 CR1 $-/-$ Mice Reveals a Role for Fractalkine in Atherogenesis." *Journal of Clinical Investigation Feb* 111 (3): 333–40. doi:10.1172/JCI200315555.Introduction.
- Li, Haiyan S, Cliff Y Yang, Kalyan C Nallaparaju, Huiyuan Zhang, Yong-jun Liu, Ananda W Goldrath, and Stephanie S Watowich. 2012. "The Signal Transducers STAT5 and STAT3 Control Expression of Id2 and E2-2 during Dendritic Cell Development The Signal Transducers STAT5 and STAT3 Control Expression of Id2 and E2-2 during Dendritic Cell Development" 120 (22): 4363–74. doi:10.1182/blood-2012-07-441311.
- Liao, Wei, Dustin E Schones, Jangsuk Oh, Yongzhi Cui, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Keji Zhao, and Warren J Leonard. 2008. "Priming for T Helper Type 2 Differentiation by Interleukin 2-Mediated Induction of Interleukin 4 Receptor Alpha-Chain Expression." *Nature Immunology* 9 (11): 1288–96. doi:10.1038/ni.1656.
- Lukaszewicz, Anne-Claire, Marion Griénay, Matthieu Resche-Rigon, Romain Pirracchio, Valérie Faivre, Bernadette Boval, and Didier Payen. 2009. "Monocytic HLA-DR Expression in Intensive Care Patients: Interest for Prognosis and Secondary Infection Prediction." *Critical Care Medicine* 37 (10): 2746–52.

doi:10.1097/CCM.0b013e3181ab858a.

- Mantovani, Alberto. 2008. “From Phagocyte Diversity and Activation to Probiotics: Back to Metchnikoff.” *European Journal of Immunology* 38 (12): 3269–73. doi:10.1002/eji.200838918.
- Mantovani, Alberto, Silvano Sozzani, Massimo Locati, Paola Allavena, and Antonio Sica. 2002. “Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes.” *Trends in Immunology* 23 (11): 549–55. doi:10.1016/S1471-4906(02)02302-5.
- Mao, Yumeng, Isabel Poschke, Erik Wennerberg, Yago Pico De Coaña, Suzanne Egyhazi Brage, Inkeri Schultz, Johan Hansson, Giuseppe Masucci, Andreas Lundqvist, and Rolf Kiessling. 2013. “Melanoma-Educated CD14+ Cells Acquire a Myeloid-Derived Suppressor Cell Phenotype through COX-2-Dependent Mechanisms.” *Cancer Research* 73 (13): 3877–87. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4115.
- Maraskovsky, E, K Brasel, M Teepe, E R Roux, S D Lyman, K Shortman, and H J McKenna. 1996. “Dramatic Increase in the Numbers of Functionally Mature Dendritic Cells in Flt3 Ligand-Treated Mice: Multiple Dendritic Cell Subpopulations Identified.” *The Journal of Experimental Medicine* 184 (5): 1953–62. doi:10.1084/jem.184.5.1953.
- Martin-Cofreces, N B, D Sancho, E Fernandez, M Vicente-Manzanares, M Gordon-Alonso, M C Montoya, F Michel, O Acuto, B Alarcon, and F Sanchez-Madrid. 2006. “Role of Fyn in the Rearrangement of Tubulin Cytoskeleton Induced through TCR.” *J Immunol* 176 (7): 4201–7. doi:176/7/4201 [pii].
- Martin, Greg S, David M Mannino, Stephanie Eaton, and Marc Moss. 2003. “The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000.” *The New England Journal of Medicine* 348 (16): 1546–54. doi:10.1056/NEJMoa022139.
- Marvel, Douglas, and Dmitry I Gabrilovich. 2015. “Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment : Expect the Unexpected.” *The Journal Clinical Investigation* 125 (9): 3356–64. doi:10.1172/JCI80005.Definition.
- Matteo Rigolin, G, J Howard, a Buggins, C Sneddon, G Castoldi, W J Hirst, and G J Mufti. 1999. “Phenotypic and Functional Characteristics of Monocyte-Derived Dendritic Cells from Patients with Myelodysplastic Syndromes.” *British Journal of Haematology* 107 (4):

844–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606893>.

- Matthews, K, N P Chung, P J Klasse, J P Moore, and R W Sanders. 2012. “Potent Induction of Antibody-Secreting B Cells by Human Dermal-Derived CD14+ Dendritic Cells Triggered by Dual TLR Ligation.” *J Immunol* 189 (12): 5729–44. doi:10.4049/jimmunol.1200601.
- Mayer, Jens M., Michael Raraty, John Slavin, Esko Kempainen, John Fitzpatrick, Antti Hietaranta, Pauli Puolakkainen, Hans G. Beger, and John P. Neoptolemos. 2002. “Severe Acute Pancreatitis Is Related to Increased Early Urinary Levels of the Activation Peptide of Pancreatic Phospholipase A2.” *Pancreatology* 2 (6). Elsevier: 535–42. doi:10.1159/000066098.
- Mazzoni, Alessandra, Vincenzo Bronte, Alberto Visintin, Jessica H Spitzer, Elisa Apolloni, Paolo Serafini, Paola Zanovello, and David M Segal. 2002. “Myeloid Suppressor Lines Inhibit T Cell Responses by an NO-Dependent Mechanism.” *Journal of Immunology* 168 (2): 689–95. doi:10.4049/jimmunol.168.2.689.
- McGovern, Naomi, Andreas Schlitzer, Merry Gunawan, Laura Jardine, Amanda Shin, Elizabeth Poyner, Kile Green, et al. 2014. “Human Dermal CD14+ Cells Are a Transient Population of Monocyte-Derived Macrophages.” *Immunity* 41 (3). The Authors: 465–77. doi:10.1016/j.immuni.2014.08.006.
- Merad, Miriam, Priyanka Sathé, Julie Helft, Jennifer Miller, and Arthur Mortha. 2013. “The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting.” *Annual Review of Immunology* 31: 563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- Mercer, Elinore M., Yin C. Lin, and Cornelis Murre. 2011. “Factors and Networks That Underpin Early Hematopoiesis.” *Seminars in Immunology* 23 (5). Elsevier Ltd: 317–25. doi:10.1016/j.smim.2011.08.004.
- Millrud, Camilla Rydberg, Caroline Bergenfelz, and Karin Leandersson. 2016. “On the Origin of Myeloid-Derived Suppressor Cells.” *Oncotarget*, 1–17. doi:10.18632/oncotarget.12278.
- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, and A. M. Hill. 2000. “M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm.” *The Journal of Immunology* 164 (12): 6166–73. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166.

- Mills, Evanna L., Beth Kelly, Angela Logan, Ana S H Costa, Mukund Varma, Clare E. Bryant, Panagiotis Tourlomousis, et al. 2016. “Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages.” *Cell* 167 (2): 457–470.e13. doi:10.1016/j.cell.2016.08.064.
- Minor, A. H, and L Burnett. 1948. “A Method for Obtaining Living Leukocytes from Human Peripheral Blood by Acceleration of Erythrocyte Sedimentation.” *Blood*, no. 3: 799–802.
- Mittag, Diana, Anna I Proietto, Thomas Loudovaris, Stuart I Mannering, David Vremec, Ken Shortman, Li Wu, and Leonard C Harrison. 2011. “Human Dendritic Cell Subsets from Spleen and Blood Are Similar in Phenotype and Function but Modified by Donor Health Status.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (11): 6207–17. doi:10.4049/jimmunol.1002632.
- Mobley, James L., Michael Leininger, Steven Madore, Theodore J. Baginski, and Richard Renkiewicz. 2007. “Genetic Evidence of a Functional Monocyte Dichotomy.” *Inflammation* 30 (6): 189–97. doi:10.1007/s10753-007-9036-0.
- Monneret, Guillaume, Alain Lepape, Nicolas Voirin, Julien Bohé, Fabienne Venet, Anne Lise Debard, Hélène Thizy, Jacques Bienvenu, François Gueyffier, and Philippe Vanhems. 2006. “Persisting Low Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR Expression Predicts Mortality in Septic Shock.” *Intensive Care Medicine* 32 (8): 1175–83. doi:10.1007/s00134-006-0204-8.
- Movahedi, Kiavash, Martin Guilliams, Jan Van Den Bossche, Rafael Van Den Bergh, Conny Gysemans, Alain Beschin, Patrick De Baetselier, and Jo A. Van Ginderachter. 2008. “Identification of Discrete Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cell Subpopulations with Distinct T Cell Suppressive Activity.” *Blood* 111 (8): 4233–44. doi:10.1182/blood-2007-07-099226.
- Mukherjee, Ratnadeep, Pijus Kanti Barman, Pravat Kumar Thatoi, and Rina Tripathy. 2015. “Non-Classical Monocytes Display Inflammatory Features : Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus.” *Scientific Reports*, no. May. Nature Publishing Group: 1–14. doi:10.1038/srep13886.
- Mukherjee, Ratnadeep, Pijus Kanti Barman, Pravat Kumar Thatoi, Rina Tripathy, Bidyut Kumar Das, and Balachandran Ravindran. 2015. “Non-Classical Monocytes Display Inflammatory Features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus.”

- Scientific Reports* 5 (1). Nature Publishing Group: 13886. doi:10.1038/srep13886.
- Munford, Robert S., and Jérôme Pugin. 2001. “Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (2): 316–21. doi:10.1164/ajrccm.163.2.2007102.
- Munoz, Carlos, Jean Carlet, Catherine Fitting, Benoit Misset, Jean Pierre Blériot, and Jean Marc Cavaillon. 1991. “Dysregulation of in Vitro Cytokine Production by Monocytes during Sepsis.” *Journal of Clinical Investigation* 88 (5): 1747–54. doi:10.1172/JCI115493.
- Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, Sergij Goerdt, Siamon Gordon, et al. 2014. “Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines.” *Immunity* 41 (1). Elsevier: 14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- Narni-Mancinelli, Emilie, Laura Campisi, Delphine Bassand, Julie Cazareth, Pierre Gounon, Nicolas Glaichenhaus, and Grégoire Lauvau. 2007. “Memory CD8+ T Cells Mediate Antibacterial Immunity via CCL3 Activation of TNF/ROI+ Phagocytes.” *Journal of Experimental Medicine* 204 (9).
- Navarro, María N, and Doreen a Cantrell. 2014. “Serine-Threonine Kinases in TCR Signaling.” *Nature Immunology* 15 (9): 808–14. doi:10.1038/ni.2941.
- Németh, Krisztián, Asada Leelahavanichkul, Peter S T Yuen, Balázs Mayer, Kent Doi, Pamela G Robey, Kantima Leelahavanichkul, et al. 2009. “Bone Marrow Stromal Cells Attenuate Sepsis via Prostaglandin E(2)-Dependent Reprogramming of Host Macrophages to Increase Their Interleukin-10 Production.” *Nature Medicine* 15 (1): 42–49. doi:10.1038/nm.1905.Bone.
- O’Neill, Luke A J, Rigel J Kishton, and Jeff Rathmell. 2016. “A Guide to Immunometabolism for Immunologists.” *Nature Reviews. Immunology*. doi:10.1038/nri.2016.70.
- Obermajer, Natasa, Ravikumar Muthuswamy, Jamie Lesnock, Robert P Edwards, and Pawel Kalinski. 2011. “Positive Feedback between PGE 2 and COX2 Redirects the Differentiation of Human Dendritic Cells toward Stable Myeloid-Derived Suppressor Cells.” *Blood* 118 (20): 5498–5505. doi:10.1182/blood-2011-07-365825.The.
- Ochoa, Maria Teresa, Anya Loncaric, Stephan R Krutzik, Todd C Becker, and Robert L Modlin. 2008. ““Dermal Dendritic Cells’ comprise Two Distinct Populations: CD1+ Dendritic

- Cells and CD209+ Macrophages.” *The Journal of Investigative Dermatology* 128 (9). Elsevier Masson SAS: 2225–31. doi:10.1038/jid.2008.56.
- Olweus, J, A BitMansour, R Warnke, P a Thompson, J Carballido, L J Picker, and F Lund-Johansen. 1997. “Dendritic Cell Ontogeny: A Human Dendritic Cell Lineage of Myeloid Origin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (23): 12551–56. doi:10.1073/pnas.94.23.12551.
- Omatsu, Yoshiki, Tomonori Iyoda, Yukino Kimura, Akiko Maki, Masaki Ishimori, Noriko Toyama-Sorimachi, and Kayo Inaba. 2005. “Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Defined by Increased Expression of an Inhibitory NK Receptor, Ly49Q.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (11): 6657–62. doi:174/11/6657 [pii].
- Onai, Nobuyuki, Kazutaka Kurabayashi, Mayuka Hosoi-Amaiike, Noriko Toyama-Sorimachi, Kouji Matsushima, Kayo Inaba, and Toshiaki Ohteki. 2013. “A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential.” *Immunity* 38 (5). Elsevier Inc.: 943–57. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.006.
- Palframan, R T, S Jung, G Cheng, W Weninger, Y Luo, M Dorf, D R Littman, et al. 2001. “Inflammatory Chemokine Transport and Presentation in HEV: A Remote Control Mechanism for Monocyte Recruitment to Lymph Nodes in Inflamed Tissues.” *The Journal of Experimental Medicine* 194 (9): 1361–73. doi:10.1084/jem.194.9.1361.
- Palucka, Karolina A, Nicolas Taquet, F Sanchez-Chapuis, and Jean Claude Gluckman. 1998. “Dendritic Cells as the Terminal Stage of Monocyte Differentiation.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (9): 4587–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9574566>.
- Passlick, B, D Flieger, and L Ziegler-Heitbrock. 1989. “Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood.” *Blood* 74 (7): 2527–34.
- Paul, Franziska, Ya’Ara Arkin, Amir Giladi, Diego Adhemar Jaitin, Ephraim Kenigsberg, Hadas Keren-Shaul, Deborah Winter, et al. 2015. “Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors.” *Cell* 163 (7). Elsevier Inc.: 1663–77. doi:10.1016/j.cell.2015.11.013.
- Payen, Didier, Valérie Faivre, A.C Lukawszewick, F Villa, and P Goldberg. 2009. “Expression of Monocyte Human Leukocyte Antigen-DR in Relation with Sepsis Severity and Plasma

- Mediators.” *Copyright, Minerva Medica*, no. September: 484–93.
- Penel-Sotirakis, Karine, Elise Simonazzi, Josette Péguet-Navarro, and Aurore Rozières. 2012. “Differential Capacity of Human Skin Dendritic Cells to Polarize CD4+T Cells into IL-17, IL-21 and IL-22 Producing Cells.” *PLoS ONE* 7 (11). doi:10.1371/journal.pone.0045680.
- Perera, Natascha C, Karl-Heinz Wiesmüller, Maria Torp Larsen, Beate Schacher, Peter Eickholz, Niels Borregaard, and Dieter E Jenne. 2013. “NSP4 Is Stored in Azurophil Granules and Released by Activated Neutrophils as Active Endoprotease with Restricted Specificity.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (5): 2700–2707. doi:10.4049/jimmunol.1301293.
- Pickl, W F, O Majdic, P Kohl, J Stockl, E Riedl, C Scheinecker, C Bello-Fernandez, and W Knapp. 1996. “Molecular and Functional Characteristics of Dendritic Cells Generated from Highly Purified CD14+ Peripheral Blood Monocytes.” *The Journal of Immunology* 157 (9): 3850–59. <http://jimmunol.org/content/157/9/3850.abstract>.
- Pillay, Janesh, Ineke Den Braber, Nienke Vrisekoop, Lydia M Kwast, Rob J De Boer, A M Borghans, Kiki Tesselaar, and Leo Koenderman. 2010. “Brief Report In Vivo Labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ Reveals a Human Neutrophil Lifespan of 5 . 4 Days.” *Blood* 116 (4): 625–27. doi:10.1182/blood-2010-01-259028.
- Poehlmann, Holger, Joerg C Schefold, Heidrun Zuckermann-Becker, Hans-Dieter Volk, and Christian Meisel. 2009. “Phenotype Changes and Impaired Function of Dendritic Cell Subsets in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Analysis.” *Critical Care (London, England)* 13 (4): 1–12. doi:10.1186/cc7969.
- Pollard, Jeffrey W. 2009. “Trophic Macrophages in Development and Disease.” *Nature Reviews Immunology* 9 (4): 259–70. doi:10.1038/nri2528.Trophic.
- Poulin, Lionel Franz, Mariolina Salio, Emmanuel Griessinger, Fernando Anjos-Afonso, Ligia Craciun, Ji-Li Chen, Anna M Keller, et al. 2010. “Characterization of Human DNGR-1+ BDCA3+ Leukocytes as Putative Equivalents of Mouse CD8alpha+ Dendritic Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1261–71. doi:10.1084/jem.20092618.
- Randolph, G J. 2001. “Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes: Cytokines, Chemokines, and Lipid Mediators.” *Seminars in Immunology* 13 (5): 267–74. doi:10.1006/smim.2001.0322.

- Rathinam, Chozhavendan, Robert Geffers, Raif Yücel, Jan Buer, Karl Welte, Tarik Möröy, and Christoph Klein. 2005. “The Transcriptional Repressor Gfi1 Controls STAT3-Dependent Dendritic Cell Development and Function.” *Immunity* 22 (6): 717–28. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.007.
- Reynolds, Gary, and Muzlifah Haniffa. 2015. “Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species?” *Frontiers in Immunology* 6 (JUN): 1–15. doi:10.3389/fimmu.2015.00330.
- Rice, WG, T Ganz, JM Kinkade, ME Selsted, RI Lehrer, and RT Parmley. 1987. “Defensin-Rich Dense Granules of Human Neutrophils.” *Blood* 70 (3): 757–65.
- Rice, WG, JM Kinkade, and RT Parmeley. 1986. “High Resolution of Heterogeneity among Human Neutrophil Granules: Physical, Biochemical, and Ultrastructural Properties of Isolated Fractions.” *Blood* 68 (2): 541–55. doi:0921-4526.
- Rissoan, M-C, Vassili Soumelis, N Kadowaki, G Grouard, F Briere, R de Waal Malefyt, and Y-J Liu. 1999. “Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation.” *Science* 283 (February): 1183–86. doi:10.1126/science.283.5405.1183.
- Rodrigues, Jennifer C., Guido C. Gonzalez, Lei Zhang, George Ibrahim, John J. Kelly, Michael P. Gustafson, Yi Lin, et al. 2010. “Normal Human Monocytes Exposed to Glioma Cells Acquire Myeloid-Derived Suppressor Cell-like Properties.” *Neuro-Oncology* 12 (4): 351–65. doi:10.1093/neuonc/nop023.
- Rodriguez, Paulo C., Marc S. Ernstoff, Claudia Hernandez, Michael Atkins, Jovanny Zabaleta, Rosa Sierra, and Augusto C. Ochoa. 2009. “Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes.” *Cancer Research* 69 (4): 1553–60. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1921.
- Rodriguez, Paulo C, David G Quiceno, Jovanny Zabaleta, Blair Ortiz, Arnold H Zea, Maria B Piauelo, Alberto Delgado, et al. 2004. “Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expr.” *Cancer Research* 64 (504): 5839–49. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0465.
- Romani, N, S Gruner, D Brang, E Kämpgen, A Lenz, B Trockenbacher, G Konwalinka, P O

- Fritsch, R M Steinman, and G Schuler. 1994. “Proliferating Dendritic Cell Progenitors in Human Blood.” *The Journal of Experimental Medicine* 180 (1): 83–93. doi:10.1084/jem.180.1.83.
- Romani, Nikolaus, Patrick M Brunner, and Georg Stingl. 2012. “Changing Views of the Role of Langerhans Cells.” *Journal of Investigative Dermatology* 132 (3). Elsevier Masson SAS: 872–81. doi:10.1038/jid.2011.437.
- Rosas, Marcela, Luke C Davies, Peter J Giles, Chia-Te Liao, Bashar Kharfan, Timothy C Stone, Valerie B O’Donnell, Donald J Fraser, Simon A Jones, and Philip R Taylor. 2014. “The Transcription Factor Gata6 Links Tissue Macrophage Phenotype and Proliferative Renewal.” *Science* 344 (6184): 645–48. doi:10.1126/science.1251414.
- Rosenbauer, Frank, and Daniel G Tenen. 2007. “Transcription Factors in Myeloid Development: Balancing Differentiation with Transformation.” *Nature Reviews. Immunology* 7 (2): 105–17. doi:10.1038/nri2024.
- Rossol, Manuela, Stephan Kraus, Matthias Pierer, Christoph Baerwald, and Ulf Wagner. 2012. “The CD14⁺ brightCD16⁺ Monocyte Subset Is Expanded in Rheumatoid Arthritis and Promotes Expansion of the Th17 Cell Population.” *Arthritis and Rheumatism* 64 (3): 671–77. doi:10.1002/art.33418.
- Sagiv, Jitka Y., Janna Michaeli, Simaan Assi, Inbal Mishalian, Hen Kisos, Liran Levy, Pazzit Damti, et al. 2015a. “Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer.” *Cell Reports* 10 (4). The Authors: 562–74. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.039.
- . 2015b. “Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer.” *Cell Reports* 10 (4). The Authors: 562–74. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.039.
- Sallusto, By Federica, and Antonio Lanzavecchia. 1994. “Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by GM-CSF plus IL4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor Alpha.” *Journal of Experimental Medicine* 179 (April).
- Salmond, Robert J., Andrew Filby, Ihjaaz Qureshi, Stefano Caserta, and Rose Zamoyska. 2009. “T-Cell Receptor Proximal Signaling via the Src-Family Kinases, Lck and Fyn, Influences T-Cell Activation, Differentiation, and Tolerance.” *Immunological Reviews* 228 (1): 9–22.

doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00745.x.

- Sánchez-Torres, C, G S García-Romo, M a Cornejo-Cortés, a Rivas-Carvalho, and G Sánchez-Schmitz. 2001. “CD16+ and CD16- Human Blood Monocyte Subsets Differentiate in Vitro to Dendritic Cells with Different Abilities to Stimulate CD4+ T Cells.” *International Immunology* 13 (12): 1571–81. doi:10.1093/intimm/13.12.1571.
- Sancho, D, M Vicente-Manzanares, M Mittelbrunn, M C Montoya, M Gordon-Alonso, J M Serrador, and F Sanchez-Madrid. 2002. “Regulation of Microtubule-Organizing Center Orientation and Actomyosin Cytoskeleton Rearrangement during Immune Interactions.” *Immunol Rev* 189 (2): 84–97. doi:imr18908 [pii].
- Satpathy, Ansuman T, Wumesh Kc, Jörn C Albring, Brian T Edelson, Nicole M Kretzer, Deepta Bhattacharya, Theresa L Murphy, and Kenneth M Murphy. 2012. “Zbtb46 Expression Distinguishes Classical Dendritic Cells and Their Committed Progenitors from Other Immune Lineages.” *The Journal of Experimental Medicine* 209 (6): 1135–52. doi:10.1084/jem.20120030.
- Schakel, Knut, Reiji Kannagi, Bernhard Kniep, Yoshiko Goto, Chikako Mitsuoka, Afsaneh Soruri, Matthias Von Kietzell, and E Peter Rieber. 2002. “6-Sulfo LacNAc , a Novel Carbohydrate Modification of PSGL-1 , Defines an Inflammatory Type of Human Dendritic Cells.” *Immunity* 17: 289–301.
- Schlitzer, Andreas, Naomi Mcgovern, and Florent Ginhoux. 2015. “Dendritic Cells and Monocyte-Derived Cells: Two Complementary and Integrated Functional Systems.” *Seminars in Cell and Developmental Biology* 41. Elsevier Ltd: 9–22. doi:10.1016/j.semcdb.2015.03.011.
- Schmidl, Christian, Kathrin Renner, Katrin Peter, Ruediger Eder, Timo Lassmann, Piotr J Balwierz, Masayoshi Itoh, et al. 2014. “Transcription and Enhancer Profiling in Human Monocyte Subsets.” *Blood* 123 (17): 90–100. doi:10.1182/blood-2013-02-484188.
- Schmielau, Jan, and Olivera J Finn. 2001. “Activated Granulocytes and Granulocyte-Derived Hydrogen Peroxide Are the Underlying Mechanism of Suppression of T-Cell Function in Advanced Cancer Patients Activated Granulocytes and Granulocyte-Derived Hydrogen Peroxide Are the Underlying Mechanism of Su.” *Cancer Research* 61: 4756–60.
- Schnurr, M, F Then, P Galambos, C Scholz, B Siegmund, S Endres, and a Eigler. 2000.

- “Extracellular ATP and TNF-Alpha Synergize in the Activation and Maturation of Human Dendritic Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (8): 4704–9. doi:10.4049/jimmunol.165.8.4704.
- Schraml, Barbara U., Janneke Van Blijswijk, Santiago Zelenay, Paul G. Whitney, Andrew Filby, Sophie E. Acton, Neil C. Rogers, Natalia Moncaut, Jaime J. Carvajal, and Caetano Reis E Sousa. 2013. “Genetic Tracing via DNGR-1 Expression History Defines Dendritic Cells as a Hematopoietic Lineage.” *Cell* 154 (4). Elsevier Inc.: 843–58. doi:10.1016/j.cell.2013.07.014.
- Schroder, Kate, Paul J Hertzog, Timothy Ravasi, and David A Hume. 2004. “Interferon- Y : An Overview of Signals , Mechanisms and Functions.” *Journal of Leukocyte Biology* 75 (February): 163–89. doi:10.1189/jlb.0603252.Journal.
- Segura, Elodie, Maxime Touzot, Armelle Bohineust, Antonio Cappuccio, Gilles Chiochia, Anne Hosmalin, Marc Dalod, Vassili Soumelis, and Sebastian Amigorena. 2013. “Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation.” *Immunity* 38 (2). Elsevier Inc.: 336–48. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.018.
- Segura, Elodie, Jenny Valladeau-Guilemond, Marie-Helene Donnadieu, Xavier Sastre-Garau, Vassili Soumelis, and Sebastian Amigorena. 2012. “Characterization of Resident and Migratory Dendritic Cells in Human Lymph Nodes.” *The Journal of Experimental Medicine* 209 (4): 653–60. doi:10.1084/jem.20111457.
- Serbina, Natalya V., Thais P. Salazar-Mather, Christine A. Biron, William A. Kuziel, and Eric G. Pamer. 2003. “TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection.” *Immunity* 19 (1): 59–70. doi:10.1016/S1074-7613(03)00171-7.
- Serbina, Natalya V, Ting Jia, Tobias M Hohl, and Eric G Pamer. 2008. “Monocyte-Mediated Defense against Microbial Pathogens.” *Annual Review of Immunology* 26: 421–52. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326.
- Serbina, Natalya V, William Kuziel, Richard Flavell, Shizuo Akira, Barrett Rollins, Eric G Pamer, and New Haven. 2003. “Sequential MyD88-Independent and -Dependent Activation of Innate Immune Responses to Intracellular Bacterial Infection University of Texas at Austin” 19: 891–901.

- Serhan, Charles N, Sue D Brain, Christopher D Buckley, Derek W Gilroy, Christopher Haslett, Luke A J O'Neill, Mauro Perretti, Adriano G Rossi, and John L Wallace. 2007. "Resolution of Inflammation: State of the Art, Definitions and Terms." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (2): 325–32. doi:10.1096/fj.06-7227rev.
- Shalova, Irina N, Tasneem Kajiji, Jyue Yuan Lim, Vanesa Gómez-Piña, Irene Fernández-Ruíz, Francisco Arnalich, Philip Tsau Choong Iau, Eduardo López-Collazo, Siew-Cheng Wong, and Subhra K Biswas. 2012. "CD16 Regulates TRIF-Dependent TLR4 Response in Human Monocytes and Their Subsets." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (8): 3584–93. doi:10.4049/jimmunol.1100244.
- Shenghui, He, Daisuke Nakada, Sean J. Morrison, S He, Daisuke Nakada, and Sean J. Morrison. 2009. "Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal." *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25 (1): 377–406. doi:10.1016/B978-0-12-409503-8.00007-X.
- Sica, A, and Alberto Mantovani. 2012. "Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas." *Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 787–95. doi:10.1172/JCI59643DS1.
- Siedlar, Maciej, Marion Frankenberger, Loems Ziegler-heitbrock, and Kai-uwe Belge. 2000. "The M-DC8-Positive Leukocytes Are a Subpopulation of the CD14 + CD16 + Monocytes." *Immunobiology* 202 (June 2000): 11–17.
- Silvestre-Roig, Carlos, Andres Hidalgo, and Oliver Soehnlein. 2016. "Neutrophil Heterogeneity: Implications for Homeostasis and Pathogenesis." *Blood* 127 (18): 2173–81. doi:10.1182/blood-2016-01-688887.
- Singer, Mervyn, Clifford S Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar-hari, Djillali Annane, Michael Bauer, Rinaldo Bellomo, et al. 2016. "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)." *JAMA* 315 (8): 801–10. doi:10.1001/jama.2016.0287.The.
- Sinha, Pratima, Virginia K Clements, Stephanie K Bunt, Steven M Albelda, and Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2007. "Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response." *Journal of Immunology* 179 (2): 977–83. doi:10.4049/JIMMUNOL.179.2.977.
- Skoog, WA, and WS Beck. 1955. "Studies on the Fibrinogen, Dextran and Phytohemagglutinin

- Methods of Isolating Leukocytes.” *Blood* 11: 436–54.
- Skrzeczynska-Moncznik, J., M. Bzowska, S. Loseke, E. Grage-Griebenow, M. Zembala, and J. Pryjma. 2008. “Peripheral Blood CD14^{high} CD16⁺ Monocytes Are Main Producers of IL-10.” *Scandinavian Journal of Immunology* 67 (2): 152–59. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x.
- Smedman, C., T. Ernemar, L. Gudmundsdotter, P. Gille-Johnson, A. Somell, K. Nihlmark, B. Gårdlund, J. Andersson, and S. Paulie. 2012. “FluoroSpot Analysis of TLR-Activated Monocytes Reveals Several Distinct Cytokine-Secreting Subpopulations.” *Scandinavian Journal of Immunology* 75 (2): 249–58. doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02641.x.
- Solito, Samantha, Ilaria Marigo, Laura Pinton, Vera Damuzzo, Susanna Mandruzzato, and Vincenzo Bronte. 2014. “Myeloid-Derived Suppressor Cell Heterogeneity in Human Cancers.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1319 (1): 47–65. doi:10.1111/nyas.12469.
- Sozzani, Silvano, Paola Allavena, Annunciata Vecchi, and Alberto Mantovani. 2000. “Chemokines and Dendritic Cell Traffic.” *Journal of Clinical Immunology* 20 (3): 151–60. doi:10.1023/A:1006659211340.
- Sprangers, Sara, Teun J De Vries, and Vincent Everts. 2016. “Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells.” *Journal of Immune Research* 2016: 1–10. doi:10.1155/2016/1475435.
- Sprung, C L., Y Sakr, JL Vincent, JR Le Gall, K Reinhart, V. M Ranieri, H Gerlach, J Fielden, C. B. Groba, and D Payen. 2006. “An Evaluation of Systemic Inflammatory Response Syndrome Signs in the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP) Study.” *Intensive Care Medicine* 32 (3): 421–27. doi:10.1007/s00134-005-0039-8.
- Srivastava, Minu K., Pratima Sinha, Virginia K. Clements, Paulo Rodriguez, and Suzanne Ostrand-Rosenberg. 2010. “Myeloid-Derived Suppressor Cells Inhibit T-Cell Activation by Depleting Cystine and Cysteine.” *Cancer Research* 70 (1): 68–77. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2587.
- Steinman, Ralph M, and Jacques Banchereau. 2007. “Taking Dendritic Cells into Medicine.” *Nature* 449 (7161): 419–26. doi:10.1038/nature06175.
- Steinman, Ralph M, and Margaret D Witmer. 1978. “Lymphoid Dendritic Cells Are Potent

- Stimulators of the Primary Mixed Leukocyte Reaction in Mice Immunology :” *Proc Natl Acad Sci* 75 (10): 5132–36. doi:10.1084/jem.157.2.613.
- Steinman, RM, and ZA Cohn. 1973. “Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution.” *The Journal of Experimental Medicine* 137: 1142–62.
- Steinman RM, Idoyaga J. 2010. “Features of the Dendritic Cell Lineage.” *Immunol Rev* 234 (1): 5–17. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00888.x.
- Stoiser, B, S Knapp, F Thalhammer, G J Locker, J Kofler, U Hollenstein, T Staudinger, A Wilfing, M Frass, and H Burgmann. 1998. “Time Course of Immunological Markers in Patients with the Systemic Inflammatory Response Syndrome: Evaluation of sCD14, sVCAM-1, sELAM-1, MIP-1 Alpha and TGF-Beta 2.” *European Journal of Clinical Investigation* 28 (8): 672–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767363>.
- Stout, Robert D, and Jill Suttles. 2004. “Functional Plasticity of Macrophages: Reversible Adaptation to Changing Microenvironments.” *Journal of Leukocyte Biology* 76 (3): 509–13. doi:10.1189/jlb.0504272.
- Sunderkötter, Cord, Tatjana Nikolic, Marilyn J. Dillon, Nico van Rooijen, Martin Stehling, Douglas A. Drevets, and Pieter J. M. Leenen. 2004. “Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response.” *The Journal of Immunology* 172: 4410–17. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4410.
- Sundqvist, Martina, Per Wekell, Veronica Osla, Johan Bylund, Karin Christenson, Karin Sävman, Dirk Foell, et al. 2013. “Increased Intracellular Oxygen Radical Production in Neutrophils during Febrile Episodes of Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, and Cervical Adenitis Syndrome.” *Arthritis and Rheumatism* 65 (11): 2971–83. doi:10.1002/art.38134.
- Suzuki, T, P Arumugam, T Sakagami, N Lachmann, C Chalk, A Sallese, S Abe, et al. 2014. “Pulmonary Macrophage Transplantation Therapy.” *Nature* 514 (7523). Nature Publishing Group: 450–54. doi:10.1038/nature13807.
- Swirski, Filip K. 2010. “Identification of Splenic Reservoir.” *Science* 612 (July): 612–16. doi:10.1126/science.1175202.
- Szilard, G. 1926. “Eine Methode Zur Isolierten Gewinnung Der Weissen Blutkoerperchen.”

Physiologie 211 (597).

- Tacke, Frank, and Gwendalyn J. Randolph. 2006. “Migratory Fate and Differentiation of Blood Monocyte Subsets.” *Immunobiology* 211 (6–8): 609–18. doi:10.1016/j.imbio.2006.05.025.
- Takala, A., I. Jousela, S. E. Jansson, K. T. Olkkola, O. Takkunen, A. Orpana, S. L. Karonen, and H. Repo. 1999. “Markers of Systemic Inflammation Predicting Organ Failure in Community-Acquired Septic Shock.” *Clinical Science (London, England : 1979)* 97 (5): 529–38. doi:10.1042/CS19990073.
- Taniguchi, Takumi, Yuichi Koido, Jyunichi Aiboshi, Teruyo Yamashita, Shinichiro Suzaki, and Akira Kurokawa. 1999. “Change in the Ratio of Interleukin-6 to Interleukin-10 Predicts a Poor Outcome in Patients with Systemic Inflammatory Response Syndrome.” *Critical Care Medicine* 27 (7). http://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/1999/07000/Change_in_the_ratio_of_interleukin_6_to.5.aspx.
- Tannahill, G M, A M Curtis, J Adamik, E M Palsson-McDermott, A F McGettrick, G Goel, C Frezza, et al. 2013. “Succinate Is an Inflammatory Signal That Induces IL-1 β through HIF-1 α .” *Nature* 496 (7444). Nature Publishing Group: 238–42. doi:10.1038/nature11986.
- Terry, Rachael L., and Stephen D. Miller. 2014. “Molecular Control of Monocyte Development.” *Cellular Immunology* 291 (1–2). Elsevier Inc.: 16–21. doi:10.1016/j.cellimm.2014.02.008.
- Thomas, Graham D., Anouk A.J. Hamers, Catherine Nakao, Paola Marcovecchio, Angela M. Taylor, Chantel McSkimming, Anh Tram Nguyen, Coleen A. McNamara, and Catherine C. Hedrick. 2017. “Human Blood Monocyte Subsets: A New Gating Strategy Defined Using Cell Surface Markers Identified by Mass Cytometry.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309145.
- Todd, R F, L M Nadler, S F Schlossman, Robert F Todd, and Stuart F Schlossman. 1981. “Antigens on Human Monocytes Identified by Monoclonal Antibodies . Information about Subscribing to The Journal of Immunology Is Online at : ANTIGENS ON HUMAN MONOCYTES IDENTIFIED BY MONOCLONAL ANTIBODIES ’.” *Journal of Immunology* 126 (4): 1435–42.

- Umehara, Hisanori, Eda T. Bloom, Toshiro Okazaki, Yutaka Nagano, Osamu Yoshie, and Toshio Imai. 2004. “Fractalkine in Vascular Biology: From Basic Research to Clinical Disease.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (1): 34–40. doi:10.1161/01.ATV.0000095360.62479.1F.
- Vallee, B, W Hughes, and J Gibson. 1947. “A Method for the Separation of Leukocytes from Whole Blood by Flotation on Serum Albumin.” *Blood*.
- van der Poll, Tom, Frank L van de Veerdonk, Brendon P Scicluna, and Mihai G Netea. 2017. “The Immunopathology of Sepsis and Potential Therapeutic Targets.” *Nat Rev Immunol* 17 (7). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 407–20. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.36>.
- Van furth, R., and A. Cohn. 1968. “The Origin And Kinetics Of Mononuclear Phagocytes.” *Journal of Experimental Medicine* 1 (5): 415–35.
- Villadangos, José a, and Petra Schnorrer. 2007. “Intrinsic and Cooperative Antigen-Presenting Functions of Dendritic-Cell Subsets in Vivo.” *Nature Reviews. Immunology* 7 (7): 543–55. doi:10.1038/nri2103.
- Volk, H D, P Reinke, and W D Docke. 2000. “Clinical Aspects: From Systemic Inflammation to ‘Immunoparalysis.’” *Chem Immunol*.
- Wachstein, M, and G Wolf. 1958. “The Histochemical Demonstration of Esterase Activity in Human Blood and Bone Marrow Smears.” *J Histochem Cytochem*.
- Wakim, Linda M. 2008. “Dendritic Cell – Induced Memory T Cell.” *Science* 319: 198–203. doi:10.1126/science.1151869.
- Walasek, Marta A., Ronald van Os, and Gerald de Haan. 2012. “Hematopoietic Stem Cell Expansion: Challenges and Opportunities.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1266 (1): 138–50. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06549.x.
- Walsh, Kevin P., and Kingston H G Mills. 2013. “Dendritic Cells and Other Innate Determinants of T Helper Cell Polarisation.” *Trends in Immunology* 34 (11). Elsevier Ltd: 521–30. doi:10.1016/j.it.2013.07.006.
- Wang, Leo D, and Amy J Wagers. 2011. “Dynamic Niches in the Origination and Differentiation of Haematopoietic Stem Cells.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*

12 (10): 643–55. doi:10.1038/nrm3184.

- Waschbisch, Anne, Sina Schröder, Dana Schraudner, Babette Weksler, Arthur Melms, Christine Stadelmann, Stefan Schwab, A Linker, Stefan Schwab, and Ralf A Linker. 2017. “Pivotal Role for CD16 + Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System.” *The Journal of Immunology* 196: 1558–67. doi:10.4049/jimmunol.1501960.
- Weber, Christian, Kai-uwe Belge, Philipp Von Hundelshausen, Georg Draude, Birgit Steppich, Mathias Mack, Marion Frankenberger, Kim S C Weber, and H W Lo. 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.” *Journal of Leukocytes Biology* 67 (5): 699–704.
- Wong, Kok Loon, June Jing-Yi Tai, Wing-Cheong Wong, Hao Han, Xiaohui Sem, Wei-Hseun Yeap, Philippe Kourilsky, and Siew-Cheng Wong. 2011. “Gene Expression Profiling Reveals the Defining Features of the Classical, Intermediate, and Nonclassical Human Monocyte Subsets.” *Blood* 118 (5): e16-31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355.
- Wong, Kok Loon, Wei Hseun Yeap, June Jing Yi Tai, Siew Min Ong, Truong Minh Dang, and Siew Cheng Wong. 2012. “The Three Human Monocyte Subsets: Implications for Health and Disease.” *Immunologic Research* 53 (1–3): 41–57. doi:10.1007/s12026-012-8297-3.
- Wynn, Thomas A, Ajay Chawla, and Jeffrey W Pollard. 2013. “Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease.” *Nature* 496 (7446). Nature Publishing Group: 445–55. doi:10.1038/nature12034.
- Yamamoto, Michio, Takayuki Kato, Chie Hotta, Akira Nishiyama, Daisuke Kurotaki, Masahiro Yoshinari, Masamichi Takami, et al. 2011. “Shared and Distinct Functions of the Transcription Factors IRF4 and IRF8 in Myeloid Cell Development.” *PLoS ONE* 6 (10): 2–11. doi:10.1371/journal.pone.0025812.
- Yamane, Hidehiro, and William E. Paul. 2013. “Early Signaling Events That Underlie Fate Decisions of Naive CD4⁺ T Cells toward Distinct T-Helper Cell Subsets.” *Immunological Reviews* 252 (1): 12–23. doi:10.1111/imr.12032.
- Yamane, Hidehiro, Jinfang Zhu, and William E Paul. 2005. “Independent Roles for IL-2 and GATA-3 in Stimulating Naive CD4⁺ T Cells to Generate a Th2-Inducing Cytokine Environment.” *The Journal of Experimental Medicine* 202 (6): 793–804.

doi:10.1084/jem.20051304.

- Yanez, A, and H S Goodridge. 2016. “Interferon Regulatory Factor 8 and the Regulation of Neutrophil, Monocyte, and Dendritic Cell Production.” *Curr Opin Hematol* 23 (1): 11–17. doi:10.1097/moh.0000000000000196.
- Yi, Huanfa, Chunqing Guo, Xiaofei Yu, Daming Zuo, and Xiang-Yang Wang. 2012. “Mouse CD11b+Gr-1+ Myeloid Cells Can Promote Th17 Cell Differentiation and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189: 4295–4304. doi:10.4049/jimmunol.1200086.
- Youn, J.-I., S. Nagaraj, M. Collazo, and D. I. Gabrilovich. 2008. “Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice.” *The Journal of Immunology* 181 (8): 5791–5802. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5791.
- Youn, Je-In, Michelle Collazo, Irina N Shalova, Subhra K Biswas, and Dmitry I Gabrilovich. 2012. “Characterization of the Nature of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice.” *Journal of Leukocyte Biology* 91 (1): 167–81. doi:10.1189/jlb.0311177.
- Zawada, Adam M., Kyrill S. Rogacev, Björn Rotter, Peter Winter, Rolf R. Marell, Danilo Fliser, and Gunnar H. Heine. 2011. “SuperSAGE Evidence for CD14 ++CD16 + Monocytes as a Third Monocyte Subset.” *Blood* 118 (12). doi:10.1182/blood-2011-01-326827.
- Zawada, Adam M., Jenny S. Schneider, Anne I. Michel, Kyrill S. Rogacev, Björn Hummel, Nicolas Krezdorn, Soeren Müller, et al. 2016. “DNA Methylation Profiling Reveals Differences in the 3 Human Monocyte Subsets and Identifies Uremia to Induce DNA Methylation Changes during Differentiation.” *Epigenetics* 11 (4). Taylor & Francis: 259–72. doi:10.1080/15592294.2016.1158363.
- Zawada, Adam M., Lu Zhang, Insa E. Emrich, Kyrill S. Rogacev, Nicolas Krezdorn, Björn Rotter, Danilo Fliser, Yvan Devaux, Loems Ziegler-Heitbrock, and Gunnar H. Heine. 2017. “MicroRNA Profiling of Human Intermediate Monocytes.” *Immunobiology* 222 (3). Elsevier: 587–96. doi:10.1016/j.imbio.2016.11.006.
- Zhan, Y., Y. Xu, S. Seah, J. L. Brady, E. M. Carrington, C. Cheers, B. A. Croker, L. Wu, J. A. Villadangos, and A. M. Lew. 2010. “Resident and Monocyte-Derived Dendritic Cells Become Dominant IL-12 Producers under Different Conditions and Signaling Pathways.”

- The Journal of Immunology* 185 (4): 2125–33. doi:10.4049/jimmunol.0903793.
- Zhang, Dachuan, Grace Chen, Deepa Manwani, Arthur Mortha, Chunliang Xu, Jeremiah J Faith, Robert D Burk, et al. 2015. “Neutrophil Ageing Is Regulated by the Microbiome.” *Nature* 525 (7570): 528–32. doi:10.1038/nature15367.
- Zhang, Jian, Nobuyuki Kawashima, Hideaki Suda, Yukiko Nakano, Yoshiro Takano, and Miyuki Azuma. 2006. “The Existence of CD11c+ Sentinel and F4/80+ Interstitial Dendritic Cells in Dental Pulp and Their Dynamics and Functional Properties.” *International Immunology* 18 (9): 1375–84. doi:10.1093/intimm/dxl070.
- Zhao, Changqing, Huoming Zhang, Wing Cheong Wong, Xiaohui Sem, Hao Han, Siew Min Ong, Yann Chong Tan, et al. 2009. “Identification of Novel Functional Differences in Monocyte Subsets Using Proteomic and Transcriptomic Methods.” *Journal of Proteome Research* 8 (8): 4028–38. doi:10.1021/pr900364p.
- Zhu, Huaqun, Fanlei Hu, Xiaolin Sun, Xiaoying Zhang, Lei Zhu, Xu Liu, Xue Li, et al. 2016. “CD16+ Monocyte Subset Was Enriched and Functionally Exacerbated in Driving T-Cell Activation and B-Cell Response in Systemic Lupus Erythematosus!” *Frontiers in Immunology* 7 (November): 1–15. doi:10.3389/fimmu.2016.00512.
- Ziegler-Heitbrock, L, H Pechumer, I Petersmann, JJ Durieux, N Vita, M Labeta, and M Ströbel. 1994. “CD14 Is Expressed and Functional in Human B Cells.” *European Journal of Immunology* 24: 1937–40. doi:10.1007/s11263-006-7538-0.
- Ziegler-Heitbrock, Loems. 2007. “The CD14+ CD16+ Blood Monocytes: Their Role in Infection and Inflammation.” *Journal of Leukocyte Biology* 81 (3): 584–92. doi:10.1189/jlb.0806510.
- Ziegler-heitbrock, Loems, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, N Derek, Pieter J M Leenen, et al. 2010. “Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood.” *E-Blood* 116 (16): e74–80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558.
- Ziegler-Heitbrock, Loems, and Thomas P J Hofer. 2013. “Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets.” *Frontiers in Immunology* 4 (FRB): 1–5. doi:10.3389/fimmu.2013.00023.
- Ziegler, EJ, CJ Fisher, CL Sprung, Straub RC, JC Sadoff, GE Foulke, CH Wortel, et al. 1991. “Treatment of Gram-Negative Bacteremia and Septic Shock with HA-1A Human

Monoclonal Antibody against Endotoxin.” *The New England Journal of Medicine* 324 (7): 429–36.

Zigmond, Ehud, and Steffen Jung. 2013. “Intestinal Macrophages: Well Educated Exceptions from the Rule.” *Trends in Immunology* 34 (4). Elsevier Ltd: 162–68. doi:10.1016/j.it.2013.02.001.