

PHYSIOLOGIE DES CELLULES MONOCYTAIRES, MACROPHAGIQUES ET DENDRITIQUES

Pierre Bongrand

► **To cite this version:**

Pierre Bongrand. PHYSIOLOGIE DES CELLULES MONOCYTAIRES, MACROPHAGIQUES ET DENDRITIQUES. Chapitre paru dans la section "hématologie" de l'encyclopédie médico-chirurgicale. 2014, <10.1016/S1155-1984(13)60100-4 >. <inserm-01071737>

HAL Id: inserm-01071737

<http://www.hal.inserm.fr/inserm-01071737>

Submitted on 6 Oct 2014

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.

TextDWAu-Electronique

(Ce texte représente la version électronique d'un chapitre de l'Encyclopédie Médico Chirurgicale – consultable sur le site <http://www.em-consulte.com/article/867949>)

[13-012-D-10] - Doi : 10.1016/S1155-1984(13)60100-4

PHYSIOLOGIE DES CELLULES MONOCYTAIRES, MACROPHAGIQUES ET DENDRITIQUES

Pierre Bongrand

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Directeur du laboratoires "Adhesion Cellulaire et Inflammation", LAI - Inserm U1067/CNRS UMR7333, Parc Scientifique de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09,
<http://lai.sciences.univmed.fr>

Chef de Service, Laboratoire d'Immunologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Hôpital de la Conception, 141 Boulevard Baille, 13385 Marseille Cedex 05

Adresse. Pr. Pierre Bongrand, Laboratoire d'Immunologie, Hôpital de la Conception, 141 Boulevard Baille, 13385 Marseille Cedex 05.

Courriel : pierre.bongrand@inserm.fr, pierre.bongrand@ap-hm.fr, pierre.bongrand@univ-amu.fr

Téléphone : (+33) 04 91 38 39 09, (+33) 04 91 82 88 52

Fax : (+33) 04 91 38 36 63, (+33) 04 91 82 88 51

Résumé

Les cellules **monocytaires**, **macrophagiques** et **dendritiques** participent aux défenses immunitaires **innées** et **adaptatives** en réalisant au moins quatre **fonctions** essentielles : (1) alerter le système immunitaire de la présence d'éléments indésirables, (2) capturer et présenter aux lymphocytes T les oligopeptides issus des éléments étrangers, (3) participer à l'élimination de ces éléments étrangers, (4) participer à la réparation des lésions occasionnées par les réponses immunitaires. Ces cellules sont caractérisées par une très grande plasticité qui a pu rendre difficile la définition de sous-populations distinctes ou d'états d'activation particuliers. La caractérisation d'un nombre croissant d'antigènes de différenciation et l'étude du transcriptome et du protéome de ces populations ont permis de les définir avec une plus grande objectivité. De nombreux travaux ont permis d'élucider avec une précision croissante les **mécanismes physiologiques fondamentaux** permettant à ces cellules de réaliser les fonctions mentionnées ci-dessus : (1) L'**adhésion** à de nombreuses cellules ou surfaces peut être induite par plusieurs dizaines de récepteurs spécialisés et l'attachement influence de nombreux aspects du comportement cellulaire. (2) La capacité de détecter les gradients de facteurs **chimiotactiques** et de se **déplacer** dans l'organisme est également indispensable à la réalisation des fonctions de ces cellules. (3) La **phagocytose** permet la capture de nombreuses particules étrangères qui sont ensuite dégradées de manière plus ou moins complète. (4) Les molécules étrangères qui ont été incomplètement dégradées peuvent être **présentées** aux lymphocytes T en association avec des signaux qui vont guider qualitativement et quantitativement leur activation. (5) les particules qui ne peuvent être phagocytées peuvent être dégradées au moyen de la libération de substances toxiques, c'est la **cytotoxicité** à médiation cellulaire. (6) Enfin, la libération de nombreux facteurs participe aux réactions immunitaires et à la **réparation des lésions**. Ces données expliquent l'implication des cellules monocytaires, macrophagiques et dendritiques dans la quasi-totalité des situations pathologiques.

Mots clefs : Phagocytose, Adhésion, Migration, Inflammation, Présentation de l'antigène, cytokines, chimiokines, cytotoxicité.

1 - INTRODUCTION

1.1 - Importance du sujet et objectifs de l'article.

Il est permis d'attribuer aux cellules monocytaires et dendritiques au moins quatre fonctions essentielles :

Détection d'une présence indésirable et émission d'un signal d'alarme. Le système immunitaire adaptatif est capable de reconnaître avec une extrême spécificité des structures étrangères ayant pénétré dans l'organisme qu'il défend. Cependant, cette spécificité peut ralentir considérablement la réponse immunitaire : On sait que les lymphocytes T sont répartis en "clones" exprimant un seul récepteur de l'antigène (TCR : T cell receptor, capable de reconnaître une structure très précise exprimée par un complexe peptide/molécule d'histocompatibilité). Etant donné qu'une très faible proportion des clones existant dans un organisme peut reconnaître une cellule infectée par un agent pathogène donné, la détection d'une infection nécessiterait un délai prohibitif [Bongrand 1998] en l'absence d'un mécanisme permettant aux cellules infectées ou altérées d'être signalées "à l'attention des lymphocytes". Comme nous le verrons plus bas, cette alerte repose sur des récepteurs membranaires spécifiques d'une part de motifs structuraux caractéristiques des microorganismes potentiellement pathogènes (PAMP: pathogen associated molecular patterns), d'autres part de structures témoignant d'une altération cellulaire (DAMP : damage associated molecular patterns).

Présentation des antigènes aux lymphocytes afin de déclencher une réponse spécifique et de l'orienter qualitativement et quantitativement. Cette fonction inclue le transport des antigènes étrangers dans les organes lymphoïdes, leur traitement, et leur présentation aux lymphocytes en association avec des facteurs de "costimulation". Cette fonction est indispensable à la stimulation des lymphocytes T qui sont incapables de reconnaître un antigène natif.

Participation à l'étape effectrice des phénomènes inflammatoires mis en oeuvre pour répondre aux facteurs d'agression. Cette fonction inclue des fonctions d'élimination telles que la phagocytose, mais aussi la sécrétion de médiateurs cytotoxiques (dérivés réactifs de l'oxygène) ou le recrutement et l'activation d'autres populations cellulaires.

Participation à l'équilibre homéostatique de l'organisme. En l'absence d'agression, l'équilibre d'un organisme nécessite une élimination des cellules en fin de vie et le soutien des cellules de remplacement. Par exemple, l'équilibre du tissu osseux résulte de l'action opposée des ostéoblastes et des ostéoclastes, qui sont des cellules macrophagiques dont les fonctions ont récemment suscité de nombreuses études. Les macrophages sont capables de synthétiser de multiples facteurs capables d'influencer ces processus.

Toutes ces fonctions nécessitent une régulation quantitative très précises : une réponse immunitaire insuffisante permettra le développement d'une infection létale. Une réponse trop active se traduit par des phénomènes d'hypersensibilité. Un déficit fonctionnel des ostéoclastes entraînera une ostéopétrose. En conséquence, les cellules monocytaires, macrophagiques et dendritiques sont impliquées dans la plupart des situations pathologiques : infections, maladies cardiovasculaires, cancers, maladies inflammatoires. Il est donc indispensable aux médecins de comprendre leur fonctionnement, ce qui peut éclairer les mécanismes physiopathologiques, permettre de tirer partie des explorations biologiques pour

diagnostiquer la présence ou le mode d'évolution d'une maladie, suggérer un traitement et en suivre l'efficacité.

Le but de cet article est essentiellement de fournir les bases nécessaires pour reconnaître les cellules monocytaires, macrophagiques et dendritiques, explorer leur état (structure et fonction) chez un patient, et relier ces données à une situation pathologique.

1.2 – Impossibilité et inutilité d'une présentation exhaustive.

L'augmentation exponentielle de nos connaissances a certainement modifié ce que nous pouvons attendre d'une revue. Il y a une vingtaine d'années, un éditeur lançait une série de livres ("FactsBooks") destinés à résumer en quelques centaines de pages ce qu'il fallait savoir d'un ensemble de protéines telles que, par exemple, les cytokines, les molécules d'adhésion ou les antigènes leucocytaires. Depuis cette date, le développement de méthodes d'investigation à haut débit a considérablement multiplié les données disponibles, et celles-ci sont maintenant accessibles en ligne sur des sites publics (on peut citer la base GEO : gene expression omnibus, du NIH : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) ou même sous la forme de "données supplémentaires" associées aux articles traditionnels : on peut ainsi trouver dans une seule publication les valeurs comparatives de l'expression de plusieurs milliers de gènes par une dizaine de populations leucocytaires [Robbins 2008]. Le nombre de publications a également continué de croître : sur la banque de données "Pubmed" utilisée par tous les biologistes, on retrouve plus de 130 000 publications parues des années 2001 à 2010 et comportant les mots clefs "monocyte", "macrophage" ou "dendritic cell". En conséquence, alors que des revues anciennes consacrées à une espèce cellulaire telle que le macrophage [Auger 1992] laissaient une large place à des listes relativement exhaustives de composants spécifiques de ces cellules (récepteurs membranaires, substances libérées), les besoins actuels des lecteurs concernent davantage des principes généraux qui leur permettront d'organiser une masse considérable de données dont il est essentiel d'apprécier la signification et la validité (qui n'est pas toujours absolue). D'autre part, alors qu'il est bien reconnu que l'intégration des données disponibles nécessite la mise en place de nouveaux cadres conceptuels au sein de la biologie cellulaire [Mellman 03], il reste utile de conserver quelques repères historiques pour comprendre le sens des données actuelles. C'est ce que nous tenterons de faire dans le présent chapitre. Enfin, étant donné la prépondérance de l'anglais dans la littérature scientifique, il nous a paru raisonnable de rappeler les termes anglais les plus spécifiques en même temps que leur traduction.

1.3 - Plan de l'article.

L'exposé comportera deux parties :

- Une description générale des cellules monocytaires, macrophagiques et dendritiques. Il s'agit de répondre à quelques questions simples : comment peut-on définir ces cellules ? comment peut-on les reconnaître ? où peut-on les trouver dans l'organisme ? peut-on définir plusieurs sous-populations ? quel est leur cycle de développement ? Ce point est essentiel car les cellules macrophagiques font preuve d'une exceptionnelle plasticité [Mosser 2008] et les propriétés fonctionnelles des cellules qui font l'objet de notre étude sont particulièrement dépendantes de leur état de différenciation et d'activation.
- Nous passerons ensuite en revue les mécanismes physiologiques fondamentaux sur lesquels repose le fonctionnement de ces cellules : adhésion, migration, phagocytose, cytotoxicité, sécrétion de médiateurs, présentation de l'antigène. Ces processus mettent en jeu une masse considérable de processus complexes qui interdisent toute présentation exhaustive. Il nous a paru plus utiles d'essayer de dégager des principes généraux qui aident à ordonner les informations dont nous disposons. Par ailleurs, nous essaierons lorsque cela est possible de

limiter notre présentation aux cellules humaines, dans le but de faciliter l'application au domaine médical.

2 DESCRIPTION GENERALE

2.1 - Rappel historique. Phagocytes mononucléés et cellules dendritiques.

Le terme de macrophage a été utilisé par Metchnikoff dès le siècle dernier. En 1924, Ashoff définissait le **système réticuloendothélial** comme une famille de cellules réparties dans tout l'organisme et révélées par leur propriété de capter des particules colloïdales (carmin, encre de chine) introduites dans la circulation. Cette classification a été critiquée dans la mesure où cette famille regroupait des cellules très diverses (macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales) qui ne présentaient pas l'homogénéité de morphologie, d'origine et de fonction que l'on attend d'un « système » [van Furth 1975]. C'est pourquoi il a été proposé en 1969 d'individualiser le système des **phagocytes mononucléés** [van Furth 1975] dont le premier élément reconnaissable est le monoblaste, apparu dans la moelle osseuse, et qui donne naissance au promonocyte puis au monocyte. Ce dernier quitte la moelle osseuse en une quinzaine d'heures [Whitelaw 1975]. Il passe ensuite dans la circulation sanguine où il existe une fraction de cellules libres et une fraction dite marginée, liée aux parois vasculaires [van Furth 1986]. Il émigre enfin dans les tissus périphériques. Cette migration apparaît comme un phénomène aléatoire dont la demi-vie a été estimée à 70 heures environ. Dans les tissus périphériques, les monocytes peuvent se différencier en fonction de l'environnement en **macrophages** dans la rate et les cavités pleurales, péritonéale ou péricardique, en **macrophages alvéolaires** dans les poumons, en **histiocytes** dans le tissu conjonctif, en **ostéoclastes** dans le tissu osseux, en **microgliocytes** dans le tissu nerveux, en **cellules de Kupffer** dans le foie. Ces cellules peuvent alors survivre plusieurs mois.

Les **cellules dendritiques** ont été individualisées dans la rate de souris en 1973 [Steinman 1973] et distinguées des macrophages en particulier par leur morphologie et une moindre activité phagocytaire. Ces cellules ont suscité un intérêt particulier lorsqu'il est apparu qu'elles pouvaient présenter des antigènes aux lymphocytes T avec une efficacité remarquable : en particuliers, elles apparaissaient comme les seules cellules capables de stimuler des lymphocytes T « naïfs », n'ayant pas encore rencontré « leur » antigène [Mellman 2001]. Leur distribution est également ubiquitaire : on peut en trouver de faibles quantités (une dizaine de cellules par μl) dans le sang [Szabolcs 2003] où ils ne persistent pas plus d'une semaine [Merad 2009]. On les retrouve également dans les organes lymphoïdes, et dans les tissus non lymphoïdes qu'il apparaît pertinent de séparer en tissus stériles (coeur, pancréas) et en tissus exposés au passage de substances étrangères (filtres comme le foie, interfaces avec l'environnement comme la peau et le poumon) [Merad 2009].

Avant de décrire la cinétique et les propriétés des différentes populations cellulaires que nous avons évoquées, il est nécessaire de discuter les méthodes utilisées pour les définir, les reconnaître, les isoler et les étudier. En effet, ces méthodes constituent la base de toutes les études ultérieures et définissent clairement les limites des conclusions qui peuvent être tirées des résultats expérimentaux.

2.2 – Définition et caractérisation des phagocytes mononucléés et des cellules dendritiques.

Remarque préliminaire. Il est essentiel de comprendre que la classification des cellules de l'organisme est une opération complexe qui peut comporter une part d'arbitraire : dans une récente revue [Vickaryous 2006] qui conduisait à proposer l'existence de 411 populations

cellulaires différentes dans l'espèce humaine, les auteurs remarquaient que a) on **admet** qu'il n'y a pas de continuum entre les différentes cellules, autrement dit, il n'est pas illégitime d'essayer de définir des populations. b) Une cellule présente de **nombreuses variations** au cours de son développement, une population ne peut donc pas être totalement homogène. Nous allons rapidement décrire les différentes méthodes utilisées pour reconnaître et définir les phagocytes mononucléés et leurs sous-populations.

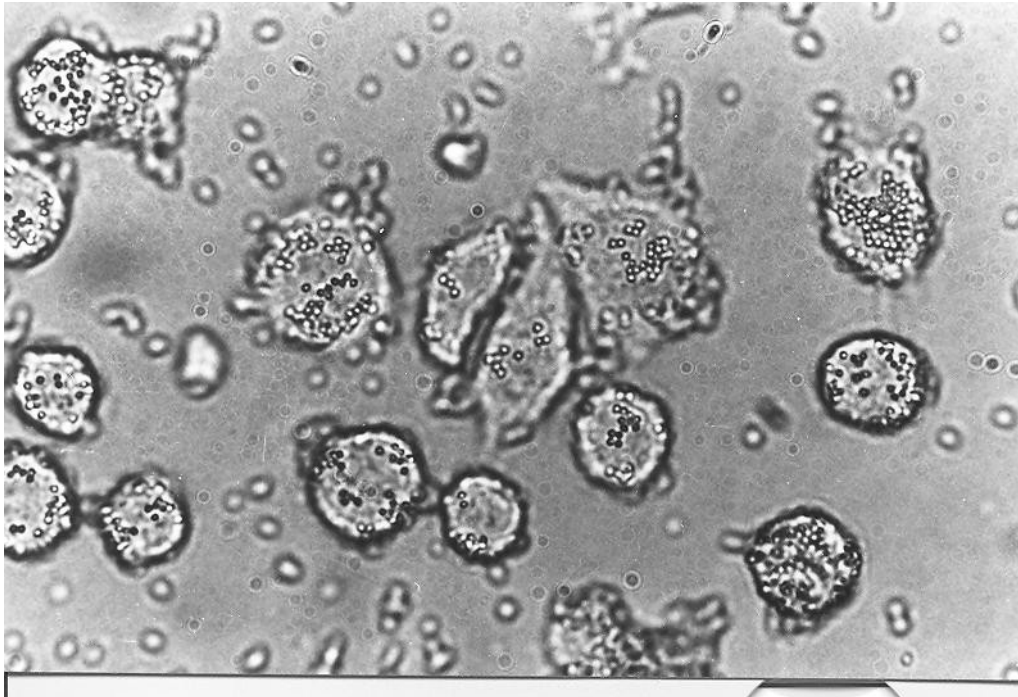


Figure 1 : Phagocytose de microsphères de latex.

Des macrophages péritonéaux de rat ont été incubés pendant une heure en présence de microsphères de latex d'une diamètre de 0,7 μm . La phagocytose est aisément observé en microscopie optique sans nécessiter une coloration particulière.

2.2.1 - Morphologie. L'examen microscopique de cellules fixées et éventuellement colorées (May-Grünwald- Giemsa) reste largement utilisé pour caractériser les cellules sanguines. Le développement de l'informatique et des systèmes de traitement d'image peut d'ailleurs conduire à augmenter la rapidité et l'objectivité de ces procédés [Cornet 2008 ; Swolin 2003]. L'observation microscopique permet facilement de distinguer les phagocytes mononucléés des granulocytes (« microphages » de Metchnikoff, dont la forme du noyau avait conduit à la dénomination erronée de « polynucléaire »). Les monocytes partagent quelques aspects typiques : une forme irrégulière, un noyau ovalaire ou réniforme, un rapport nucléocytoplasmique relativement faible, mais ils sont hétérogènes et parfois difficiles à distinguer morphologiquement des lymphocytes ou des cellules NK sanguines [Auffray 2009]. Les cellules dendritiques avaient été dénommées sur la base de leur morphologie caractéristique [Steinman 1973] qui les distingue des macrophages [Fogg 2006], mais on a remarqué que ce critère était parfois difficile à appliquer [Auffray 2009]

En conclusion, les propriétés morphologiques ne sont pas assez stables ni assez caractéristiques pour permettre une caractérisation exhaustive des populations cellulaires.

2.2.2 - Cytochimie. L'expression de peroxydase a souvent été utilisée pour suivre la différenciation des phagocytes mononucléés. L'expression d'estérases non spécifiques

(produisant une coloration cytoplasmique diffuse après traitement à l'alpha-naphtyl-butyrat) a également été utilisée pour reconnaître ces cellules.

2.2.3 - Taille et densité. Alors que les tentatives d'automatisation des observations microscopiques restent récentes et limitées, on a depuis longtemps essayé de compter les monocytes sanguins sur la base de leur taille et de leur densité [Loos 1976; Figdor 1982] et ces méthodes ont depuis longtemps permis de définir plusieurs sous-populations de monocytes [Grage-Griebenow 2001]

2.2.4 - Propriétés fonctionnelles. Les propriétés fonctionnelles ont souvent été utilisées pour reconnaître les phagocytes mononucléés.

Ces cellules ont la propriété de **phagocyter** activement des particules cibles, en particulier lorsqu'elles ont été recouvertes d'immunoglobulines. Cette propriété a conduit à qualifier les phagocytes mononucléés de *phagocytes professionnels*, pour les distinguer de « phagocytes occasionnels ». Des particules de latex introduites dans le sang sont rapidement phagocytées par les monocytes et les granulocytes qui peuvent ainsi être détectés sans ambiguïté (**Figure 1**).

La capacité d'**adhérer** aux récipients de culture présente un intérêt particulier car elle a souvent été utilisée pour purifier les cellules phagocytaires contenues dans une population hétérogène. La généralisation de cette pratique a conduit à utiliser le terme de **cellules adhérentes** pour désigner les cellules présentatrices d'antigène qui étaient assimilées aux macrophages [Mosier 1968]. Ce n'est que bien plus tard que cette propriété a pu être attribuée à une classe particulière de récepteurs membranaires (**récepteurs éboueurs** ou **scavenger receptors** [Fraser 1993]).

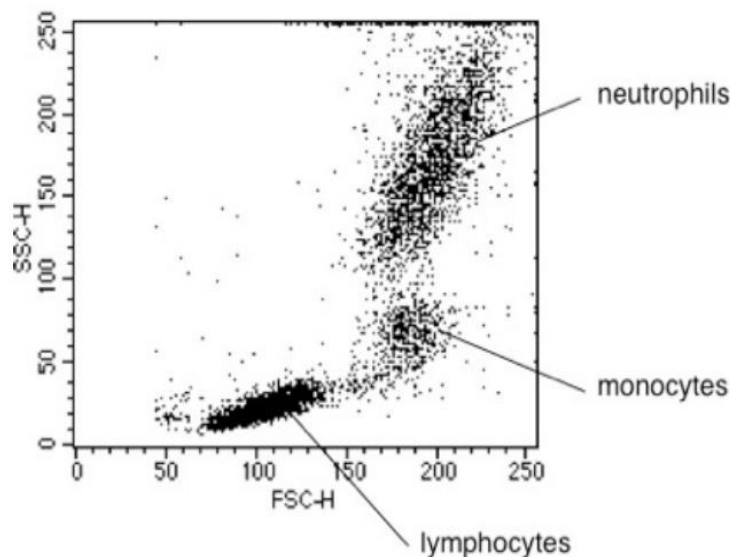


Figure 2 :Cytométrie en flux. Un cytomètre en flux permet en quelques dizaines de secondes de mesurer de 4 à plus de 10 paramètres sur plusieurs milliers de cellules individuelles. On peut facilement représenter de manière intuitive les valeurs de deux paramètres : la figure représente les résultats obtenus sur un échantillon de leucocytes sanguins. Le paramètre SSC (side scatter) est d'autant plus élevé qu'une cellule est riche en granules capables de diffuser la lumière à des angles élevés. Le paramètre FSC (forward scatter) donne une représentation des dimensions cellulaires (qui déterminent la section efficace d'interaction avec le rayonnement du laser). Cette figure montre que deux paramètres suffisent à définir des populations cellulaires. L'analyse pourra être précisée au moyen des paramètres de fluorescence qui sont déterminés simultanément. L'augmentation récente des capacités des cytomètres en flux rend de plus en plus difficile l'interprétation des résultats.

2.2.5 - Antigènes spécifiques. L'utilisation d'anticorps spécifiques a toujours été considérée par les immunologistes comme une méthode de choix pour identifier les différentes

populations cellulaires qu'ils étudiaient. L'efficacité de cette approche a été considérablement renforcée à la fois par la découverte des anticorps monoclonaux qui ont permis de caractériser des centaines d'antigènes de différenciation, et par le développement de la cytométrie en flux : cette technique a permis de détecter simultanément jusqu'à 17 marqueurs différents sur des milliers de cellules individuelles [Perfetto 2004] et elle peut actuellement être utilisée en routine dans les laboratoires de biologie pour explorer au moins 8 paramètres différents. La cytométrie de flux est largement utilisée à la fois pour distinguer des lignées cellulaires différentes (par exemple, les monocytes, les neutrophiles, les lymphocyte T, B et NK dans le sang) et pour distinguer l'état de différenciation ou d'activation de populations plus restreintes, par exemple les cellules dendritiques [Szabolcs 2003, Wang 2009 JIM], les monocytes [Grage-Griebenow 2001] ou des macrophages [Ambarus 2012].

Il y a une dizaine d'années, les cytomètres en flux de routine mesuraient simultanément quatre paramètres cellulaires : les propriétés de diffusion de la lumière aux petits angles (« forward scatter » ou FS, dépendant essentiellement de la taille) ou aux grands angles (« side scatter » ou SS, dépendant de l'hétérogénéité optique, ou encore de la granularité) et deux paramètres de fluorescence (Figure 2). L'étude de la diffusion de la lumière permettait de différencier les lymphocytes, les granulocytes et les monocytes parmi les leucocytes sanguins. Un petit nombre de marqueurs spécifiques pouvaient être utilisés pour le contrôle et l'affinement des résultats. On peut ainsi citer :

- CD11bCD18, une intégrine aussi appelée MAC-1 (macrophage-1) ou CRIII (récepteur du complément de type III) qui est un récepteur capable de fixer des dizaines de ligands différents [Yakubenko 2002]. Malgré son nom, cette intégrine peut aussi être exprimée par des lymphocytes tels que les cellules NK (*natural killers*)
- CD11cCD18, une intégrine de structure voisine, est souvent utilisée pour reconnaître les cellules dendritiques [Wang 2009].
- CD14 reconnaît des motifs moléculaires retrouvés sur des lipopolysaccharides bactériens, des lipoprotéines à haute densité (HDL), le fibrinogène. Il fait partie des **récepteurs spécifiques de motifs** ou **pattern recognition receptors (PRRs)** qui sont capables de reconnaître directement de très nombreuses structures étrangères, ce qui permettra à la fois le développement de réactions inflammatoire et de la réponse immunitaire adaptative [Gordon 2002]. Dans le sang, CD14 est considérée comme relativement spécifique des cellules myéloïdes, mais certains monocytes peuvent en être dépourvus [Grage-Griebenow 2001].
- Les cellules phagocytaires peuvent reconnaître les particules couvertes d'anticorps au moyen de nombreux récepteurs spécifiques des immunoglobulines. En particulier, les récepteurs de haute (CD64), moyenne (CD32) et basse (CD16) affinité des IgG, dont les constantes d'affinité sont respectivement voisines de 10^8 , 2.10^6 et 5.10^5 M^{-1} [Murphy 2008]. Le récepteur de haute affinité CD64 est considéré comme spécifique des monocytes/macrophages, bien qu'il soit inductible sur les granulocytes.
- Les molécules CD33 (membre de la superfamille des immunoglobulines fixant l'acide sialique) et CD68 (molécule très acide retrouvée dans les granules cytoplasmiques mais aussi sur la membrane cellulaire) ont également été retrouvées sur les monocytes

En conclusion, si les marqueurs antigéniques constituent une méthode de choix pour reconnaître des populations et des sous-populations cellulaires, leur spécificité n'est généralement pas absolue et l'on utilise plutôt des combinaisons de marqueurs pour définir des sous-populations cellulaires (Table 1)

La multiplication importantes des données fournis par la cytométrie de flux conduit actuellement au développement de méthodes automatiques de traitement basées sur la statistique multivariée (Encadré 1) qui vont permettre de regrouper des amas de points dans

des espaces multidimensionnels. Il est probablement trop tôt pour évaluer la fiabilité et l'utilité de ces développements [Pedreira 2008A, Pyne 2009].

2.2.6 - Transcriptome.

Au cours de la dernière décennie, les développements technologiques engendrés par le projet de séquençage du génome humain ont permis d'étudier une fraction substantielle ou même la totalité du transcriptome de populations cellulaires à partir d'échantillons de dimensions raisonnables (de l'ordre de 10^6 cellules) en utilisant des **puces** ou **microarrays** disponibles commercialement. Après une étape essentielle de standardisation, les résultats sont présentés sous forme de tableaux d'expression relative de milliers de gènes et facilement accessibles dans des banques de données publiques telles que GEO (gene expression omnibus), ou associées aux publications sous forme d'informations supplémentaires disponibles en ligne.

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux de valeurs que l'on peut se représenter comme des points dans un espace multidimensionnel (Lebart 2006). Par exemple, si l'on étudie l'expression de 5000 gènes dans vingt populations cellulaires on peut considérer une population cellulaire comme un point dans un espace de 5000 dimensions. On peut alors effectuer le traitement suivant [Eisen 1998; Robbins 2008] : Après avoir défini une distance dans cet espace, on peut regrouper les deux populations les plus voisines, et les remplacer par une "population moyenne". Ce processus peut être répété plusieurs fois, ce qui permet de construire un "arbre" **suggérant** des relations évolutives entre les différentes populations. Les conclusions peuvent être comparées à celles qui résultent de traitements plus complexes, et moins intuitifs, tels que l'analyse en composants principaux. L'intérêt de cette démarche peut être illustré par une comparaison de plusieurs populations leucocytaires et murines comportant des lymphocytes (T, B, et NK), des cellules myéloïdes "traditionnelles" (monocytes et granulocytes neutrophiles) et des cellules dendritiques de ganglions lymphatiques dont on peut distinguer trois sous populations : les cellules dendritiques "plasmacytoïdes" ou pDC, qui seraient les principaux producteurs d'interféron α , et les cellules dendritiques "classiques" ou cDC comportant deux sous-populations [Robbins 2008], qui pourraient être spécialisées respectivement dans la stimulation des lymphocytes T CD4 et CD8 [Heath 2004 ; Dudziak 2007]. Ce travail a conduit aux conclusions suivantes :

- la distinction de plusieurs populations doit reposer sur l'analyse d'une combinaison de marqueurs.
- Les cellules monocytaires et dendritiques se retrouvent sur une branche commune séparée de la branche "lymphoïde" des cellules T, B et NK. Il faut noter que ce résultat n'était pas absolument prévisible. Par exemple, l'existence de nombreuses propriétés communes aux cellules dendritiques et NK a récemment été soulignée [Spits 2007].
- Si l'on regroupe les cellules humaines et murines, on constate que les pDCs humaines et murines se retrouvent dans un même groupe, alors que les deux sous-populations de cDCs humaines d'une part, murines d'autre part, se retrouvent dans des groupes différents. Cet exemple montre bien les limites des analogies existant entre des espèces différentes. Elle confirme l'impossibilité de superposer de manière absolue les étapes de la différenciation hématopoïétique chez l'homme et la souris [Geissmann 2010; Doulatov 2010].

Il faut souligner que ce type d'étude ne se limite pas à la définition de populations cellulaires. La comparaison de l'expression génique dans plusieurs populations peut aussi donner des indications sur le rôle de gènes jusqu'ici inconnus [Robbins 2008]

2.2.7 - Protéome.

Malgré l'intérêt majeur de l'étude du transcriptome, on a pu remarquer que sa détermination ne fournissait qu'une image incomplète de la structure cellulaire, car

l'expression des protéines n'est pas strictement corrélée à celle du RNA messenger [Gygi 1999]. D'autre part, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles susceptibles de modifier leurs fonctions. Le développement de la spectrométrie de masse permet maintenant d'analyser des mélanges complexes de protéines à partir de quantités raisonnables de matériel. Par exemple une étude récente combinant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, la chromatographie à haute pression et la spectrométrie de masse a permis d'individualiser 458 protéines membranaires des macrophages murins à partir de quelques dizaines de mg de matériel [Zhang 2007]. Les auteurs ont ainsi retrouvé la plupart des marqueurs membranaires connus, ainsi qu'un nombre significatif de protéines nouvelles.

En conclusion : plusieurs méthodes, et plus particulièrement la cytométrie de flux, en raison de sa simplicité et de la possibilité de tri, et la transcriptomique, en raison de son exhaustivité, permettent de caractériser un nombre croissant de populations et de sous-populations cellulaires, ce qui constitue la base de leur étude.

Nous allons maintenant rapidement décrire les différentes étapes du développement et de la différenciation des principales populations de cellules monocytaires, macrophagiques et dendritiques dont les fonctions seront décrites au chapitre suivant. Cet exposé permettra de d'éclairer la signification des termes de **sous-population**, d'**activation**, de **sensibilisation** (« **priming** ») et de **polarisation** qui sont essentiels à la description du matériel cellulaire faisant l'objet des études expérimentales.

2.3 - Développement des cellules monocytaires, macrophagiques et dendritiques.

Nous ne disposons pas encore d'un modèle exhaustif et définitif de l'hématopoïèse humaine [Doulatov, 2010] et les recherches de ces dernières années ont révélé la complexité et la multiplicité des mécanismes de développement cellulaire. Nous nous bornerons donc à rappeler quelques principes simples qui devraient fournir un cadre suffisant. Pour clarifier l'exposé, nous distinguerons de manière un peu arbitraire les processus de **différenciation**, relativement irréversibles, qui conduisent à l'apparition de plusieurs sous populations cellulaires stables, et d'**activation**, correspondant à des modifications fonctionnelles, qui se traduisent généralement par une augmentation de certaines fonctions, parfois au prix de la disparition de fonctions complémentaires. Plusieurs espèces de molécules peuvent déclencher ces processus de développement. Il peut s'agir de molécules endogènes appartenant à la famille des cytokines [Encadré 2 et §2.3.1.1.], et de molécules produites par des microorganismes (Pathogen Associated Molecular Patterns ou PAMPs [Medzhitov 2002]) ou des cellules altérées (Damage Associated Molecular Patterns ou DAMP [Matzinger 2002]). Les PAMPs et les DAMPs peuvent être reconnus en particulier par les récepteurs éboueurs qui sont susceptibles de faciliter la phagocytose (§3.3.1.1.), ou les "Toll like receptors" (TLRs). Les TLRs ont été identifiés chez la drosophile chez qui ils sont impliqués à la fois dans la morphogenèse et les défenses immunitaires. Chez l'homme, on a identifié 10 TLRs qui peuvent être exprimés essentiellement sur la membrane cellulaire (TLR 1, 2 4, 5, 6 et 10) ou dans les organelles intracellulaires (TLR 3, 7, 8 et 9). Ils reconnaissent des structures caractéristiques des procaryotes telles que certains lipopolysaccharides (TLR4), les RNA à deux brins (TLR3) ou la flagelline (TLR5), mais aussi des "heat shock proteins" (TLR2) libérées par les cellules altérées [Manavalan 2011].

2.3.1 - Différenciation.

2.3.1.1 - Le système classique des phagocytes mononucléés..

On considère couramment que la formation d'un organisme repose sur une suite d'étapes de maturation liées à une diminution monotone du potentiel de différenciation cellulaire [Galvao 2010]. Dans ce cadre, il y a une vingtaine d'années [Alberts 1994], la

différenciation des lignées sanguine pouvait être représentée comme un arbre engendré par une cellule souche hématopoïétique pluripotente. Un événement précoce était supposé séparer les lignées lymphoïdes (lymphocytes T, B et NK) et myéloïdes : un **précurseur myéloïde commun (CMP : common myeloid precursor)** donnant naissance aux cellules formatrices de colonies (CFC : colony forming cells) parmi lesquelles la CFC-GM donnait naissance à des colonies mixtes de précurseurs des granulocytes neutrophiles et des monocyte-macrophages.

Le système des **phagocytes mononucléés** défini par van Furth s'intégrait dans ce schéma : le **monoblaste** se différenciait en **promonocyte** puis en **monocyte** dans la moelle osseuse, passait dans le sang sous forme de monocyte, qui migrait ensuite vers les tissus périphériques en se différenciant en **macrophage**, susceptible de survivre plusieurs mois. On pouvait attribuer aux phagocytes mononucléés deux fonctions essentielles : (1) agir comme effecteurs essentiels de l'élimination des cellules altérées ou des microorganismes pathogènes. La phagocytose constituait le mécanisme essentiel, renforcé par la sécrétion de médiateurs actifs. (2) Coopérer avec les lymphocytes T pour permettre le développement des réponses immunitaires adaptatives dépendant des lymphocytes T [Mosier 1968].

D'autres travaux ont permis d'identifier des facteurs de croissance spécifiques nécessaires aux étapes de différenciation et de prolifération il s'agit de cytokines, comprenant en particulier le multi-CSF ou interleukine 3, le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et le M-CSF (macrophage colony stimulating factor). Ces facteurs peuvent être produits par plusieurs espèces cellulaires comprenant les lymphocytes T (interleukine 3 ou IL-3), les fibroblastes (IL-3, GM-CSF, M-CSF), les cellules endothéliales (GM-CSF, M-CSF), les phagocytes mononucléés eux mêmes (GM-CSF, M-CSF). Ces facteurs de croissance peuvent stimuler à la fois la prolifération et la différenciation des précurseurs des monocytes/macrophages, et activer des fonctions effectrices telles que la phagocytose. Les récepteurs des facteurs de croissance appartiennent à des classes de récepteurs bien connues : récepteurs associés à des tyrosine-kinases (récepteur du M-CSF également nommé M-CSFR, CD115 ou c-fms) ou récepteurs de la famille des récepteurs des cytokines (GM-CSFR, IL-3R). La réponse d'une cellule à une combinaison de facteurs de croissance dépend des récepteurs qu'elle exprime et du traitement quantitatif des signaux qu'ils produisent.

2.3.1.2 - Les différentes populations de cellules dendritiques.

Définition. Les travaux initiaux de Steinman et Cohn [Steinman 1973, 1974] ont permis de distinguer des phagocytes mononucléés de cellules qui en différaient par leur morphologie (responsable de leur appellation) et une moindre activité phagocytaire et adhésive. Ces cellules ont suscité un intérêt croissant lorsqu'on a démontré leur remarquable capacité de présenter les antigènes aux lymphocytes T, en particulier naïfs [Mellman 2001]. La nomenclature de ces cellules est compliquée par leur diversité structurale et fonctionnelle, qui dépend à la fois de leur localisation et de leur histoire.

Cellules dendritiques lymphoïdes (plasmactytoïdes) et myéloïdes. Il y a une dizaine d'années, on pouvait proposer un schéma de différenciation distinguant deux types de cellules dendritiques, issues respectivement d'un précurseur lymphoïde et myéloïde [Alberts 2002]. Logiquement, on distinguait les cellules dendritiques **lymphoïdes** exprimant le marqueur CD123 (correspondant à la chaîne alpha du récepteur de l'IL-3) des cellules dendritiques **myéloïdes** (CD11c+/CD123-) dont la croissance était stimulée par le GM-CSF plutôt que l'IL-3 [Szabolcs 2003].

- On utilise le terme de cellules dendritiques **plasmactytoïdes** ou **pDCs** pour désigner des cellules remarquables par leurs capacité de production d'interféron α [Merad 2009]. Une

étude transcriptomique récente retrouve chez les pDCs une transcription élevée du gène codant pour CD123 (IL3RA) mais pas de celui qui code pour CD11c (ITGAX) [Robbins 2008]. Ces cellules correspondent donc aux cellules dendritiques lymphoïdes définies ci-dessus.

- Pour désigner les cellules dendritiques myéloïdes, on utilise parfois les termes de **cellules dendritiques classiques (cDCs: conventional dendritic cells)** et de **cellules dendritiques tissulaires** qui distinguent les cellules dendritiques retrouvées dans les ganglions lymphatiques et les autres tissus. Cet usage a été critiqué [Merad 2009] dans la mesure où les cellules dendritiques tissulaires ayant endocyté une particule étrangère peuvent se différencier (avec une diminution de l'activité phagocytaire et une augmentation de l'expression de molécules d'histocompatibilité) et migrer vers les ganglions lymphatiques.

- Comme nous l'avons déjà indiqué, on retrouve des cellules dendritiques dans le sang : 0,5% et 5% des leucocytes sanguins pourraient être respectivement des cellules dendritiques plasmacytoïdes et classiques.

Sous-populations de cellules dendritiques classiques. On a depuis longtemps distingué les lymphocytes T CD4+, qui reconnaissent essentiellement les antigènes exogènes présentés par les molécules d'histocompatibilité de classe II, et les lymphocytes T CD8+, reconnaissant les antigènes endogènes présentés par les molécules d'histocompatibilité de classe I : c'est le cas de la majorité des lymphocytes T cytotoxiques qui peuvent ainsi reconnaître et détruire les cellules infectées par des virus. En accord avec ce schéma, on a pu distinguer chez la souris plusieurs sous-populations de cDC, ayant respectivement la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4 et CD8 (ces dernières cDCs expriment les marqueurs CD8 α et CD205) [Heath 2004]. Il existe aussi plusieurs sous-populations de cDCs humaines et celles-ci pourraient présenter une spécialisation analogue.

2.3.1.3 - Relation entre les phagocytes mononucléés et les cellules dendritiques.

Récemment, on a décrit chez la souris un précurseur médullaire commun aux macrophages et aux cellules dendritiques [Fogg 2006 ; Geissmann 2010]. La situation apparaît moins claire chez l'homme [Geissmann 2010]. Il n'est pas certain que les monocytes puissent se différencier en cellules dendritiques en l'absence de réaction inflammatoire. En particulier, on admet que les cellules de Langerhans de l'épiderme, apparentées aux cellules dendritiques [Geissmann 2010], sont capables de se renouveler en l'absence d'apport extérieur.

Plasticité des précurseurs hématopoïétique. Plusieurs expériences suggèrent de représenter les étapes de la différenciation cellulaire par un réseau plutôt que par un arbre [Galvao 2010]. Dans le domaine de l'hématopoïèse, un article récent suggère que les phagocytes mononucléés et les cellules dendritiques pourraient se différencier à partir de deux précurseurs au moins : les GMPs (granulocyte-macrophage progenitors) et les MLPs (multilymphoid progenitors) [Doulatov 2010]. D'autres travaux soulignent la plasticité des différentes populations cellulaires : des lymphocytes B [Xie 2004] ou des lymphocytes T [Laiosa 2006] ont pu être reprogrammés en macrophages à la suite de la surexpression de facteurs de transcription spécifique.

Difficulté d'appliquer aux cellules humaines les résultats obtenus chez la souris.

Il serait séduisant d'appliquer à l'homme les résultats obtenus chez la souris, facilités par la disponibilité de marqueurs de surface des différentes populations, de méthodes de culture efficace, et la possibilité d'inactivation génique [Doulatov, 2010]. Cependant, l'expérience a montré que des différences substantielles pouvaient exister entre différentes espèces. Par

exemple, on sait depuis longtemps que l'équilibre des chaînes kappa et lambda est très différent chez l'homme et la souris.

Modes de renouvellement cellulaire en conditions normales et inflammatoire.

En dehors du cas particulier des cellules dendritiques mentionné plus haut, il a été démontré que, dans le tissu nerveux, les cellules microgliales pouvaient se renouveler sans passer par le compartiment des monocytes [Ajami 2007]. Les monocytes ne sont donc pas les précurseurs obligatoires des phagocytes mononucléés en l'absence d'inflammation.

Cependant, de nombreux travaux ont montré que les monocytes cultivés en présence de cytokines inflammatoires pouvaient acquérir des caractéristiques de plusieurs sous-populations de macrophages ou de cellules dendritiques. Ce point sera détaillé dans le paragraphe consacré à l'activation des cellules phagocytaires. Deux résultats méritent d'être soulignés : (a) les monocytes différenciés en présence de cytokines ne deviennent pas nécessairement identiques aux populations cellulaires retrouvées en l'absence d'inflammation. Cette constatation est bien illustrée par une comparaison du transcriptome de cellules dendritiques purifiées ou différenciées *in vitro* à partir de monocytes [Robbins 2008]. (b) Il a été souligné que les phagocytes mononucléés présentent une très grande plasticité qui interdit peut-être la définition de sous-populations *bona fide* [Mosser 2008].

2.3.1.4 - Complexité des mécanismes de l'hématopoïèse.

Il serait évidemment très utile de disposer d'un cadre théorique simple permettant d'organiser les multiples données expérimentales dont nous disposons. Il a paru tentant de supposer que l'expression génique pouvait être considérée comme la superposition de quelques "programmes génétiques" [Segal 2003] dont la réalisation pourrait être contrôlée par un petit nombre de facteurs de transcription [Hu 1997 ; Iwasaki 2007]. Par exemple, il a été suggéré que l'équilibre des facteurs de transcription PU.1 et C/EBP α pouvait déterminer la décision de précurseurs hématopoïétiques murins de se différencier en macrophage (si l'induction de PU.1 précédait celle de C/EBP α) ou en granulocyte neutrophile (dans le cas contraire) [Laslo 2006]. Cependant, des travaux récents ont montré que la réalité était bien plus complexe. Au terme d'une étude comparative du transcriptome de 38 populations de cellules hématopoïétiques humaines, il a été conclu que des centaines de facteurs de transcription étaient exprimés de manière différentielle entre les lignées étudiées, suivant 80 modules cohérents. Ces facteurs étaient organisés en circuits interconnectés dont seulement une partie de la complexité a pu être analysée [Novershtern 2011].

2.3.2 - Activation des phagocytes mononucléés.

De nombreuses études ont permis de souligner la très grande plasticité des phagocytes mononucléés [Stout 2005, Mosser 2008]. Les propriétés fonctionnelles qui seront décrites dans le §3 peuvent être modifiées quantitativement et qualitativement par le microenvironnement cellulaire sans qu'il soit nécessairement possible de définir des sous-populations aussi clairement séparées que, par exemple, les lymphocytes T CD4 et CD8. On peut parler de **sensibilisation** ou d'**activation** pour désigner le développement de capacités fonctionnelles. Un stimulus peut aussi orienter le développement des phagocytes vers un type particulier de fonction. On parle alors de **polarisation**.

Nous précisons ces notions en définissant un certain nombre de termes qui ont été utilisés dans le passé.

2.3.2.1 - Définitions classiques.

Les macrophages retrouvés dans les tissus périphériques en absence de réaction inflammatoire ont été qualifiés de **macrophages résidents**. ils ont une activité métabolique faible et une activité phagocytaire réduite.

Des études pionnières réalisées par Mackaness ont montré que la guérison de certaines infections telles que la tuberculose étaient associées à une augmentation considérable de l'activité métabolique, phagocytaire et bactéricide des macrophages locaux qui ont été qualifiés de **macrophages activés** [Cohn, 1978]. Alors que de nombreux stimuli pouvaient augmenter l'activité des macrophages, il est rapidement apparu que le terme générique de macrophage activé recouvrait des populations très différentes. On a proposé de réserver la dénomination de macrophage activé aux cellules fortement bactéricides apparaissant à la suite d'une infection, et stimulées par des cytokines telles que l'interféron γ (autrefois appelé MAF: macrophage activating factor). Des substances "irritantes" telles que des milieux de culture qui étaient souvent injectés à des souris par voie intrapéritonéale permettaient d'obtenir des macrophages induits (**elicited macrophages**) activement phagocytaires mais dépourvu de l'activité bactéricide des macrophages activés.

Plus récemment, il est apparu que les propriétés des phagocytes mononucléés étaient modifiées **qualitativement** autant que quantitativement par de nombreuses combinaisons de substances inflammatoires.

2.3.2.2 - Etats d'activation M1 et M2.

- Classiquement [Mosser03 ; Martinez06], la culture de monocytes en présence d'interféron γ (IFN γ) associé ou non à d'autres cytokines (TNF α , GM-CSF) et à des substances bactériennes (lipopolysaccharides bactériens : LPS) augmente fortement leur activité phagocytaire et bactéricide, ainsi que leur capacité de produire certaines cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-12) et des dérivés réactifs de l'oxygène.

- On s'est aperçu ensuite que d'autres cytokines (IL-4, IL-13) ou des complexes immuns (stimulant les récepteurs Fc) stimulaient les phagocytes mononucléés de manière différente : augmentation de la production d'IL-10, augmentation de l'expression de certains récepteurs : récepteurs fossoyeurs, récepteurs du mannose, qui induit la phagocytose.

Ces deux états d'activation ont respectivement été appelés « activation classique » et « activation alternative » [Stein92, Mosser03]. Par analogie avec la notion d'équilibre Th1/Th2 [Mosmann 1986 ; Encadré 3] on a proposé de dénommer respectivement M1 et M2 ces états d'activation classique et alternative, ce qui suggérait une interprétation logique de cette dualité [Mantovani05]. On a également désigné les macrophages M1 et M2 par les termes de macrophages « inflammatoires » et « anti-inflammatoires ».

2.3.2.3 - Multiplicité des états d'activation.

Au moment même où les termes de macrophages M1 et M2 étaient proposés, de nombreuses études expérimentales montraient que les états de stimulation des macrophages étaient en fait multiples [Stout05]. Il a été récemment suggéré de représenter l'état d'activation d'une population donnée de macrophages comme une combinaison quantitativement variable de trois types « purs » associés à trois fonctions essentielles : (a) la défense de l'hôte contre les agressions. (b) la réparation des lésions. (c) la régulation de la réponse immunitaire [Mosser08]. Cette présentation est séduisante, puisqu'elle permet d'associer des conséquences pathologiques à un déséquilibre de chacune de ces fonctions : destructions tissulaires liées à une réaction inflammatoire excessive, fibrose associée à un excès de la seconde « branche », auto-immunité du fait d'un déséquilibre des fonctions régulatrices. L'avenir nous montrera si cette distinction est réellement fructueuse.

2.3.2.4 - Sensibilisation (priming)

Le terme de **sensibilisation** ("**priming**") a souvent été utilisé pour désigner la propriété de certains stimuli d'augmenter la réactivité des cellules phagocytaires vis-à-vis d'une stimulation ultérieure. Ce terme a très souvent été appliqué à la réponse oxydative des phagocytes. Par exemple, le TNF α n'induit pas directement la libération de dérivés réactifs de l'oxygène par les granulocytes, mais l'exposition à cette cytokine augmente fortement la réponse ultérieure à un facteur chimiotactique. L'exposition à l'IL-27 augmente la production d'IL-6 ou de TNF α chez les monocytes stimulés par un lipopolysaccharide bactérien [Guzzo2012]. On a suggéré que l'exposition à l'interféron α augmentait la capacité de cellules dendritiques de stimuler la différenciation de lymphocytes Th1 et Th17 [Farkas 2012]. Ce "priming" peut être considéré comme une activation transitoire. Il illustre la dépendance de la réactivité des cellules phagocytaires vis-à-vis de leur histoire immédiate.

2.3.3 - Modèles d'étude des phagocytes mononucléés.

Les résultats que nous avons cités montrent bien d'une part que les phagocytes mononucléés présentent des variations individuelles importantes, d'autre part que leur activité fonctionnelle dépend de leur histoire. Il en résulte que les résultats des études expérimentales réalisées sur ces populations cellulaires dépendent fortement du matériel initial. Il est donc utile de résumer quelques points importants concernant les modèles qui ont couramment été utilisés pour étudier les fonctions des cellules monocytaires. Nous nous limiterons aux études effectuées chez l'homme.

- Le modèle de choix est constitué par les **monocytes de sang périphérique**. Le matériel de départ est essentiellement constitué par un mélange de lymphocytes et de phagocytes mononucléés préparés par centrifugation du sang sur une barrière de densité (PBMC : peripheral blood mononuclear cells). On a proposé une double centrifugation pour séparer les monocytes des lymphocytes. L'élutriation (centrifugation à contre courant) est un procédé plus complexe nécessitant un équipement particulier qui n'est pas généralisé [Figdor 1982]. Il faut noter que la seule centrifugation, considérée pourtant comme un traitement "banal", peut induire une certaine activation des cellules [Kuijpers 1991]. D'autre part, les préparations de monocytes peuvent être contaminées par d'autres fractions cellulaires, comme les plaquettes [Du 2006].

La séparation par adhérence aux récipients de culture permet d'obtenir des préparations riches en monocytes, mais il est difficile de détacher ces cellules. Une autre méthode intéressante consiste à effectuer une sélection négative : les suspensions de PBMCs sont mélangées à des microsphères magnétiques couvertes d'anticorps fixant les populations non monocytaires. Ces microsphères sont ensuite éliminés avec un aimant. Ce procédé est commercialisé (Miltenyi Biotec™)

- Les préparations de monocytes ont pu être utilisées pour obtenir par différenciation in vitro d'autres populations de macrophages (culture pendant une semaine sur un substrat recouvert de constituant des matrices extracellulaires) ou de cellules dendritiques (utilisation d'un mélange de GM-CSF, de TNF et d'IL-4). On a pu remarquer que ces modèles pouvaient différer des "équivalents" qu'ils étaient supposés représenter [Robbins 2008].

- La limitation quantitative due à la faible concentration des monocytes ont conduit à utiliser des lignées immortalisées [Harris 1985]. Par exemple, on a pu utiliser la lignée promyélocytaire HL60 qui peut être différenciée in vitro en cellules "neutrophil-like" (par ajout de DMSO dans le milieu) ou "monocyte-like" (par ajout d'un ester de phorbol : l'acétate-myristate de phorbol ou PMA). La lignée monocyttaire THP-1 [Tsuchiya 1982] peut également être transformée en cellules "macrophage-like" au moyen de quelques jours de culture. La lignée U937 constitue un autre modèle d'étude. Il est largement reconnu que ces cellules ne peuvent pas être considérées comme des modèles vraiment représentatifs des cellules normales. D'autre part, elles peuvent dériver et différer largement d'un laboratoire à

l'autre. Cependant, elles ont permis d'obtenir des résultats importants, et la possibilité de les modifier par transfection constitue une possibilité précieuse.

3 - FONCTIONS DES CELLULES PHAGOCYTAIRES, MACROPHAGIQUES ET DENDRITIQUES.

Le comportement d'une cellule dépend à la fois des propriétés de cette cellule, des informations qu'elle reçoit de l'extérieur, et du traitement de ces informations qui conduit à déclencher certains programmes. Bien que tous ces processus soient intriqués, il paraît nécessaire, dans un but de clarification, de décrire séparément quelques programmes dont l'association permet à une cellule de réaliser un certain nombre de tâches. Il a été suggéré [Adams 1984] de distinguer les **capacités** des macrophages, qui sont des processus élémentaires tels que l'adhésion ou la migration, des **fonctions**, qui représentent un ensemble de processus permettant de répondre à un besoin, comme par exemple, la phagocytose. Les auteurs ont reconnu eux-mêmes les limites de cette classification et nous décrivons successivement sous le terme de fonctions des comportements semblant correspondre à un besoin ou à un but cohérent.

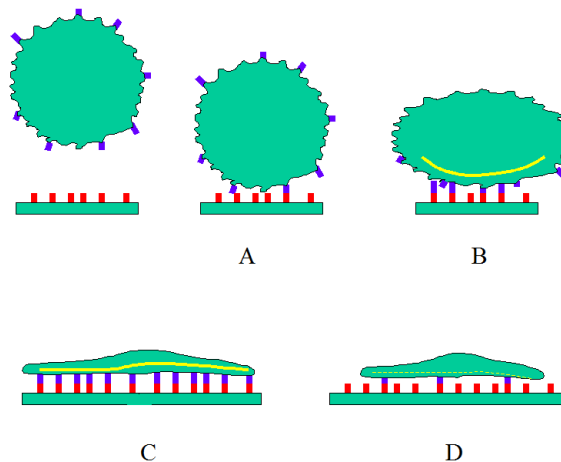


Figure 3 : Etapes de l'adhésion cellulaire. L'attachement d'une cellule à une surface débute par la formation d'une première liaison (A) qui est suivie rapidement de la formation de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de liaisons supplémentaires (B), ce qui nécessite une diffusion latérale des récepteurs d'adhésion membranaire (en bleu) et une déformation cellulaire nécessaire à la formation d'une zone de contact moléculaire. Dans certains cas, la cellule s'étale activement (C). Le cytosquelette (en jaune) se renforce dans la région de contact, ce qui augmente la rigidité cellulaire. Le détachement (D) est un processus actif incomplètement compris qui peut comprendre une dépolymérisation locale du cytosquelette d'actine, une protéolyse de certains récepteurs d'adhésion, la génération de forces de traction qui vont détruire les liaisons.

3.1 - Adhésion.

La capacité d'adhérer à des surfaces est une propriété fondamentale de la quasi-totalité des populations cellulaires, et cette adhésion détermine de manière souvent essentielle des processus fondamentaux : survie, prolifération, différenciation, migration, activation [Pierres 2000; Vitte 2005]. Les phagocytes mononucléés ont été souvent appelés cellules adhérentes en raison de leur capacité d'adhérer à de très nombreuses surfaces avec des spécificités souvent particulières [Rich 1981]. Cette capacité est essentiellement due à la présence sur la membrane d'une très grande variété de récepteurs. Le volume de cette revue ne permettrait pas de décrire exhaustivement les propriétés adhésives des macrophages. Nous décrivons

successivement (1) Les principaux récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésivité des cellules phagocytaires, (2) les étapes de l'adhésion cellulaire, (3) les mécanismes de régulation de l'adhésion, (4) les conséquences de l'adhésion : quels signaux sont-ils perçus par les cellules au contact d'un substrat et en quoi leur comportement est-il modifié, enfin (5) nous décrirons brièvement les méthodes actuellement disponibles pour explorer l'adhésion cellulaire.

3.1.1 - Récepteurs impliqués dans les propriétés adhésives des phagocytes mononucléés.

On peut estimer qu'un leucocyte exprime plusieurs dizaines, voire plus de cent espèces de récepteurs membranaires capables d'induire l'adhésion à une surface couverte de ses ligands spécifiques. La stimulation de ces récepteurs peut engendrer des cascades de signalisation qui induiront des comportements spécifiques. Une description exhaustive de ces récepteurs n'entrerait pas dans le volume alloué à cette revue. Il nous paraît plus utile de fournir un cadre général en décrivant succinctement les principales familles de récepteurs impliqués dans l'adhésion [Isacke 2000]. Celles ci sont en règle exprimées par plusieurs sous-populations de phagocytes mononucléés.

3.1.1.1 - Sélectines. Bien que d'identification récente, ces molécules constituent sans doute la famille la plus simple de récepteurs d'adhésion. Les sélectines doivent leur nom à la partie N-terminale, extracellulaire, qui a la structure d'une lectine animale de type C dont le ligand comporte pour motif principal un tétrasaccharide : le groupement sialyl-LewisX. Ce motif n'est fixé qu'avec une faible affinité par la L-sélectine, car il ne représente pas son ligand complet. Seule la L-sélectine (sélectine leucocytaire, CD62L) est exprimée par les leucocytes, en particulier les cellules phagocytaires. Elle est en règle concentrée au sommet des microvilli, ce qui augmente l'efficacité d'interaction avec son ligand mucinique porté par les cellules endothéliales, et que nous allons décrire brièvement.

3.1.1.2 - Mucines. Les structures muciniques se présentent comme des chaînes polypeptidiques "hérissées" de chaînes oligosaccharidiques qui empêchent leur repliement, ce qui confère à la molécule une forme allongée. Les principaux ligands de la L-sélectine sont la molécule CD34 exprimée par certaines cellules endothéliales (la forme exprimée par les leucocytes ne fixe pas la L-sélectine du fait d'une glycosylation différente), la molécule endothéliale MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1), dont la partie extracellulaire comporte deux domaines immunoglobuliniques et une région mucinique), et la molécule GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1, qui peut être exprimée à la surface de certaines cellules endothéliales ou secrétée). Notons aussi que les leucocytes expriment un récepteur mucinique des sélectines endothéliales : PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, CD162)

3.1.1.3 - Intégrines. Comme leur nom l'indique, ces molécules sont des protéines membranaires intrinsèques. Ce sont des hétérodimères formés d'une chaîne α (parmi 18 espèces) et d'un chaîne β (parmi 8 espèces connues). Vingt-quatre intégrines ont été retrouvées. Les leucocytes, et les phagocytes mononucléés, expriment essentiellement les intégrines $\beta 2$ constituées d'une chaîne $\beta 2$ (CD18) et d'une chaîne α . Elles sont toutes susceptibles d'être exprimées par les phagocytes mononucléés. Leurs ligands sont souvent des membres de la superfamille des immunoglobulines. On peut citer :

- CD11a/CD18 (LFA-1 : lymphocyte function associated I), qui fixe essentiellement les molécules ICAM (ICAM-1 à ICAM-5) qui sont exprimées en particulier sur les cellules endothéliales, mais aussi sur les leucocytes et de nombreuses cellules non hématopoiétiques.

- CD11bCD18(MAC-1 : macrophage 1, CRIII : récepteur du complément de type III) : cette molécule fixe également des molécules ICAM, le fragment C3bi du complément, et de nombreux autres ligands parmi lesquels le fibrinogène et la fibronectine [Yakubenko 2002].
 - CD11cCD18, récepteur multispécifique fixant en particulier ICAM-1 et le fragment C3bi, a déjà été cité pour son utilisation comme marqueur des cellules dendritiques.
 - CD11dCD18, de découverte plus récente, peut fixer en particulier ICAM-3 et la molécule endothéliale VCAM-1 (CD106). Cette intégrine est particulièrement exprimée par les cellules spumeuses (foam cells) d'origine monocytaire, que l'on trouve au stade initial de développement des lésions d'athérosclérose [Yakubenko 2006].
- Les intégrines ont été qualifiées de "machines bidirectionnelles" qui transmettent des signaux centripètes après avoir fixé leur ligand, et dont la régulation peut faire appel à des signaux centrifuges (§3.1.3.3).

Les phagocytes mononucléés peuvent également exprimer des intégrines $\beta 1$, qui sont souvent des récepteurs de constituants de la matrice extracellulaire : $\alpha 4\beta 1$ (CD49dCD29) est un récepteur de la fibronectine mais aussi de la molécule endothéliale VCAM-1. $\alpha 5\beta 1$ (CD49eCD29) est également un récepteur de la fibronectine. Enfin, l'intégrine $\alpha V\beta 3$, qui fixe des molécules telles que la vitronectine, est impliquée dans la résorption osseuse par les ostéoclastes et l'élimination des cellules mortes.

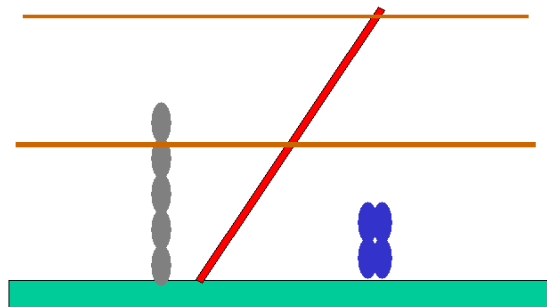


Figure 4 : Présence d'une barrière anti-adhésive sur les membranes cellulaires.

La figure représente en conservant une échelle approximative des molécules d'adhésion (récepteur des immunoglobulines en bleu, molécule ICAM-1 en gris, la leucosialine, une molécule potentiellement répulsive de grande taille (en rouge) et des polysaccharides liés à la surface (en marron). Les récepteurs d'adhésion peuvent se trouver enfouis dans une région répulsive qui peut empêcher l'attachement.

3.1.1.4 Membres de la superfamille des immunoglobulines.

La superfamille des immunoglobulines [Williams 1988] rassemble des molécules comportant un ou plusieurs domaines présentant des caractéristiques structurales des domaines des immunoglobulines (environ 110 acides aminés, deux feuillets beta antiparallèles, un pont disulfure formant une boucle d'une soixantaine d'acides aminés, une dimension de l'ordre de 4x2,5x2,5 nm). Parmi les récepteurs d'adhésion susceptibles d'être exprimés par les phagocytes mononucléés, on peut citer :

- Les molécules ICAM, déjà citées. L'activation des leucocytes peut conduire à une agrégation résultant de l'interaction des intégrines leucocytaires et des molécules ICAM.
- PECAM-1 (CD31) est une molécule d'adhésion homotypique que l'on trouve à la fois sur les leucocytes et les jonctions interendothéliales. Elle semble impliquée dans la transmigration.
- Les molécules JAM (junctional adhesion molecules) sont des molécules d'adhésion homotypiques que l'on retrouve sur les cellules endothéliales et sur les leucocytes humains. Elles semblent également impliquées dans la migration transendothéliales.

3.1.1.5 *Cadhérines.*

Ces molécules d'adhésion homotypiques sont en particulier impliquées dans la stabilité des endothéliums. Elles peuvent être exprimées par certaines populations de cellules myéloïdes telles que les cellules de Langerhans.

3.1.2 - *Les étapes de l'adhésion cellulaire.*

Comme l'indique la [Figure 3](#), on peut distinguer quatre étapes successives : (1) la formation d'un premier contact moléculaire, (2) la consolidation de l'adhésion, (3) l'étalement (processus facultatif) et (4) la déadhesion.

3.1.2.1 - Formation d'un premier contact. Comme le montre la [Figure 4](#), la surface cellulaire peut être représentée comme une bicouche lipidique renforcée par le cytosquelette sous-jacent et dont la face externe expose des **protéines intrinsèques** dont le domaine extracellulaire possède une longueur de quelques nm à quelques dizaines de nm (on peut citer par exemple les molécules d'histocompatibilité : 8 nm, et la leucosialine/CD43 : 43 nm). Ces protéines sont incluses dans un assemblage plus lâche de macromolécules intrinsèques, souvent riches en polysaccharides et constituant le **glycocalyx** (matrice péricellulaire ou "cell coat") dont l'épaisseur peut varier de 0,1 μm à plusieurs μm [[Robert 2006](#)]. Ce glycocalyx engendre une répulsion par deux mécanismes complémentaires : (1) du fait de sa charge globale négative, l'intrication des glycocalyx de deux cellules entraîne une répulsion électrostatique. La portée de cette répulsion est faible en raison de l'effet d'écran des ions présents dans le milieu. (2) : du fait de leur flexibilité, les polymères présents à la surface se comportent comme des "ressorts" et engendrent une répulsion : c'est le phénomène de stabilisation stérique [[de Gennes 1988](#)]. Pour que les récepteurs cellulaires puissent entrer en contact avec leurs ligands, exposés par des cellules ou des tissus, il faut donc que le glycocalyx se réorganise, en particulier par diffusion latérale des molécules répulsives [[Soler 1997](#)]. Cette réorganisation nécessite des forces et/ou du temps [[Patel 1995](#); [Sabri 1995](#)]. Des résultats récents [[Zidovska 2008](#) ; [Pierres 2008](#)] suggèrent un mécanisme potentiel permettant à des cellules de franchir la barrière répulsive : les membranes cellulaires sont extrêmement mobiles et présentent des "ondulations" d'amplitude nanométrique et de fréquence pouvant dépasser 1/seconde (soit 1 Hz), ce qui pourrait permettre d'établir des contacts au travers du glycocalyx.

Le premier contact entre des récepteurs d'adhésion va permettre l'établissement d'une liaison moléculaire qui va maintenir les membranes en contact. La rapidité de formation et la durée de vie de cette première liaison sont des paramètres clés qui vont décider de la formation ou non de la molécule d'adhésion. Au cours des deux dernières décennies, des techniques innovantes ont permis d'étudier expérimentalement la formation et la dissociation de liaisons entre des récepteurs d'adhésion [[Robert 2007](#), [Pierres 2008a](#)]

3.1.2.2 - *Consolidation de l'adhésion.*

Les expériences réalisées au niveau des liaisons individuelles ont montré que la durée de vie des liaisons formées avec des récepteurs tels que les intégrines ou les sélectines était souvent inférieure à quelques secondes et ne résistait pas à des forces de traction supérieures à

quelques dizaines de piconewton. Cependant, l'attachement d'une cellule à une surface peut résister à une force plus de mille fois supérieure et durer plusieurs jours ou même des mois. La formation d'un attachement solide repose sur la combinaison de plusieurs processus :

- L'adaptation de la membrane cellulaire à la surface adjacente est nécessaire pour réaliser une aire de contact moléculaire compatible avec le contact des récepteurs d'adhésion. A la suite de ce processus ("alignment" ou "fitting"), les surfaces adhérentes sont séparées par une distance de quelques dizaines de nanomètres [Mège 1987, Pierres 2002 & 2003]. Les mécanismes mis en jeu, qui conduisent à un aplatissement des microvilli, restent mal connus.
- Le cytosquelette d'actine sous-membranaire se renforce ce qui conduit à une augmentation de la rigidité membranaire. L'importance de ce mécanisme est démontré par les conséquences d'une désorganisation locale du cytosquelette, qui peut conduire à la déadhesion [Rees 1977].
- Enfin, une redistribution latérale des molécules membranaires conduit à une concentration des récepteurs d'adhésion dans la région de contact et à une déplétion locale des molécules de grande taille susceptibles d'exercer une action anti-adhésive, comme la leucosialine (CD43) [Bell 1984; Soler 1997]. Les mécanismes de cette redistribution ne sont pas entièrement connus : ils peuvent comporter une composante "passive", résultant des lois de la thermodynamique, et des phénomènes actifs [Delon 2001].

3.1.2.3 - *Étalement.*

L'adhésion d'une cellule à une surface peut se limiter à la formation d'une aire de contact de quelques μm^2 à quelques dizaines de μm^2 . Dans certains cas, on peut observer une modification majeure de la morphologie cellulaire. Alors qu'une cellule en suspension est souvent approximativement sphérique, du fait de la tension membranaire, l'adhésion à une surface peut entraîner l'émission de lamellipodes et un aplatissement considérable de la cellule qui va conduire à la formation d'une aire de contact de quelques centaines de μm^2 [Pierres 2002]. Cet aplatissement s'accompagne d'une augmentation de l'aire apparente de la membrane, ce qui implique en particulier un « déplissement » significatif. Les mécanismes mis en jeu ne sont pas complètement compris. L'étalement s'accompagne souvent d'une modification des fonctions cellulaires [Laurent 1991]. Des modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène qui reste incomplètement compris [Meyers 2006; Neves 2008].

3.1.2.4 - *Déadhesion.*

De nombreux travaux ont montré que la séparation d'une cellule adhérente et d'une surface est souvent un phénomène actif pouvant résulter de nombreux processus non exclusifs :

- La dissociation du cytosquelette sous-membranaire peut entraîner une diminution de la rigidité de la surface cellulaire, ce qui permettra une rupture progressive des liaisons [Rees 1977].
- Le détachement peut nécessiter un effort de traction de la cellule. Les forces mises en jeu peuvent entraîner une rupture locale de la membrane et des fragments cellulaires peuvent persister dans la zone de contact.
- Le détachement peut être réalisé par des ligands cellulaires endogènes qui détacheraient les récepteurs d'adhésion par compétition avec les ligands exogènes [Cai 1996].
- On a suggéré que le détachement d'une cellule et d'une surface puisse résulter d'une lyse enzymatique des molécules impliquées dans l'adhésion [Cai 1996].
- Enfin, un mécanisme qui n'a pas été exploré consisterait pour une cellule adhérente à introduire dans la zone de contact des constituants « encombrants » du glycocalyx qui écarteraient suffisamment les surfaces d'interaction pour empêcher le contact des récepteurs d'adhésion et de leurs ligands [Seveau 2000].

3.1.3 – *Régulation de l'adhésion.*

La nécessité pour une cellule de contrôler très précisément son attachement aux surfaces qui l'entourent est attestée par la multiplicité des mécanismes régulateurs qui interviennent de manière non exclusive pour contrôler l'attachement [Vitte 2005]. Nous les citons rapidement :

3.1.3.1 – Modulation du glycocalyx.

Comme nous l'avons indiqué, l'adhésion cellulaire est essentiellement déterminée par l'interaction de récepteurs membranaires avec des ligands exogènes. Ces récepteurs sont « enfouis » dans une région répulsive anti-adhésive. Un procédé efficace de régulation positive de l'adhésion consiste à réduire l'épaisseur du glycocalyx. Nous avons montré que l'activation de cellules monocytaires par des stimulations physiologiques (interféron gamma, fibronectine) entraînait en quelques heures une diminution de l'épaisseur du glycocalyx (environ 20%) accompagnée d'une désialylation de la molécule anti-adhésive CD43. Parallèlement, la capacité de capture dynamique de particules couvertes d'immunoglobulines G était augmentée [Sabri 2000].

3.1.3.2 – Régulation de l'expression des récepteurs membranaires d'adhésion.

C'est sans doute le mécanisme le plus « naturel » de régulation de l'adhésion et celui qui a été le plus étudié. La régulation positive de l'adhésion des cellules monocytaires est souvent associée à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion. Par exemple, l'exposition de cellules phagocytaires à une substance chimiotactique telle que le fMLF peut décupler en quelques minutes l'expression de l'intégrine CD11bCD18 [Elbim 1994]. Réciproquement, l'activation de ces cellules peut entraîner le clivage et la libération de L-sélectine (CD61L).

3.1.3.3 – Modification conformationnelle des molécules d'adhésion.

Les modifications conformationnelles constituent un mode majeur de régulation des fonctions des protéines. Les intégrines constituent un exemple remarquable : on a depuis longtemps décrit des anticorps monoclonaux capables de modifier l'activité des intégrines, et, de manière concomitante, de mesurer cette activité. Au cours de la dernière décennie, les études de diffraction des rayons X ont permis de mettre en évidence plusieurs conformations remarquables des intégrines leucocytaires LFA-1 (CD11aCD18) et MAC-1 (CD11bCD18) : on distingue au moins trois conformations : une forme inactive correspondant à une position recourbée de la molécule, ce qui rend inaccessible le site actif. Une forme redressée d'affinité moyenne, et une forme redressée dont la haute affinité est liée à une modification conformationnelle du site actif [Salas 2004].

Les modifications conformationnelles peuvent être initiées par des signaux centripètes engendrant des cascades de signalisation intracellulaires (signalisation "inside-out"). Ces cascades sont déclenchées par l'activation de récepteurs spécialisés tels que les récepteurs des substances chimiotactiques. L'activation des intégrines peut aussi être déclenchée par des stimulations extracellulaires : anticorps déjà mentionnés, qui stabilisent les conformations actives, ou modification de l'équilibre ionique. Les ions Mn^{2+} sont souvent utilisés pour activer les intégrines.

3.1.3.4 - Modification de la distribution topographique des molécules d'adhésion sur la membrane.

Il est maintenant bien établi que les molécules membranaires ne sont pas réparties uniformément sur la membrane plasmique. Plusieurs expériences montrent que cette répartition est étroitement régulée et peut fortement conditionner l'activité fonctionnelle des récepteurs d'adhésion :

a) L'activation des intégrines membranaires s'accompagne de la formation de micro (ou même nano-) agrégats de quelques molécules seulement [Detmers 1987]. Bien que l'importance respective de l'agrégation et des modifications conformationnelles des intégrines ne fasse pas l'objet d'un consensus, plusieurs expériences démontrent que l'agrégation des récepteurs d'adhésion possède la capacité intrinsèque d'augmenter l'adhésivité, sans doute en favorisant la formation d'interactions multivalentes [Vitte 2004].

b) L'observation en microscopie électronique des membranes cellulaires met bien en évidence la rugosité de cette membrane à l'échelle submicrométrique. Il paraît intuitivement évident que l'efficacité fonctionnelle des récepteurs d'adhésion doit être augmentée si ceux-ci sont localisés à l'extrémité des protrusions plutôt que dans les régions les plus concaves. Cette hypothèse a été vérifiée dans le cas des sélectines : ces molécules sont concentrées aux extrémités des protrusions des membranes leucocytaires en raison d'interactions impliquant la région transmembranaire de ces molécules. La modification des régions transmembranaires peut abolir la localisation sur les microvilli, réduisant ainsi l'activité adhésive des sélectines sans que les sites de reconnaissance soient altérés [von Andrian 1995]. Réciproquement, le contrôle de la topographie des récepteurs peut être mis à profit par les cellules pour réguler leur activité adhésive : on a décrit un regroupement des intégrines leucocytaires sur les régions les plus externes en réponse à un stimulus activateur [Erlandsen 1993].

3.1.3.5 - Modulation de la mobilité latérale des récepteurs d'adhésion.

Il paraît logique de penser que l'établissement d'un attachement solide entre deux surfaces nécessite que les récepteurs puissent se déplacer dans le plan de la membrane de manière à venir se localiser en face de leurs ligands. Cette hypothèse simple est confortée par une expérience largement citée [Kucik 1996] : la technique de "single particle tracking" (suivi au microscope de particules nanométriques attachées à des molécules membranaires) a permis de montrer que l'activation fonctionnelle de l'intégrine leucocytaire LFA-1 par des esters de phorbol entraînait de manière concomitante une "libération" de ces molécules, qui permettait de multiplier leur coefficient de diffusion par un facteur supérieur à 10.

3.1.3.6 - Renforcement de l'attachement des récepteurs d'adhésion au cytosquelette.

La force que peut supporter un récepteur d'adhésion est au maximum égale à la solidité de sa fixation à la cellule. Il est logique de penser que l'attachement de la région intracytoplasmique du récepteur au cytosquelette contribue à la résistance à l'arrachement. La vraisemblance de ce modèle simple est confortée par des données expérimentales : si l'on remplace la L-sélectine native par une molécule incapable de s'accrocher au cytosquelette sous-jacent du fait d'une délétion de la région intracytoplasmique, la capacité de fixer son ligand n'est pas altérée mais ce traitement inhibe la capacité d'induire un "roulement" sur une monocouche endothéliale [Dwir 2001] suivant un mécanisme décrit dans le paragraphe 3.2.

Les mécanismes que nous avons discutés expliquent l'effet ambivalent d'une libération des récepteurs d'adhésion vis-à-vis du cytosquelette : la mobilité latérale sera augmentée, mais la solidité de l'insertion membranaire sera diminuée. Ce double mécanisme pourrait expliquer des effets contradictoires d'une altération du cytosquelette sur l'adhésivité cellulaire [Lub 1997].

En conclusion : de multiples mécanismes participent à l'efficacité fonctionnelle des récepteurs d'adhésion, et il ne suffit pas de recenser les récepteurs membranaires exprimés par une cellule (par exemple en utilisant la cytométrie de flux) pour rendre compte de son adhésivité.

3.1.4 - Conséquences de l'adhésion des cellules phagocytaires et paramètres détectés par les cellules adhérentes.

Comme nous l'avons indiqué, l'adhésion à une surface modifie considérablement les propriétés et le comportement cellulaires, qu'il s'agisse de survie, de prolifération, de différenciation ou de comportements à court terme comme les mouvements ou la sécrétion de médiateurs. L'étude de ces phénomènes constitue un domaine très actif et nous ne disposons pas d'une interprétation générale des phénomènes. Une conclusion remarquable qui s'est maintenant imposée est que le comportement cellulaire n'est pas dicté seulement par la nature biochimique des molécules exposées par les surfaces, mais aussi par des propriétés physiques telles que la rigidité et la topographie. Nous illustrerons ces remarques par quelques exemples s'appliquant aux cellules phagocytaires.

3.1.4.1 - Nature biochimique du substrat : On sait depuis longtemps que l'adhésion à une surface entraîne la différenciation des monocytes en macrophages. Ce processus est profondément affecté par la nature de la surface. Par exemple, une expérience classique a montré que des monocytes se différenciaient beaucoup plus efficacement sur une surface de verre lorsque celle-ci avait préalablement été recouverte d'une couche de collagène, qui est un ligand de certaines intégrines [Kaplan, 1982].

3.1.4.2 - Propriétés physico-chimiques du substrat : On sait depuis longtemps que les cellules sont capables de distinguer des substrats de propriétés biochimiques différentes. En particulier, les macrophages adhèrent de manière particulièrement efficace aux surfaces hydrophobes [Rich 1981 ; Capo 1979] ou dont la charge électrostatique a été réduite [Capo 1981 ; Mège 1987]. Les mécanismes mis en jeu ne sont pas entièrement connus. En particulier, la conformation des molécules adsorbées sur une surface dépend des propriétés physicochimiques de celle-ci, ce qui peut influencer la nature des sites de reconnaissance exposés.

3.1.4.3 - Distribution latérale des sites de reconnaissance : Dans certaines conditions, des macrophages adhérant à une surface recouverte de fibronectine peuvent fusionner de manière à former des cellules géantes multinucléées. La fibronectine est reconnue par des intégrines membranaires telles que $\alpha 5 \beta 1$ (CD49eCD29). Ces molécules reconnaissent deux sites différents au moins, mimés par les oligopeptides RGD et PHSRN (désignés par la nomenclature à une lettre des acides aminés). On a montré que l'effet de la fibronectine pouvait être mimé par des surfaces couvertes de sites RGD et PHSRN à conditions que ceux-ci soient séparés par un "espaceur" de longueur convenable et convenablement orientés [Kao 2001]. D'autres expériences réalisées sur des fibroblastes concluent également à l'importance de la topographie des ligands des récepteurs membranaires.

3.1.4.4 - Rugosité et topographie tridimensionnelle (3D) du substrat : On a rapporté depuis longtemps que les macrophages se concentraient sélectivement sur les surfaces rugueuses, à l'opposé des fibroblastes [Rich 1981]. Plus récemment, il a été rapporté que des granulocytes neutrophiles déposées sur des surfaces rugueuses présentaient une mortalité élevée vraisemblablement liée à la production de dérivés oxygénés [Chang, 2003]. On a également montré que l'efficacité de phagocytose d'une particule fixée par des macrophages dépendait de sa forme et de sa relation géométrique avec la membrane cellulaire [Champion 2006].

3.1.4.5 - Rigidité du substrat : De nombreuses expériences réalisées sur plusieurs espèces cellulaires ont montré que les cellules adhérentes exerçaient des forces sur les substrats sous-

jacents et développaient des réponses dépendant de la rigidité de ce substrat. Cette règle s'applique aux phagocytes mononucléés : des macrophages s'étalent beaucoup plus efficacement sur des surfaces rigides que sur des gels de polyacrylamide de faible résistance mécanique [Féréol 2006].

En conclusion : Il est maintenant bien établi que le comportement cellulaire résulte de l'intégration de nombreuses informations concernant leur environnement. Les interactions adhésives constituent un mode majeur de génération de telles informations. Les mécanismes mis en jeu sont encore incomplètement compris et font l'objet de recherches actives [Pierres 2009].

3.1.5 - Exploration de l'adhésion.

L'adhésivité cellulaire a longtemps été étudiée au moyen de techniques simples donnant des informations qualitatives : des populations cellulaires étaient déposées sur un substrat. Après une incubation de durée variable, les cellules non adhérentes étaient éliminées par un simple lavage et les cellules adhérentes étaient comptées et - éventuellement - examinées avec un microscope standard. Plus récemment, de nombreuses méthodes ont été développées pour étudier l'adhésion cellulaire de manière bien plus sensible en fournissant des données quantitatives. Ces méthodes ont été décrites dans plusieurs ouvrages [Bongrand 1994] et revues [Bongrand 1999] et nous nous citerons seulement deux techniques complémentaires :

3.1.5.1 - Chambre à flux laminaire. Il s'agit d'une méthode très puissante d'étude de l'adhésion cellulaire [Pierres 2008a] : une suspension cellulaire est injectée dans une chambre à faces parallèles de faible épaisseur (quelques centaines de μm) située sur la platine d'un microscope. Les trajectoires cellulaires sont suivies individuellement et un traitement informatique simple permet de calculer la fréquence et la durée des événements adhésifs. En présence d'un flux suffisamment faible, la force d'entraînement des cellules est de l'ordre du piconewton, et une liaison moléculaire individuelle peut suffire à entraîner un arrêt détectable.

3.1.5.2 - Microscopie à contraste de réflexion (IRM : interference reflection microscopy ou RICM : reflection interference contrast microscopy). Cette méthode optique introduite par A. Curtis permet de visualiser le contact moléculaire entre une cellule et une surface plane [Pierres 2003]. Il n'est pas nécessaire d'utiliser un marqueur et les cellules peuvent être suivies individuellement dans une enceinte thermostatée placée sur la platine d'un microscope. Il est ainsi possible de déterminer de manière extrêmement précise la cinétique d'attachement.

Ces méthodes ont permis de mettre en évidence des déficits de l'adhésion des cellules phagocytaires : le LAD (leukocyte adhesion deficiency) est certainement l'exemple le plus représentatif. Le LAD de type I, lié à un déficit d'expression des intégrines $\beta 2$, a été découvert peu après la caractérisation de la molécule LFA-I. Il comporte un déficit évident de l'adhésion leucocytaire. Plus récemment, des formes moins sévères de LAD (LAD de type III) ont été mises en évidence : elles sont dues à des déficits fonctionnels de l'activation des intégrines, et ont pu en particulier être attribuée à une anomalie d'une molécule interagissant avec les intégrines, la kindline 3. Des déficits quantitatifs de l'adhésion et de l'étalement ont pu aisément être mises en évidence avec les méthodes que nous venons de citer [Robert 2011].

3.2 - Migration des phagocytes mononucléés

La capacité de se déplacer est un élément indispensable au fonctionnement des cellules phagocytaires. Une cellule capable d'ingérer et de détruire des microorganismes pathogènes serait inefficace si elle devait attendre un contact fortuit pour déclencher son activité. Les leucocytes peuvent mettre en jeu plusieurs mécanismes complémentaires pour organiser leurs

déplacements. Nous les examinerons successivement avant de citer brièvement les principales méthodes utilisées pour explorer ces processus.

3.2.1 - Mécanismes de migration.

3.2.1.1 - Migration sur une surface en présence de facteurs chimiotactiques.

Le dispositif expérimental le plus simple consiste à observer au microscope les déplacements de cellules déposées sur une surface. Les granulocytes neutrophiles figurent parmi les cellules les plus étudiées dans ce domaine et nous nous appuyerons essentiellement sur les résultats obtenus avec ce modèle. Une étude détaillée n'entrerait pas dans le cadre de ce chapitre et des renseignements complémentaires peuvent être trouvés dans une excellente revue [Kay 2008].

Description générale. Un neutrophile déposé sur une surface peut détecter des gradients de concentrations très faibles de substances **chimiotactiques** : Une différence de concentration de l'ordre de 2% entre deux extrémités distantes d'une dizaine de μm suffit à déclencher le mouvement. La cellule émet une protrusion (**lamellipode**) dans la direction où la concentration de facteur chimiotactique est maximale. Le déplacement s'effectue par un cycle comprenant l'adhésion du lamellipode à l'avant, une contraction cellulaire qui permet le détachement de la région opposée, plus étroite, appelée **uropode** et l'avancement du corps cellulaire. Ce mouvement repose donc sur une succession de phénomènes d'attachement à l'avant et de détachement à l'arrière. Il nécessite une polarisation de la cellule (c'est précisément la définition d'une orientation). La vitesse de déplacement peut atteindre une dizaine de μm par minutes. Si le gradient de concentration est suffisant, la cellule se dirige sans détour dans la direction de celui-ci. Le rapport du déplacement effectué durant un intervalle de temps donné à la longueur du chemin parcouru (c'est l'**indice chimiotactique**) est alors voisin de l'unité. Si la direction du gradient est modifiée expérimentalement, la cellule se réoriente progressivement en émettant de nouveaux lamellipodes.

Récepteurs des substances chimiotactiques. Les phagocytes mononucléés peuvent reconnaître des substances de structure chimique très variées au moyen de nombreux récepteurs possédant une remarquable communauté de structure : il s'agit de protéines membranaires de type I formées de 350 acides aminés environ, et dotées de sept segments transmembranaires, ce qui est une propriété connue des récepteurs mettant en jeu des protéines G hétérotrimériques [Snyderman 1984]. Il ne serait pas possible de décrire tous les récepteurs exprimés par toutes les sous-populations de phagocytes mononucléés, mais il est intéressant de citer des exemples importants :

- le N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (**fMLF**), qui peut être reconnu par des récepteurs d'affinité modulable ($K_D \approx 20 \text{ nM}$ et 1 nM ; [Snyderman 1984]), est considéré comme représentatif de structures exprimées par les procaryotes, dont la synthèse protéique commence par la mise en place d'un résidu formyl-méthionine. Cela expliquerait la capacité connue des surnageants de cultures de bactéries d'attirer les phagocytes.
- Certains constituants du complément, en particulier le **C5a**, sont chimiotactiques pour les phagocytes qui sont ainsi attirés par les surfaces activatrices du complément (par la voie classique ou une voie alternative). Cette propriété est un exemple de synergie entre le système immunitaire adaptatif (producteur des anticorps) et inné.
- Certaines chimiokines [Encadré 4] (RANTES, MCP 1, MCP 2, MCP 3) peuvent être libérées par les lymphocytes activés par la rencontre d'un antigène. Cette capacité de recruter des phagocytes était connue depuis longtemps et attribuée à un hypothétique LDCF (lymphocyte derived chemotactic factor) de nature chimique mal définie.

- Certaines chimiokines qu'ils libèrent, ce qui permet à des phagocytes activés de recruter d'autres phagocytes (Les « macrophage chemotactic proteins » MCP 1, 2 et 3 déjà citées) et des facteurs chimiotactiques lipidiques (PAF : platelet activating factor).
- Certains facteurs libérés sur les sites de lésions cellulaires, tels que la thrombospondine, sont chimiotactiques pour les cellules phagocytaires. La capacité des phagocytes de détecter des cellules récemment tuées est illustrée par le phénomène de nécrotaxie décrit par M. Bessis.

La migration des cellules dendritiques, d'abord vers les tissus périphériques, puis vers les organes lymphoïdes après la détection et la capture des antigènes, constitue un autre exemple important [Banchereau 2000].

Au total : les phagocytes mononucléés expriment de nombreux récepteurs leur permettant de se diriger au sein de l'organisme dans des conditions de repos ou en présence d'une agression : Les phagocytes vont alors se diriger vers les régions où se développent des bactéries, où des structures étrangères sont reconnues par le système immunitaire adaptatif (anticorps et lymphocytes T), enfin, sur les lieux où se développent des lésions cellulaires. Il convient de rappeler deux propriétés importantes des récepteurs chimiotactiques :

- La régulation de l'affinité et la désensibilisation sont des propriétés importantes de ces récepteurs qui jouent sans doute un rôle essentiel dans leur capacité de fonctionner dans une gamme très large de concentrations de facteurs chimiotactiques. On distingue la **désensibilisation homologue**, qui désigne la diminution de sensibilité d'un récepteur après l'exposition à son propre ligand, de la **désensibilisation hétérologue**, qui désigne la désensibilisation d'un récepteur à la suite de l'exposition de la cellule à un ligand d'un autre récepteur, ce qui suggère que la désensibilisation concerne une voie de signalisation commune.
- La stimulation des récepteurs chimiotactiques peut entraîner plusieurs types de réponses cellulaires : classiquement, la réponse à une faible concentration de ligand consiste à amorcer un déplacement cellulaire alors que des concentrations plus élevées peuvent entraîner la sécrétion de facteurs bactéricides.

Mécanismes de signalisation. Les mécanismes moléculaires de guidage chimiotactique sont très complexes et incomplètement connus. Des résultats récents ont montré que les cellules disposent de plusieurs mécanismes de guidage. Un des mécanismes les plus étudiés repose sur la concentration locale de phosphatidyl inositol 3,4,5 tris-phosphate qui induit la formation de pseudopode en interagissant avec des protéines capables de le reconnaître (en particulier par l'intermédiaire de domaine d'homologie avec la pleckstrine). Cette redondance des mécanismes de signalisation est un facteur de robustesse pour la cellule, mais complique considérablement l'interprétation des données expérimentales [Hoeller 2007 ; Kay 2008].

3.2.1.2 – Migration tridimensionnelle.

La plupart des études concernant les mécanismes de déplacement cellulaire portent sur les déplacements sur une surface. Les expériences ont mis en évidence un mécanisme général de locomotion comportant de nombreux cycles d'adhésion (à l'avant) et de déadésion (à l'arrière de la cellule). Il a été justement remarqué que dans les conditions physiologiques les cellules doivent se déplacer dans un environnement tridimensionnel, ce qui privilégie l'importance de la capacité de déformation par rapport aux mécanismes adhésifs. [Lammermann 2008].

3.2.1.3 - Circulation leucocytaire et diapédèse.

La capacité des cellules immunitaires de migrer des vaisseaux sanguins vers les tissus (diapédèse) joue un rôle important dans l'accomplissement de leurs fonctions. Ainsi, les monocytes et les cellules dendritiques présents dans le sang migrent rapidement vers les tissus

en vue de poursuivre leur maturation. D'autre part, l'initiation des réactions inflammatoires repose sur la capacité des cellules endothéliales activées de fixer et d'activer les leucocytes circulants pour induire leur passage vers les tissus. Les mécanismes généraux de cette interaction ont fait l'objet de multiples études au cours des 25 dernières années et semblent obéir à un même schéma [Springer 1995 ; Ley 2007] :

- Les sélectines E et P exprimées par les cellules endothéliales interagissent avec leur principal ligand leucocytaire PSGL-1. La formation et la rupture successives de nombreuses liaisons sélectine/PSGL-1 réduit considérablement la vitesse d'écoulement des leucocytes (de quelques mm/s à une dizaine de $\mu\text{m/s}$), entraînant un déplacement saccadé appelé "roulement" ou "rolling".

- Le ralentissement des leucocytes leur permet d'interagir avec les facteurs chimiotactiques liés à la matrice péricellulaire des cellules endothéliales. Il en résulte une activation des intégrines membranaires

- Ces intégrines se fixent à leurs ligands (en particulier LFA-I - CD11aCD18 se fixe aux molécules ICAM et VLA-4, et CD49dCD29 se fixe à VCAM-I), ce qui entraîne l'arrêt des leucocytes.

- Les cellules immunitaires se dirigent alors vers les jonctions des cellules endothéliales qu'elles traversent en bloquant temporairement les liaisons homotypiques formées par les molécules JAM et PECAM-1/CD31 [Alon 2004]

- Après la traversée des jonctions interendothéliales, les leucocytes doivent ensuite traverser la basale sous jacente et entamer leur déplacement intra-tissulaire.

De très nombreuses molécules participent à ces processus. Le processus d'adressage des leucocytes à l'endothélium avait été comparé [Springer 1995] à un téléphone cellulaire, guidé par une combinaison sélective de trois molécules parmi les sélectines, les facteurs chimiotactiques et les intégrines, qui pouvaient varier d'une espèce cellulaire à l'autre, et parmi les régions de l'organisme. Plus récemment, il a été estimé [Ley 2007] que l'activation des intégrines par les chimiokines était initiée par 47 protéines, qui conduisaient à mettre en jeu un réseau de près de 900 protéines liées par 6000 interactions.

3.2.2 – Exploration du chimiotactisme.

Depuis longtemps, la mesure du chimiotactisme est effectuée dans le cadre de l'exploration fonctionnelle des phagocytes mononucléés. Les tests effectués *in vivo* (fenêtre de Rebeck) ne sont plus pratiqués. On peut mentionner trois méthodes utilisables *in vitro* :

- On peut observer (éventuellement avec un enregistrement en accéléré) le déplacement des leucocytes dans des chambres spéciales permettant de créer un gradient de concentration d'une substance chimiotactique. Cette méthode permet de déterminer la trajectoire et de calculer un "indice chimiotactique" égal au rapport de la distance des extrémités de la trajectoire à sa longueur totale (un indice égal à un correspond à une trajectoire rectiligne, témoin d'un guidage parfait).

- *La chambre de Boyden* est constituée de deux compartiments séparés par un filtre (les dimensions des pores ont un diamètre de 3 à 5 μm). Un facteur chimiotactique est introduit dans un compartiment, et des leucocytes sont déposés sur le filtre, dans l'autre compartiment. On mesure au bout de quelques heures le nombre de cellules ayant traversé le filtre (ce qui peut bénéficier d'un marquage des cellules) ou le déplacement maximal des cellules dans le filtre (celui-ci doit d'abord être rendu transparent par un traitement chimique, puis observé au microscope).

- *La migration sous agarose* est étudiée en déposant sur une lame de verre une solution d'agarose chauffée qui se solidifie au refroidissement. On creuse avec un emporte-pièce des séries de trois puits permettant d'introduire des cellules (puits central), une solution témoin ou une solution chimiotactique. Après une quinzaine d'heures, une observation microscopique à

faible grossissement permet de visualiser le nuage formé par les cellules au cours de leur déplacement sous la couche d'agarose. On peut ainsi apprécier la mobilité spontanée et la capacité de diriger le mouvement dans la direction du gradient.

L'exploration du chimiotactisme a permis de détecter des anomalies qui pouvaient être temporaires (diminution du chimiotactisme chez les sujets infectés, ce qui pourrait être dû à une désensibilisation de nombreux récepteurs) ou liés à une anomalie génétique : le déficit d'adhésion lié au LAD entraîne une anomalie détectable par la technique de migration sous agarose, mais la migration au travers d'un filtre est normale, en accord avec des expériences déjà citées [Lammermann 2008]. Réciproquement, la migration peut être anormale dans la chambre de Boyden et normale sous agarose : cela semble être le cas chez les patients atteints de syndrome de Chediak Higashi : la présence de granules géants gêne les déformations des cellules et leur déplacement dans un filtre. La migration sur une surface (conditions 2D) est cependant normale.

3.3 - Phagocytose

La phagocytose est l'ingestion d'une particule par une cellule. Cette fonction est apparue très tôt dans l'évolution : on la retrouve chez les protozoaires qui l'utilisent pour leur nutrition. La phagocytose existe à la fois dans le Règne animal et dans le Règne végétal. Il n'est donc pas surprenant que de nombreuses populations cellulaires puissent ingérer des particules dans des conditions particulières. Cependant, la capacité de phagocyter activement des particules étrangères couvertes d'anticorps est réservée aux phagocytes "professionnels", granulocytes et phagocytes mononucléés, et constitue un moyen efficace d'éliminer les microorganismes pathogènes ainsi que les constituants altérés de l'organisme sans léser les tissus environnants. Nous décrirons rapidement trois phases successives de la phagocytose : reconnaissance, ingestion et digestion.

3.3.1 - Reconnaissance.

A l'exception de quelques situations très particulières (phagocytose de surface), l'ingestion d'une particule nécessite sa fixation préalable à la cellule. Cependant, seuls certains des récepteurs d'adhésion des phagocytes peuvent déclencher l'ingestion [Capo 1978]. Nous décrirons successivement les principaux mécanismes d'adhésion susceptibles de déclencher la phagocytose.

3.3.1.1 - Reconnaissance directe des particules étrangères et des cellules altérées.

Il n'est pas illogique de constater l'intrication des mécanismes de reconnaissance de certains motifs caractéristiques des microorganismes étrangers (PAMP : pathogen associated molecular patterns) et celle de structures associées à des lésions des constituants de l'organisme (DAMP : damage associated molecular patterns) : il est utile que le système immunitaire puisse être alerté par la détection d'un agent étranger [Medzhitov 2002], mais aussi par la détection d'une lésion exercée par un agent étranger qui a pu échapper à la reconnaissance [Matzinger 2002]

- On sait depuis longtemps que les phagocytes peuvent fixer et phagocyter des particules **hydrophobes** telles que des bactéries non encapsulées, des microsphères de latex ou des hématies modifiées par certains aldéhydes [van Oss 1975 ; Capo, 1979]. Les mécanismes mis en jeu sont complexes : un matériau introduit dans un milieu biologique est recouvert en quelques secondes de macromolécules dont la conformation va évoluer progressivement [Vitte 2004a]. Il est donc très difficile d'identifier la structure moléculaire "reconnue" par les phagocytes.

- Le terme de "**récepteurs éboueurs**" (**scavenger receptors**) est utilisé pour désigner plusieurs familles structurellement différentes de récepteurs membranaires [Pearson 1996;

[Greaves 2009] qui peuvent fixer de nombreuses structures microbiennes, mais aussi des lipoprotéines altérées, ce qui peut participer au rôle supposé des phagocytes mononucléés dans l'athérosclérose [Moore 2011]. Ces récepteurs éboueurs peuvent déclencher plusieurs réponses cellulaires : phagocytose, mais aussi pinocytose ou libération de cytokines. Nous citerons en particulier:

*Les **récepteurs éboueurs de type A** (SRA I, SRA II, MARCO). Ils ont une région extracellulaire formée de trois brins dont l'arrangement est semblable à celui du collagène. Ils reconnaissent les LDL (low density lipoproteins) oxydées, les polysaccharides anioniques et des bactéries Gram -. Leur implication dans la reconnaissance de particules hydrophobes a été rapportée depuis plusieurs décennies [Fraser 1993].

*Les **récepteurs éboueurs de type B** (SRB-I, CD36) ont un domaine intracytoplasmique conservé. Ils reconnaissent surtout des lipides : phosphatidyl sérine, LDL oxydées. CD36 peut aussi fixer les cellules apoptotiques par l'intermédiaire de la thrombospondine (dont il est un récepteur) ou la phosphatidylsérine dont on sait qu'elle est un "marqueur" des cellules apoptotiques : ce phospholipide se trouve sur le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules vivantes, et apparaît sur le feuillet externe au cours de l'apoptose.

*Les **récepteurs éboueurs de type C** contiennent deux domaines "CCP" (complement control protein) N terminaux et un domaine mucinique. Ils fixent les beta glucanes et des sucres microbiens non chargés.

- Les phagocytes mononucléés peuvent également reconnaître des motifs polysaccharidique par des récepteurs "dédiés". Le **récepteur du mannose** est sans doute l'exemple le mieux défini, et l'on a pu montrer que la stimulation de ce récepteur pouvait déclencher la phagocytose. Il est séduisant d'imaginer que les récepteurs des polysaccharides sont apparus pour permettre aux phagocytes de fixer les bactéries recouvertes d'une capsule polysaccharidique hydrophile et antiphagocytaire.

- Notons enfin que la reconnaissance des cellules apoptotiques peut mettre en jeu l'adsorption de vitronectine qui est reconnue par l'intégrines $\alpha\beta 3$ exprimée par les phagocytes mononucléés.

3.3.1.2 - Reconnaissance des particules "marquées" par le système immunitaire adaptatif : récepteurs des immunoglobulines.

Les phagocytes mononucléés expriment de nombreux récepteurs leur permettant de reconnaître des immunoglobulines IgG (CD16, CD32, CD64), les IgA (CD89), les IgE (récepteur de faible affinité FcεRII). Les récepteurs des IgG ont été les plus étudiés, en particulier le récepteur de haute affinité CD64 (La constante de dissociation est de l'ordre de $10^{-8}M^{-1}$) et de moyenne affinité (CD32, K_A est de l'ordre de $2 \times 10^6 M^{-1}$). Il est intéressant de remarquer que ces récepteurs peuvent se compléter comme l'explique un raisonnement assez simple : si les récepteurs de haute affinité des phagocytes portent tous des anticorps, en l'absence de sensibilisation récente, le nombre absolu d'immunoglobulines spécifiques d'un pathogène donnée est nécessairement faible sur chaque cellule phagocytaire. Par exemple, si 0,01% des immunoglobulines circulantes peuvent se fixer à une bactérie donnée, un monocyte exprimant 50.000 récepteurs de haute affinité ne portera que 5 molécules spécifiques de la bactérie considérée, ce qui est insuffisant pour induire la phagocytose. Au contraire, si la bactérie pénètre dans l'organisme et fixe les immunoglobulines circulantes qui la reconnaissent, les récepteurs de moyenne affinité des monocytes pourront agir en synergie pour fixer et endocyter cette bactérie.

L'importance des récepteurs Fc est illustrée par un exemple particulièrement démonstratif : un seul pneumocoque peut engendrer une infection létale chez une souris incapable de produire des anticorps spécifiques après l'induction d'un état de tolérance.

La phagocytose peut être également induite par des constituants du complément tels que le C3bi qui est fixé par l'intégrine CD11bCD18. Une synergie est possible entre plusieurs systèmes de reconnaissance. On peut rappeler à ce propos le terme ancien d'**opsonisation** qui signifie étymologiquement "préparer pour manger". Ce terme désigne le "marquage" de particules par des facteurs tels que les anticorps ou le complément, ce qui déclenche leur ingestion par les cellules phagocytaires qui les rencontrent.

3.3.1.3 - *Combinaisons des mécanismes spécifiques et non spécifiques.*

La complexité du système immunitaire est bien illustrée par l'intrication des phénomènes spécifiques et non spécifiques : l'activation des constituants du complément à la surface d'une particule peut être déclenchée par la présence d'anticorps (voie classique) et par des mécanismes de reconnaissance innés. Le complément peut induire la phagocytose chez des phagocytes mononucléés par l'intermédiaire des récepteurs du complément. Le récepteur CRIII (MAC-1, CD11bCD18) qui reconnaît le constituant C3bi ne peut induire la phagocytose que si le phagocyte a été préalablement activé. Par ailleurs Il existe une synergie entre les récepteurs Fc et les récepteurs du complément. Enfin, on a montré que le CRIII peut interagir avec plus de 30 ligands, protéiques ou non protéiques, comprenant des motifs bactériens et de nombreux constituants de l'organisme, en particulier des constituants des matrices extracellulaires [Yakubenko 2002]

3.3.2 - *Ingestion.*

3.3.2.1 - *Description générale.*

L'ingestion d'une particule adhérant à un phagocyte peut s'effectuer en quelques secondes [Evans 1989]. Le mécanisme précis d'ingestion peut dépendre de la nature des récepteurs ayant permis la reconnaissance. La phagocytose d'une particule couverte d'immunoglobulines s'effectue par l'émission membranaire d'une protrusion analogue à un lamellipode qui s'étale sur la particule jusqu'à ce qu'elle l'englobe complètement dans une vacuole qui se détache de la membrane par un mécanisme incomplètement élucidé [Fairn 2009]. Selon le modèle classique de la fermeture-éclair [Griffin 1975], l'ingestion nécessite que la totalité de la surface puisse adhérer aux phagocytes, ce qui montre que le lamellipode doit être "guidé" le long de la surface. La particule se trouve alors englobée dans une vésicule formée par une partie de la membrane qui a été internalisée. Des études quantitatives récentes [Zhang 2010] montrent cependant que le mécanisme impliqué peut être plus compliqué que ne le suggère ce modèle simple.

Ce schéma général peut être précisé par plusieurs remarques :

3.3.2.2 - *Remarques.*

- L'ingestion s'accompagne d'une redistribution latérale des molécules membranaires dont certaines sont sauvegardées de l'internalisation. Cette redistribution peut être inhibée par des drogues antagonistes des microtubules [Oliver, 1974].
- L'ingestion nécessite la "consommation" d'une partie de la membrane plasmique qui doit être libérée. C'est d'ailleurs ce phénomène qui peut limiter quantitativement l'étendue de la phagocytose. La libération de membrane pourrait s'effectuer par déplissement de la membrane plasmique [Herant 2005] ou par exocytose de vésicules intracellulaires qui serviraient de réservoir de membranes, comme cela se produit au cours de l'étalement cellulaire [Gauthier 2009].
- Comme nous l'avons indiqué, les mécanismes de phagocytose peuvent différer suivant la nature des récepteurs impliqués. Par exemple, on a rapporté que l'ingestion de particules opsonisées par des constituants du complément étaient internalisées à la suite de la formation

d'une concavité sur la surface plutôt que par l'émission d'un lamellipode [Munthe-Kaas, 1976; Herant 2011]

3.3.3 - Digestion des particules phagocytées.

La phagocytose d'un microorganisme pathogène ne peut être utile à l'organisme que si la particule est détruite rapidement après son ingestion. L'importance de la digestion est illustrée par l'exemple des germes à développement intracellulaire qui ont acquis des mécanismes leur permettant d'induire la phagocytose qui leur permet ensuite de se multiplier dans un environnement qui leur convient. C'est pour cette raison que les phagocytes mettent simultanément en jeu de multiples mécanismes de destruction des particules phagocytées. Ces mécanismes peuvent être déclenchés dès la rencontre de la particule qui va être ingérée. Ils peuvent aussi être initiés par des processus de reconnaissance impliquant des "capteurs" intracellulaires comprenant certains TLRs (TLR 3, 7, 8 et 9 mentionnés plus haut [Manavalan 2011] ou les constituants des inflammasomes [Strowig 2012]

On peut distinguer trois processus complémentaires :

3.3.3.1 - Acidification du phagosome.

La phagocytose est suivie en une dizaine de minutes d'une acidification de une à deux unités pH. Ce processus est important à connaître pour deux raisons au moins :

- L'acidification peut influencer significativement le devenir des microorganismes endocytés : (a) l'acidification peut déclencher la traversée du phagosome par des virus comme le virus grippal, ce qui a conduit à utiliser des inhibiteurs de l'acidification comme antiviraux. (b) On a constaté que certaines bactéries comme *Legionella Pneumophila* [Horwitz 1984] inhibaient l'acidification des phagosomes, ce qui a été interprété comme un mécanisme de survie. (c) Au contraire, certains parasites comme *Leishmania* peuvent accentuer l'acidification des phagosomes pour se construire un environnement adapté [Antoine 1990].
- L'acidification peut moduler l'efficacité des mécanismes bactéricides mis en jeu par la cellule, par exemple les enzymes protéolytiques.

3.3.3.2 - Production de dérivés oxygénés réactifs.

La phagocytose déclenche une augmentation considérable de l'activité métabolique cellulaire, conduisant à une production considérable de dérivés réactifs de l'oxygène : anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle (OH.), oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). C'est l'explosion oxydative ("oxidative burst"). Cette réponse repose sur l'activation d'une NADPH-oxydase (NOX2) qui s'organise sur la membrane plasmique avant même la fermeture du phagosome [Segal 2005 ; Russell 2009]. L'élément essentiel de cette oxydase est le cytochrome b558 qui est constitué de deux sous-unités : p22^{phox} et gp91^{phox}. Le complexe nécessite également un petit nombre d'autres constituants : p27^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} et p21^{rac} qui est une petite protéine G (*phox* signifie simplement : phagocyte oxydase).

L'activité bactéricide de ces composés a été attribuée à plusieurs mécanismes non exclusifs: L'oxydation d'anions chlorure présents en abondance dans le milieu conduit à la production d'hypochlorite (ClO^-) dont l'activité bactéricide est bien connue (eau de Javel). L'importance d'un autre mécanisme a été mieux démontré chez la souris que chez l'homme : l'activation des phagocytes induit la production de monoxyde d'azote (NO) qui est ensuite oxydé en peroxynitrite ONO^- , qui joue un rôle important dans la destruction de pathogènes à développement intracellulaire. L'importance de ces mécanismes a été critiquée [Segal 2005] : il est difficile de prouver que des réactifs dont on a montré le rôle bactéricide in vitro sont effectivement responsables de l'activité bactéricide des phagocytes.

L'importance de la réponse oxydative est attestée par les conséquences de son déficit, une anomalie rare (l'incidence est voisine de 10^{-6}) appelée granulomatose chronique. On a récemment constaté que les mitochondries pouvaient augmenter la production de dérivés oxygénés [West 2011].

3.3.3.3 - Fusion des phagosomes avec les lysosomes

Le phagosome interagit successivement avec plusieurs compartiments vacuolaires de la cellule [Russell 2009], et va acquérir des constituants spécifiques tels que LAMP-1 ("lysosome-associated membrane protein 1"), témoins du processus de **maturation du phagosome**. Cette maturation va conduire à introduire dans le phagosome de nombreuses substances potentiellement bactéricides : le lysozyme qui détruit certains parois bactériennes, les **défensines**, des protéases et des lipases [Auger 1999]. Ce processus conduit à transformer le phagosome en **phagolysosome** après plusieurs dizaines de minutes.

L'ensemble des processus d'acidification, de modification de l'équilibre d'oxydo-réduction, et d'introduction de différents enzymes conduisent à créer les conditions de la destruction des particules phagocytées. L'inhibition de la fusion phagosome-lysosome figure parmi les stratégies d'échappement développées par les agents pathogènes à développement intracellulaire (par exemple, les mycobactéries)

3.4 - Présentation de l'antigène et modulation de la réponse immunitaire adaptative.

La réponse immunitaire adaptative est apparue dans l'évolution bien plus tardivement que la phagocytose. Cependant, les fonctions des lymphocytes et des phagocytes mononucléés sont profondément intriquées. Une étude détaillée des mécanismes mis en jeu n'entrerait pas dans le cadre de cette revue. Nous décrirons successivement deux points fondamentaux : le traitement de l'antigène en vue de sa présentation aux lymphocyte T et le dialogue bidirectionnel existant entre les lymphocytes et les cellules phagocytaires.

3.4.1 - Traitement de l'antigène en vue de sa présentation aux lymphocytes T.

L'élucidation des mécanismes de reconnaissance des lymphocyte T a constitué un objectif essentiel des immunologistes jusqu'à l'identification du récepteur des lymphocytes T et l'élucidation à l'échelle de l'Angström de la structure des molécules d'histocompatibilité. Nous résumons les principes généraux qui mettent en lumière le rôle fondamental des phagocytes mononucléés.

3.4.1.1 - Rôle des lymphocytes T CD4 et CD8 (résumé).

Les lymphocytes T, par l'intermédiaire de leur récepteur spécifique (TCR : T cell receptor) ne reconnaissent pas directement une protéine étrangère native mais un oligopeptide d'une dizaine d'acides aminés (résultant d'une protéolyse partielle) qui se trouve inséré dans un sillon d'une molécule d'histocompatibilité [Bjorkman 1987]. Ce mécanisme explique le phénomène longtemps mystérieux de la **restriction de la reconnaissance par le complexe majeur d'histocompatibilité** : le lymphocyte T ne reconnaît pas un antigène étranger de manière intrinsèque mais seulement dans **le contexte du soi**.

On distingue depuis longtemps deux catégories de lymphocytes T :

Les lymphocyte T exprimant l'antigène différenciation CD8 reconnaissent les oligopeptides associés aux molécules d'histocompatibilité de classe I (HLA-A, B et C chez l'homme). Etant donné que ces molécules fixent en règle des fragments de protéines **endogènes**, on peut penser que le rôle majeur des lymphocytes CD8 est de reconnaître les cellules synthétisant des protéines étrangères, par exemple des protéines virales témoignant d'une infection. Ces cellules seront détruites par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques, ce qui a pour but d'arrêter l'infection.

Les Lymphocytes T CD4 reconnaissent les oligopeptides associés aux molécules d'histocompatibilité de classe II. Ces molécules ne sont exprimés que par des cellules présentatrices spécialisées (phagocytes mononucléés, lymphocytes B). Les phagocytes mononucléés associent aux molécules d'histocompatibilité de classe II des fragments de protéines de particules **exogènes** phagocytées **qui ont été incomplètement dégradées**. Le rôle du lymphocyte T consiste ici à activer des cellules effectrices qui sont souvent des phagocytes mononucléés.

3.4.1.2 - Rôle des cellules phagocytaires.

Le résumé qui précède explique que les cellules phagocytaires peuvent jouer plusieurs rôles :

- Ingérer des particules étrangères et les **dégrader complètement**.
- Ingérer des particules étrangère, et les **dégrader incomplètement**, pour associer les fragments aux antigènes d'histocompatibilité de classe II pour les présenter aux lymphocytes T CD4.
- Ingérer les particules étrangères, les dégrader incomplètement et associer les fragments aux antigènes d'histocompatibilité de classe I pour sensibiliser des lymphocytes T CD8. c'est la **présentation croisée** (cross presentation) dont les mécanismes sont incomplètement élucidés [Heath 2004].

Cette multiplicité de rôles explique l'existence d'une antinomie entre la capacité de dégradation et la capacité de présentation, ce qui explique l'utilité d'une différenciation fonctionnelle : les cellules dendritiques ont pour rôle de sensibiliser les lymphocytes T (CD4 ou CD8), ce qui conduit à limiter leur activité protéolytique et à privilégier l'expression de molécules d'histocompatibilité et de molécules d'activation des lymphocytes T. Une autre fonction des cellules dendritiques consiste à se déplacer vers les organes lymphoïdes pour accélérer la rencontre des lymphocytes T. Ces déplacements sont guidés par des récepteurs des chimiokines.

Les monocytes et les macrophages peuvent dégrader plus efficacement les antigènes que les cellules dendritiques, au prix d'une moindre efficacité de présentation. Cette compétition entre la capacité de destruction et de présentation était suggérée par des expériences anciennes [Mouton 1984] et a été confirmée par des données plus récentes [Delamarre 2005].

3.4.2 - Dialogue entre les lymphocytes T et les cellules phagocytaires.

Le rôle des phagocytes mononucléés dans l'activation des lymphocytes T ne se limite pas à l'exposition sur leur surface de complexes (pMHC) formés entre les oligopeptides antigéniques et les molécules d'histocompatibilité. On peut distinguer schématiquement trois fonctions complémentaires.

3.4.2.1 – Régulation de l'adhésion et des conditions physiques de l'interaction.

Lorsqu'un lymphocyte T « reconnaît » un ligand de son TCR sur une cellule présentatrice, il forme un contact durable qui comportera en particulier, après quelques dizaines de minutes, une réorganisation des molécules de sa membranes constituant la « synapse immunologique » [Monks 1998 ; Grakoui 1999]. Cette adhésion nécessite une interaction des récepteurs d'adhésion des deux cellules, en particulier LFA-1 sur la cellule T et la cellule présentatrice et les molécules ICAM-1 exposées par les deux cellules. Un déficit d'adhésion compromet la stimulation des lymphocytes T [Davis 2009]. Réciproquement, une activation excessive de l'intégrine LFA-1 **sur les cellules dendritiques** peut diminuer l'activation [Balkow 2010]. On peut noter aussi qu'un fonctionnement correct du cytosquelette d'actine est nécessaire à la capacité de stimulation des cellules dendritiques [AlAlwan 2001]. Les mécanismes mis en jeu sont incomplètement compris. Quelques données expérimentales récentes suggèrent l'importance potentielle de force susceptibles d'être exercées par les cellules présentatrices sur les lymphocytes T [Huppa 2010 ; Li 2010; He 2012].

3.4.2.2 – Exposition de molécules de co-stimulation.

L'activation lymphocytaire T dépend quantitativement et qualitativement de la stimulation de plusieurs récepteurs « de costimulation », et non pas seulement de celle du TCR. On peut citer en particulier les molécules lymphocytaires T CD28 (qui fixe en particulier CD80 et CD86), CD40L/CD154 (qui fixe CD40) et CD70 (qui fixe CD27) [Rodriguez-Fernandez 2010]. La capacité de stimulation des différentes populations de cellules présentatrices dépend autant de l'expression de molécules de costimulation que de l'efficacité de traitement des protéines étrangères. Ces molécules pourraient déterminer les conséquences quantitatives de la présentation : développement d'une réponse immunitaire de type TH1 ou TH2 [Kuchroo 1995], voire stimulation préférentielle de la tolérance [Geijtenbeek 2004]

3.4.2.3 – Libération de molécules activatrices.

Nous avons plusieurs fois mentionné l'importance du rôle des cytokines dans le développement des cellules immunitaires : L'interleukine 1 (IL-1) autrefois appelée LAF (lymphocyte activating factor) est libérée par les phagocytes mononucléés et promeut l'activation lymphocytaire T. L'IL-12 facilite la formation de la synapse alors que le TGF- β (transforming growth factor β) l'inhibe. Réciproquement, l'interféron gamma (IFN- γ) synthétisé par les lymphocytes T est un activateur des phagocytes mononucléés. Ces cytokines peuvent être libérées dans le milieu et agir à distance, mais une action au contact (qualifiée de « juxtacrine ») a également été décrite [Kaplanski 1994].

3.5 – Cytotoxicité.

La phagocytose peut être considérée comme un mécanisme très « propre » d'élimination des particules étrangères, puisque les facteurs toxiques libérés par le phagocyte sont essentiellement confinés dans le phagosome, ce qui évite les lésions des tissus environnants. Cependant, ce mécanisme ne peut s'appliquer aux cibles de taille excessive. Cette limitation justifie l'existence du processus de destruction au contact sans ingestion, qui constitue la **cytotoxicité à médiation cellulaire**. Depuis plusieurs décennies, on a décrit la capacité des macrophages de détruire des cibles au contact, soit par une reconnaissance directe comme cela avait été rapporté pour des cellules tumorales [Piessens 1975], soit par l'intermédiaire d'anticorps (c'est le phénomène d'ADCC : antibody dependent cell cytotoxicity). Bien que la possibilité de contamination par d'autres populations cellulaires telles que les cellules NK puisse être évoquée [Auffray 2009], On peut estimer que certaines population de phagocytes mononucléés possèdent effectivement la capacité de cytotoxicité. En particulier, une sous-population de monocytes n'exprimant pas CD16 (un marqueur NK) peut lyser des hématies couvertes d'anticorps [Connor 90].

Les mécanismes permettant à un phagocytes mononucléé de détruire une cible au contact sont sans doute multiples : on peut citer la sécrétion de dérivés toxiques de l'oxygène ou de protéases. D'autre part, certaines cytokines telles que le TNF α (tumor necrosis factor alpha) sont fortement cytotoxiques : la lyse de cellules L929 a longtemps été mise à profit pour doser le TNF.

La destruction au contact de tissu osseux a suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières années [Boyle 2003]. Les ostéoclastes sont des phagocytes mononucléés différenciés et activés par l'exposition à des facteurs spécifiques : RANKL (ligand de RANK : receptor activator of NF kappa B) et M-CSF/CSF-1 mentionné plus haut. Au contact du tissu osseux, les ostéoclastes font appel à une intégrine β 3 pour former une jonction étroite entourant un espace clos où ils vont sécréter des enzymes (TRAP : tartrate resistant acid phosphatase, cathepsine K) . Une activation excessive des ostéoclastes peut conduire à des situations pathologiques, par exemple une ostéoporose ou des lésions osseuses associées à la

polyarthrite rhumatoïde. Un déficit fonctionnel peut au contraire être responsable d'une ostéopétrose.

3.6 - Libération de médiateurs

Les phagocytes mononucléés ont la capacité de synthétiser de très nombreux médiateurs jouant un rôle important dans le développement du système immunitaire et l'homéostasie de l'organisme. Une description exhaustive de ces substances n'entrerait pas dans le cadre de cette revue. Nous nous bornerons à énumérer une liste représentative de médiateurs important en essayant de les classer, au moins approximativement, par fonction. Cette tentative est compliquée par la multiplicité des cibles et des actions de nombreuses molécules.

3.6.1 – Les cytokines inflammatoires traditionnelles.

Interleukine 1. En dehors de son action activatrice des lymphocytes T, l'IL-1 induit l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, ce qui favorise le déclenchement des réactions inflammatoires. Par ailleurs, cette substance est pyrogène (on l'a nommé : pyrogène endogène. Au contraire, le récepteur antagoniste de l'IL-1 (IL-1 RA) peut réduire l'action de l'IL-1.

Tumor necrosis factor α . Le TNF- α est également une cytokine inflammatoire très active, qui peut induire l'expression de molécules d'adhésion, activer les cellules phagocytaires, présenter une toxicité directe vis à vis des certaines espèces cellulaires, et exercer des actions métaboliques (activation d'une lipoprotéine lipase) ce qui, en particulier, lui a valu la dénomination de **cachectine**.

Interleukine 6. L'action pro-inflammatoire de cette interleukine est plus discutable que celle des molécules précédentes. L'IL-6 induit la synthèse de la quasi-totalité des protéines de phase aigue pas les cellules hépatiques.

3.6.2 -Cytokines chimiotactiques (chimiokines).

Les phagocytes mononucléés libèrent de nombreuses chimiokines leur permettant de recruter d'autres cellules immunitaires sur les lieux de leur activation. On peut citer :

- Des chimiokines CXC : l'interleukine-8 (IL-8) qui recrute les granulocytes, et MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2)
- Des chimiokines CC : MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) et RANTES.

3.6.3 – Des cytokines régulatrices de la réponse immunitaire.

Interleukine 10. l'IL-10 (CSIF : cytokine synthesis inhibiting factor), d'action plutôt anti-inflammatoire.

Interleukine 12. L'IL-12 (NKSF : NK cell stimulating factor) est un promoteur des réponse TH-1.

Interleukine 18. L'IL-18 a été initialement caractérisée par sa capacité de potentialiser la production d'interféron gamma (une cytokine Th1 typique) par les lymphocytes T stimulés par l'IL-12. Cependant, en l'absence d'IL-12, l'IL-18 semble capable de stimuler une réponse Th2.

3.6.4 – Facteurs de croissance.

Transforming growth factor (TGF). Le TGF α et les TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3. Le TGF β est considéré comme un facteur de désactivation du système immunitaire, qui participerait aux processus de réparation suivant la phase destructrice de la réponse inflammatoire.

On peut encore citer l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet derived growth factor), le VEGF (vascular endothelial growth factor), le bFGF (basic fibroblast growth factor).

La multiplicité de ces facteurs explique pourquoi les macrophages ont pu dans le passé être utilisés comme « cellules de soutien » (feeder cells) pour réaliser de nombreuses cultures cellulaires

3.6.5 – Autres facteurs intervenant dans les réactions inflammatoires.

Parmi les nombreux facteurs libérés par les macrophages, nous pouvons encore citer :

- la plupart des constituants du complément.
- Des facteurs de la coagulation (en particulier : facteur tissulaire, activateur du plasminogène)
- Des régulateurs enzymatiques (α 2-macroglobuline, inhibiteur de l' α 1-antitrypsine, inhibiteur de l'activateur du plasminogène)
- des médiateurs lipidiques de l'inflammation : prostaglandines, leucotriènes, PAF (platelet activating factor).
- Nous avons déjà cité la production de dérivés oxygénés : ceux-ci peuvent être produits au niveau du phagosome, mais aussi être libéré en absence de phagocytose par des phagocytes mononucléés convenablement stimulés (par exemple, par des chimiokines).

4 – CONCLUSION

Les phagocytes mononucléés constituent une famille de cellules présentant une plasticité et une diversité fonctionnelle remarquables. Ils sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme, en participant par l'élimination des facteurs d'agression et aussi la réparation des dommages tissulaires. Ils jouent un rôle fondamentale dans les deux grandes classes de réponses immunitaires, innée et adaptative, qui sont profondément intriquées.

Du fait de leur richesse fonctionnelle, les phagocytes mononucléés sont impliqués dans de très nombreuses situations pathologiques : infections et insuffisance de la réponse immunitaire, maladies inflammatoires, athérosclérose, maladies auto-immunes, ostéoporose, qui sont associées à une réponse immunitaire excessive ou mal dirigée, peut-être même dans le développement tumoral [Biswas08]. Enfin, de très nombreux travaux mettent en évidence la subtilité du rôle des phagocytes mononucléés dans l'évolution des tumeurs.

La connaissance des principes généraux de la physiologie de ces cellules est indispensable à leur exploration, et à la mise en œuvre des outils diagnostiques et thérapeutiques qui découlent maintenant de la recherche fondamentale.

REFERENCES

Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 1984; 2:283-318.

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neurosciences* 2007; 10:1537-1541.

Al-Alwan MM, Rowden G, Lee TDG, West KA. Cutting edge: the dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J. Immunol.* 2001; 166:1452-1456.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell.* 3rd edition. New York: Garland; 1994.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* 4th edition. New York: Garland; 2002.

Alon R, Luscinkas FW. Crawling and INTEGRating apical cues. *Nature Immunol* 2004; 5:351-353.

- Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TRDJ, Reedquist KA, Tak PP, Baeten DLP. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 2012; 375: 196-206.
- Antoine J-C, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infection and Immunity* 1990; 58:779-787.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 2009; 27:669-692.
- Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage. In: Lewis CE, McGee JO'D, editors. *The Macrophage*. Oxford. IRL Press; 1992, p. 1-74.
- Balkow S, Heinz S, Schmidbauer P, Kolanus W, Holzmann B, Grabbe S, Laschinger M. LFA-1 activity state on dendritic cells regulates contact duration with T cells and promotes T-cell priming. *Blood* 2010; 116:1885-1894.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, Pulendrant B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
- Bell GI, Dembo M, Bongrand P. Cell adhesion – Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys J* 1984; 45:1051-1064.
- Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* 2008; 180:2011-2017.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
- Bongrand P, Claesson P, Curtis A, editors. *Studying cell adhesion*. Berlin: Springer -Verlag, 1994.
- Bongrand P, Malissen B. Quantitative aspects of T-cell recognition: from within the antigen-presenting cell to within the T cell. *BioEssays* 1998; 20:412-422.
- Bongrand P. Ligand-receptor interactions. *Reports Prog Physics* 1999; 62:921-968.
- Boyle WJ, Simone WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423:337-342.
- Cai T-Q, Wright SD. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, $\alpha_M\beta_2$) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J Exp Med* 1996; 184:1213-1223.
- Capo C, Bongrand P, Benoliel AM, Depieds R. Dependence of phagocytosis on strength of phagocyte-particle interaction. *Immunology* 1978; 35:177-182.
- Capo C, Bongrand P, Benoliel AM, Depieds R. Nonspecific recognition in phagocytosis: ingestion of aldehyde-treated erythrocytes by rat peritoneal macrophages. *Immunology* 1979; 36:501-508.
- Capo C, Garrouste F, Benoliel AM, Bongrand P, Depieds R. Nonspecific binding by macrophages: evaluation of the influence of medium-range electrostatic repulsion and short-range hydrophobic interaction. *Immunol Communications* 1981; 10:35-43.
- Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:4930-4934.
- Chang S, Popowich Y, Greco RS, Haimovich B. Neutrophil survival on biomaterials is determined by surface topography. *J Vas Surg* 2003; 37:1082-1090.
- Cohn ZA. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J Immunol* 1978; 121:813-816.

- Connor RI, Shen LI, Fanger MW. Evaluation of the antibody-dependent cytotoxic capabilities of individual human monocytes. Role of FcγRI and FcγRII and the effects of cytokines at the single cell level. *J Immunol* 1990; 145:1483-1489.
- Cornet E, Perol J-P, Troussard X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision[®] DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *Int. J Lab Hematol* 2008; 30: 536-542.
- Davis DM. Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nature Rev Immunol* 2009; 9:543-555.
- de Gennes PG. Model polymers at interfaces. In: Bongrand P, editor, *Physical basis of cell-cell adhesion*. Boca Raton : CRC press. 1988, p 39-60.
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 2005; 307:1630-1634.
- Delon J, Kaibuchi K, Germain RN. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 2001; 691-701.
- Detmers PA, Wright SD, Olsen E, Kimball B, Cohn ZA. Aggregation of complement receptors on human neutrophils in the absence of ligand. *J Cell Biol* 1987; 105:1137-1145.
- Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature Immunol.* 2010; 11: 585-593.
- Du X, Tang Y, Xu H, Lit L, Walker W, Ashwood P, Gregg JP, Sharp FR. Genomic profiles for human peripheral blood T cells, B cells, natural killer cells, monocytes and polymorphonuclear cells: comparisons to ischemic stroke, migraine and Tourette syndrome. *Genomics* 2006; 87:693-703.
- Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee H-W, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007; 315:107-111.
- Dwir O, Kansas GS, Alon R. Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. *J Cell Biol* 2001; 155:145-156.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 14863-14868.
- Elbim C, Prevot MH, Bouscarat F, Franzini E, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidallo MA. Polymorphonuclear neutrophils from immunodeficiency virus-infected patients show enhanced activation, diminished fMLP-induced L-selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. *Blood* 1994; 84:2759-2766.
- Erlandsen SL, Hasslen SR, Nelson RD. Detection and spatial distribution of the β₂ integrin (Mac-1) and L-selectin (LCAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:327-333.
- Evans E. Kinetics of granulocyte phagocytosis: rate limited by cytoplasmic viscosity and constrained by cell size. *Cell Motility cytoskeleton* 1989; 14:544-551.
- Fairn GD, Ogata K, Botelho RJ, Stahl PD, Anderson RA, de Camilli P, Meyer T, Wodak S, Grinstein S. An electrostatic switch displaces phosphatidylinositol phosphate kinases from the membrane during phagocytosis. *J Cell Biol* 2009; 187:701-714.
- Farkas A, Kemény L. Monocyte-derived interferon-alpha primed dendritic cells in the pathogenesis of psoriasis: new pieces in the puzzle. *Int. Immunopharmacol* 2012; 13:215-218.
- Féréol S, Fodil R, Labat B, Galiacy S, Laurent VM, Louis B, Isabey D, Planus E. Sensitivity of alveolar macrophages to substrate mechanical and adhesive properties. *Cell Motility Cytoskeleton* 2006; 63:321-340.

- Figdor CG, Bont WS, Touw I, de Roos J, Roosnek EE, de Vries JE (1982) Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation. *Blood* 60:46-53.
- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006; 311: 83-87.
- Fraser I, Hughes D, Gordon S . Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor. *Nature* 1993; 364: 346-346.
- Galvao V, Miranda JGV, Andrade RFS, Andrade Jr JS, Gallos LK, Makse Ha. Modularity map of the network of human differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:5750-5755.
- Gauthier NC, Rossier OM, Mathur A, Hone JC, Sheetz MP. Plasma membrane area increases with spread area by exocytosis of a GPI-anchored protein compartment. *Mol Biol Cell* 2009; 20:3261-3272.
- Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Engering A, Hart BA, van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:33-54.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 2010; 327: 656-661.
- Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; 111: 927-930.
- Grage-Griebenow E, Flad H-D, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukocyte Biol* 2001; 69:11-20.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221-227.
- Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 2009; 50:S282-S286.
- Griffin FM, Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* 1975; 142:1263-1282.
- Guzzo C, Ayer A, Basta S, Banfield BW, Gee K. IL-27 enhances LPS-induced proinflammatory cytokine production via upregulation of TLR4 expression and signaling in human monocytes. *J Immunol* 2012; 188:864-873.
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19:1720-1731.
- Harris A, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukocyte Biol* 1985; 37:407-422.
- He HT, Bongrand P. Membrane dynamics shape TCR-generated signaling. *Frontiers Immunol* 2012; 3:00090.
- Heath WR, Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004; 199:9-26.
- Herant M, Heinrich V, Dembo M. Mechanics of neutrophil phagocytosis: behavior of the cortical tension. *J Cell Sci* 2005; 118:1789-1797.
- Herant M, Lee C-Y, Dembo M, Heinrich V. Protrusive push versus enveloping embrace: computational model of phagocytosis predicts key regulatory role of cytoskeletal membrane anchors. *PLoS Comput Biol* 2011; 7:e1001068.
- Hoeller O, Kay RR. Chemotaxis in the absence of PIP3 gradients. *Current Biol* 2007; 17:813-817.di

- Horwitz MA, Maxfield FR. Legionella pneumophila inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* 1984; 99:1936-1943.
- Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes & Dev* 1997; 11:774-786.
- Huppa JB, Axmann M, Mörtelmaier MA, Lillemeier BF, Newell EW, Brameshuber M, Klein LO, Schütz GJ, Davis MM. TCR-peptide-MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity. *Nature* 2010; 463:963-967.
- Isacke CM, Horton MA. The adhesion molecule FactsBook. New York: Academic Press; 2000.
- Iwasaki H, Akashi K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* 2007; 26:6687-6696.
- Kao WJ, Lee D, Schense JC, Hubbell JA. Fibronectin modulates macrophage adhesion and FBGC formation: the role of RGD, PHSRN, and PRRARV domains. *J Biomed Mater Res* 2001; 55:79-88.
- Kaplan G, Gaudernack G. In vitro differentiation of human monocytes – Differences in monocyte phenotypes induced by cultivation on glass or on collagen. *J Exp Med* 1982; 156:1101-1114.
- Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, Dinarello CA. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood* 1994; 84:4242-4248.
- Kay RR, Langridge P, Traynor D, Hoeller O. Changing directions in the study of chemotaxis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:455-463.
- Kucik DF, Dustin ML, Miller JM, Brown EJ. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J Clin Invest* 1996; 97:3139-2144.
- Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJ, Roos D, Verhoeven AJ. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 1991; 78:1105-1111.
- Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995;80:707-718.
- Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T (2006) Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP α and PU.1 transcription factors. *Immunity* 2006; 25:731-744.
- Lämmermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Söldner R, Hirsch K, Keller M, Förster R, Critchley DR, Fäsler R, Sixt M. Rapide leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453:51-55.
- Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee H-J, Sciammas R, Gantner BN, Dinner AR, Singh H. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 2006; 126:755-766.
- Laurent F, Benoliel AM, Capo C, Bongrand P. Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes: modulation by adhesive stimuli. *J Leukocyte Biol* 1991; 49:217-226.
- Lebart L, Piron M, Morineau A. Statistique exploratoire multidimensionnelle. Paris : Dunod; 2006.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev Immunol* 2007; 7:678-689.
- Li YC, Chen BM, Wu PC, Cheng TL, Kao LS, Tao MH, Lieber A, Roffler SR. Cutting edge: mechanical forces acting on T cells immobilized via the TCR complex can trigger TCR signaling. *J Immunol* 2010; 184:5959-5963.

- Loos H, Blok-Schut B, Kipp B, van Doom R, Meerhof L. Size distribution, electronic recognition, and counting of human blood monocytes. *Blood* 1976; 48:743-753.
- Lub M, van Kooyk Y, van Vliet SJ, Figdor CG. Dual role of the actin cytoskeleton in regulating cell adhesion mediated by the integrin lymphocyte function-associated molecule-1. *Mol Biol Cell* 1997; 8:341-351.
- Manavalan B, Basith S, Choi S. Similar structures but different roles - an updated perspective on TLR structures. *Frontiers Physiol* 2011; 2:00041.
- Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005; 23:344-346.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 2006; 177:7303-7311.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-305.
- Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296:298-300.
- Mege JL, Capo C, Benoliel AM, Bongrand P. Use of cell contour analysis to evaluate the affinity between macrophages and glutaraldehyde-treated erythrocytes. *Biophys J* 1987; 52:177-186.
- Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106: 255-258.
- Mellman I, Misteli T. *Computational cell biology*. 2003; 161:463-464.
- Merad M, MG Manz. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 2009; 113:3418-3427.
- Meyers J, Craig J, Odde DJ. Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. *Current Biol*. 16:1685-1693.
- Monks CRF, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998; 395:82-86.
- Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011; 145:341-355.
- Mosier DE, Coppelson LW. A three-cell interaction required for the induction of the primary immune response in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61: 542-547.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol* 1986; 136:2348-2357.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukocyte Biol* 2003; 73:209-212.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev Immunol* 8:958-969.
- Mouton D, Bouthillier Y, Mevel JC, Biozzi G. Genetic selection for antibody responsiveness in mice: further evidence for inverse modification of macrophage catabolic activity without alteration of the expression of T-cell-mediated immunity. *Ann Immunol (Paris)* 1984; 135D:173-186.
- Munthe-Kaas AC, Kaplan G, Seljelid R. On the mechanism of internalization of opsonized particles by rat Kupfer cells in vitro. *Exp Cell Res* 1976; 103:201-212.
- Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science. 7e Edition 2008.

Neves SR, Tsokas P, Sarkar An, Grace EA, Rangamani P, Taubenfeld SM, CM Alberini, Schaff JC, Blitzer RD, Moraru II, Iyengar R. Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell* 2008; 133:666-680.

Novershtern N, Subramanian A, Lawton LN, Mak RH, Haining WN, McConkey ME, Habib N, Yosef N, Chang CY, Shay T, Frampton GM, ACB Drake, Leskow I, Nilsson B, Preffer F, Dombkowski D, Evans JW, Liefeld T, Smutko JS, Chen J, Friedman N, Young RA, Golub TR, Regev A, Ebert BL. Densely Interconnected Transcriptional Circuits Control Cell States in Human Hematopoiesis. *Cell* 2011; 144:296-309.

Oliver JM, Ukena TE, Berlin RD. Effects of phagocytosis and colchicine on the distribution of lectin-binding sites on cell surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71:394-398.

Patel KD, Nollert MU, McEver RP. P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *J Cell Biol* 1995; 131:1893-1902.

Pearson AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Current Opinion Immunol* 1996; 8:20-28.

Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, Fernandez C, Quijano S, Flores J, Barrena S, Lecrevisse O, van Dongen JJM, Orfao A, on behalf of the EuroFlow Consortium. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry* 2008; 73A: 1141-1150.

Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature Rev Immunol* 4: 648-655.

Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Cell-cell interactions. In: Baszkin A, Norde W, editors. *Physical chemistry of biological interfaces*. New York: Marcel Dekker, p. 459-522.

Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Cell fitting to adhesive surfaces: a prerequisite to firm attachment and subsequent events. *Eur Cell Materials* 2002; 3:31-45.

Pierres A, EymERIC P, Baloche E, Touchard D, Benoliel AM, Bongrand P. Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophys J* 2003; 84:2058-2070.

Pierres A, Benoliel AM, Touchard D, Bongrand P. How cells tiptoe on adhesive surfaces before sticking. *Biophys. J* 2008; 94:4114-4122.

Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Studying molecular interactions at the single bond level with a laminar flow chamber. *Cell Mol Bioeng* 2008a; 1:247-262.

Pierres A, Monnet-Corti V, Benoliel AM, Bongrand P. Do membrane undulations help cells probe the world? *Trends Cell Biol* 2009; 19:428-433.

Piessens WF, Churchill WH, David JR. Macrophages activated in vitro with lymphocyte mediators kill neoplastic but not normal cells. *J Immunol* 1975; 114:293-300.

Pyne S, Hu X, Wang K, Rossin E, Lin T-I, Maier LM, Baecher-Allan C, McLachlan GJ, Tamayo P, Hafler DA, De Jager PL, Mesirov JP. Automated high-dimensional flow cytometric data analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 8519-8524.

Rees DA, Lloyd CW, Thom D. Control of grip and stick in cell adhesion through lateral relationships of membrane glycoproteins. *Nature* 1977; 267:124-128.

Rich A, Harris AK. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *J Cell Sci* 1981; 50:1-7.

Robbins SH, Walzer T, Dembélé D, Thibault C, Defays A, Bessou G, Xu H, Vivier E, Sellars M, Pierre P, Sharp FR, Chan S, Kastner P, Dalod M. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 2008; 9:R17.

- Robert P, Limozin L, Benoliel AM, Pierres A, Bongrand P. Glycocalyx regulation of cell adhesion. In King MR, editor, New York: Academic Press; 2006, p143-169.
- Robert P, Benoliel AM, Pierres A, Bongrand P. What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single-molecule studies ? *J Mol Recognit* 2007; 20:432-447.
- Robert P, Canault M, Farnarier C, Nurden A, Grosdidier C, Barlogis V, Bongrand P, Pierres A, Chambost H, Alessi MC. A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. *J Immunol* 2011; 186:5273-5283.
- Rodriguez-Fernandez JL, Riol-Blanco L, Delgado-Martin C. What is the function of the dendritic cell side of the immunological synapse ? *Sci Signal* 2010; 3:re2.
- Russell DG, VanderVen BC, Glennie S, Mwandumba H, Heiderman RS. the macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. *Nature Rev Immunol* 9:594-600.
- Sabri S, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Influence of surface charges on cell adhesion: differences between static and dynamic conditions. *Biochem Cell Biol* 1995; 73:411-420.
- Sabri S, Soler M, Foa C, Pierres A, Benoliel AM, Bongrand P. Glycocalyx modulation is a physiological means of regulating cell adhesion. *J Cell Sci* 113:1589-1600.
- Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin $\alpha_L\beta_2$ and relation to a I and b I-like domain interaction. *Immunity* 2004; 20:393-406.
- Segal E, Shapira M, Regev A, Pe'er D, Botstein D, Koller D, Friedman N. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nature Genet* 2003; 34:166-176.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:197-223.
- Seveau S, Keller H, Maxfield FR, Piller F, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophil polarity and locomotion are associated with surface redistribution of leukosialin (CD43), an antiadhesive membrane molecule. *Blood* 2000; 95:2462-2470.
- Snyderman R, Pike MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. *Annu Rev Immunol* 1984; 2:257-281.
- Soler M, Merant C, Servant C, Fraternali M, Allasia C, Lissitzky JC, Bongrand P, Foa C. Leukosialin (CD43) behavior during adhesion of human monocytic THP-1 cells to red blood cells. *J. Leukocyte Biol* 1997; 61:609-618.
- Spits H, Lanier LL. Natural killer or dendritic: what's in a name ? *Immunity* 2007; 26:11-16.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:827-872.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992; 176:287-292.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-1162.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974; 139:380-397.
- Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol* 2005; 175:342-349.
- Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012; 481:278-286.

Swolin B, Simonsson P, Backman S, Löfqvist I, Bredin I, Johnsson M. Differential counting of blood leukocytes using automated microscopy and a decision support system based on artificial neural networks - evaluation of DiffMaster™ Octavia. *Clin Lab Haem* 2003; 25:139-147.

Szabolcs P, Park K-D, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells* 2003; 21:296-303.

Tsuchiya S, Kobayashi V, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol ester. *Cancer Res* 1982; 42:1530-1536.

van Furth R, Langevoort HL, Schaberg A. Mononuclear phagocytes in human pathology – Proposal for an approach to improved classification. In: van Furth R, editor. *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications; 1975, p. 1-15.

van Furth R, Sluiter W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J Exp Med* 1986; 163, 474-479.

Van Oss CJ, Gillman CF, Neumann AW. *Phagocytic engulfment and cell adhesiveness as cellular surface phenomena*. New York: Marcel Dekker; 1975.

Vickaryous MK, Hall BK. Human cell type diversity, evolution, development and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biol Rev* 2006; 81:425-455.

Vitte J, Benoliel AM, Eymeric P, Bongrand P, Pierres A. b-1 integrin-mediated adhesion may be initiated by multiple incomplete bonds, thus accounting for the functional importance of receptor clustering. *Biophys J* 2004; 86:4059-4074.

Vitte J, Benoliel AM, Pierres A, Bongrand P. Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behaviour at the interface ? *Eur Cells Materials* 2004; 7:52-63.

Vitte J, Benoliel AM, Pierres A, Bongrand P. Regulation of cell adhesion. *Clin Hemorheology Microcirc* 2005; 33:167-188.

von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 1995; 82:989-999.

Wang J-CE, Kobie JJ, Zhang L, Cochran M, Mosmann TR, Ritchlin CT, Quataert SA. A 11-color flow cytometric assay for identifying, phenotyping, and assessing endocytic ability of peripheral blood dendritic cell subsets in a single platform. *J Immunol Methods* 2009; 341: 106-116.

West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 2011; 472:476-480.

Whitelaw DM, Batho HF. Kinetics of monocytes. In: van Furth R, editor. *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications; 1975, p. 175-188.

Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily – domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988; 6:381-405.

Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117:663-676.

Yakubenko VP, Lishko VK, Lam SCT, Ugarova TP. A molecular basis for integrin $\alpha\text{Mb}2$ ligand binding promiscuity. *J Biol chem* 2002; 277:48635-48642.

Yakubenko VP, Yadav SP, Ugarova TP. Integrin $\alpha\text{Db}2$, an adhesion receptor up-regulated on macrophage foam cells, exhibits multiligand-binding properties. *Blood* 2006; 107:1643-1650.

Zhang L, Lun Y, Yan D, Yu L, Ma W, Du B, Zhu X. Proteomic analysis of macrophages: a new way to identify novel cell-surface antigens. *J. Immunological Methods* 2007; 321: 80-85.

Zhang Y, Hoppe AD, Swanson JA. Coordination of Fc receptor signaling regulates cellular commitment to phagocytosis. *Proc Natl Acad USA* 2010; 107:19332-19337.

Zidovska A, Sackmann E. Brownian motion of nucleated cell envelopes impedes adhesion. *Phys Rev Lett* 2006; 96:048103.

Pour en savoir plus :

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*. 5th edition. New York : Garland Science. 2008.

- Lewis CE, McGee JOD, editors, *The Macrophage*. Oxford. IRL Press. 1992.

- Mount DW. *Bioinformatics : sequence and genome analysis*. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory press. 2004.

- Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's immunobiology*. 7th edition. New York : Garland Science. 2008.

- Phillips R, Kondev J, Theriot J. *Physical Biology of the Cell*. New York : Garland Science, 2010.

ENCADRES

Encadré 1 – Statistique multivariée

Les méthodes statistiques familières aux médecins ont été élaborées durant la première moitié du XX^e siècle et concernent essentiellement l'étude de la distribution d'une variable (moyenne, écart-type, loi normale), éventuellement des corrélations entre deux variables. L'appréhension intuitive des données est facilitée par l'utilisation de figures simples (histogrammes, courbes de régression).

Depuis quelques décennies, les mathématiciens et les statisticiens ont développé [Lebart 2006] des méthodes permettant d'analyser des données beaucoup plus complexes qui sont souvent représentées comme des tableaux de valeurs qui peuvent décrire plusieurs milliers de paramètres mesurés sur des dizaines de populations (par exemple : expression génique) ou des dizaines de paramètres mesurés sur des milliers d'individus (par exemple : une dizaine de paramètres mesurés sur plusieurs milliers de cellules). Les résultats d'une expérience peuvent être assimilés à une population de points dans un espace multidimensionnel, et leur traitement nécessite un certain degré d'abstraction. Parmi les méthodes de traitement actuellement proposées, on peut citer les méthodes de **classification** qui permettent de définir des groupes parmi les individus (« **clustering** ») ou de construire des « arbres » (classification **hiérarchique**) analogues à ceux qui sont couramment utilisés pour représenter l'évolution des espèces. L'analyse en **composants principaux** consiste à projeter un ensemble de données multidimensionnelles sur un sous-espace dont les variables ont été judicieusement choisies comme des combinaisons linéaires des coordonnées de cet espace multidimensionnel. La signification de ces variables n'est pas toujours facile à comprendre. Étant donné l'accessibilité croissante des méthodes d'analyse à haut débit et de logiciels permettant de réaliser ces opérations, il est important que les biologistes et les médecins se familiarisent avec les principes de ces méthodes qui reposent souvent sur des hypothèses simplificatrices dont la validité n'est pas assurée.

Encadré 2 – Cytokines.

Les cytokines constituent un réseau complexe de molécules impliquées dans les réactions immunitaires et inflammatoires. La complexité de cette famille et de la nomenclature de ses constituants peut être expliquée par quelques données historiques :

On a très tôt essayé d'attribuer les manifestations inflammatoires des réactions d'hypersensibilité à des médiateurs biologiquement actifs produits par les lymphocytes (*lymphokines*) ou les phagocytes mononucléés (*monokines*) convenablement activés. Ces médiateurs étaient préparés sous forme de surnageants de culture extrêmement hétérogènes, et définis par une activité biologique : par exemple, le MIF (macrophage inhibiting factor) produit par des lymphocytes inhibait la migration des macrophages, le SRF (skin reactive factor) provoquait une réaction cutanée ...

La difficulté principale résidait dans la mauvaise définition des lymphokines et des monokines : un même terme pouvait désigner deux molécules différentes si elles avaient une activité biologique commune (par exemple, l'IL-1 et le TNFalpha sont pyrogènes et induisent l'expression endothéliale de molécules d'adhésion). Réciproquement, une molécule pourvue de deux activités biologiques distinctes pouvait recevoir deux noms (l'interleukine 1 a été nommée "pyrogène endogène" et "lymphocyte activating factor").

La nomenclature a évolué lorsque le développement des anticorps monoclonaux et de l'ingénierie génétique ont permis la caractérisation moléculaires de ces médiateurs : on a convenu ainsi de renommer *interleukine* une lymphokine ou une monokine définie au niveau moléculaire et ayant une action biologique démontrée sur des populations leucocytaires.

Il est vite apparu que la dénomination d'interleukine (IL en abrégé) était trop restreinte : une interleukine telle que l'IL-1 peut être produit par des cellules non leucocytaires, elle exerce des effets dépassant largement le système immunitaire (cellules endothéliales, centres nerveux). Le terme général de *cytokine* a paru plus approprié pour désigner ces médiateurs solubles des réactions immunitaires et inflammatoires dont la production est déclenchée par une activation du système immunitaire. On utilise le terme de *réseau des cytokines* pour rappeler plusieurs éléments de complexité de ce système : les cytokines peuvent être produites par plusieurs populations cellulaires. Elles ont plusieurs actions et plusieurs cibles (pléiotropie). Elles peuvent se moduler mutuellement (au niveau des fonctions ou de la synthèse).

Pour des raisons historiques, les cytokines ont pu recevoir des dénominations différentes : *interleukines* mais aussi *interférons*, *CSFs* (colony stimulating factors), *TNFs* (tumor necrosis factors), *GF* (facteurs de croissance ou growth factors). On peut rattacher aux cytokines les *chimiokines* : famille de molécules chimiotactiques dont le nombre dépasse plusieurs dizaines.

Encadré 3 : Réponses immunitaires TH1 et TH2

On distingue depuis longtemps deux modes de réponse du système immunitaire à une stimulation antigénique : la réponse humorale consiste à synthétiser des anticorps, la réponse cellulaire consiste à activer des cellules telles que les lymphocytes T cytotoxiques ou des macro-

phages activés. On savait depuis longtemps que les conditions d'induction de ces deux modes de réponses étaient différentes. Une interprétation élégante de ces constatations a été proposée dans les années 1980 [Mosmann 1986] : il existerait deux populations de lymphocytes T auxiliaires ou « helpers » : les lymphocytes Th1 activent les réponses cellulaires en produisant des cytokines telles que l'interféron gamma, les lymphocytes Th2 activent les réponses humorales en produisant des cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-5. L'intérêt de ce modèle est dû à l'antagonisme de ces deux modes de réponse : le développement des lymphocytes Th1 est stimulé par l'interféron g et inhibé par l'IL-4. Réciproquement, l'IL-4 active les lymphocytes Th2. Il en résulte que le choix du mode de réponse à un antigène va être conservé au cours du temps dans un organisme donné. Une réponse défectueuse (par exemple, réponse humorale vis à vis d'un agent pathogène à développement intracellulaire) pourra donc éventuellement être corrigée.

L'intérêt de ce schéma a conduit à le transposer de l'espèce murine à l'espèce humaine, ce qui est une approximation. D'autre part, on a proposé de distinguer deux états d'activation des macrophages, M1 et M2, qui correspondraient l'action de cytokines TH1 et TH2 respectivement.

Encadré 4 : Chimiokines.

Les chimiokines [Baggiolini 1997] constituent une famille de molécules initialement assimilées à des cytokines (l'IL-8 est une chimiokine) qui se distinguent par des similitudes de structure (environ 80 acides aminés, quatre cystéines formant des ponts disulfures) et de séquence. On classe les chimiokines en quatre familles en fonction de l'organisation des cystéines NH2 terminales qui peuvent être séparées par zéro (CC), un (CXC) ou trois (CX3C) acides aminés. La quatrième famille (C) se caractérisant par l'absence d'une cystéine. On a décrit plus de trente chimiokines. Leurs récepteurs présentent également des caractéristiques structurales communes : ils sont formés de 350 acides aminés environ et comportent 7 segments transmembranaires, ce qui caractérise les récepteurs associés à des protéines G trimériques. La liaison de ces récepteurs à leurs ligands déclenche de nombreuses réponses cellulaires : augmentation de la concentration de calcium cytosolique, mouvement, exocytose, prolifération.

La complexité du système des chimiokines résulte de plusieurs propriétés : plusieurs récepteurs peuvent reconnaître une même chimiokine (par exemple, l'IL-8 est reconnue par les récepteurs CXCR1 et CXCR2). Un récepteur peut reconnaître plusieurs chimiokines (par exemple, CXCR1 fixe les chimiokines GRO, mais pas CXCR2). Plusieurs récepteurs d'une même chimiokine peuvent déclencher des réponses cellulaires différentes. Le système des chimiokines et de leurs récepteurs forme un réseau.

L'une des fonctions importantes de ce réseau consiste à guider les mouvements des différentes populations leucocytaires. Par exemple, les cellules dendritiques ayant détecté et capturé des antigènes subissent un processus de maturation comportant l'acquisition du récepteur CCR7 qui va leur permettre de migrer vers les ganglions lymphatiques.

Une dernière propriété importante des chimiokines est leur capacité de se fixer aux constituants des matrices péricellulaires. C'est ce qui leur permet, par exemple, de se localiser sur les régions des parois vasculaires sur les lieux d'une réaction inflammatoire.