

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
Introduction	1
Le tabagisme.....	1
Composantes de la cigarette	1
Impacts du tabagisme sur la santé pulmonaire	2
<i>Les impacts du tabagisme à court terme</i>	4
<i>Les impacts du tabagisme à long terme</i>	5
La fumée de cigarette et l'immunité pulmonaire.....	9
Immunité innée pulmonaire.....	9
<i>Rôles des macrophages</i>	11
<i>Rôles des neutrophiles</i>	13
<i>Rôles des cellules dendritiques</i>	14
Immunité adaptative pulmonaire	16
Le système de régulation SIRP α et CD47.....	19
Description détaillée de SIRP α et CD47	22
Interaction entre SIRP α et CD47.....	26
Implications de l'axe SIRP α /CD47	28
Chapitre 1 : hypothèses et objectifs.....	32
1.1. Pertinence de l'étude	32
1.2. But du projet	32
1.3. Hypothèses.....	33
1.4. Objectifs du projet	33
Chapitre 2 : méthodologie	34
2.1. Protocoles animaux.....	34
2.1.1. Souris et exposition à la fumée de cigarette	34
2.1.2. Activation de SIRP α	34
2.2. Euthanasie des souris et récolte des échantillons	35
2.3. Culture et stimulation des macrophages alvéolaires murins	36
2.4. Dosage des cytokines.....	37
2.5. PCR quantitatif	37
2.5.1. Extraction d'ARN et transcriptase inverse	37
2.5.2. RT-qPCR	38

2.6. Cytométrie en flux.....	39
2.6.1. Récolte et digestion.....	39
2.6.2. Marquage extracellulaire	39
2.7. Analyses statistiques.....	44
Chapitre 3 : résultats.....	45
3.1. Caractérisation des niveaux pulmonaires de SIRP α et de CD47 en contexte tabagique	45
3.1.1. L'exposition à la fumée de cigarette module les niveaux d'ARNm de SIRP α et de CD47 dans le poumon.....	45
3.1.2. Une exposition de quatre jours à la fumée de cigarette affecte les niveaux protéiques de SIRP α chez différents types cellulaires présents dans le poumon et le lavage broncho-alvéolaire.....	46
3.2. Investigation de l'impact d'une activation de SIRP α sur l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette.....	54
3.2.1. L'Activation de SIRP α , par l'administration systémique de la protéine de fusion CD47-Fc, entraîne une diminution de l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette.....	54
3.3. Investigation de la capacité de liaison de la protéine de fusion CD47-Fc aux différents types cellulaires de l'environnement pulmonaire en contexte tabagique	59
3.3.1. L'exposition à la fumée de cigarette pendant quatre jours semble altérer la liaison du CD47-Fc aux différents types cellulaires du poumon et du lavage broncho-alvéolaire.....	59
Chapitre 4 : discussion.....	64
4.1. Forces et limites de l'étude.....	72
4.2. Perspectives	75
Conclusion.....	78
Bibliographie	80
Annexe.....	87

LISTE DES FIGURES

Introduction

- Figure 1.** Initiation de l'inflammation par l'inhalation de la fumée de cigarette.....3
- Figure 2.** Cellules immunitaires innées et adaptatives dans le développement de la MPOC induite par la fumée de cigarette.....18
- Figure 3.** Interaction entre CD47 et les principaux membres de la famille SIRP.....21
- Figure 4.** Schéma de la signalisation bidirectionnelle lors d'une interaction entre SIRP α et CD47.....26

Chapitre 2 – Méthodologie

- Figure 5.** Schéma de la stratégie d'analyse utilisée en cytométrie en flux dans le tissu pulmonaire d'une souris non fumeuse pour évaluer l'expression protéique de SIRP α42
- Figure 6.** Schéma de la stratégie d'analyse utilisée en cytométrie en flux dans le tissu pulmonaire d'une souris non fumeuse pour évaluer la capacité de liaison du CD47-Fc43

Chapitre 3 – Résultats

- Figure 7.** Modulation des niveaux d'expression des gènes *sirpa* et *cd47* selon différents temps d'exposition à la fumée de cigarette dans le tissu pulmonaire de souris.....46
- Figure 8.** Représentation en pourcentage de différents types cellulaires retrouvés dans le tissu pulmonaire de souris non fumeuses et de souris exposées à la fumée de cigarette pendant quatre jours48
- Figure 9.** L'expression protéique de SIRP α est modulée par l'exposition à la fumée de cigarette chez différents types cellulaires retrouvés dans le tissu pulmonaire.49
- Figure 10.** Représentation en pourcentage des différents types cellulaires retrouvés dans le lavage broncho-alvéolaire de souris non fumeuses et de souris exposées à la fumée de cigarette pendant quatre jours.....51

Figure 11. L'expression protéique de SIRP α est modulée par l'exposition à la fumée de cigarette chez différents types cellulaires retrouvés dans le lavage broncho-alvéolaire.....	52
Figure 12. L'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette est influencée par le traitement systémique du CD47-Fc au niveau des comptes cellulaires du lavage broncho-alvéolaire.....	55
Figure 13. L'administration systémique du CD47-Fc affecte la sécrétion d'IL-1 α par les macrophages alvéolaires non stimulés et les macrophages alvéolaires stimulés au LPS.....	56
Figure 14. L'administration systémique du CD47-Fc affecte la sécrétion de TNF- α par les macrophages alvéolaires non stimulés et les macrophages alvéolaires stimulés.....	57
Figure 15. La liaison du CD47-Fc aux différents types cellulaires retrouvés dans le tissu pulmonaire est altérée par l'exposition à la fumée de cigarette.....	60
Figure 16. La liaison du CD47-Fc aux différents types cellulaires retrouvés dans le lavage broncho-alvéolaire est affectée par la fumée de cigarette.....	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Caractéristiques des amorces utilisées lors des analyses de qPCR.....87

Tableau II. Caractéristiques des anticorps utilisés lors des analyses de cytométrie en flux...88

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- ARN : Acide ribonucléique
- AVC : Accident vasculaire cérébral
- BAFF : *B-cell activation factor*
- C : Celsius
- CD : Cluster de différenciation
- Cdc42 : *Cell division control protein 42 homolog*
- CDs : Cellules dendritiques
- CE : Cellules épithéliales
- CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
- CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
- CO₂ : Dioxyde de carbone
- CPAUL : Comité de protection des animaux de l'Université Laval
- CVF : Capacité vitale forcée
- DAP12 : *DNAX activator protein 12*
- FA : *Formaldehyde agarose*
- FACS : *Fluorescence Activated Cell Sorting*
- FcR : Récepteur Fc
- FMO : *Fluorescence minus one*
- FSC-A : *Forward scatter-A*
- EGF : *Epidermal growth factor*
- ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- GOLD : *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*
- GM-CSF : *Granulocyte-macrophages colony-stimulating factor*

hIgG1 : Immunoglobuline G 1 humaine

Hprt : *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase protein coding gene*

IAP : Protéine associée à une intégrine

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IL-1R : Récepteur d'interleukine-1

ITAM : Motifs d'activation immunorécepteur à base de tyrosine

ITIM : Motifs d'inhibition immunorécepteur à base de tyrosine

IU : Unité internationale

JAK-STAT : *Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*

kDa : Kilodalton

LBA/BAL : Lavage broncho-alvéolaire/Bronchoalveolar lavage

LPS : Lipopolysaccharide

MA : Macrophages alvéolaires

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein 1*

miARN : Micro-ARN

MMPs : Métalloprotéinases matricielles

Mo/M ϕ INT : Monocytes/macrophages interstitiels

MPOC : Maladie pulmonaire obstructive chronique

Neutro : Neutrophiles

NF- κ B : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NOD : *Non-obese diabetic*

NOR : *Non-obese diabetes-resistant*

NTC : *No template control*

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PBS : *Phosphate-buffered saline*

PDGF : *Platelet-derived growth factor*

PI3 : Phosphoinositide 3

POLY (I:C) : *Polyinosinic–polycytidylic acid sodium salt*

qPCR : *Quantitative polymerase chain reaction*

ROS : *Reactive oxygen species*

Rplp0 : *60S acidic ribosomal protein P0 coding gene*

RT : *Reverse transcriptase (transcriptase inverse)*

SHP-1 : *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*

SHP-2 : *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*

SIGLEC F : *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*

SIRP : *Signal regulatory protein*

SIRP α : *Signal regulatory protein alpha*

SP-A : *Surfactant protein A*

SP-D : *Surfactant protein D*

SSC-A : *Side scatter A*

SVF : *Sérum de veau foetal*

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*

TSP-1 : *Trombospondine-1*

V : *Volt*

VEMS : *Volume expiratoire maximale par seconde*

α : *Alpha*

β : *Beta*

γ : *Gamma*

δ : *Delta*

φ : *Phi*

κ : *Kappa*

REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier Mathieu Morissette, mon directeur de recherche. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire et de m'avoir donné la chance de découvrir la recherche. Merci d'être un chercheur aussi dévoué et disponible pour tous tes étudiants. Tes conseils et ton encadrement ont grandement contribué à la réussite de ma maîtrise. Et bien sûr, merci d'avoir fait confiance à une Beauportoise !

Un merci tout spécial à mes parents, Diane Lainé et Benoit Routhier, qui ont su m'appuyer tout au long de ma maîtrise. Merci pour votre dévouement ainsi que votre soutien financier et moral. Merci d'avoir toujours cru en moi et surtout, de m'avoir transmis des valeurs qui font de moi la fille que je suis aujourd'hui. Je vous en serai reconnaissante toute ma vie!

Je tiens ensuite à remercier quatre professionnels de recherches exceptionnels qui m'ont suivie durant ces deux années : Marie-Josée Beaulieu, Marie-Ève Paré, Sophie Aubin et Dany Patoine. Marie-Jo, ce fut un plaisir d'écouter toutes tes histoires et surtout d'avoir tant appris à tes côtés. Un énorme merci à vous Marie-Ève et Dany pour avoir répondu à mes multiples questions. Sans vous, je n'aurais certainement pas l'expérience que j'ai acquise aujourd'hui. Finalement, merci à toi, Sophie, pour tout le temps que tu as investi à mon égard, quelle que soit la tâche. Je me rappellerai toujours nos discussions effervescentes à propos des candidats d'occupation double et des agriculteurs de l'amour est dans le pré.

J'aimerais aussi remercier tous mes collègues de l'IUCPQ, sans qui ces années n'auraient pu être aussi palpitantes. Je tiens particulièrement à remercier Marie Pineault, Éric Jubinville, Mélanie Hamel-Auger, Maude Talbot, Ariane Lechasseur et Nadia Milad pour leur support, mais surtout pour tous nos moments de folies. Je suis partante pour un Bloody au Cactus quand vous voulez ! Finalement, je tiens à remercier mon amoureux, sans qui je n'aurais pu passer au travers ces années saine d'esprit. Ton appui, tes encouragements, ton écoute et ton soutien moral m'ont permis de continuer jour après jour. Merci pour toutes ces belles années passées et pour toutes les prochaines à venir!

« Et si c'est vrai que l'avenir appartient à ceux qui se lèvent tôt, à moi la belle vie ! »

Pascale Gingras, *Une carte sans légende*, 2009

INTRODUCTION

Le tabagisme

Malgré toutes les connaissances actuelles sur les effets nocifs du tabagisme, cette pratique demeure populaire de nos jours. Mondialement, le nombre de consommateurs de tabac est évalué à 1,1 milliard par année (OMS, 2018). En 2016, près de 17% de la population canadienne âgée de 12 ans et plus était considérée comme des fumeurs actifs ou occasionnels. Malheureusement, la moitié des fumeurs actuels mourront des conséquences liées à la fumée de cigarette. D'ailleurs, cette habitude est responsable d'une mort toutes les six secondes dans le monde (StatistiqueCanada, 2017). Les coûts de santé associés à ce fléau ne sont pas à négliger et sont estimés à un milliard de dollars US annuellement, dont les deux tiers sont dus à la mortalité prématurée. D'autres parts, l'usage de la cigarette a également des impacts sur d'autres aspects que celui de la santé, notamment sur l'environnement puisque la production de tabac conduit à une déforestation majeure (Kids, 2016). En somme, les effets néfastes du tabagisme ne sont plus à débattre. L'étude de ses impacts sur diverses maladies demeure essentielle afin de réduire le nombre de décès qui lui est associé tout en permettant le développement de nouvelles approches thérapeutiques (StatistiqueCanada, 2017).

Composantes de la cigarette

La fumée de cigarette est composée d'un mélange complexe comprenant entre 4000 (Greabu et al., 2007; Proulx, Pare, & Bissonnette, 2007; Rodgman, 1992; Talhout et al., 2011) et 7000 composés chimiques (Benjamin, 2011; Québec, 2017). De ces composées, plus d'une soixantaine sont considérés comme cancérigènes (Talhout et al., 2011) alors que d'autres sont connus comme ayant des propriétés pro-inflammatoires, mutagéniques, cytotoxiques (Morse & Rosas, 2014) ou encore antigéniques (Arnson, Shoefeld, & Amital, 2010). La fumée provenant de cigarettes filtrées contient deux phases : la phase gazeuse et

la phase particulaire ou solide (Greabu et al., 2007; Lofroth, 1989). La phase gazeuse traverse le filtre et comprend des composés semi-volatils et volatils tels que l'arsenic, le cadmium et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. La phase solide, aussi appelée la phase de goudron, est constituée de fines particules pouvant atteindre les voies aériennes inférieures si les cigarettes sont non filtrées (Morse & Rosas, 2014). Il a été démontré que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont créées par combustion dans les deux phases. D'ailleurs, ces phases sont toutes deux très riches en radicaux libres (Greabu et al., 2007). En effet, il est estimé que chaque bouffée de fumée de cigarette contient environ 5×10^{14} radicaux libres (Bhalla, Hirata, Rishi, & Gairola, 2009), des composés pouvant activer différentes voies de signalisation qui modulent ensuite la réponse immunitaire innée et adaptative (Chung & Adcock, 2008).

Impacts du tabagisme sur la santé pulmonaire

Sachant l'hétérogénéité de la composition de la fumée de cigarette, il n'est pas surprenant que l'inhalation de la fumée de cigarette engendre de graves répercussions sur la santé. Après plusieurs années d'exposition, les fumeurs ont un risque accru de développer des maladies chroniques telles que des accidents vasculaires cérébraux (AVC), de la cécité, des maladies coronariennes, de l'athérosclérose et des maladies pulmonaires chroniques. Plus particulièrement, ils peuvent développer des cancers du système respiratoire (larynx, trachée, bronches, et poumon) et également d'autres types de cancers comme celui du pancréas, des reins, de la vessie, etc. (Centers for Disease et al., 2010). Ils peuvent aussi souffrir de diverses maladies inflammatoires associées au tabagisme telles que l'arthrite rhumatoïde, le syndrome vascularite et des maladies inflammatoires de l'intestin (Arnson et al., 2010). L'étude de chacune de ces pathologies est nécessaire, mais celles qui affectent le système respiratoire restent tout de même prioritaires compte tenu du fait que le poumon représente la ligne de front (Morse & Rosas, 2014).

Le tabagisme peut entraîner des perturbations sur l'ensemble du corps humain puisque les composés de la fumée de cigarette sont acheminés aux différents organes par la circulation sanguine (Benjamin, 2011). Toutefois, le système respiratoire est le premier environnement affecté par l'exposition à divers agents ou substances nuisibles comme la fumée de cigarette (Scott, 2004). Il est donc pertinent de l'étudier de façon approfondie et de mieux comprendre les processus cellulaires et moléculaires qui mènent au développement de la réponse immunitaire pulmonaire puisque ces mécanismes ne sont toujours pas parfaitement compris aujourd'hui (Morissette et al., 2015a).

Les étapes initiant l'inflammation pulmonaire suivant une exposition à la fumée de cigarette ont été décrites dans l'étude de l'équipe du Dr. Morissette, tel qu'illustré à la **Figure 1**. Tout d'abord, l'inhalation de la fumée de cigarette entraîne des dommages au surfactant pulmonaire (**Figure 1. a**) (Morissette et al., 2015a). Le surfactant pulmonaire est

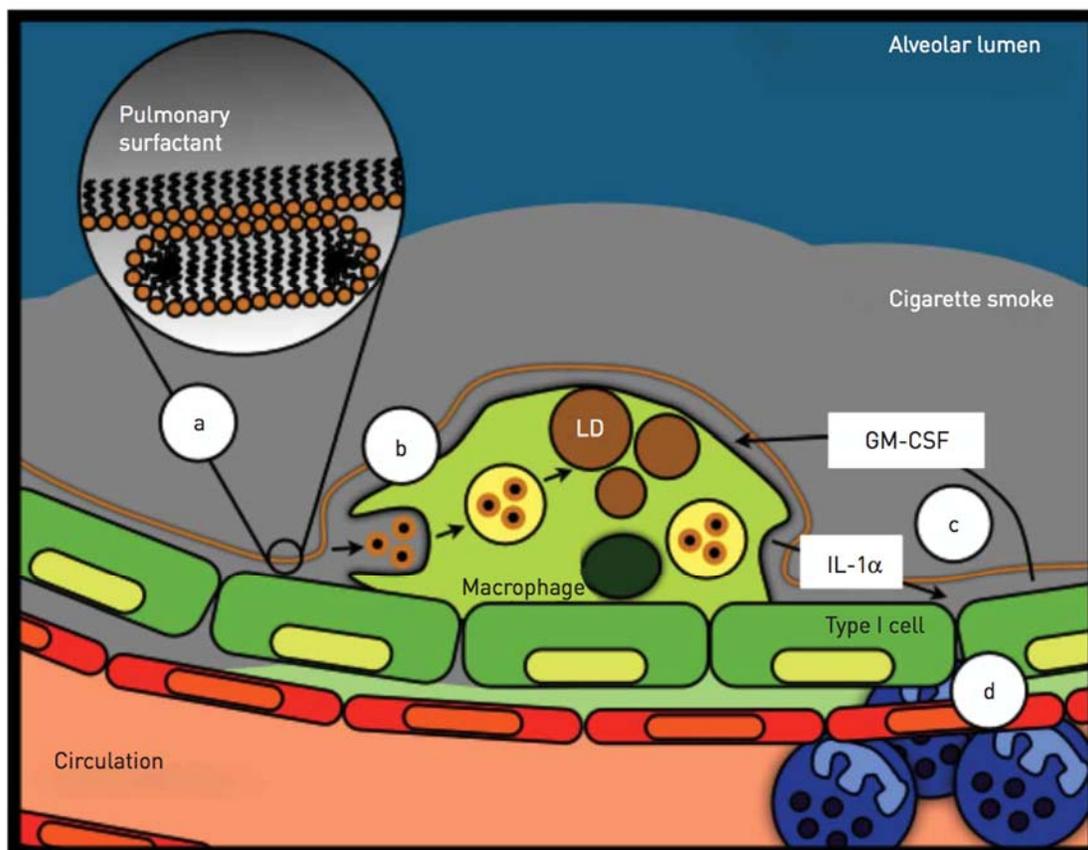


Figure 1. Initiation de l'inflammation par l'inhalation de la fumée de cigarette
Figure tirée de (Morissette, Shen, Thayaparan, & Stampfli, 2015a)

une fine couche lipidique située à la surface interne des alvéoles, permettant de réduire la tension de surface afin de prévenir l'affaissement du poumon lors de l'expiration (Akella & Deshpande, 2013; Scott, 2004). Cette structure indispensable est composée de lipides à 90%, dont la majorité (85%) est des phospholipides. Lorsque le surfactant pulmonaire est altéré, une augmentation de la capture lipidique par les macrophages pulmonaires est observée (**Figure 1. b**). Ces macrophages verront alors leur taille augmenter due à cette accumulation de lipides et libéreront une cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine-1 alpha (IL-1 α). La sécrétion d'IL-1 α entrainera ensuite le relâchement du facteur « Granulocyte-macrophages colony-stimulating factor » (GM-CSF) par les pneumocytes, ce qui déclenche les processus impliqués dans la dégradation et le recyclage du surfactant pulmonaire (**Figure 1. c**) (Morissette et al., 2015a). Le GM-CSF est un facteur de croissance pour les cellules hématopoïétiques. Au poumon, cette cytokine est importante pour la différenciation, l'activation et la maturation des macrophages alvéolaires (van Nieuwenhuijze et al., 2013). De plus, la libération d'IL-1 α engendre le recrutement de cellules inflammatoires provenant de la circulation sanguine notamment les neutrophiles, ce qui initiera l'installation de l'inflammation pulmonaire (**Figure 1. d**). Bien que la réponse immunitaire pulmonaire semble protectrice, les facteurs entrainant son évolution vers un stade chronique demeurent toujours à l'étude due aux ravages qu'elle produit à court et à long terme (Morissette et al., 2015a).

Les impacts du tabagisme à court terme

À court terme, le tabagisme peut avoir plusieurs impacts à différents niveaux et ce, peu importe l'âge à laquelle une personne commence à fumer. Premièrement, au point de vue clinique, les fumeurs peuvent développer l'apparition de différents symptômes tels que de la toux, des mucosités, de la dyspnée ou encore une respiration sifflante (Committee on the Public Health Implications of Raising the Minimum Age for Purchasing Tobacco, Board on Population, Public Health, & Institute of, 2015). Deuxièmement, au point de vue cellulaire, la fumée de cigarette entraîne une irritation des voies aériennes qui endommage les cils des cellules épithéliales tapissant les parois des voies respiratoires qui sont responsables de la

clairance mucociliaire. Par conséquent, la fumée de cigarette ralentit les battements ciliaires et accroît la sensibilité des fumeurs aux infections lors de l'inhalation de pathogènes (Leopold et al., 2009). De plus, le recrutement majeur de neutrophiles et l'augmentation de la taille des macrophages pulmonaires dans la lumière alvéolaire sont des caractéristiques typiques d'une exposition aiguë à la fumée de cigarette (Morissette et al., 2015a). D'ailleurs, rapidement après l'inhalation de la fumée de cigarette, la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires diminue, ce qui limite l'élimination de particules étrangères (van der Vaart, Postma, Timens, & ten Hacken, 2004). Finalement, au point de vue moléculaire, l'inhalation de la fumée de cigarette entraîne un stress oxydatif accru et immédiat puisqu'une seule cigarette contient 10^{16} radicaux libres (Bhalla et al., 2009) causant des lésions oxydatives aux protéines, aux lipides et à l'ADN (Committee on the Public Health Implications of Raising the Minimum Age for Purchasing Tobacco et al., 2015). En outre, la libération de la cytokine IL-1 α ainsi que le relâchement de GM-CSF sont également deux particularités distinctes suivant l'exposition aiguë à la fumée de cigarette (Morissette et al., 2015a). En somme, il est clair que le tabagisme engendre rapidement des troubles sur la santé pulmonaire et, par le fait même, une réponse immune pulmonaire.

Les impacts du tabagisme à long terme

À long terme, le tabagisme peut entraîner différentes pathologies pulmonaires telles que les maladies pulmonaires interstitielles (MPI) (Vassallo & Ryu, 2012), l'asthme (Stapleton, Howard-Thompson, George, Hoover, & Self, 2011), le cancer du poumon (Ozlu & Bulbul, 2005) ou encore des maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) (GouvernementCanada, 2011). Bien que chacune de ces maladies soit considérée comme sévère, la MPOC a suscité davantage notre attention, car elle est assurément le défi sanitaire des prochaines décennies (Decramer, Janssens, & Miravitlles, 2012) et elle touche plus de 200 millions de personnes dans le monde (Brusselle et al., 2011).

Maladie pulmonaire obstructive chronique

La MPOC est présentement la quatrième cause mondiale de décès et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) prévoit qu'elle passera en troisième place d'ici 2030 (Decramer et al., 2012). Au Canada, les provinces ayant le plus haut taux de mortalité lié à la MPOC sont le Québec et les provinces de l'Atlantique (Association Pulmonaire, 2016). Différents facteurs de risque peuvent amener certains individus à développer cette maladie mortelle. Premièrement, la pollution de l'air intérieur dû à la combustion de carburant issue de la biomasse ou l'exposition professionnelle suffisamment grande à des gaz ou des poussières peuvent jouer un rôle dans le développement de la MPOC. Deuxièmement, il existe des susceptibilités génétiques qui augmentent le risque de développer cette maladie, notamment chez les personnes qui présentent une déficience en alpha-1-antitrypsine, un inhibiteur majeur des sérines protéases. Troisièmement, le tabagisme est de loin le facteur de risque prédominant dans le développement de cette pathologie (Pauwels & Rabe, 2004). Le développement de cette maladie est attribué à la charge totale de particules et de gaz toxiques qu'une personne inhale au cours de sa vie. La pollution atmosphérique peut être en partie responsable de cette charge, mais le tabagisme n'en demeure pas moins le principal facteur de risque (Hogg, 2004).

Au niveau physiopathologique, la MPOC est un terme commun qui englobe différentes maladies, dont la bronchite chronique et l'emphysème. De façon générale, ces maladies se caractérisent par une inflammation chronique et une obstruction des voies respiratoires. Plus précisément, la bronchite chronique est définie par une inflammation des bronches, une hypersécrétion de mucus pendant plus de trois mois (Bourbeau, 2002; Pauwels & Rabe, 2004) et une limitation du débit d'air non complètement réversible (Hogg, 2004). L'emphysème se manifeste par la perte d'élasticité du poumon ainsi que par la destruction du tissu pulmonaire et des parois alvéolaires entravant ainsi les échanges gazeux (Association Pulmonaire, 2016; Pauwels & Rabe, 2004).

Du point de vue clinique, les patients atteints de ces maladies souffrent d'essoufflement, de toux et de fatigue, des symptômes qui réduisent leur qualité de vie

(Association Pulmonaire, 2016). Ces maladies évoluent très lentement et elles sont souvent diagnostiquées tard, c'est-à-dire chez les personnes âgées de 55 ans et plus. Toutefois, rien n'écarte les dommages causés aux poumons au cours des années précédant l'apparition des premiers symptômes. De plus, les patients atteints de MPOC présentent fréquemment d'importantes comorbidités telles que la dépression, l'anxiété, la cachexie (Reardon, Lareau, & ZuWallack, 2006), le cancer du poumon, le diabète ou encore des maladies coronariennes (Decramer et al., 2012). Certains traitements existent afin d'améliorer la qualité de vie de ces patients ou de ralentir la progression de la maladie. Cependant, que ce soit par l'utilisation de bronchodilatateurs (bêta-agonistes ou agents anticholinergiques), de corticostéroïdes ou encore de l'oxygénothérapie, aucun de ces traitements n'est curatif, c'est-à-dire qu'ils ne permettent pas de renverser les dommages causés par ces maladies. L'arrêt tabagique demeure l'outil essentiel pour ralentir la progression de la MPOC (Association Pulmonaire, 2016). Il est donc primordial de poursuivre la recherche sur cette maladie et de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

Les patients atteints de MPOC sont regroupés en différentes catégories selon l'envergure de leur maladie. En effet, une classification de la sévérité de la MPOC, la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) a été établie et comprend cinq stades se distinguant de « à risque » (GOLD 0) à « très sévère » (GOLD 4). La distribution de chaque patient dans les différents stades est déterminée selon les résultats obtenus par des tests de spirométrie. La spirométrie est l'outil de référence pour diagnostiquer et suivre la progression de la MPOC puisque cette technique évalue la limitation du débit d'air chez ces patients. Celle-ci est définie principalement par les mesures suivantes : la capacité vitale forcée (CVF), le volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) et le rapport entre les deux (VEMS/CVF) (Decramer et al., 2012; Pauwels & Rabe, 2004). Les données recueillies par ces tests sont ensuite comparées à des valeurs prédites basées selon différents facteurs dont le sexe, la taille et l'âge des individus. De façon générale, les personnes atteintes de MPOC ont une diminution de leur VEMS et de leur CVF se traduisant par un déclin de leurs fonctions respiratoires (Pauwels & Rabe, 2004). Les fumeurs retrouvés dans la catégorie à risque ou léger (GOLD 0 ou 1) ont un VEMS supérieur à 80% de leur valeur prédite, une valeur similaire à ce qui est obtenue chez des non-fumeurs, alors qu'aux autres stades, les

fonctions pulmonaires chutent rapidement. Les patients présents dans le groupe modéré (GOLD 2) ont un VEMS entre 50 et 80%, ceux dans le groupe sévère (GOLD 3) sont situés entre 30 et 50%, tandis que les patients du groupe très sévère (GOLD 4) ont un VEMS plus petit que 30% (Hogg, 2004). L'évaluation de la sévérité de la MPOC aide donc à prédire les complications pouvant survenir et permet de traiter convenablement chaque patient (Pauwels & Rabe, 2004).

En plus des multiples symptômes et comorbidités que les patients peuvent développer, ils sont aussi à risque d'exacerbations. Ces exacerbations sont caractérisées par l'apparition de nouveaux symptômes ou par une aggravation soudaine des symptômes existants qui ont des répercussions supplémentaires sur la qualité de vie des patients. Ces exacerbations sont couramment causées par une infection bactérienne ou virale, une allergie, une pollution de l'air (intérieur ou extérieur) ou une embolie pulmonaire (Escudier, 2018). Les exacerbations sont donc la principale cause d'hospitalisation chez ces patients et par conséquent, elles doivent être considérées lors de l'élaboration de nouveaux choix thérapeutiques (AssociationPulmonaire, 2014).

Bien que les manifestations cliniques et les caractéristiques physiopathologiques de la MPOC soient établies, les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la MPOC ne sont pas totalement élucidés. Certaines théories émises énoncent la possibilité que le développement de cette pathologie soit dû à l'interaction entre plusieurs mécanismes, par exemple, l'équilibre entre les protéases et les antiprotéases (Demirjian, Abboud, Li, & Duronio, 2006; MacNee, 2005), le stress oxydatif, l'infection d'adénovirus latente ou encore l'apoptose qui agit en tant que processus destructeur dans l'emphysème (MacNee, 2005). Par conséquent, une meilleure identification des médiateurs orchestrant le développement de l'inflammation chronique contribuerait à l'avancement des connaissances dans la pathogenèse de la MPOC (Demirjian et al., 2006). Il est donc important de mieux comprendre les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse immunitaire chronique induite par la fumée de cigarette et le rôle des différents types cellulaires dans cette réponse.

La fumée de cigarette et l'immunité pulmonaire

La fumée de cigarette altère autant la réponse inflammatoire induite par l'immunité innée que l'immunité adaptative (Arnson et al., 2010; Colarusso, Terlizzi, Molino, Pinto, & Sorrentino, 2017), car elle a un impact sur la production de cytokines, les fonctions effectrices et le développement des cellules de l'immunité spécifique et non spécifique (Qiu et al., 2017). L'immunité adaptative, correspondant à l'immunité spécifique, a la capacité d'induire une mémoire immunologique des infections antérieures, alors que l'immunité innée, typique à l'immunité non spécifique, répond rapidement aux agressions et lésions tissulaires de façon non distinctive (Xu & Larbi, 2017). L'exposition à la fumée de cigarette modifie indubitablement la réponse immunitaire et celle-ci peut induire autant des effets pro-inflammatoires que suppressifs (Arnson et al., 2010; Rom, Avezov, Aizenbud, & Reznick, 2013). Les impacts du tabagisme sur le système immunitaire sont complexes et nécessitent d'être mieux étudiés.

Immunité innée pulmonaire

La fumée de cigarette affecte l'immunité innée pulmonaire sur différents plans. Tout d'abord, lorsqu'inhalée, la fumée de cigarette se rend dans les voies respiratoires et endommage les cellules épithéliales qui tapissent les parois (Lee, Taneja, and Vassallo 2012). Les jonctions serrées qui relient ces cellules entre elles forment une barrière physique entre l'espace aérien et le tissu qui sera dégradée en continuant à fumer. D'ailleurs, une perte de la viabilité des cellules épithéliales est observée à la suite d'expositions à la fumée de cigarette (van der Vaart et al., 2004). Ensuite, les ROS créés par la fumée de cigarette activent des cascades intracellulaires qui mènent à la production de plusieurs cytokines dont *Monocyte chemoattractant proteïne-1* (MCP-1), *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) (Rom et al., 2013), l'interleukine-8 (IL-8) et le facteur de stimulation GM-CSF (Lee, Taneja, & Vassallo, 2012). La sécrétion de ces médiateurs provoque le recrutement de cellules immunitaires telles que les macrophages et les neutrophiles qui libèrent à leur tour des métalloprotéinases

matricielles (MMPs) et de l'élastase. Celles-ci sont responsables de la dégradation des protéines présentes dans la matrice extracellulaire et contribuent ainsi aux dommages tissulaires (Rom et al., 2013).

Il a été démontré que l'inhalation de la fumée de cigarette active plusieurs cascades de signalisation moléculaire qui résultent en la production de puissantes cytokines et chimiokines par les différents leucocytes de l'environnement pulmonaire. La voie NF- κ B est l'une des voies les plus importantes induites par le tabagisme puisqu'elle active les cellules immunitaires. Brièvement, la fumée de cigarette stimule l'activation du complexe NF- κ B/I κ B qui conduit ensuite à la dégradation de I κ B par le protéasome. Ainsi, NF- κ B est transloqué au noyau des cellules myéloïdes et lymphoïdes où il induit la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation (Rom et al., 2013). De plus, il est bien connu que la fumée de cigarette en soi est associée à une augmentation de la sécrétion de TNF- α , d'IL-1, d'IL-6, d'IL-8 et du facteur de croissance GM-CSF. Il a aussi été démontré que la fumée de cigarette régule à la hausse les niveaux d'IL-1 α et d'IL-1 β , des cytokines clés dans l'initiation et la persistance de l'inflammation pulmonaire (Botelho et al., 2011). De plus, la fumée de cigarette est aussi connue pour inhiber la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. Toutefois, la fumée de cigarette peut aussi entraîner des effets suppressifs dus à la nicotine, à l'hydroquinone ou au monoxyde de carbone. Par exemple, il semblerait que la nicotine ait également des propriétés inhibitrices sur la production d'IL-6 et d'IL-8 (Arnson et al., 2010). Par ailleurs, il a été établi que l'activation du récepteur acétylcholine nicotinique $\alpha 7$ sur les macrophages réduit la sécrétion de TNF- α et IL-1 β en supprimant les réactions Th17 et Th1 (Nizri et al., 2009). Plusieurs cytokines et voies moléculaires sont donc modulées par la fumée de cigarette.

Le tabagisme cause plusieurs modifications au niveau cellulaire. Il est bien établi que l'exposition à la fumée de cigarette entraîne une augmentation du nombre de cellules totales dans le lavage broncho-alvéolaire (D'Hulst A, Vermaelen, Brusselle, Joos, & Pauwels, 2005). Celle-ci est due au recrutement de macrophages/monocytes et de neutrophiles dans le poumon. De plus, une augmentation des mastocytes est observée dans les voies respiratoires.

Ces accumulations se produisent rapidement suite à l'inhalation de la fumée de cigarette, c'est-à-dire en moins de 24 heures (van der Vaart et al., 2004). Il est également connu que le nombre de cellules dendritiques augmente après trois jours d'exposition dans le poumon des souris fumeuses. En contexte tabagique aigu, un effet suppressif de la fumée de cigarette peut aussi être observé pour certains types cellulaires notamment les éosinophiles. En effet, leur nombre chute considérablement dans le tissu pulmonaire, six à 24 heures suivant une exposition à la fumée de cigarette (van der Vaart et al., 2004), alors qu'après trois jours, leur nombre est redevenu comparable à celui retrouvé chez les souris non fumeuses (D'Hulst A et al., 2005). Cependant, chez un sous-groupe de patients atteints de MPOC et/ou en période d'exacerbation, d'autres études ont confirmé l'observation d'un nombre élevé d'éosinophiles dans leur poumon (Saetta et al., 1994). L'étude plus détaillée de certains types cellulaires engagés dans la réponse immunitaire pulmonaire induite par la fumée de cigarette est nécessaire.

Rôles des macrophages

L'exposition à la fumée de cigarette affecte la réponse des macrophages pulmonaires. Ces phagocytes sont la première ligne de défense contre les polluants et les agents microbiens (Arnson et al., 2010; Rom et al., 2013). Il est bien connu que le tabagisme augmente leur nombre dans le poumon et favorise la production de médiateurs inflammatoires, de ROS et d'enzymes protéolytiques par ceux-ci (Rom et al., 2013). Les médiateurs sont libérés dans le but de résoudre l'inflammation et, par le fait même, de réparer les dommages tissulaires. Cependant, l'hypersécrétion de ces médiateurs par les macrophages activés mène au développement de maladies inflammatoires telles que la MPOC (Lim, Kim, Lee, Bae, & Kim, 2018).

Bien que leur nombre augmente dans le poumon, ces macrophages ne sont pas nécessairement plus fonctionnels. En effet, immédiatement après l'inhalation de la fumée de cigarette, les macrophages alvéolaires voient leur capacité de phagocytose diminuer, un mécanisme très important pour la défense de l'hôte (van der Vaart et al., 2004). Leur capacité

à éliminer les cellules apoptotiques, un processus nommé efferocytose, est également restreinte par la fumée de cigarette, ce qui conduit à une accumulation de cellules nécrosées (Lim et al., 2018). En outre, une diminution de la viabilité de ces macrophages alvéolaires est observée (van der Vaart et al., 2004). De plus, comme mentionné précédemment, des changements morphologiques (Arnson et al., 2010), notamment une augmentation de la taille des macrophages due à une accumulation lipidique associée avec la libération d'IL-1 α , sont constatés (Morissette et al., 2015a).

La production de cytokines par les macrophages dont IL-1 α et IL-1 β , mérite d'être élaborée davantage. Il a été démontré qu'à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette de quatre jours, la sécrétion *in vitro* d'IL-1 α par des macrophages pulmonaires isolés du lavage broncho-alvéolaire augmente significativement comparativement aux macrophages des souris non fumeuses. De plus, cette étude a permis de caractériser l'impact de la fumée de cigarette sur les comptes cellulaires des souris déficientes en IL-1 α ou en IL-1 β . Ils n'ont observé aucune augmentation du nombre de cellules mononuclées chez les souris fumeuses par rapport aux souris non fumeuses et ce, chez les deux types de souris déficientes. Toutefois, ils ont remarqué que le nombre de neutrophiles habituellement retrouvé chez les souris fumeuses sauvages est abrogé chez les souris fumeuses déficientes en IL-1 α , un fait qui n'est pas constaté chez les souris fumeuses déficientes en IL-1 β . De plus, la libération d'IL-1 α par les macrophages serait responsable de maintenir l'homéostasie lipidique pulmonaire puisqu'une accumulation de phospholipides, le principal lipide retrouvé dans le surfactant pulmonaire, est observée dans le fluide du lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses déficientes en IL-1 α (Morissette et al., 2015a).

Le rôle des macrophages pulmonaires a récemment été investigué d'une tout autre façon, en évaluant les impacts de leur déplétion sur la réponse immunitaire pulmonaire induite par la fumée de cigarette. Dans une étude, des souris ont été exposées à la fumée de cigarette pendant quatre semaines et leurs macrophages ont été déplétés à l'aide d'injections de clodronate incorporé dans des liposomes. Il a été démontré que le nombre de cellules totales, de macrophages, de neutrophiles et de lymphocytes diminue dans le lavage broncho-

alvéolaire des souris traitées au clodronate incorporé dans des liposomes. De plus, ces souris traitées avaient une plus faible quantité de cytokines MCP-1, TNF- α , IL-6 et IL-1 β dans leur fluide du lavage broncho-alvéolaire. Bref, ce traitement pourrait être efficace pour diminuer l'inflammation pulmonaire à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette. Cependant, cette approche comporte un risque; l'épuisement des macrophages pourrait entraîner un déséquilibre immunitaire, par exemple, en augmentant la susceptibilité aux infections (Lim et al., 2018). Des recherches plus ciblées sur le rôle des macrophages à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette demeurent essentielles.

Ainsi, une investigation plus détaillée de la réponse des macrophages alvéolaires à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette est primordiale afin d'évaluer leurs rôles, d'autant plus qu'ils sont des joueurs fondamentaux dans la pathogenèse de la MPOC (Botelho et al., 2011)

Rôles des neutrophiles

L'exposition à la fumée de cigarette augmente significativement le nombre de neutrophiles dans le poumon se traduisant par un nombre plus élevé dans le lavage broncho-alvéolaire. Leur présence accrue dans les voies respiratoires des fumeurs augmente leur activité protéolytique via la sécrétion de la protéase-3, les cathepsines G (Arnson et al., 2010), l'élastase des neutrophiles, et les MMPs (D'Hulst A et al., 2005). D'ailleurs, les protéases des neutrophiles ont aussi la capacité de stimuler la libération de mucines par les cellules caliciformes (Arnson et al., 2010). Ces composés dégradent des composantes de la matrice extracellulaire qui peuvent engendrer à leur tour un recrutement et une suractivation des cellules immunitaires (D'Hulst A et al., 2005).

L'accumulation de neutrophiles suivant une exposition aiguë à la fumée de cigarette semble être seulement dépendante de l'IL-1 α . En effet, l'administration quotidienne d'un anticorps anti-IL-1 α supprime la neutrophilie chez des souris fumeuses de type BALB/c,

alors que l'administration d'un anti-IL-1 β n'a aucun impact sur celles-ci. Cette étude a également confirmé ce fait chez des souris C57BL/6 déficientes en IL-1 α exposées pendant quatre jours à la fumée de cigarette. Le nombre de neutrophiles diminue de façon significative chez les souris fumeuses déficientes comparativement aux souris fumeuses sauvages, un résultat aussi observable à la suite d'une exposition chronique de huit semaines à la fumée de cigarette. IL-1 α aurait donc un rôle crucial dans le développement de la neutrophilie lors d'expositions aiguës et chroniques à la fumée de cigarette. Des thérapies ciblant cette cytokine ou son récepteur pourraient atténuer l'inflammation chez les fumeurs et les exacerbations des patients atteints de MPOC (Botelho et al., 2011).

Il est bien connu que les souris fumeuses infectées par le virus influenza ont une réponse inflammatoire accrue. Celle-ci se traduit par l'augmentation du nombre de cellules immunitaires dans le lavage broncho-alvéolaire de ces souris, cinq jours après l'infection, comparativement à des souris non fumeuses infectées. Toutefois, chez des souris qui sont déficientes pour le récepteur d'IL-1 (IL-1R), la réponse neutrophilique est atténuée malgré une exposition à la fumée de cigarette et une infection par le virus l'influenza. Au contraire, chez des souris qui recevaient un anti-IL-1 α , c'est leur nombre de cellules totales et de cellules mononuclées qui était nettement réduit (Botelho et al., 2011). D'autres parts, l'infiltration chronique de neutrophiles au poumon suggère qu'ils jouent un rôle potentiel dans l'obstruction des voies respiratoires et dans les lésions tissulaires retrouvées chez les gens atteints de MPOC (Botelho et al., 2011). La caractérisation du rôle des neutrophiles en contexte tabagique n'est donc pas à négliger, bien au contraire.

Rôles des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont un autre type cellulaire important dans la réponse inflammatoire induite par la fumée de cigarette. En plus de leur fonction assurant la présentation d'antigènes, ces cellules sont situées à un endroit critique dans les voies respiratoires, c'est-à-dire à l'interface entre le poumon et l'air inhalé. Elles sont capables de capter les signaux de danger et de répondre à toutes perturbations à la surface des muqueuses

en initiant l'immunité innée et en contrôlant le développement d'une réponse immunitaire adaptative.

Les études concernant l'effet de la fumée de cigarette sur cette population sont toutefois contradictoires. Selon certaines études, la fumée de cigarette induirait à la fois une hausse de leur nombre dans le poumon ainsi que leur activation. En effet, il a été démontré qu'après seulement trois jours d'exposition, une augmentation significative de cellules dendritiques est observée dans le lavage broncho-alvéolaire et le parenchyme pulmonaire de souris et que cette accumulation se maintient durant une exposition chronique de six mois (D'Hulst A et al., 2005). Cette étude a aussi constaté que la fumée de cigarette augmente les niveaux d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et de molécules costimulatrices telles que CD40 et CD86 dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses (D'Hulst A et al., 2005). Toutefois, une expression réduite du CCR7 serait observable, suggérant que les cellules dendritiques de fumeurs pourraient avoir une capacité accrue à induire une réponse lymphocytaire, mais une capacité diminuée concernant leur migration aux ganglions lymphatiques drainants (Arnson et al., 2010). Par contre, selon d'autres études, la fumée de cigarette diminue la fonction des cellules dendritiques dans le poumon ainsi que leur capacité à induire la prolifération des lymphocytes T aux ganglions lymphatiques (Robbins et al., 2008). Toutefois, leur propre migration n'est pas affectée ou augmentée (Lee et al., 2012). D'ailleurs, il est également bien établi que dans le poumon de fumeurs, une augmentation de cellules de Langherhans, un sous-groupe de cellules dendritiques, est observée (Arnson et al., 2010).

Le rôle des cytokines IL-1 α et IL-1 β a aussi été étudié chez les cellules dendritiques. Il a été démontré que l'accumulation de cellules dendritiques suivant une exposition à la fumée de cigarette était seulement dépendante d'IL-1 α chez des souris BALB/c exposées pendant quatre jours à la fumée de cigarette. Ces souris avaient également reçu un anticorps anti-IL-1 α ou anti-IL-1 β quotidiennement. Seules les souris traitées avec l'anti-IL-1 α ont obtenu une réduction du nombre de cellules dendritiques et de leur maturation. Le même scénario a également été obtenu chez des souris déficientes en IL-1 α . Ce résultat est aussi

observé suivant une exposition chronique à la fumée de cigarette (Botelho et al., 2012). IL-1 α a donc également un rôle dans l'infiltration de cellules dendritiques suivant une exposition au tabagisme.

Somme toute, il est clair que les neutrophiles, les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques jouent un rôle fondamental dans la réponse immunitaire innée suivant une exposition à la fumée de cigarette. Étant donné que les cellules dendritiques établissent le lien entre l'immunité innée et adaptative (D'Hulst A et al., 2005), il est justifié de s'interroger sur la réponse immunitaire spécifique suite à une exposition à la fumée de cigarette.

Immunité adaptative pulmonaire

Bien que la plupart des études portent sur l'immunité innée, quelques études ont tout de même dirigé leur attention sur les impacts de la fumée de cigarette sur le système immunitaire adaptatif.

Lymphocytes B

Lors d'une exposition aiguë, une augmentation du nombre de lymphocytes B est retrouvée dans le lavage broncho-alvéolaire de souris après trois jours d'exposition à la fumée de cigarette alors qu'aucune différence n'a été observée dans le tissu pulmonaire (D'Hulst A et al., 2005). Il est également connu qu'une exposition chronique à la fumée de cigarette entraîne la formation de tissus lymphoïdes tertiaires. Une apparition de tissus lymphoïdes tertiaires, composés principalement de lymphocytes B-IgM positifs, mais aussi de lymphocytes T, de macrophages et de cellules dendritiques, est retrouvée dans le poumon de souris exposées à la fumée de cigarette pendant 24 semaines. De plus, ces structures persistent même après une cessation tabagique de 60 et 120 jours (Morissette, Jobse, et al.,

2014). Récemment, il a aussi été démontré qu'une expression élevée du *B-cell activator factor* (BAFF), un facteur jouant un rôle dans l'homéostasie et l'activation des lymphocytes B, est observée chez les lymphocytes B et les macrophages alvéolaires de patients atteints de MPOC. Le BAFF est également augmenté chez la souris après quatre jours d'exposition à la fumée de cigarette et persiste jusqu'à 24 semaines. De plus, cette étude confirme l'importance du BAFF dans la production d'auto-anticorps locale et dans la formation des tissus lymphoïdes tertiaires à la suite d'une exposition chronique à la fumée de cigarette (Morissette et al., 2016). Le blocage du BAFF par un anticorps prévient et induit la résolution des tissus lymphoïdes tertiaires (Morissette et al., 2016). Les lymphocytes B seraient donc influencés par la fumée de cigarette et auraient un certain impact dans la MPOC.

Lymphocytes T

À la suite d'une exposition de 12 semaines à la fumée de cigarette, une augmentation significative du nombre de lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ est observée et va davantage s'intensifier jusqu'à six mois d'exposition (D'Hulst A et al., 2005). Dans le lavage broncho-alvéolaire de fumeurs, une hausse du nombre de lymphocytes CD8⁺, aussi connus sous le nom de lymphocytes cytotoxiques, a été notée comparativement aux non-fumeurs, alors que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ diminue dans le lavage broncho-alvéolaire des fumeurs. De plus, chez des souris déficientes en lymphocytes CD8⁺, une exposition chronique à la fumée de cigarette n'induit pas d'inflammation ni d'emphysème. Donc, les lymphocytes CD8⁺ sembleraient être un médiateur clé pour le développement de MPOC (Qiu et al., 2017). Le tabagisme affecte aussi d'autres types cellulaires de l'immunité spécifique tels que les lymphocytes T auxiliaires, les lymphocytes T régulateurs ainsi que les lymphocytes T et B mémoires, toutefois ceux-ci ne seront pas décrits dans ce mémoire (Qiu et al., 2017).

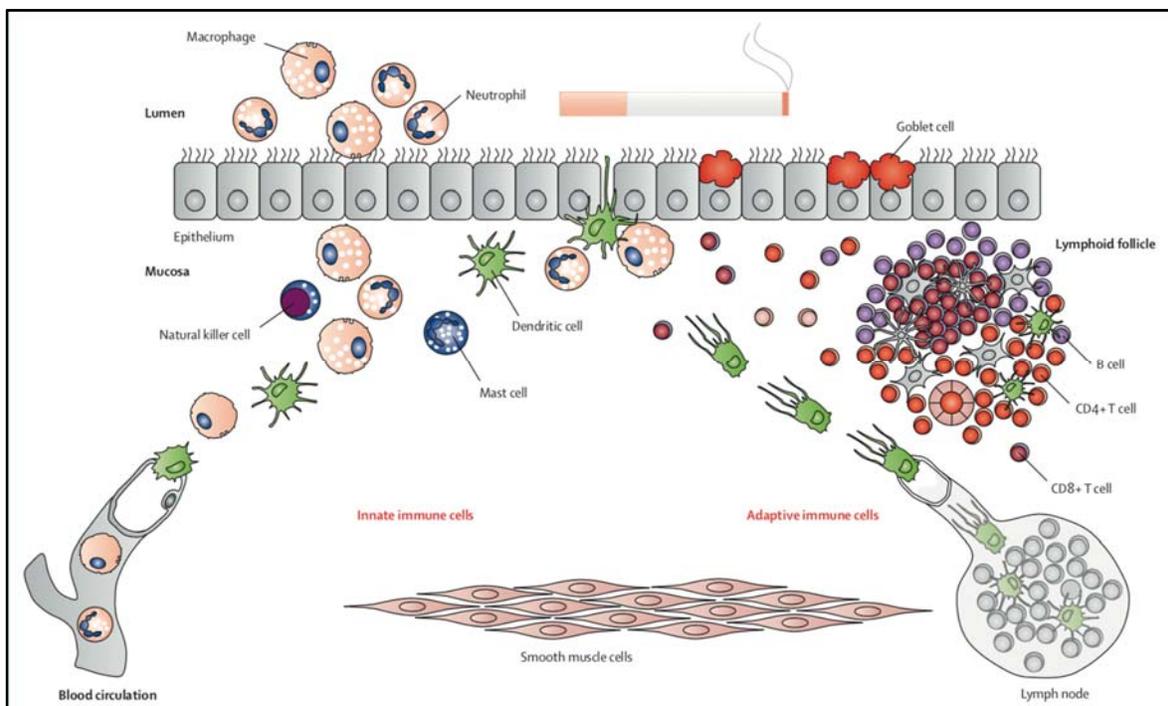


Figure 2. Cellules immunitaires innées et adaptatives dans le développement de la MPOC induite par la fumée de cigarette. La fumée de cigarette active les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages et les neutrophiles. Quant à elles, les cellules dendritiques établissent le lien entre l'immunité innée et adaptative en orchestrant des réponses immunitaires spécifiques, incluant les lymphocytes B et T, qui conduisent au développement de follicules lymphoïdes lors de l'inflammation chronique. CD : cluster de différenciation
Figure tirée de (Brusselle, Joos, & Bracke, 2011)

En somme, l'exposition tabagique conduit les fumeurs dans un cercle vicieux. La fumée de cigarette crée des ROS déclenchant une réponse immunitaire au cours de laquelle il y a production d'autres substances réactives qui provoquent ensuite d'importants dommages tissulaires. Le tabagisme entraîne des conséquences majeures sur l'immunité innée et adaptative et celles-ci se reflètent dans différentes pathologies notamment dans des maladies inflammatoires pulmonaires comme la MPOC. L'identification de mécanismes spécifiques par lesquels la fumée de cigarette induit une grande infiltration cellulaire permettra le développement de nouveaux traitements afin de mieux gérer les maladies dont sont atteints les fumeurs (Rom et al., 2013).

Le système de régulation SIRP α et CD47

Inflammation et système de régulation de l'inflammation

L'inflammation est un processus complexe qui nécessite d'être régulé puisqu'il consiste à éliminer les stimuli dommageables envers l'organisme afin de rétablir et de maintenir l'homéostasie. Ce mécanisme est essentiel pour contrôler les infections causées par des pathogènes ou encore pour résoudre des dommages tissulaires. Par contre, une réponse immunitaire persistante ou exagérée peut mener à une perte de contrôle et au développement de différentes maladies chroniques comme la MPOC (Colarusso et al., 2017).

Des systèmes de régulation de l'inflammation de type récepteur-ligand existent pour contrer les effets néfastes que peut produire une réponse immunitaire soutenue (Xu & Larbi, 2017). Les axes CD200R/CD200 et SIRP α /CD47 font partie de ces systèmes. Le CD200 est omniprésent dans tous les types cellulaires alors que l'expression de son récepteur CD200R est limitée aux cellules myéloïdes et lymphoïdes. L'implication du système CD200R/CD200 a été étudiée dans différentes maladies telles que les troubles allergiques et auto-immuns, les maladies infectieuses et la croissance tumorale (Gorczyński, 2012). Concernant l'axe SIRP α /CD47, CD47 est également retrouvé de façon ubiquitaire comme le CD200 tandis que de la protéine SIRP α est principalement exprimée par les neurones et les cellules myéloïdes. L'interaction de CD47 avec SIRP α a aussi été étudiée dans plusieurs maladies notamment dans des maladies inflammatoires (Raymond, Van, Rubio, Welzenbach, & Sarfati, 2010), des maladies auto-immunes, certains cancers et des maladies du sang (Barclay & Van den Berg, 2014).

Toutefois, le système SIRP α /CD47 a davantage capté notre attention pour différentes raisons. Tout d'abord, des données préliminaires générées par analyses bio-informatiques dans notre laboratoire confirment que l'expression du gène *sirp α* augmente en contexte tabagique dans le tissu pulmonaire de souris et d'humain. Une soustraction transcriptionnelle de la signature d'expression pulmonaire du lipopolysaccharide (LPS), de l'asthme et de

l'influenza a été réalisée afin de déterminer précisément quels gènes étaient sur- ou sous-exprimés en condition tabagique. Ainsi, nous avons constaté que le gène *sirpα* était surexprimé uniquement en contexte tabagique. De plus, puisque la protéine SIRPα est principalement exprimée par les cellules myéloïdes telles que les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques, tous des joueurs majeurs dans l'homéostasie pulmonaire, et que CD47 est retrouvée de façon ubiquitaire, nous pensons que cet axe serait des plus pertinents à explorer en contexte tabagique. D'ailleurs, à ce jour, aucune étude n'a encore investigué l'impact de ces deux protéines sur la réponse immunitaire à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette.

La famille SIRP

La famille « Signal regulatory protein » (SIRP), majoritairement exprimée par les cellules myéloïdes, est une famille de récepteurs impliquée dans la régulation des fonctions leucocytaires. Cette famille de récepteurs de surface est largement présente chez les mammifères, par contre, elle n'est pas retrouvée chez les amphibiens, les poissons et les invertébrés (van Beek, Cochrane, Barclay, & van den Berg, 2005). Ces récepteurs divergent au niveau de leur domaine cytoplasmique et de leur signalisation intracellulaire (activateur ou inhibiteur), mais ils sont similaires au niveau de leur domaine extracellulaire. La famille SIRP comporte 15 membres apparentés (Cant & Ullrich, 2001). Les trois membres principaux de cette famille sont SIRPα, SIRPβ1 et SIRPγ (van Beek et al., 2005) (**Figure 3.**). Chez l'humain, les gènes codants pour ces trois membres se retrouvent sur le chromosome 20p13 alors que chez la souris, ils se situent sur le chromosome 2 (Cant & Ullrich, 2001). Il existe deux autres protéines plus lointainement apparentées qui ne sont toujours pas bien caractérisées dans la littérature : SIRPβ2 et SIRPδ (Barclay & Van den Berg, 2014). SIRPβ1 a une très courte région cytoplasmique, est exprimé par les macrophages et les neutrophiles et ne possède aucun ligand connu jusqu'à présent (Barclay & Van den Berg, 2014). Toutefois, sa courte queue intracellulaire lui sert de récepteur pour s'associer avec la protéine adaptatrice « DNAX activator protein 12 » (DAP12) (Liu et al., 2002). DAP12 possède un motif d'activation immunorécepteur à base de tyrosine (ITAM) qui, lorsque associée avec

SIRP β 1, lui confère un potentiel activateur pouvant agir sur la phagocytose des macrophages et la migration des neutrophiles. Bien que SIRP β 2 ne soit pas très bien étudié, il semblerait que cette protéine ait aussi la propriété de s'associer à DAP12 ou toute autre protéine adaptatrice de ce genre. Concernant SIRP δ , elle ne comporte qu'un seul domaine protéique et ne semble pas avoir la capacité de s'attacher à la membrane cellulaire (Barclay & Van den Berg, 2014). SIRP γ est principalement exprimé par les lymphocytes T et les cellules NK et possède également une courte région cytoplasmique de quatre acides aminés. Contrairement à SIRP β , SIRP γ ne s'associe pas avec des protéines adaptatrice, mais peut se lier à la protéine CD47. Cependant, lorsque CD47 et SIRP γ interagissent, aucun signal ne se transmet (Barclay & Brown, 2006).

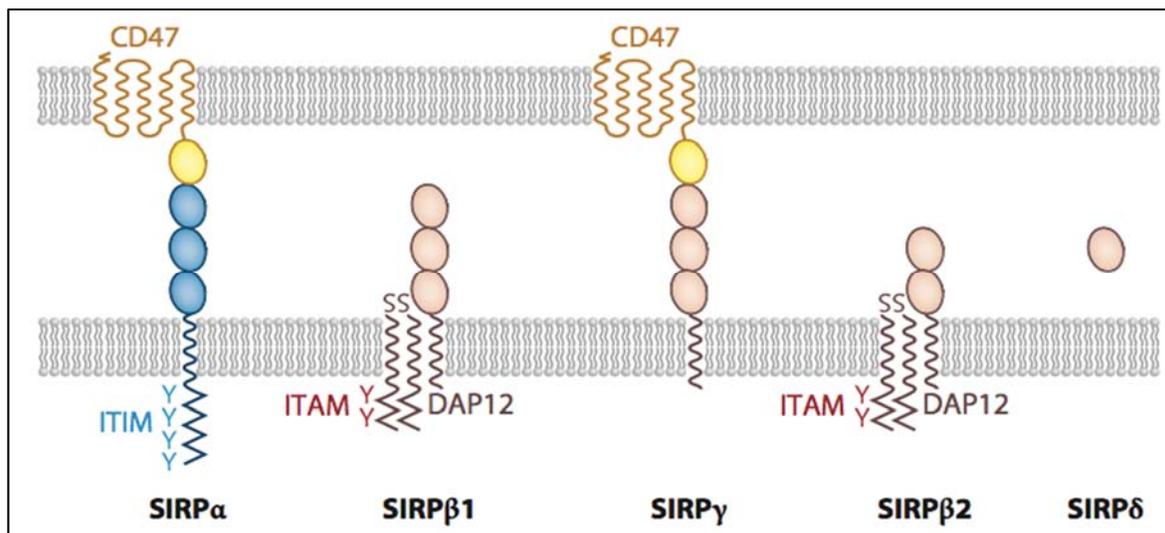


Figure 3. Interaction entre CD47 et les principaux membres de la famille SIRP. CD47 peut interagir avec deux protéines de la famille SIRP : SIRP α et SIRP γ . SIRP α contient quatre résidus tyrosines sur sa queue cytoplasmique formant deux motifs d'inhibition immunorécepteur à base de tyrosine (ITIM), alors que SIRP β 1 et SIRP β 2 s'associent avec la protéine adaptatrice DAP12 qui contient qu'un motif d'activation immunorécepteur à base de tyrosine (ITAM). SIRP : Signal regulatory protein, DAP12 : « DNAX activator protein 12 »

Figure tirée de (Barclay & Van den Berg, 2014)

Description détaillée de SIRP α et CD47

SIRP α

La protéine SIRP α , aussi connue sous le nom de CD172a, P84 et SHPS1, a été originalement identifiée dans des cellules de rat (van Beek et al., 2005). SIRP α est exprimée principalement par les neurones ainsi que par les cellules myéloïdes telles que les macrophages, certains sous-ensembles de cellules dendritiques et les neutrophiles. Cette protéine contient trois régions différentes : un domaine extracellulaire, une courte région transmembranaire et une queue cytoplasmique. Le domaine extracellulaire N-terminal de SIRP α est fortement glycosylé (Kong et al., 2007) et est composé de trois domaines de type immunoglobuline (Ig) dont un IgV et deux IgC (Murata, Kotani, et al., 2014) tous connectés avec trois paires de ponts disulfures (Liu et al., 2002). La région cytoplasmique contient quatre résidus tyrosines qui forment des motifs d'inhibition immunorécepteur à base de tyrosine (ITIM). Ces ITIMs sont des arrangements en tandem de deux motifs peptidiques centrés sur deux tyrosines présentes sur la queue cytoplasmique de SIRP α . Cette région est très bien conservée chez les espèces, plus particulièrement chez les rats, les souris et les humains. Il existe aussi plusieurs polymorphismes au niveau du domaine extracellulaire de la protéine SIRP α qui ont été retrouvés chez les souris et les humains, toutefois, selon certaines études, ces polymorphismes n'affectent en rien la liaison au CD47 chez l'humain (Barclay & Brown, 2006; Hatherley, Lea, Johnson, & Barclay, 2014), alors que chez la souris, l'inverse a été démontré. En effet, l'étude de Dai et al. a découvert que les polymorphismes de SIRP α , reliés à diverses souches de souris, modulent la liaison au CD47. Chez des monocytes de différentes souches, la liaison du mCD47-Fc, un activateur murin de SIRP α , à la protéine SIRP α a été évaluée. Ils ont démontré que le mCD47-Fc se liait davantage aux souches NOD et CAST et plus faiblement aux souches C57BL/6, C3H et les BALB/c (Dai et al., 2017). De plus, la liaison du CD47-Fc humain a été testée sur des macrophages de différentes souches de souris. Une réactivité beaucoup plus élevée entre le hCD47-Fc et les macrophages des souris NOD est obtenue comparativement aux souris NOR et B6 (Takenaka et al., 2007).

Bien que CD47 soit l'un des principaux ligands de SIRP α , SP-A et SP-D sont deux autres ligands qui permettent la régulation de la réponse immunitaire pulmonaire. SP-A et SP-D sont des protéines solubles retrouvées dans le surfactant pulmonaire et ont une plus forte affinité avec SIRP α que CD47 (Barclay & Van den Berg, 2014). L'interaction de SIRP α sur les macrophages alvéolaires avec les protéines du surfactant pulmonaire garde ces macrophages en veille et semble avoir un rôle régulateur et protecteur (Janssen et al., 2008). Donc, la présence d'autres ligands de SIRP α dans le poumon est non négligeable.

Puisque que SIRP α est principalement exprimée par les cellules myéloïdes telles que les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques et que ces types cellulaires sont des joueurs fondamentaux dans l'immunité innée pulmonaire, la brève caractérisation du rôle de ces cellules dans l'axe SIRP α /CD47 est pertinente.

Macrophages

Plusieurs études impliquant l'axe SIRP α /CD47 ont été réalisées sur des macrophages. Premièrement, l'interaction entre deux macrophages, c'est-à-dire la liaison entre le CD47 de l'un et le SIRP α de l'autre, confère la reconnaissance du soi et entraîne la fusion de ces macrophages, possiblement par un processus d'internalisation. La fusion entre ces deux cellules mène à la création de cellules géantes multinucléées et d'ostéoclastes, des cellules jouant un rôle important dans le remodelage osseux (Han et al., 2000), mais pouvant aussi contribuer au développement de maladies inflammatoires chroniques ou de l'ostéoporose (Vignery, 2005). Deuxièmement, il a été démontré que l'expression de SIRP α par les macrophages était réduite à la suite d'une stimulation au LPS. Par conséquent, la diminution d'expression de SIRP α a prolongé l'activation des voies MAPK et NF- κ B. (Kong et al., 2007). Plusieurs autres études évoquant les macrophages et l'axe SIRP α /CD47 ont été réalisées et certaines d'entre elles sont discutées plus en détail dans la section portant sur les implications de l'axe SIRP α /CD47.

Neutrophiles

Quelques études du système SIRP α /CD47 ont été effectuées chez les neutrophiles. Sur des cellules humaines, il a été démontré *in vitro* que SIRP α régule la transmigration des neutrophiles à travers une monocouche de cellules épithéliales par son interaction avec CD47 (Liu et al., 2002). Plus récemment, une étude a observé que la queue cytoplasmique de SIRP α est clivée chez les neutrophiles lors d'une inflammation aiguë et que cette perte contribue à la réponse inflammatoire de ces cellules (Zen et al., 2013).

Cellules dendritiques

Dans les voies respiratoires, les cellules dendritiques non plasmacytoïdes se divisent en deux sous-types : CD11b^{high} CD103⁻ et CD11b^{low} CD103⁺. Les cellules dendritiques qui sont CD11b^{high} CD103⁻ expriment SIRP α contrairement à celles qui sont CD11b^{low} CD103⁺ (Raymond et al., 2009). Il a été conclu que la liaison du hCD47-Fc à la protéine SIRP α des cellules dendritiques inhibe leur maturation, autant au niveau phénotypique que fonctionnelle, et diminue leur quantité de cytokines produites (Latour et al., 2001).

Compte tenu de la diversité des études concernant SIRP α sur ces différents types cellulaires, nous estimons qu'une recherche plus approfondie de l'expression de SIRP α sur chacune de ces populations cellulaires est nécessaire pour évaluer leurs rôles spécifiques dans la réponse immunitaire innée face à une exposition à la fumée de cigarette.

CD47

CD47 est une protéine membranaire de la superfamille des immunoglobulines (Ig) agissant en tant que marqueur du soi (Liu et al., 2002). Elle est très glycosylée et a un poids moléculaire d'environ 50 Kilodaltons (kDa) (Oldenborg, 2013). Cette protéine est considérée

comme ubiquitaire puisqu'elle se retrouve chez pratiquement toutes les cellules du corps humain (cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques) y compris les érythrocytes et les plaquettes. Elle était originellement appelée : protéine associée à une intégrine (IAP) puisqu'elle s'associe à des intégrines telles que $\alpha\beta3$. Toutefois, il est préférable de la nommer CD47, car il n'y a pas d'intégrine exprimée sur les globules rouges (Oldenborg, 2013). CD47 est bien conservée d'une espèce à l'autre et sa séquence d'acides aminés possède entre 60 et 70% de similitudes avec celle de l'humain et les espèces murines et bovines. Elle comporte un seul domaine extracellulaire de type Ig, cinq domaines transmembranaires ainsi qu'une très courte queue cytoplasmique alternativement épissée (Oldenborg, 2013). Chez l'humain et la souris, la queue cytoplasmique de CD47 peut se retrouver sous quatre isoformes réparties dans différents tissus. L'isoforme 1 est formée de seulement quatre acides aminés et est majoritairement exprimée par les cellules endothéliales et épithéliales. La forme 2, la plus prédominante, comprend 16 acides aminés et est retrouvée chez toutes les cellules hématopoïétiques ainsi que chez les cellules endothéliales et épithéliales. L'isoforme 3, qui ressemble beaucoup à l'isoforme 4, est composée de 36 acides aminés et est présente dans les neurones, les testicules et les intestins.

CD47 a lui aussi d'autres ligands, dont des glycoprotéines non structurelles de la matrice extracellulaire : les trombospondines et SIRP γ (Barclay & Van den Berg, 2014). CD47 a plus d'affinité avec la trombospondine-1 (TSP-1) et leur interaction semble impliquée dans la régulation de la survie cellulaire (Xiao et al., 2015). L'affinité de liaison entre le CD47 et SIRP γ est beaucoup moins grande, soit précisément 10 fois plus faible que celle entre CD47 et SIRP α (Barclay & Van den Berg, 2014). Une fois de plus, la présence de ligands supplémentaires est un fait à prendre en considération lors de la modulation de l'axe SIRP α /CD47.

Interaction entre SIRP α et CD47

Plusieurs étapes se produisent à la suite de la liaison entre SIRP α et CD47. Tout d'abord, la région IgV à l'extrémité NH₂ du domaine extracellulaire de SIRP α se lie au domaine IgV de CD47. Ensuite, une phosphorylation des résidus tyrosines présents sur la queue cytoplasmique de SIRP α est produite par les enzymes de la famille kinase Src (Barclay & Van den Berg, 2014). Cet événement est une caractéristique clé de la signalisation de SIRP α puisque les résidus phosphorylés peuvent ensuite recruter et activer deux tyrosines phosphatases cytosoliques : SHP-1 et SHP-2. Celles-ci déphosphorylent ensuite des substrats et régulent ainsi négativement des voies de signalisation inhibant à leur tour les fonctions des cellules exprimant SIRP α (Barclay & Van den Berg, 2014; Murata, Kotani, et al., 2014). SHP-1 et SHP-2 ont une forte homologie structurale, mais sont très différentes du point de vue fonctionnel. Effectivement, même si ces deux phosphatases sont impliquées simultanément dans plusieurs voies de signalisation, l'une ne peut remplacer l'autre. Par exemple, chez des souris ayant une mutation du gène codant pour SHP-1, il a été démontré

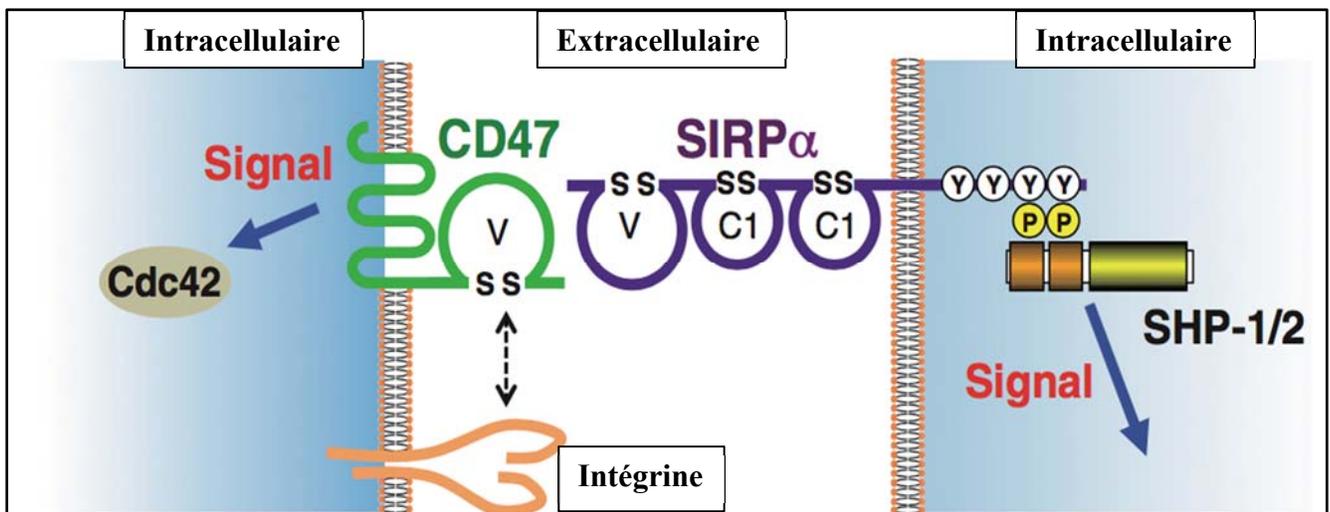


Figure 4. Schéma de la signalisation bidirectionnelle lors d'une interaction entre SIRP α et CD47. Le domaine IgV N-terminal de SIRP α interagit avec le domaine IgV de CD47. À la suite de cette liaison, une phosphorylation des résidus tyrosines présents sur la queue cytoplasmique de SIRP α est produite et engendre le recrutement de deux phosphatases : SHP-1 et SHP-2. L'engagement du CD47 peut aussi conduire à un signal intracellulaire activant ainsi l'homologue de la protéine de contrôle de la division cellulaire 42 (Cdc42).

Figure tirée et adaptée de (Murata, Kotani, Ohnishi, & Matozaki, 2014)

que SHP-2 ne peut remplacer la fonction de SHP-1 et, par le fait même, qu'elle ne peut renverser le phénotype (Qu, 2002). Or, une description plus détaillée de chacune de ces phosphatases est de mise.

SHP-2 est exprimée de façon ubiquitaire alors que SHP-1 est exprimée principalement sur les cellules épithéliales et les cellules hématopoïétiques (Barclay & Van den Berg, 2014). SHP-2 est impliquée dans diverses voies de signalisation. Par exemple, elle intervient dans plusieurs voies initiées par des cytokines telles qu'IL-1, IL-3, IL-5, IL-6 et le GM-CSF ainsi que par des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). De plus, elle est impliquée dans différentes voies de transformation du signal comme les voies JAK-STAT, PI3, Ras-Raf-MAP Kinase et NF- κ B. SHP-2 peut interagir directement avec le récepteur d'une cytokine ou encore avec des intermédiaires de signalisation (Qu, 2002). Majoritairement, SHP-2 induit une régulation positive, c'est-à-dire qu'elle active un signal, mais dans certaines voies, elle peut émettre une régulation négative en aval comme SHP-1. En revanche, SHP-1 régule négativement la signalisation des cytokines et des facteurs de croissance. Une des fonctions primordiales de SHP-1 est la régulation de l'activation et la prolifération des macrophages. D'ailleurs, une mutation du gène codant pour SHP-1 entraîne une grande accumulation de macrophages dysfonctionnels dans le poumon de souris menant ainsi, à des dommages pulmonaires sévères (Timms et al., 1998).

La signalisation induite par la liaison de SIRP α à CD47 peut être de type bidirectionnel. En effet, les cellules exprimant le CD47 peuvent également émettre un signal intracellulaire lors de la liaison à SIRP α (Barclay & Van den Berg, 2014). Ce signal permet l'activation de l'homologue de la protéine de contrôle de la division cellulaire 42 (Cdc42), un membre de la famille Rho de petites protéines GTPases dans les neurones. Toutefois, les composantes moléculaires menant la signalisation en aval du CD47 restent méconnues (Murata, Kotani, et al., 2014). Il semble que le CD47 émet des signaux via des voies dépendantes ou indépendantes en s'associant aux protéines Gi ou via des intégrines (Takenaka et al., 2007). Par ailleurs, ce signal peut aussi être médié à travers la queue

cytoplasmique de l'intégrine associée. De plus amples études permettront de mieux comprendre le signalement que produit CD47 (Barclay & Van den Berg, 2014).

Exemple illustrant le fonctionnement de l'axe SIRP α /CD47

Un exemple couramment utilisé pour illustrer le fonctionnement et l'impact de cette signalisation est la clairance des globules rouges sénescents. Les globules rouges survivent environ 120 jours chez l'humain et entre 40 (Ishikawa-Sekigami et al., 2006) et 60 (Arias & Arias, 2017) jours chez la souris. Il est important que les macrophages spléniques éliminent les érythrocytes qui sont en fin de vie afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Les niveaux de CD47 sur les jeunes globules rouges sont très élevés et permettent donc une bonne interaction avec les macrophages qui expriment SIRP α (Arias & Arias, 2017). Lorsqu'il y a une liaison, la cascade de signalisation qui s'en suit régule négativement les fonctions des phagocytes et empêche ainsi l'élimination de ces globules rouges. Toutefois, plus les globules rouges vieillissent, plus ils perdent l'expression du CD47 sur leurs membranes cellulaires et donc les macrophages spléniques ne peuvent plus s'y lier. Les globules rouges sénescents sont ainsi phagocytés et éliminés. Indubitablement, une dérégulation de l'expression de ces protéines peut engendrer des maladies du sang (Barclay & Van den Berg, 2014).

Implications de l'axe SIRP α /CD47

Processus cellulaires

L'interaction entre SIRP α et CD47 est impliquée dans différents processus cellulaires. Premièrement, il semblerait que cet axe aurait un rôle à jouer dans l'adhésion cellulaire. Cependant, il n'y a pas encore de portrait bien établi définissant ce processus. Néanmoins, une hypothèse suggère que ces protéines auraient un impact dans l'adhésion des macrophages aux cellules apoptotiques (Oldenborg, 2013). Deuxièmement, ce système joue

également un rôle dans la migration cellulaire. Par exemple, la liaison entre SIRP α , présent sur les phagocytes, et CD47, présent sur les cellules épithéliales et endothéliales, a un rôle à jouer durant la transmigration épithéliale et endothéliale en ouvrant les jonctions entre ces cellules. Cet axe aurait aussi une fonction dans la migration des cellules dendritiques et des cellules polymorphonucléées notamment les neutrophiles (de Vries et al., 2002). Finalement, un des processus majeurs impliquant l'interaction de SIRP α et CD47 est la phagocytose, par exemple, lors de la clairance des érythrocytes sénescents ou dans les rejets de xénogreffes (Wang, Wang, Wang, Fu, & Yang, 2010). Par ailleurs, les premières études *in vitro* sur le rejet des xénogreffes ont démontré une incompatibilité potentielle entre le SIRP α humain et le CD47 porcine, car les cellules lymphoblastoïdes porcines sont phagocytées par les macrophages humains. De plus, l'expression forcée du CD47 humain ou l'administration du hCD47-Fc réduit la phagocytose des cellules porcines par les cellules humaines (Ide et al., 2007). L'axe SIRP α /CD47 a donc un rôle déterminant dans certains processus cellulaires qui auront évidemment des répercussions dans différentes maladies.

Pathologies

L'interaction de SIRP α avec son ligand CD47 est aussi étudiée dans différentes maladies sévères telles que certains cancers, des maladies auto-immunes ainsi que des maladies inflammatoires (Barclay & Van den Berg, 2014).

Cancers

Jouant un rôle inhibiteur dans la phagocytose, l'interaction entre SIRP α et CD47 peut entraver l'élimination des cellules tumorales. D'ailleurs, les cellules cancéreuses de plusieurs types de cancers (les tumeurs solides du cancer du sein, des ovaires et du côlon ainsi que de la leucémie myéloïde, des myélomes et du lymphome non hodgkinien (LNH)) expriment plus fortement le CD47 comparativement aux cellules normales (Zeng et al., 2016). La liaison entre les macrophages exprimant SIRP α et les cellules cancéreuses qui expriment le CD47 entraîne le recrutement de phosphatases (SHP-1 et SHP-2) et mène à

l'inhibition de la phagocytose de ces cellules et, par le fait même, empêche leur élimination (Barclay & Van den Berg, 2014). Il y a également une corrélation entre l'expression de CD47 et le pronostic du cancer. En effet, plus les niveaux de cette protéine sont élevés, pire est le pronostic (Rivera, Fu, Tao, & Zhang, 2015). Les cellules cancéreuses utilisent donc ce mécanisme afin d'échapper à l'immunosurveillance des macrophages. Des stratégies visant à bloquer l'interaction de SIRP α et CD47, en utilisant des anticorps anti-CD47 et anti-SIRP α , sont investiguées dans des études précliniques afin de contrer l'échappement des cellules cancéreuses à la phagocytose (Ho, Danska, & Wang, 2013).

Maladies auto-immunes

Le système SIRP α /CD47 semble aussi avoir des répercussions sur le développement de maladies auto-immunes (Barclay & Van den Berg, 2014). En effet, l'importance de ces protéines a été investiguée dans certaines pathologies telles que la sclérose en plaques et l'arthrite rhumatoïde par l'utilisation de deux modèles murins : l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et l'arthrite induite par le collagène. De façon générale, ils ont observé que les souris déficientes en CD47 et les souris mutantes pour SIRP α , c'est-à-dire que la queue cytoplasmique de SIRP α était absente et qu'aucune signalisation ne pouvait être engendrée, étaient résistantes au développement de l'EAE. De plus, aucune des souris mutantes pour SIRP α n'a développé l'arthrite induite par le collagène (Murata, Saito, et al., 2014). Il a aussi été démontré que CD47 semble impliqué dans la susceptibilité au diabète en contrôlant la régulation des lymphocytes T CD4⁻ CD8⁻ (Dugas, Beauchamp, Chabot-Roy, Hillhouse, & Lesage, 2010).

Maladies inflammatoires

L'implication de SIRP α et de CD47 a aussi été établie dans des modèles de maladies inflammatoires, dont l'asthme et la maladie de Crohn. Il a été démontré qu'un taux anormal de cellules dendritiques SIRP α ⁺ est retrouvé dans la muqueuse intestinale des patients atteints de la maladie de Crohn et qu'une grande quantité d'IL-1 β et TNF est produite restrictivement par ces cellules. Baba et al. ont donc administré la protéine de fusion CD47-Fc à des cultures

d'explants tissulaires et ont observé une diminution de la sécrétion de plusieurs cytokines, dont IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF (Baba et al., 2013).

D'autre part, dans un modèle murin d'asthme allergique induit par l'ovalbumine, Raymond et al. ont démontré que l'administration intrapéritonéale d'un activateur de SIRP α protège les souris BALB/c de la sensibilisation à l'ovalbumine. L'ovalbumine, qui constitue la majeure glycoprotéine retrouvée dans le blanc d'œuf, est immunogène et est largement employée comme allergène dans le but de provoquer une réaction allergique (UniProt, 1986). Dans leur étude, une diminution de la sécrétion de mucus ainsi qu'une réduction du nombre de cellules totales, du nombre d'éosinophiles, du nombre de neutrophiles et du nombre de lymphocytes ont été observées dans le fluide du lavage broncho-alvéolaire des souris asthmatiques traitées au CD47-Fc. Ils ont également observé une diminution dans la sécrétion des cytokines IL-5 et IL-13 dans le fluide du lavage broncho-alvéolaire ainsi qu'une réduction des niveaux IgE spécifiques à l'ovalbumine dans le sérum, suggérant ainsi une résolution de la réponse allergique. Bref, ils ont montré que l'administration intrapéritonéale du CD47-Fc protège les souris traitées de la réponse Th2 locale et systémique induite par l'ovalbumine et, par le fait même, du développement de l'inflammation des voies respiratoires (Raymond et al., 2010).

En résumé, l'axe SIRP α /CD47 est un système régulateur important pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et la régulation des fonctions des cellules immunitaires innées. L'implication de cet axe a été démontrée dans différents processus cellulaires notamment la phagocytose, mais également dans plusieurs maladies telles que certains cancers et des maladies inflammatoires comme l'asthme allergique (Barclay & Van den Berg, 2014). La modulation de cet axe pourrait donc avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement de différentes maladies, dont la MPOC. L'axe SIRP α /CD47 requiert donc d'être grandement exploré.

CHAPITRE 1 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

1.1. Pertinence de l'étude

L'inflammation est un processus nécessaire afin de maintenir et de rétablir l'homéostasie suivant une infection ou un dommage. Toutefois, il est possible que celle-ci demeure soutenue et devienne exagérée jusqu'à mener au développement de maladies inflammatoires pulmonaires. En effet, l'inhalation de la fumée de cigarette initie une réponse immunitaire au poumon qui, à la longue, conduit à des dommages tissulaires causant la MPOC (Colarusso et al., 2017). Des systèmes de régulation de l'inflammation existent afin de calmer et contrôler l'intensité de l'activation immunitaire. L'axe SIRP α /CD47 se retrouve parmi ces systèmes. L'implication de ces protéines dans diverses pathologies telles que la maladie de Crohn et l'asthme allergique ainsi que l'augmentation de l'expression pulmonaire du gène *sirp α* retrouvée en contexte tabagique justifie l'intérêt d'investiguer le rôle de SIRP α et de CD47 dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette. Ainsi, l'étude de cet axe pourrait mener à la découverte d'une cible thérapeutique potentielle afin de réduire la réponse immunitaire, de limiter le développement de certaines maladies pulmonaires et les manifestations associées aux exacerbations chez les patients atteints de MPOC.

1.2. But du projet

Le but de ce projet de maîtrise consiste, en premier lieu, à caractériser et documenter le rôle de l'axe SIRP α /CD47 dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par l'exposition à la fumée de cigarette et, en deuxième lieu, à investiguer l'impact d'une administration d'une molécule activatrice de SIRP α sur le contrôle de cette réponse immunitaire afin d'en évaluer son potentiel thérapeutique.

1.3. Hypothèses

Selon nos analyses bio-informatiques préliminaires, nous savons que les niveaux d'expression du gène *sirpα* augmentent dans le poumon des souris fumeuses. Ainsi, nous pensons que l'expression protéique de SIRPα et sa liaison à son activateur sera accentuée chez les différents types cellulaires myéloïdes présents dans le tissu pulmonaire et le lavage broncho-alvéolaire des souris exposées à la fumée de cigarette, plus particulièrement sur les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques et les neutrophiles.

Connaissant l'implication répandue des protéines SIRPα et CD47 dans plusieurs processus cellulaires et différentes maladies, nous pensons que cet axe pourrait être une cible thérapeutique potentielle afin de contrôler la réponse inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette. En effet, l'administration systémique d'un activateur de SIRPα, le CD47-Fc, pourrait réduire le nombre de cellules mononuclées et de neutrophiles retrouvés dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses traitées. De plus, ce traitement pourrait abaisser les niveaux de cytokines sécrétées par les macrophages alvéolaires provenant des souris ayant reçu le traitement.

1.4. Objectifs du projet

1. Caractériser la cinétique d'expression pulmonaire de SIRPα et de CD47 en contexte tabagique au niveau transcriptionnel.
2. Déterminer l'expression protéique de SIRPα sur les différents types cellulaires contenus dans le poumon et le lavage broncho-alvéolaire de souris exposées à la fumée de cigarette.
3. Investiguer l'impact de l'administration systémique du CD47-Fc sur la réponse inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette.
4. Explorer la capacité de liaison du CD47-Fc aux différents types cellulaires retrouvés dans le poumon et le lavage broncho-alvéolaire.

CHAPITRE 2 : MÉTHODOLOGIE

2.1. Protocoles animaux

2.1.1. Souris et exposition à la fumée de cigarette

Des souris femelles BALB/c âgées de six à huit semaines provenant de Charles River (St-Constant, QC, Canada) ont été utilisées pour ce projet. À leur arrivée, elles pesaient entre 18 et 20 grammes, étaient exposées à la lumière 12 heures par jour (6AM à 6PM) et avaient un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture (moulée). Lors des protocoles d'exposition, les souris étaient exposées à la fumée de 24 cigarettes de recherche 3R4F, sans filtre, deux heures consécutives par jour (AM) dans un système d'exposition de type « whole body exposure » (Promech Lab AB). Certains protocoles d'exposition ont une durée de quatre jours, alors que d'autres ont une durée de plusieurs semaines, à raison de cinq jours d'exposition par semaine. Toutes les procédures appliquées dans cette étude ont été préalablement approuvées par le comité de protection des animaux de l'Université Laval (CPAUL) (Numéros d'approbation : 2014121-2 et 2017101-1)

2.1.2. Activation de SIRP α

Des protocoles visant à explorer l'impact d'une activation de SIRP α en contexte tabagique ont été effectués. La protéine de fusion CD47-Fc, qui a été gracieusement fournie par Novartis (Bâle, Suisse), a été administrée de façon systémique. CD47-Fc est un activateur de SIRP α qui est composé du domaine extracellulaire du CD47 murin fusionné avec la portion constante d'un IgG1 humain. Cette dernière portion a été conçue de manière à réduire son affinité avec les récepteurs Fc (FcR) retrouvés sur différents types cellulaires tels que les macrophages et les neutrophiles. Les protocoles d'exposition à la fumée de cigarette étaient d'une durée de quatre jours et l'administration du CD47-Fc se faisait quotidiennement de façon intrapéritonéale à raison de 100 μ g/150 μ l/souris, le véhicule étant du « Phosphate-

buffered saline » (PBS). Les souris contrôles recevaient un isotype de type hIgG1, ne comportant pas la portion CD47 (Novartis, Bâle, Suisse), à la même concentration que le CD47-Fc.

2.2. Euthanasie des souris et récolte des échantillons

Pour tous les protocoles, les sacrifices avaient lieu le lendemain de la dernière exposition à la fumée de cigarette. Les souris étaient anesthésiées à l'isoflurane, puis euthanasiées par exsanguination. À la suite de l'exsanguination, les poumons, toujours attachés au cœur, étaient retirés de la cage thoracique. Dans certains protocoles, le multi-lobes droit était rapidement congelé à -80°C à des fins d'analyses transcriptionnelles ou protéiques, alors que pour d'autres protocoles, la trachée était canulée afin de réaliser des lavages broncho-alvéolaires effectués comme suit : deux lavages de 500 μl de PBS froid chacun suivi de trois lavages de 1 ml dans le poumon complet (superlavages). Les cellules immunitaires du lavage broncho-alvéolaire étaient comptées à l'hémacymètre après dilution 1:1 dans du « Turk Blood dilution fluid » (Fisher scientifique, Ottawa, ON, Canada) afin d'éliminer les globules rouges. Le reste du lavage était centrifugé à 800 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant était ensuite récolté et congelé à -80°C pour d'éventuelles analyses, alors que le culot de cellules était remis en suspension dans du PBS pour obtenir une concentration de cellules d'environ 10^6 cellules/ml. À l'aide de cette suspension, une impaction des cellules sur lame (cytospin) suivie d'une coloration de type Wright-Giemsa (Héma3, Fisher scientifique, Ottawa, ON, Canada) était faite afin de procéder à des comptes cellulaires différentiels. Trois photos de chacune des lames étaient prises au microscope (Nikon eclipse E600) à l'aide du logiciel Q Capture et 300 cellules par lames étaient comptées. La grosseur des macrophages était également analysée à l'aide du logiciel Image J software (v1.44o) en mesurant la circonférence de 30 macrophages choisis de façon aléatoire pour chaque lame.

2.3. Culture et stimulation des macrophages alvéolaires murins

Une fois les cytopins réalisés, les superlavages étaient centrifugés pendant 10 minutes à une vitesse de 800 g. Le culot cellulaire était remis en suspension dans 1 ml de PBS et un deuxième compte cellulaire était effectué en ne comptant que les macrophages alvéolaires, distingués visuellement par leur plus grande taille. Les comptes étaient aussi effectués en utilisant du bleu de trypan à 0,4% (Fisher scientifique, Ottawa, ON, Canada) (dilution 1 :1) afin de compter seulement les cellules vivantes. La suspension de cellules était centrifugée de nouveau à 800 g pendant 10 minutes et remise en suspension dans du RPMI 1640 complet (WISSENT Inc, Saint-Bruno, Québec, Qc, Canada) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Fisher scientifique, Ottawa, ON, Canada) et 1% d'antibiotiques (pénicilline 10 000 IU/ml et streptomycine 10 000 µg/ml) (WISSENT Inc, Saint-Bruno, Québec, Qc, Canada), à raison de 50 000 cellules/100 µl par puits d'une plaque 96 puits. Des triplicatas étaient effectués pour chaque condition de stimulation lorsque le nombre de cellules le permettait. Une incubation minimale d'une heure à 37°C, 5% CO₂, était effectuée afin de permettre aux macrophages alvéolaires d'adhérer à la plaque avant de procéder aux stimulations *in vitro*. Le surnageant de chaque puits était ensuite aspiré et remplacé par 100 µl de milieu contenant les divers stimuli. Certains puits étaient incubés avec 1 µg/ml de lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), une molécule permettant de mimer une infection bactérienne, alors que d'autres étaient stimulées avec 10 µg/ml de « Polyinosinic–polycytidylic acid sodium salt » (POLY (I:C)) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), une molécule mimant une infection virale. Les puits servant de contrôles négatifs contenaient seulement les cellules et du RPMI complet. À la suite d'une incubation de 24 heures, le surnageant de culture de chaque puits était récolté et gardé à -80°C pour le dosage des cytokines libérées.

2.4. Dosage des cytokines

Les deux cytokines pro-inflammatoires IL-1 α et TNF- α ont été dosées par la technique « Enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA) de type sandwich et à phase solide dans le surnageant des macrophages alvéolaires ayant été stimulés *in vitro*. Les ELISA ont été faits en utilisant des troussees DuoSet provenant de la compagnie R&D system en suivant les instructions du manufacturier. L'absorbance a été mesurée à l'aide du lecteur de plaque Synergy H1 hybrid reader (BioTeK, Winooski, VT, USA).

2.5. PCR quantitatif

2.5.1. Extraction d'ARN et transcriptase inverse

L'ARN total d'un lobe pulmonaire congelé était extrait dans 1 ml de TRIzolTM Reagent (Fisher scientifique, Ottawa, ON, Canada). Le protocole suggéré par le fournisseur était suivi et un homogénéisateur (Fischer Scientific) était utilisé pour broyer le tissu.

L'ARN était dosé par spectrophotométrie à l'aide de la plaque Take3 et du lecteur de plaque Synergy (BioTek). L'analyse de gels d'agarose à 1% contenant du formaldéhyde 37% ainsi que du SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) ont permis de vérifier l'intégrité de l'ARN. Une quantité approximative de 500 ng d'ARN était déposée par puits et le gel a migré à 100V dans du tampon « Formaldehyde Agarose » (FA) pendant environ 30 minutes. Pour la révélation du gel aux ultraviolets, l'appareil UV transillumination Chemi Genius² Bio Imaging System (Woodbridge, ON, Canada) était utilisé. L'analyse et la prise de photo étaient réalisées à partir du logiciel Gene Snap.

Afin de générer de l'ADN complémentaire (ADNc), une transcriptase inverse (RT) était effectuée à l'aide du iScriptTM Advanced cDNA Synthesis Kit for quantitative PCR (qPCR) (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Le volume final par échantillon pour la

réaction enzymatique était de 20 µl et se composait comme suit : 1 µg d'ARN, 4 µl iScript advanced 5X reaction mix et 1 µl iScript advanced RT enzyme. Le protocole thermique était le suivant : 30 minutes à 42°C suivi de cinq minutes à 85°C. Le thermocycleur utilisé pour cette réaction était de la compagnie Eppendorf®. L'ADNc était conservé à -20°C.

2.5.2. RT-qPCR

Les RT-qPCR étaient réalisés à l'aide de l'appareil RotorGene 6000 (Corbett Research). La réaction était effectuée dans un volume total de 20 µl et contenait l'ADNc, le SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) et les amorces (Integrated DNA technologies) à une concentration de 0,3 µM. Les plaques des qPCR étaient chargées manuellement et tous les échantillons étaient faits en duplicata. Un gradient de température ainsi que des courbes d'efficacité pour chaque amorce étaient réalisés afin de déterminer la température optimale d'hybridation ainsi que la dilution idéale pour l'utilisation des échantillons d'ADNc. Les pourcentages d'efficacité des amorces se situaient entre 90 et 110% avec un R^2 entre 0,99 et 1. Le protocole thermique des qPCR commençait avec une première étape à 95°C pendant trois minutes, suivi des 40 cycles composés de 10 secondes à 95°C et de 30 secondes à la température optimale choisie pour chacune des amorces, c'est-à-dire à 56 ou 57°C. Une courbe de fusion était également incluse à chaque qPCR. Les principaux gènes d'intérêt utilisés étaient *sirpa* et *cd47* et leur niveau d'expression fût rapporté sur deux gènes de références : *hpert* et *rplp0*, en utilisant la méthode du $\Delta\Delta CT$. Ces gènes rapporteurs ont également été comparés à l'aide d'un GeNorme v3 (VBA applet for microsoft excel) afin d'assurer la reproductibilité de la variation d'expression entre ces deux gènes. Les facteurs de normalisation d'expression étaient tous plus petits que 0,5. De plus, des contrôles négatifs « no template control » (NTC) étaient inclus dans chaque qPCR et un contrôle ARN non rétrotranscrit (no RT) était effectué pour chaque amorce. Toutes les informations concernant les amorces sont retrouvées dans le tableau I présenté en annexe.

2.6. Cytométrie en flux

2.6.1. Récolte et digestion

La technique de cytométrie en flux était utilisée afin d'évaluer l'expression de SIRP α ainsi que la capacité de liaison du CD47-Fc à SIRP α sur les différents types cellulaires présents dans le poumon et dans le lavage broncho-alvéolaire.

Pour l'analyse du lavage broncho-alvéolaire, des superlavages étaient faits, suivis d'une lyse des globules rouges. Cette lyse était arrêtée avec du PBS de façon à diluer un minimum de 20 fois le tampon de lyse (NH₄OH 0,84%, KHCO₃ 0,1%). La suspension était centrifugée pendant 10 minutes à 800 g et remise en suspension dans du PBS afin d'effectuer un compte cellulaire.

Pour l'analyse du tissu pulmonaire, les poumons entiers étaient d'abord récoltés, coupés en petits morceaux, puis digérés avec 1 mg/ml de collagénase provenant de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) diluée dans du RPMI ne contenant pas de sérum pendant environ une heure à 37°C avec une légère agitation toutes les cinq minutes. Les échantillons de poumon étaient ensuite passés sur un tamis cellulaire de 70 μ m en les écrasant avec le piston d'une seringue et étaient centrifugés. Après la lyse des globules rouges, une autre centrifugation était faite, puis le culot de cellule était remis en suspension dans 1 ml de PBS. La suspension était passée une seconde fois sur un autre filtre et un compte cellulaire était effectué afin de remettre en suspension les cellules à une concentration de 10⁶ cellules/0,2ml de « Fluorescence Activated Cell Sorting » (FACS buffer), un tampon composé de PBS et de SVF à 1%.

2.6.2. Marquage extracellulaire

Le marquage était réalisé en plaque 96 puits. Les cellules étaient distribuées à raison de 2x10⁵ cellules et de 10⁶ cellules/FACS buffer par puits pour les cellules du lavage

broncho-alvéolaire et du poumon respectivement. À la suite d'une centrifugation de trois minutes à 700 g à 4°C, les cellules étaient incubées 10 minutes à une concentration finale de 1/150 (25µl) de TruStain fcX™ anti-mouse CD16/32 (Biolegend, San Diego, CA, USA). Le CD16/32 permet de bloquer les liaisons non spécifiques des anticorps aux récepteurs Fc (FcR) des macrophages. Ensuite, les anticorps étaient ajoutés de façon à obtenir une concentration finale de 1/400 (25µl). Après une incubation de 20 minutes sur glace à l'abri de la lumière, deux lavages étaient faits avec 0,2 ml de FACS buffer par puits et la plaque était centrifugée à 700 g pendant trois minutes. Les cellules étaient remises en suspension dans du PBS et transférées dans des tubes pour le cytomètre (Bio-rad). L'acquisition des données était faite avec le cytomètre BD LSRFortessa™ (BD, Mississauga, ON, Canada) à l'aide du logiciel BD FACSDIVA™ Software (BD Biosciences).

Des compensations étaient effectuées à l'aide de billes BD™ CompBeads anti-rat Ig, κ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) pour chaque fluorochrome utilisé afin de réduire la fenêtre de chevauchement d'un fluorochrome à un autre. Ces compensations étaient obtenues en mélangeant une goutte de billes négatives, une goutte de billes positives et 1 µl d'un anticorps rat anti-souris du fluorochrome d'intérêt. Une incubation sur glace de 10 minutes à l'abri de la lumière était nécessaire avant d'ajouter 0,2 ml de PBS et d'acquies les données pour calculer les compensations au cytomètre. De plus, des cellules non marquées et des contrôles de type « fluorescence minus one » (FMO) comprenant les cellules d'intérêts et tous les anticorps sauf un étaient faits. Les résultats étaient analysés à l'aide du logiciel FlowJo® v10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). Plusieurs marqueurs extracellulaires étaient utilisés pour retrouver différentes populations cellulaires du poumon et du lavage broncho-alvéolaire. La stratégie utilisée pour localiser les différentes populations cellulaires et les marqueurs d'intérêt sont expliqués en détail dans la section **résultats 3.1.2**. Un tableau indiquant tous les anticorps, les clones et les fluorochromes utilisés provenant de Biolegend est présenté en annexe (**Tableau II**).

Pour chacune des souris et pour chacun des groupes du protocole, la même stratégie d'analyse et de localisation des populations cellulaires était effectuée afin de pouvoir comparer les résultats de chaque groupe (**Figure 5**). Tout d'abord, la délimitation des

cellules était déterminée en produisant un premier graphique de la granularité des cellules (SSC-A) en fonction de leur grosseur (FSC-A) dans le but d'éliminer les débris cellulaires et/ou les globules rouges de nos analyses. Ensuite, les cellules étaient séparées en deux groupes à l'aide du marqueur CD45, soit les cellules leucocytaires (CD45⁺) et les cellules non leucocytaires (CD45⁻) (**Figure 5. A**). Nous avons ensuite utilisé le marqueur CD326 de notre groupe de cellules CD45⁻ pour déterminer la population de cellules épithéliales (CD45⁻ CD326⁺). Il était possible de déterminer par la suite l'expression protéique de SIRPα par cette population (**Figure 5. B**). Afin de séparer les différents types de leucocytes présents dans l'environnement pulmonaire, un graphique de style cadran comprenant le marqueur F4/80 en fonction du marqueur CD11c était réalisé sur la population cellulaire exprimant le CD45. De cette façon, nous avons obtenu quatre cadrans distincts représentant chacun une population différente. Le cadran #1 regroupait les cellules F4/80⁺ CD11c⁻, des cellules considérées comme des monocytes provenant de la circulation et/ou des macrophages interstitiels (**Figure 5. E**). Les cellules doublement positives (F4/80⁺ CD11c⁺) retrouvées dans le cadran #2 étaient considérées comme des macrophages alvéolaires F4/80⁺ (**Figure 5. C**). Pour ces deux populations, l'expression protéique de SIRPα était déterminée directement à partir de ces deux cadrans. Pour la population retrouvée dans le cadran #3 (CD45⁺ F4/80⁻ CD11c⁺), le marqueur CMH de classe II était utilisé pour délimiter la population de cellules dendritiques (CD45⁺ F4/80⁻ CD11c⁺ CMHII⁺) et de cette dernière, l'expression protéique de SIRPα était évaluée (**Figure 5. F**). Le restant des cellules CD11c⁺ (CD45⁺ F4/80⁻ CD11c⁺ CMHII⁻) était aussi considéré comme des macrophages alvéolaires (macrophages alvéolaires F4/80⁻) (**Figure 5. G**). L'expression protéique de SIRPα a donc aussi été déterminée dans cette population. Concernant la population cellulaire du cadran #4, étant des cellules doublement négatives (CD45⁺ F4/80⁻ CD11c⁻), le marqueur GR-1 était utilisé afin de définir la population de neutrophiles par l'expression élevée de ce marqueur (CD45⁺ F4/80⁻ CD11c⁻ GR-1^{high}) et de cette population, l'expression protéique de SIRPα était déterminée (**Figure 5. D**). De cette façon, chaque population cellulaire a pu être délimitée et l'expression protéique de SIRPα a pu être étudiée dans chacune d'entre elles. Un exemple de la stratégie d'analyse utilisée est schématisé ci-dessous (**Figure 5.**).

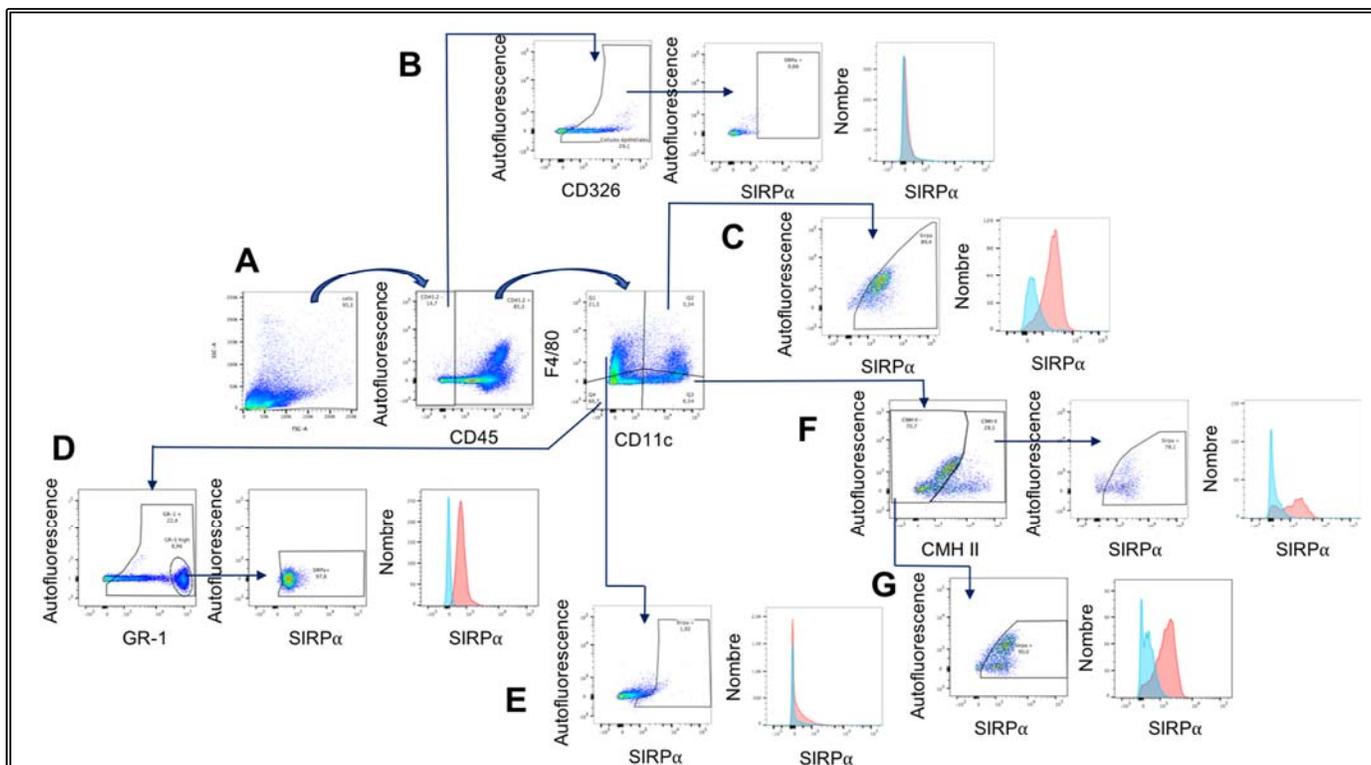
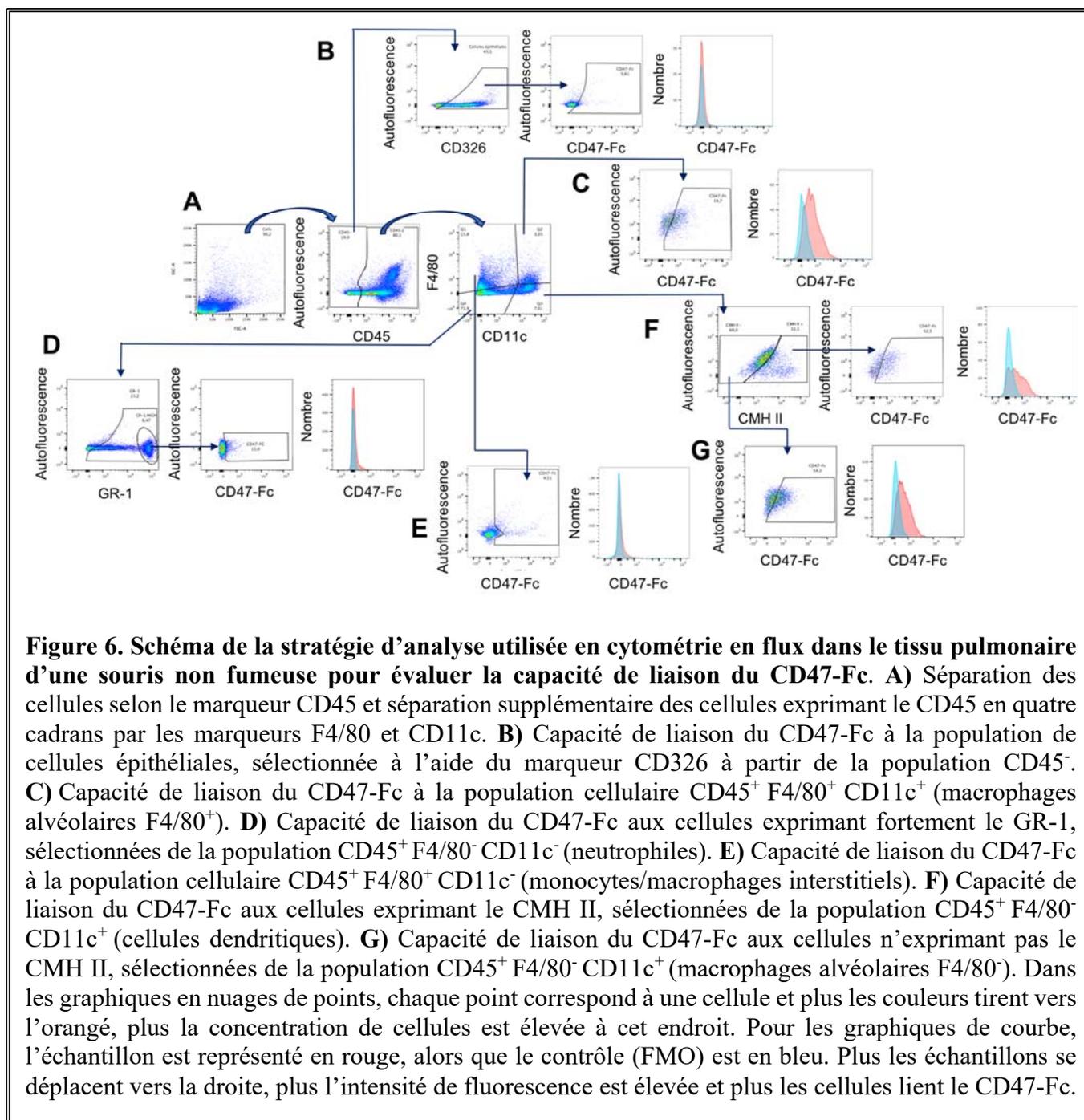


Figure 5. Schéma de la stratégie d'analyse utilisée en cytométrie en flux dans le tissu pulmonaire d'une souris non fumeuse pour évaluer l'expression protéique de SIRP α . A) Séparation des cellules selon le marqueur CD45 et séparation supplémentaire des cellules exprimant le CD45 en quatre cadrans par les marqueurs F4/80 et CD11c. B) Expression protéique de SIRP α par la population de cellules épithéliales, sélectionnée à l'aide du marqueur CD326 à partir de la population CD45⁻. C) Expression protéique de SIRP α par la population cellulaire CD45⁺ F4/80⁺ CD11c⁺ (macrophages alvéolaires F4/80⁺). D) Expression protéique de SIRP α par les cellules exprimant fortement le GR-1, sélectionnées de la population CD45⁺ F4/80⁻ CD11c⁻ (neutrophiles). E) Expression protéique de SIRP α par la population cellulaire CD45⁺ F4/80⁺ CD11c⁻ (monocytes/macrophages interstitiels). F) Expression protéique de SIRP α par les cellules exprimant le CMH II, sélectionnées de la population CD45⁺ F4/80⁻ CD11c⁺ (cellules dendritiques). G) Expression protéique de SIRP α par les cellules n'exprimant pas le CMH II, sélectionnées de la population CD45⁺ F4/80⁻ CD11c⁺ (macrophages alvéolaires F4/80⁻). Dans les graphiques en nuages de points, chaque point correspond à une cellule et plus les couleurs tirent vers l'orangé, plus la concentration de cellules est élevée à cet endroit. Pour les graphiques de courbe, l'échantillon est représenté en rouge, alors que le contrôle (FMO) est en bleu. Plus les échantillons se déplacent vers la droite, plus l'intensité de fluorescence est élevée et plus le marqueur est exprimé.

La liaison de la protéine de fusion CD47-Fc était aussi évaluée chez les différents types cellulaires du tissu pulmonaire et du lavage broncho-alvéolaire. Ces cellules étaient d'abord incubées une heure à 4°C avec le CD47-Fc à raison de 1,5 μ g/10⁶ cellules. Une fois cette étape réalisée, le protocole de marquage extracellulaire, décrit un peu plus haut dans cette section, était suivi. La stratégie d'analyse utilisée pour retrouver les différentes

populations cellulaires du poumon et du lavage broncho-alvéolaire était exactement la même que celle déjà détaillée dans cette section à l'exception que dans ce protocole-ci, la liaison du CD47-Fc aux cellules était investiguée à l'aide d'un anticorps ciblant la portion Fc d'un IgG1 humain, une portion retrouvée sur la protéine de fusion. De plus, cette stratégie est également illustrée à la **Figure 6.**, ci-dessous.



2.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques étaient faites en utilisant des « one-way ANOVA » suivies de tests *post hoc* de Tukey lorsque plusieurs groupes étaient comparés entre eux (> 2 groupes). Des tests t bilatéraux étaient utilisés lors de comparaison entre deux groupes seulement ainsi qu'à des fins d'analyses supplémentaires. Tous les graphiques étaient réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7 Software, Inc et représentent la moyenne de chaque groupe \pm SEM. Les résultats étaient considérés comme statistiquement significatifs lorsque la valeur de p était plus petite que 0,05. (*p < 0,05, ** p <0,01, *** p < 0,001 et **** p < 0,0001)

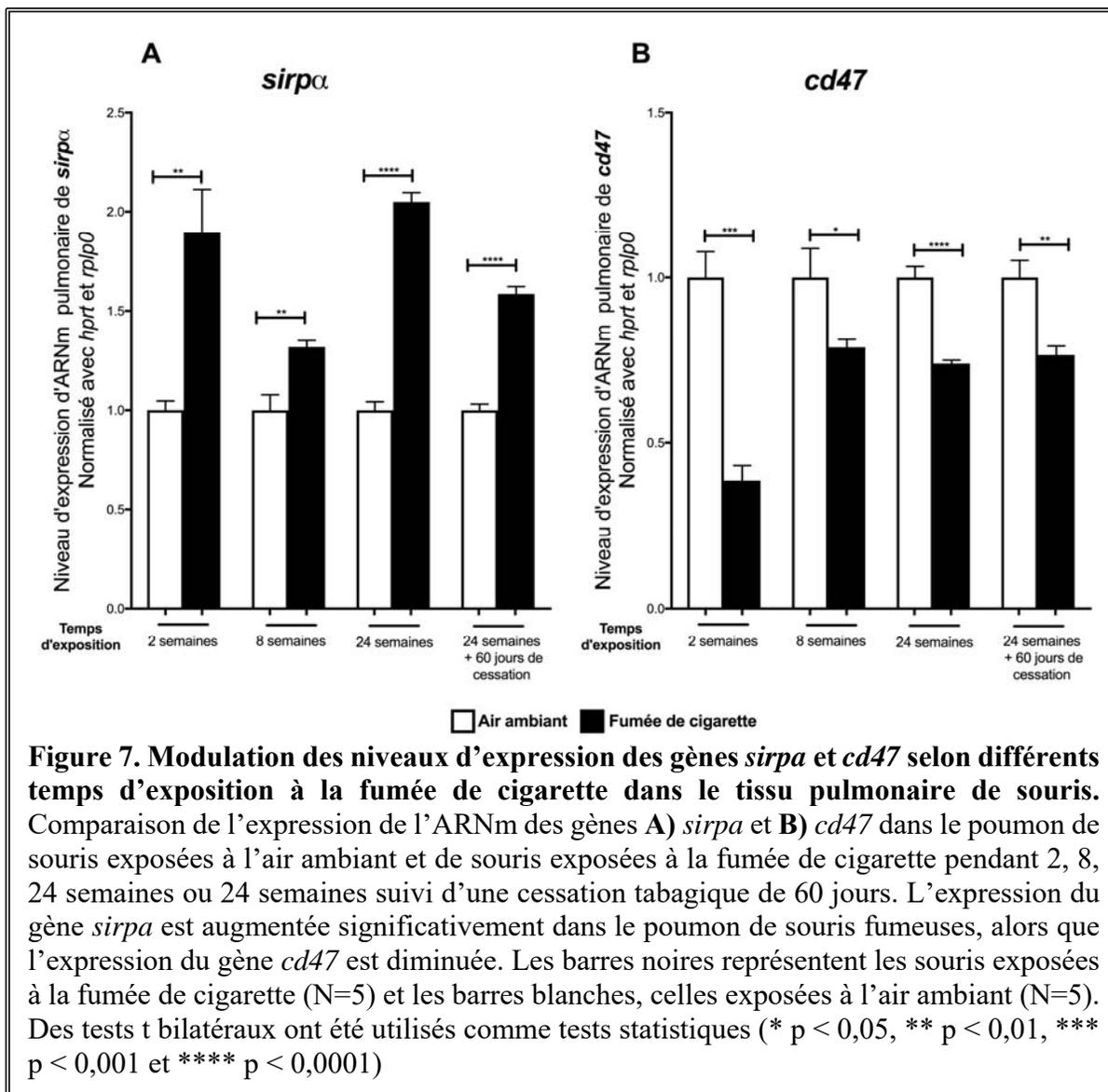
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1. Caractérisation des niveaux pulmonaires de SIRP α et de CD47 en contexte tabagique

3.1.1. L'exposition à la fumée de cigarette module les niveaux d'ARNm de SIRP α et de CD47 dans le poumon.

La caractérisation de l'expression des gènes codant pour SIRP α et CD47 a été réalisée dans le poumon total de souris BALB/c exposées à la fumée de cigarette ou à l'air ambiant selon différentes durées d'exposition : deux semaines, huit semaines, 24 semaines ou 24 semaines suivi d'une cessation tabagique de 60 jours. De cette façon, il est possible de caractériser la variation des niveaux transcriptionnels de ces deux gènes lors d'exposition à la fumée de cigarette (à court ou à long terme) et si cette variation perdure après une cessation tabagique.

Une augmentation significative de l'expression du gène *sirpa* est observée dans le poumon de souris exposées à la fumée de cigarette comparativement aux souris exposées à l'air ambiant, et ce, peu importe le temps d'exposition à la fumée de cigarette (**Figure 7. A**). Concernant l'expression du gène *cd47*, l'inverse est obtenu. En effet, les niveaux d'ARNm diminuent de façon significative dans le poumon de souris exposées à la fumée de cigarette comparativement aux souris exposées à l'air ambiant (**Figure 7. B**). De plus, il faut noter que ces variations sont maintenues à la suite d'une cessation tabagique de 60 jours. Les résultats démontrent donc que l'exposition à la fumée de cigarette, de courte ou longue durée, affecte l'expression des gènes *sirpa* et *cd47* dans le poumon de souris BALB/c.



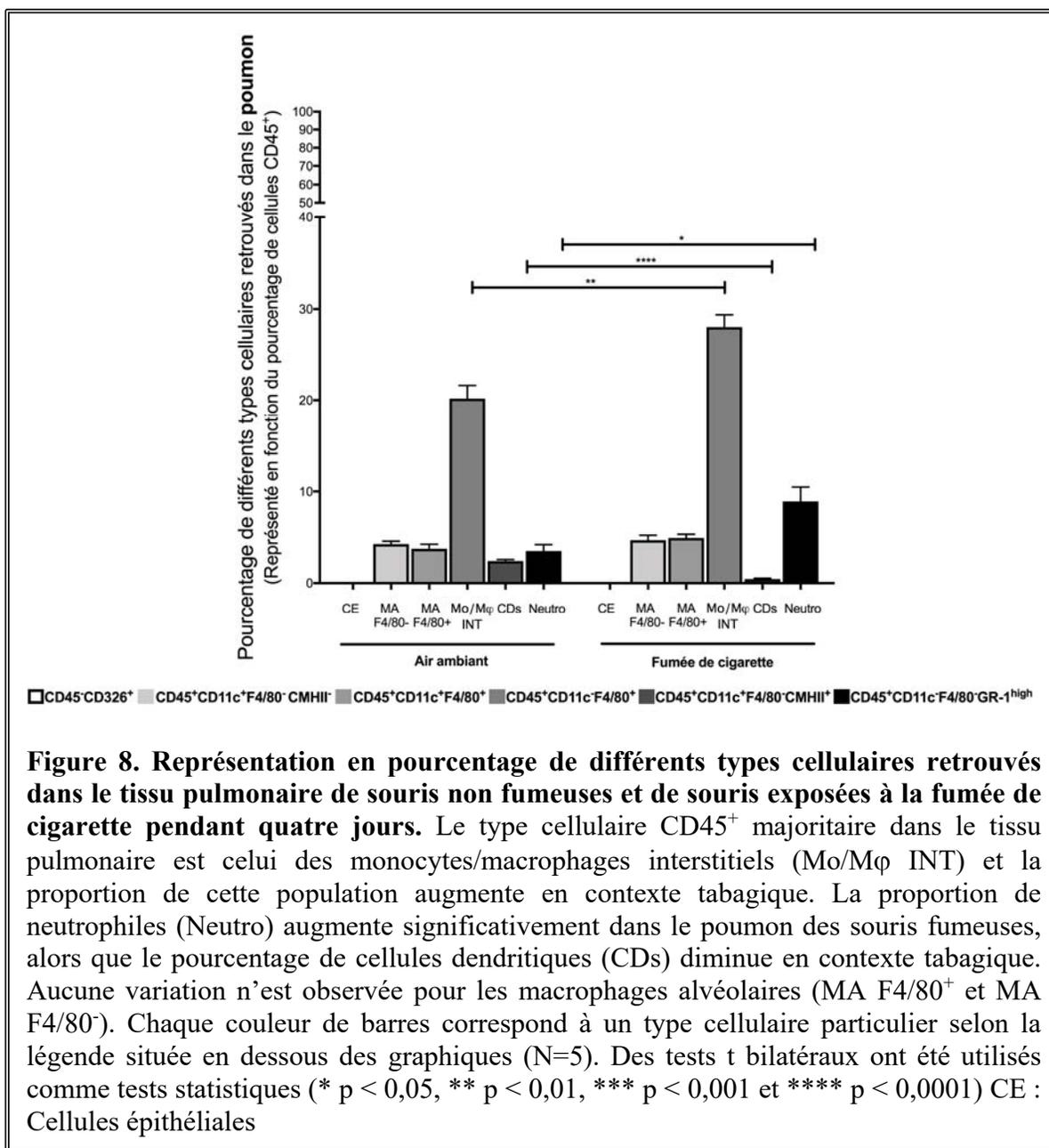
3.1.2. Une exposition de quatre jours à la fumée de cigarette affecte les niveaux protéiques de SIRPα chez différents types cellulaires présents dans le poumon et le lavage broncho-alvéolaire.

Nous savons que l'expression du gène *sirpa* est plus élevée dans le tissu pulmonaire des souris exposées à la fumée de cigarette et que, selon la littérature, l'expression de SIRPα est principalement limitée à la lignée myéloïde comparativement à CD47 qui est retrouvée

de façon ubiquitaire et diminuée dans le poumon de souris fumeuses. Nous nous sommes donc intéressés à caractériser plus précisément les niveaux protéiques de SIRP α chez différents types cellulaires retrouvés dans le tissu pulmonaire et dans le lavage broncho-alvéolaire, pour ensuite comparer ces niveaux d'expression entre des souris exposées à l'air ambiant et des souris exposées à la fumée de cigarette. Afin d'être dans le pic de la réponse inflammatoire induite par la fumée de cigarette, une exposition aiguë d'une durée de quatre jours a été réalisée chez des souris de souche BALB/c. Pour permettre l'exploration des niveaux protéiques de SIRP α chez plus d'un type cellulaire à la fois, nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux pour répondre à cet objectif.

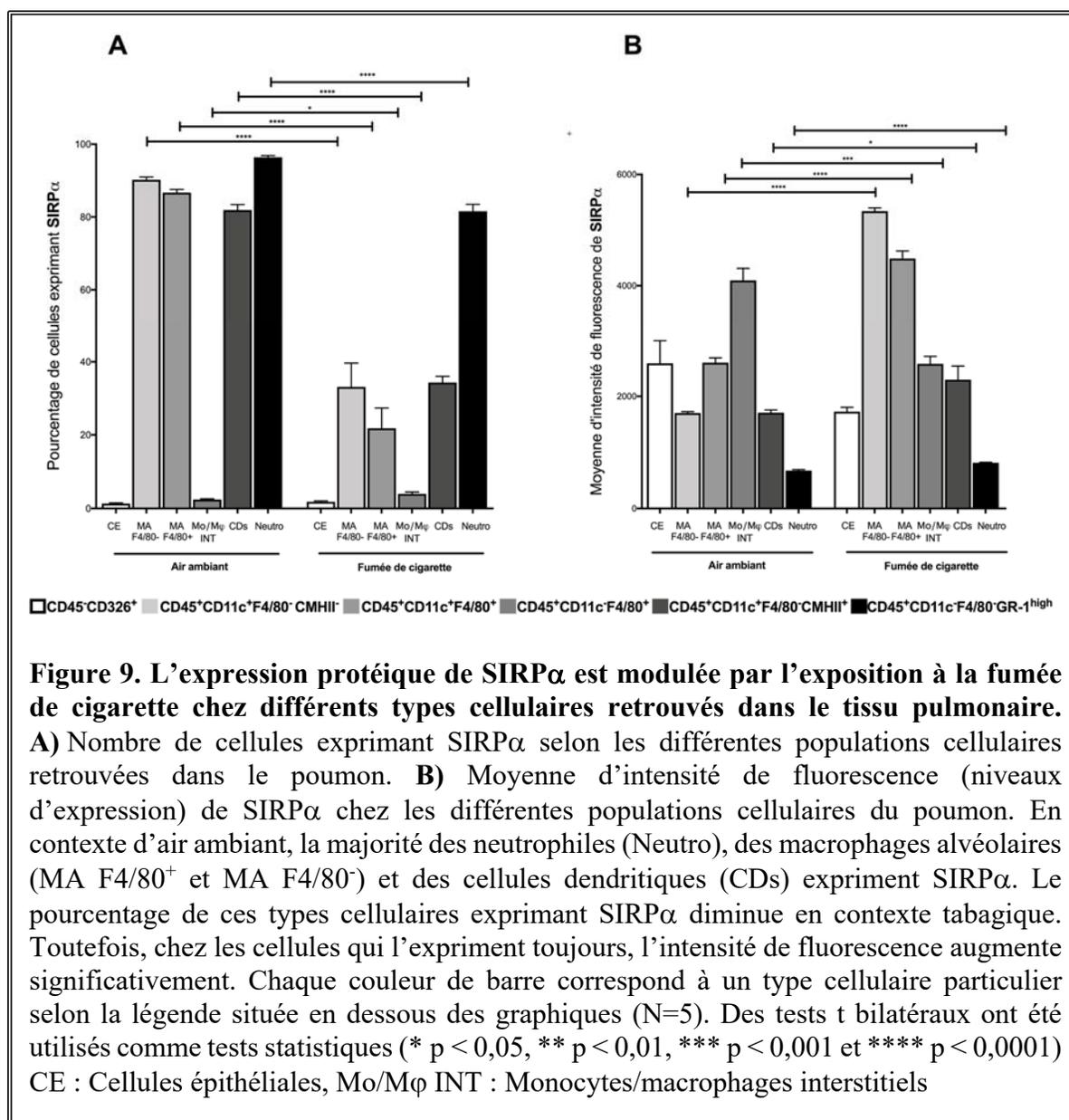
Expression protéique de SIRP α dans le tissu pulmonaire

Avant de décrire les résultats obtenus concernant l'expression protéique de SIRP α pour chaque type cellulaire, il importe de connaître le pourcentage respectif de chacune de ces populations retrouvées dans le tissu pulmonaire en contexte d'air ambiant et tabagique (**Figure 8.**). Chez les souris non fumeuses, la population cellulaire majeure du tissu pulmonaire est celle des monocytes/macrophages interstitiels (CD45⁺ F4/80⁺ CD11c⁻) (20%). D'ailleurs, la proportion de cette population augmente significativement chez les souris fumeuses (\approx 30%). Une augmentation du pourcentage de neutrophiles est également observée dans le poumon des souris fumeuses (de 5 à 10%), alors qu'une réduction de la proportion des cellules dendritiques est obtenue en contexte tabagique (de 4 à 1%). Concernant les macrophages alvéolaires (F4/80⁻ et F4/80⁺), leur pourcentage reste semblable dans le poumon de souris exposées ou non à la fumée de cigarette (5%). Les cellules épithéliales sont représentées à 0% sur le graphique puisqu'elles n'expriment pas le marqueur CD45. Toutefois, elles représentent 11% des cellules CD45⁻ dans le poumon de souris exposées à l'air ambiant et 21% des cellules CD45⁻ dans le poumon de souris exposées à la fumée de cigarette (données non illustrées).



Chaque graphique représente en **A**) le pourcentage de chaque type cellulaire exprimant SIRPα chez les souris fumeuses et non fumeuses et en **B**) la moyenne d'intensité de fluorescence de SIRPα qui correspond plus précisément aux niveaux d'expression (quantité) de cette protéine à la surface membranaire des différentes populations cellulaires des souris fumeuses et non fumeuses.

Tel que représenté dans la **figure 9.**, le pourcentage de macrophages alvéolaires F4/80⁺ (85%), de macrophages alvéolaires F4/80⁻ (90%), de cellules dendritiques (80%) et de neutrophiles (95%) exprimant SIRP α est très élevée chez les souris non fumeuses, alors que le pourcentage de cellules épithéliales (2%) et de monocytes/macrophages interstitiels (5%) qui exprime SIRP α est très faible. Chez les souris fumeuses, on remarque que pour les macrophages alvéolaires F4/80⁻, une baisse drastique du pourcentage de cette population exprimant SIRP α est observée. Lorsqu'on compare l'intensité de fluorescence, on observe que les macrophages alvéolaires F4/80⁻ des souris fumeuses qui expriment toujours SIRP α ,

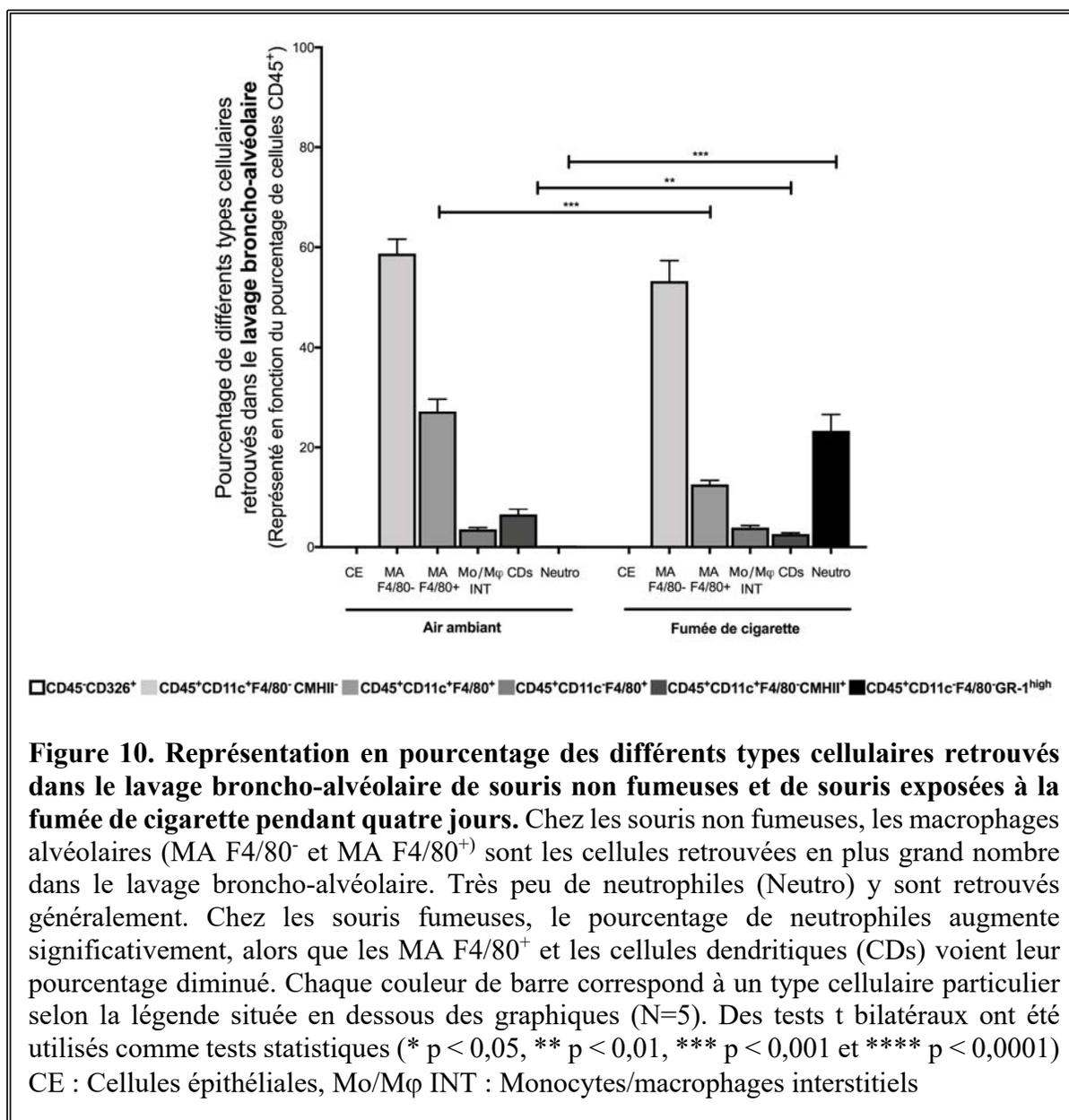


le font plus fortement. Le même patron d'expression et d'intensité de fluorescence est constaté pour les macrophages alvéolaires F4/80⁺, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Toutefois, la diminution du nombre de neutrophiles exprimant SIRP α est beaucoup moins sévère que pour les autres types cellulaires. De plus, il faut noter que les niveaux d'expression de SIRP α chez ce type cellulaire demeurent assez faibles en contexte tabagique. La proportion de monocytes/macrophages interstitiels qui expriment SIRP α augmente d'environ 5% chez les souris fumeuses. Cependant, les niveaux d'expression de SIRP α diminuent chez ce type cellulaire en contexte tabagique. Pour les cellules épithéliales, aucune variation n'a été observée autant pour le pourcentage d'expression que pour l'intensité de fluorescence de SIRP α chez les souris exposées à la fumée de cigarette comparativement aux souris exposées à l'air ambiant. Même si l'intensité semble plus élevée chez les cellules épithéliales que chez d'autres types cellulaires, il faut se rappeler que de base ces cellules n'expriment que très peu SIRP α (2%). En somme, les résultats démontrent que la fumée de cigarette entraîne une diminution du nombre de macrophages alvéolaires, de cellules dendritiques et de neutrophiles exprimant SIRP α , mais également une augmentation de l'intensité à laquelle ces types cellulaires expriment SIRP α .

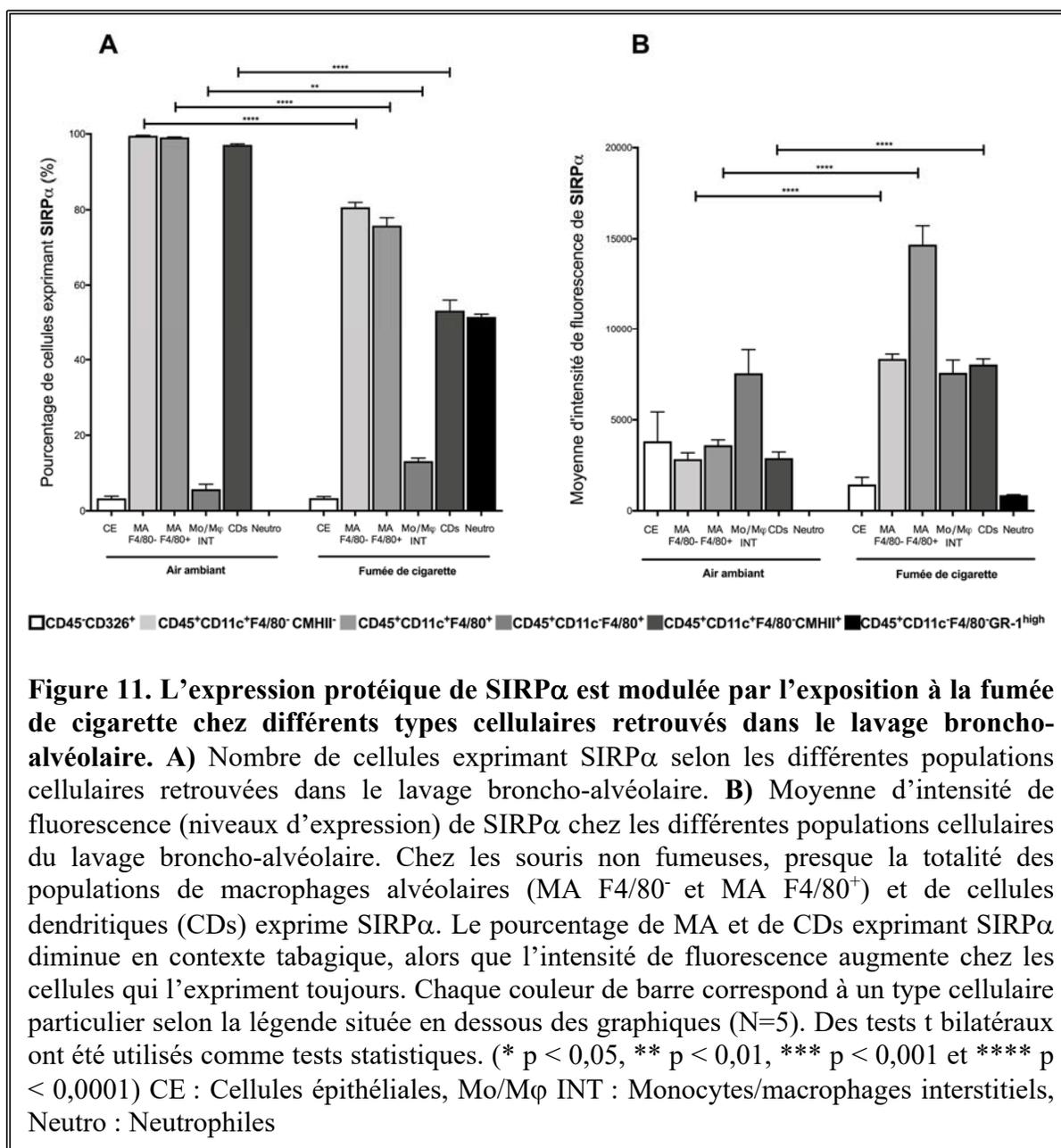
Expression protéique de SIRP α dans le lavage broncho-alvéolaire

Il importe également de connaître les différentes proportions de chaque type cellulaire présent dans le lavage broncho-alvéolaire des souris non fumeuses et fumeuses avant de procéder à la description des résultats obtenus. Chez les souris non fumeuses, la population globale de macrophages alvéolaires (F4/80⁻ et F4/80⁺) représente près de 90% de la totalité des cellules du lavage broncho-alvéolaire. Toutefois, le pourcentage de macrophages alvéolaires F4/80⁺ est réduite à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette. Les autres types cellulaires, c'est-à-dire les monocytes/macrophages interstitiels, les cellules dendritiques et les neutrophiles représentent le 10% restant. Les neutrophiles sont retrouvés beaucoup plus rarement et faiblement chez les souris non fumeuses, alors qu'à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette, ce pourcentage augmente significativement jusqu'à représenter environ 25% des cellules présentes dans le lavage broncho-alvéolaire. Le

pourcentage de monocytes/macrophages interstitiels reste semblable en contexte tabagique ($\approx 5\%$), alors que celui des cellules dendritiques diminue d'environ 5% chez les souris fumeuses (**Figure 10.**). Une fois de plus, les cellules épithéliales ne sont pas représentées dans cette figure, car elles n'expriment pas le marqueur CD45. Elles se retrouvent en très faible quantité dans le lavage broncho-alvéolaire de souris et représentent environ 5% des cellules CD45⁻ présentes dans le lavage broncho-alvéolaire de souris fumeuses et non fumeuses (données non illustrées).



Un patron très semblable des résultats obtenus pour le tissu pulmonaire est observé pour le lavage broncho-alvéolaire. Chez les souris non fumeuses, le pourcentage de cellules exprimant SIRP α et la moyenne d'intensité de fluorescence de cette protéine sont plus élevés de base chez tous les types cellulaires comparativement à ce qui était observé pour le tissu pulmonaire. Le pourcentage de macrophages alvéolaires (MA F4/80⁻ et MA F4/80⁺) exprimant SIRP α atteint près de 100% chez les souris non fumeuses et diminue autour de 75-80% en contexte tabagique. Une fois de plus, l'intensité à laquelle ces cellules expriment



SIRP α augmente significativement chez les souris fumeuses. Pour les cellules dendritiques, un résultat semblable est observé. Le pourcentage de cellules dendritiques exprimant SIRP α est passé de 95% (souris non fumeuses) à environ 55% (souris fumeuses) et l'intensité de fluorescence a doublé en contexte tabagique. Il n'y a pas de donnée concernant les neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire de souris exposées à l'air ambiant puisqu'ils y sont rarement présents. Toutefois, leur pourcentage d'expression de SIRP α chez les souris fumeuses est d'environ 55% et l'intensité à laquelle ils expriment cette protéine en contexte tabagique est très faible comparativement aux autres types cellulaires. Contrairement aux autres types cellulaires, le pourcentage de monocytes/macrophages interstitiels exprimant SIRP α est très faible chez les souris non exposées et augmente en contexte tabagique. L'intensité de fluorescence est moyennement élevée pour cette population cellulaire et ne varie pas entre les souris fumeuses et non fumeuses. Très peu de cellules épithéliales se retrouvent dans le lavage broncho-alvéolaire. Aucune variation concernant le pourcentage de cellules exprimant SIRP α et l'intensité de fluorescence n'a été observée chez ce type cellulaire (**Figure 11**).

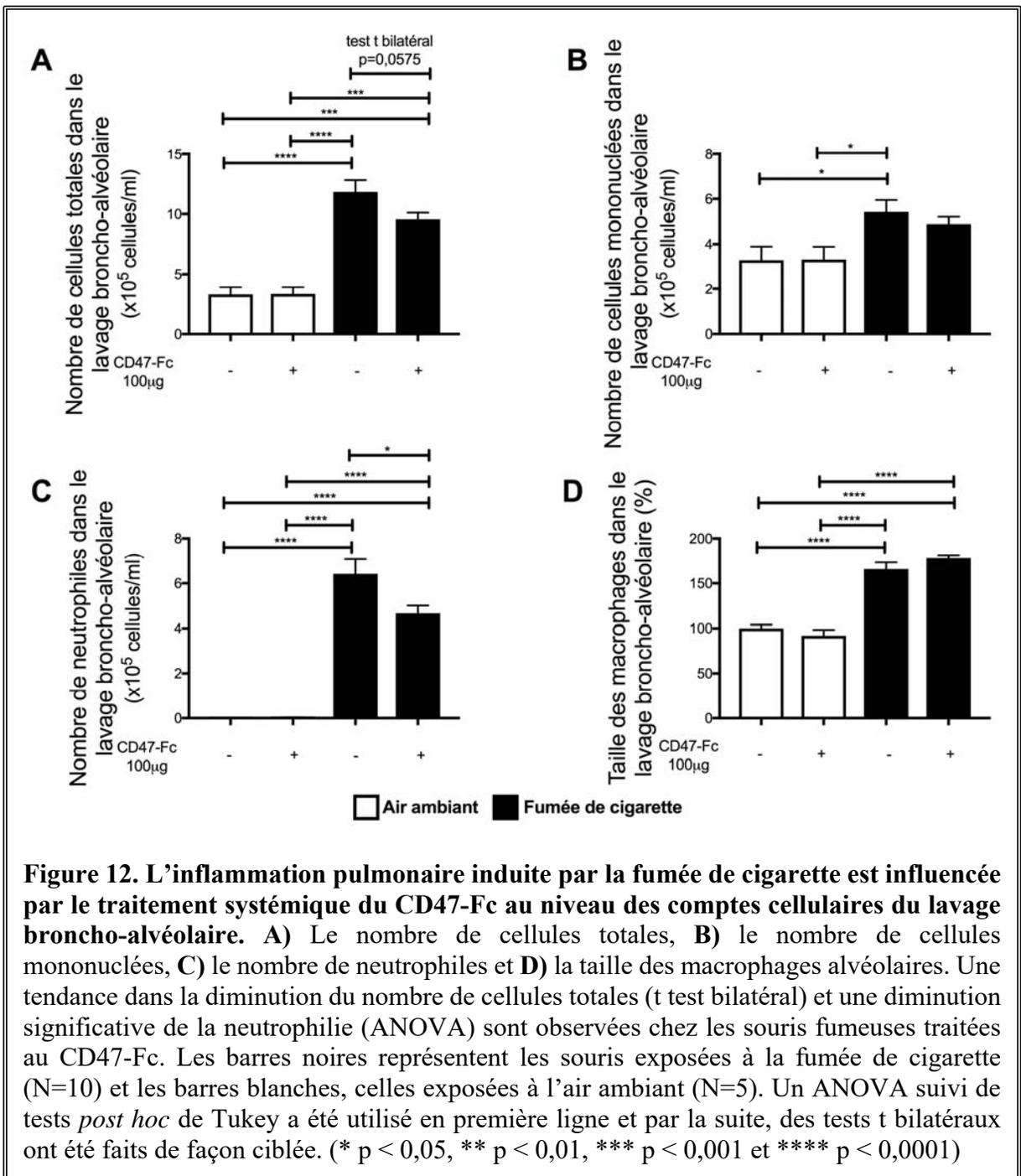
En résumé, nous concluons qu'autant dans le tissu pulmonaire que dans le lavage broncho-alvéolaire, le pourcentage de macrophages alvéolaires et de cellules dendritiques exprimant SIRP α diminue chez les souris fumeuses. Néanmoins, l'intensité à laquelle ces populations cellulaires expriment SIRP α augmente significativement en contexte tabagique. Dans le tissu pulmonaire, ces observations sont aussi vraies pour les neutrophiles. Un changement phénotypique dans ces populations induit par la fumée de cigarette pourrait expliquer ce phénomène. L'investigation plus approfondie de cette observation sera certainement à considérer.

3.2. Investigation de l'impact d'une activation de SIRP α sur l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette

3.2.1. L'Activation de SIRP α , par l'administration systémique de la protéine de fusion CD47-Fc, entraîne une diminution de l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette.

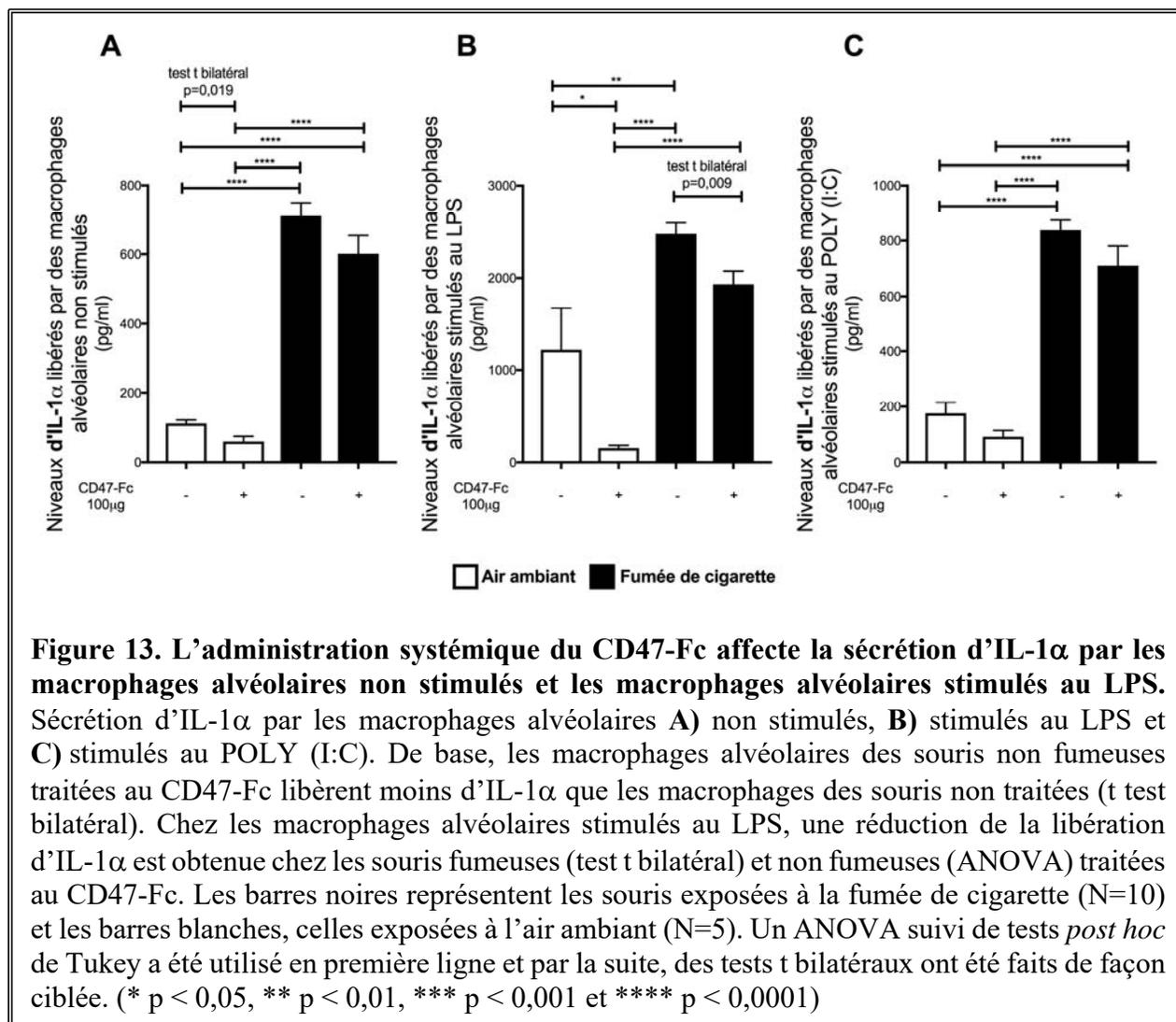
L'activation quotidienne de SIRP α par l'administration systémique du CD47-Fc (100 μ g/souris) a été effectuée chez des souris de type BALB/c exposées à la fumée de cigarette pendant quatre jours. Afin d'investiguer l'impact du CD47-Fc sur l'inflammation pulmonaire chez ces souris, des comptes cellulaires totaux et différentiels du lavage broncho-alvéolaire et l'évaluation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α et TNF- α) ont été réalisés.

Nous observons une augmentation du nombre de cellules totales, du nombre de neutrophiles ainsi que de la taille des macrophages alvéolaires dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses, ce qui correspond à la réponse classique à la fumée de cigarette. Chez les souris non exposées, le traitement au CD47-Fc n'affecte pas en soi les comptes cellulaires et la taille des macrophages alvéolaires. Chez les souris fumeuses, le CD47-Fc tend à réduire le nombre de cellules totales (t test bilatéral) (**Figure 12. A**) et diminue significativement le nombre de neutrophiles (ANOVA) (**Figure 12. C**). Cependant, le traitement n'affecte pas le compte de cellules mononuclées ni la taille des macrophages alvéolaires (**Figure 12. B et D**).



Les macrophages alvéolaires, qui représentent la majorité du lavage broncho-alvéolaire, ont été stimulés *in vitro* avec du LPS, du POLY (I:C) ou un véhicule pendant 24 heures. L'IL-1 α et le TNF- α , deux cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages alvéolaires, ont été dosées dans le surnageant de culture.

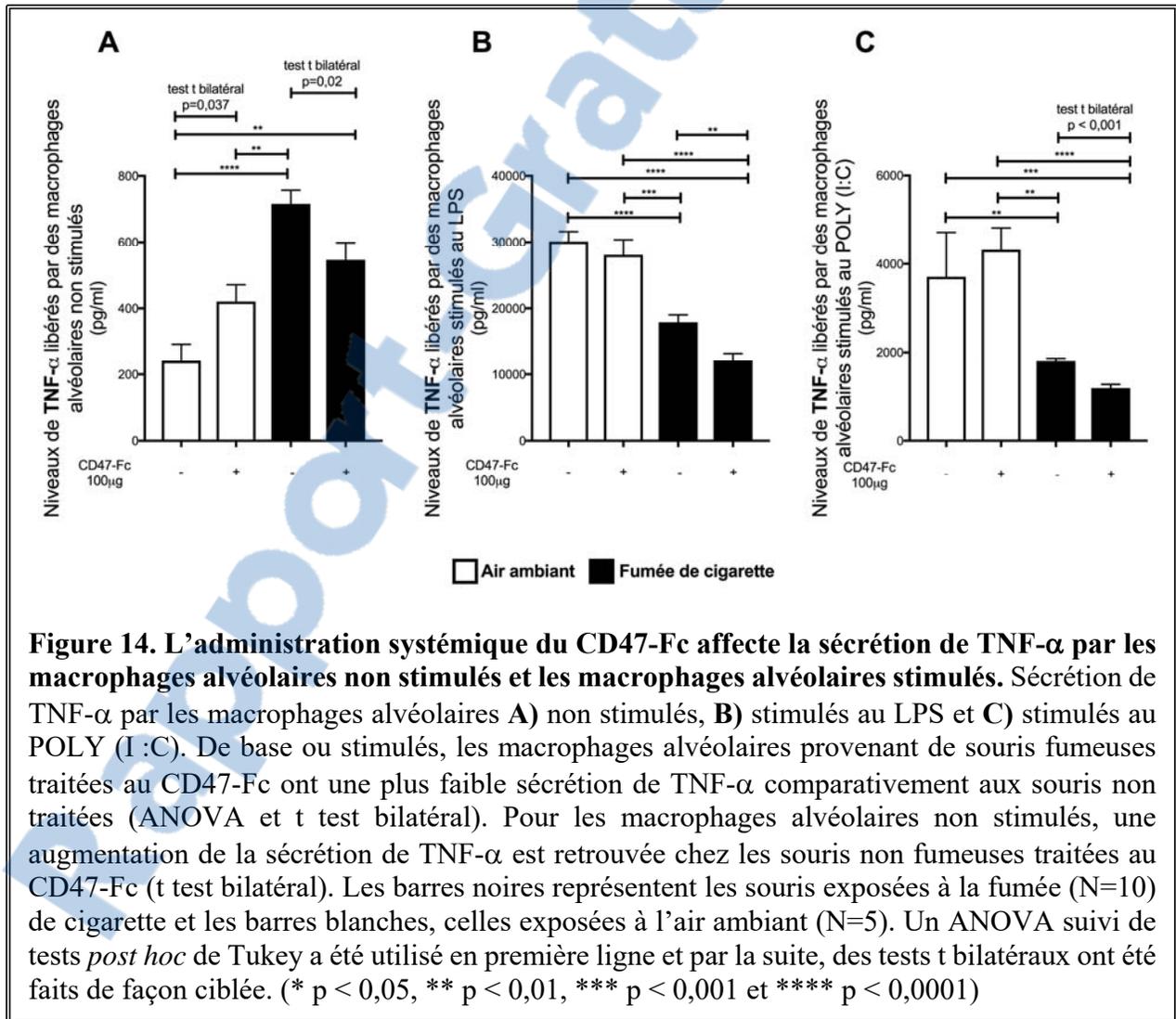
Chez les souris non fumeuses, les macrophages alvéolaires non stimulés libèrent de faibles niveaux d'IL-1 α et ceux provenant des souris traitées au CD47-Fc en sécrètent encore moins (test t bilatéral). Chez les deux groupes de souris fumeuses, une augmentation significative de la sécrétion d'IL-1 α est observée (ANOVA), mais aucune différence n'est obtenue entre ces deux groupes. Les macrophages alvéolaires stimulés au POLY (I:C)



libèrent sensiblement les mêmes niveaux d'IL-1 α que les macrophages non stimulés. Toutefois, aucune variation de la sécrétion de cette cytokine n'est observée entre les macrophages des souris traitées au CD47-Fc et ceux des souris non traitées. Les macrophages alvéolaires stimulés au LPS sécrètent beaucoup plus cette cytokine comparativement aux macrophages non stimulés ou stimulés au POLY (I:C). Une diminution significative de la

libération d'IL-1 α est observée chez les groupes qui ont reçu le CD47-Fc *in vivo*, et ce, autant chez les souris fumeuses (t test bilatéral) que chez les souris non fumeuses (ANOVA). (**Figure 13**). Le traitement au CD47-Fc affecte donc la sécrétion d'IL-1 α des macrophages alvéolaires isolés du lavage broncho-alvéolaire, plus particulièrement ceux stimulés au LPS.

Les macrophages alvéolaires non stimulés de souris exposées à l'air ambiant libèrent que de faibles quantités de TNF- α . Une augmentation de la sécrétion de celle-ci est observée chez les souris ayant été traitées au CD47-Fc (test t bilatéral). Chez les deux groupes de souris fumeuses, les niveaux de cytokine libérés par les macrophages sont significativement plus élevés par rapport aux souris non fumeuses qui sont non traitées (ANOVA). Entre les deux



groupes de souris fumeuses, une diminution de la sécrétion de TNF- α est observée chez les macrophages provenant de souris traitées au CD47-Fc (test t bilatéral). Lorsque les macrophages alvéolaires sont stimulés au LPS ou au POLY (I :C), les niveaux de libération de TNF- α sont beaucoup plus élevés comparé aux macrophages non stimulés. Le traitement au CD47-Fc ne semble pas affecter la sécrétion de cette cytokine chez les macrophages stimulés de souris non fumeuses, alors qu'une diminution de la sécrétion de TNF- α est obtenue chez les macrophages stimulés des souris fumeuses traitées au CD47-Fc (LPS : ANOVA, POLY (I :C) : test t bilatéral) (**Figure 14.**). La sécrétion *in vitro* de TNF- α par les macrophages alvéolaires est aussi affectée par l'administration *in vivo* du CD47-Fc, plus particulièrement chez les souris fumeuses.

En résumé, nous constatons que l'administration systémique du CD47-Fc semble réguler à la baisse la réponse inflammatoire pulmonaire causée par la fumée de cigarette notamment par la diminution de la neutrophilie dans le lavage broncho-alvéolaire de souris fumeuses, mais également par la réduction de la production *in vitro* de deux cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α et TNF- α) par les macrophages alvéolaires isolés du lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses traitées *in vivo*. Cependant, une autre question doit être investiguée : quelle est l'affinité et l'efficacité de la liaison du CD47-Fc aux différentes populations myéloïdes pulmonaires des souris fumeuses et non fumeuses.

3.3. Investigation de la capacité de liaison de la protéine de fusion CD47-Fc aux différents types cellulaires de l'environnement pulmonaire en contexte tabagique

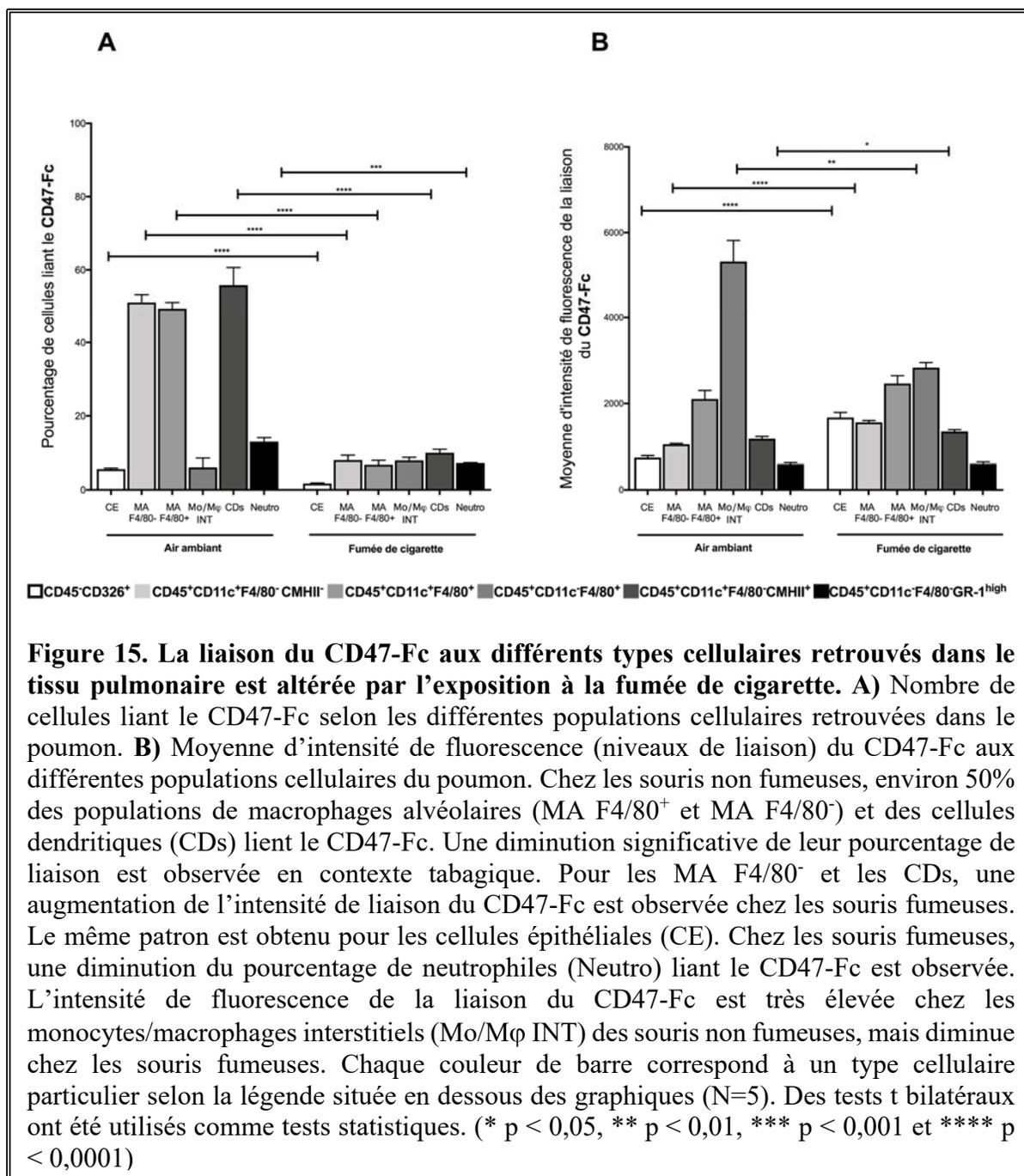
3.3.1. L'exposition à la fumée de cigarette pendant quatre jours semble altérer la liaison du CD47-Fc aux différents types cellulaires du poumon et du lavage broncho-alvéolaire.

Afin de caractériser davantage la liaison du CD47-Fc sur les différents types cellulaires exprimant SIRP α dans le poumon et le lavage broncho-alvéolaire en contexte tabagique, un protocole de quatre jours d'exposition à la fumée de cigarette a été effectué. La cytométrie en flux a été utilisée pour répondre à cet objectif. Les résultats ont tous été regroupés dans les mêmes types de graphiques que ceux pour l'investigation des niveaux protéiques de SIRP α . Ainsi, chaque graphique représente en **A)** le pourcentage de chaque type cellulaire liant le CD47-Fc chez les souris fumeuses et non fumeuses et en **B)** la moyenne d'intensité de fluorescence de la liaison du CD47-Fc, qui correspond plus précisément aux niveaux de liaison du CD47-Fc à la protéine SIRP α , chez les différentes populations cellulaires des souris fumeuses et non fumeuses.

Capacité de liaison du CD47-Fc dans le tissu pulmonaire

Dans le tissu pulmonaire des souris non fumeuses, le pourcentage de macrophages alvéolaires (F4/80⁺ et F4/80⁻) et de cellules dendritiques liant le CD47-Fc est d'environ 50%. Toutefois, ce pourcentage diminue drastiquement en contexte tabagique jusqu'à environ 10%. Chez les souris non fumeuses, les macrophages alvéolaires F4/80⁻ et les cellules dendritiques ont une faible intensité de liaison du CD47-Fc, alors que chez les souris fumeuses, celle-ci augmente significativement. De base, les macrophages alvéolaires F4/80⁺ des souris non fumeuses ont une plus grande intensité de liaison au CD47-Fc, mais aucune

variation n'est observée en contexte tabagique. Un faible pourcentage de cellules épithéliales, de neutrophiles et de monocytes/macrophages interstitiels lient le CD47-Fc (entre 5 et 10%). Les cellules épithéliales suivent le même patron de variation que les macrophages alvéolaires F4/80⁻ et les cellules dendritiques, c'est-à-dire qu'en contexte tabagique, le pourcentage de cellules épithéliales liant le CD47-Fc diminue et les niveaux de liaison augmentent. Pour les neutrophiles, une réduction significative du pourcentage de cellules liant le CD47-Fc est

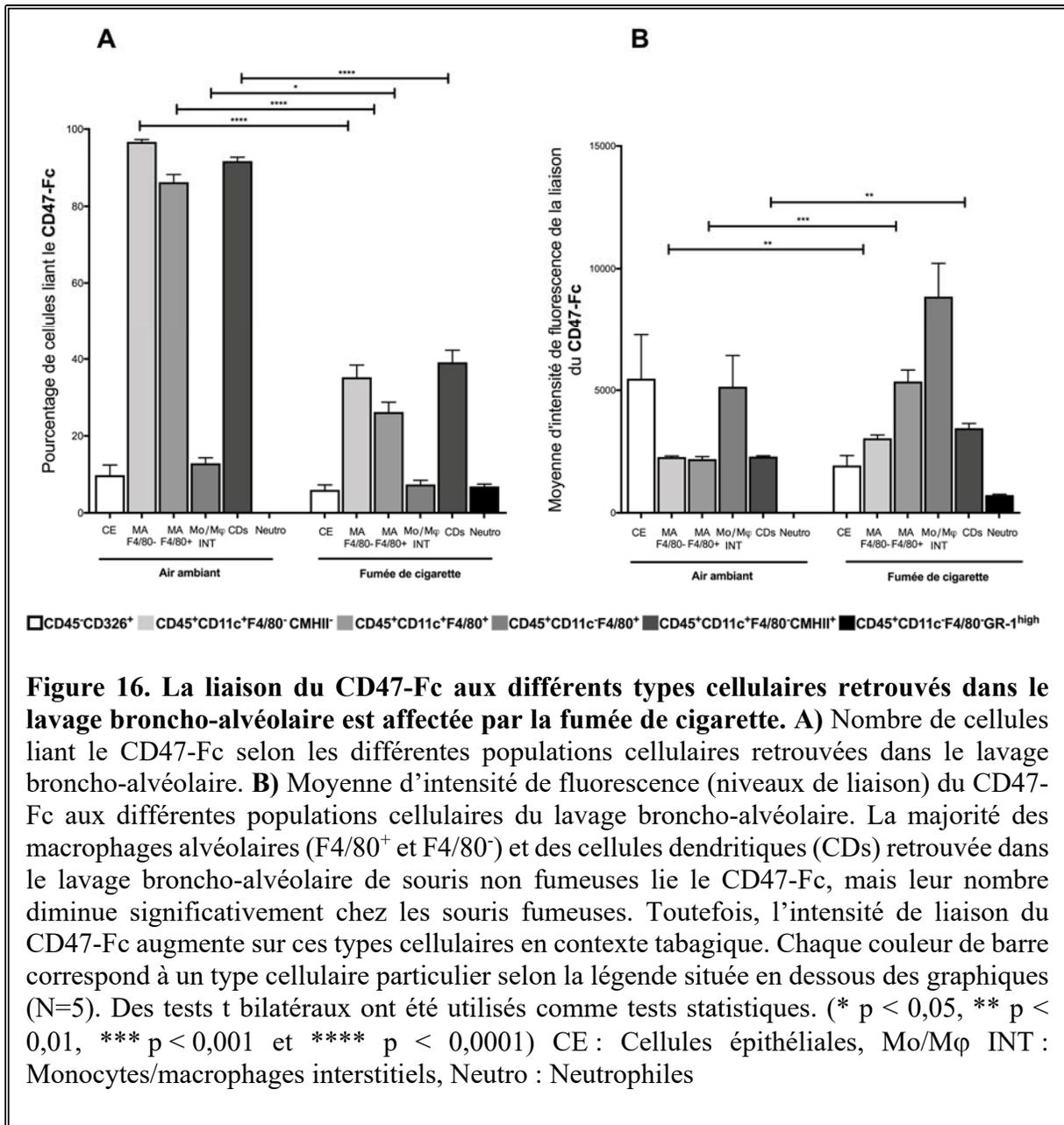


obtenue en contexte tabagique. Cependant, aucune variation de l'intensité de fluorescence n'est décelée entre les souris fumeuses et non fumeuses. Finalement, l'exposition à la fumée de cigarette n'engendre aucune différence dans le pourcentage de monocytes/macrophages interstitiels liant le CD47-Fc. Chez les souris non fumeuses, ces cellules lient fortement le CD47-Fc. Toutefois, cette intensité de liaison diminue significativement en contexte tabagique. En somme, nous pouvons conclure que chez la plupart des types cellulaires du tissu pulmonaire, le CD47-Fc ne se lie pas très bien à la protéine SIRP α (maximum de 50% de liaison chez certains types cellulaires). De plus, ce pourcentage diminue significativement lors d'une exposition à la fumée de cigarette. Cependant, les niveaux de liaison du CD47-Fc (intensité de fluorescence) augmentent chez les macrophages alvéolaires F4/80⁻, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales en contexte tabagique (**Figure 15.**). Toutefois, il faut se rappeler que très peu de cellules épithéliales expriment SIRP α dans le poumon.

Capacité de liaison du CD47-Fc dans le lavage broncho-alvéolaire

La liaison du CD47-Fc a aussi été étudiée chez les différents types cellulaires du lavage broncho-alvéolaire. Chez les souris non fumeuses, le pourcentage de macrophages alvéolaires (F4/80⁺ et F4/80⁻) et de cellules dendritiques liant le CD47-Fc est très élevé (entre 85 et 95%), alors que chez les souris fumeuses, une réduction sévère de ce pourcentage (de plus de 50%) est observée chez ces types cellulaires. Pourtant, lorsqu'on compare l'intensité à laquelle ces cellules lient la protéine de fusion, on remarque que celle-ci augmente en contexte tabagique. Chez les souris exposées à l'air ambiant, seulement 10 à 15% des autres types cellulaires lient le CD47-Fc. Pour les monocytes/macrophages interstitiels, une faible diminution du pourcentage de cellules liant le CD47-Fc est obtenue en contexte tabagique. Par contre, aucune différence n'est obtenue concernant les niveaux de liaison du CD47-Fc. Pour les cellules épithéliales, la fumée de cigarette n'entraîne aucune variation concernant le pourcentage de cellules liant le CD47-Fc et l'intensité de cette liaison. Finalement, chez les souris fumeuses, le pourcentage de neutrophiles liant le CD47-Fc et les niveaux de liaison de cette protéine de fusion sont très faibles. Toutefois, ces valeurs ne peuvent être comparées

aux souris non fumeuses puisque très peu de neutrophiles sont retrouvés chez celles-ci (Figure 16).



Globalement, le pourcentage de macrophages alvéolaires (F4/80⁺ et F4/80⁻) et de cellules dendritiques liant le CD47-Fc diminue dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses. Cependant, la population de ces macrophages alvéolaires et de ces cellules

dendritiques qui lie toujours notre protéine de fusion en contexte tabagique, le fait plus fortement.

En résumé, les résultats obtenus à propos de la liaison du CD47-Fc suivent sensiblement ceux observés concernant l'expression protéique de SIRP α . Toutefois, les diminutions observées sont beaucoup plus importantes pour la liaison du CD47-Fc que pour l'expression protéique de SIRP α chez les souris fumeuses. Les résultats suggèrent donc que l'exposition à la fumée de cigarette altère la liaison du CD47-Fc chez différents types cellulaires exprimant SIRP α retrouvés dans le poumon et dans le lavage broncho-alvéolaire, notamment les macrophages alvéolaires (F4/80⁺ et F4/80⁻) et les cellules dendritiques. Cette découverte devra certainement être prise en compte au cours des prochains protocoles d'exposition à la fumée de cigarette et de plus amples recherches sur l'activation de SIRP α seront à considérer.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Cette étude avait pour but premier de caractériser les niveaux d'expression et le rôle des protéines SIRP α et CD47 dans la réponse immunitaire pulmonaire induite par la fumée de cigarette. Dans un deuxième temps, nous visions à investiguer l'impact d'une administration systémique d'un activateur de SIRP α sur la régulation de cette réponse immunitaire afin d'en évaluer son potentiel thérapeutique. Pour répondre à ces principaux objectifs, nous avons utilisé un système d'exposition à la fumée de cigarette de type « whole body exposure » qui permet l'exposition du corps entier des souris à la fumée de cigarette. Ce modèle induit les caractéristiques typiques d'une inflammation pulmonaire causée par le tabagisme, dont l'augmentation du nombre de neutrophiles et de la taille des macrophages alvéolaires dans le lavage broncho-alvéolaire. Nous avons également utilisé une molécule qui active la protéine SIRP α , le CD47-Fc, afin d'évaluer son potentiel thérapeutique sur la réponse inflammatoire induite par le tabagisme. Le potentiel de cette protéine de fusion a déjà été démontré dans quelques études notamment dans celle de l'asthme allergique où le CD47-Fc empêche la sensibilisation des souris à l'ovalbumine (Raymond et al., 2010). D'ailleurs, plusieurs autres recherches ont été réalisées dans l'optique d'explorer l'implication de l'axe SIRP α /CD47 dans le développement d'autres maladies telles que certains cancers (Zeng et al., 2016) et certaines maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde (Murata, Saito, et al., 2014). Toutefois, aucune étude n'avait encore investigué le rôle de cet axe dans la réponse immunitaire pulmonaire induite par la fumée de cigarette.

À ce jour, le tabagisme est encore une pratique répandue qui ne cesse de faire des ravages. En effet, malgré la connaissance des effets nocifs de cette habitude meurtrière, plus d'un sixième de la population canadienne était toujours considéré comme des fumeurs actifs ou occasionnels en 2016 (Statistique Canada, 2017). Le développement de nouveaux traitements visant à réduire les manifestations causées par la fumée de cigarette demeure prioritaire compte tenu de toutes les maladies sévères que ce fléau peut engendrer. L'étude

des impacts du tabagisme, plus précisément des mécanismes moléculaires menant aux effets néfastes de celui-ci sur la santé pulmonaire, reste donc extrêmement pertinente.

L'idée de ce projet découle de résultats préliminaires générés par analyses bio-informatiques dans notre laboratoire qui a démontré que le gène *sirpα* est surexprimé dans le poumon en contexte tabagique. Nous nous sommes donc interrogés sur les niveaux pulmonaires d'ARNm de SIRPα et de CD47 chez des souris BALB/c suivant différentes durées d'exposition à la fumée de cigarette soit : deux semaines, huit semaines, 24 semaines ainsi que 24 semaines suivi d'une cessation tabagique de 60 jours. Ensuite, sachant que SIRPα est principalement retrouvée sur les cellules myéloïdes, nous nous sommes questionnés sur les niveaux d'expression membranaire de cette protéine chez les différentes populations cellulaires retrouvées dans le lavage broncho-alvéolaire et le tissu pulmonaire de souris exposées pendant quatre jours à la fumée de cigarette.

L'exposition à la fumée de cigarette module l'expression des gènes codant pour SIRPα et CD47.

Comme observé lors de nos analyses bio-informatiques préliminaires, nous avons confirmé que l'expression du gène *sirpα* augmente dans le poumon des souris fumeuses et ce, peu importe la durée d'exposition à la fumée de cigarette, alors que l'expression du gène *cd47* diminue en contexte tabagique. De plus, à la suite d'une cessation tabagique, la variation d'expression obtenue pour ces deux gènes perdure pendant au moins 60 jours. Ces résultats indiquent donc qu'une exposition à la fumée de cigarette, à court et à long terme, influence significativement l'expression de ces deux gènes.

Étant donné que les niveaux transcriptionnels et membranaires de SIRPα se comportent différemment, la comparaison entre les deux peut être discutée. Il faut d'abord considérer que les temps d'exposition à la fumée de cigarette n'étaient pas les mêmes dans les deux protocoles. En effet, l'analyse protéique des niveaux de SIRPα a été réalisée après une exposition aiguë de quatre jours, alors que les niveaux d'ARNm du gène *sirpα* ont été

investigués à la suite d'expositions chroniques, c'est-à-dire entre deux et 24 semaines d'exposition. Nous pouvons donc considérer la durée d'exposition comme une explication possible de la différence d'expression entre les deux protocoles. Ensuite, l'expression transcriptionnelle a également été explorée sur l'ensemble du tissu pulmonaire, donc sur plusieurs types cellulaires à la fois, contrairement aux niveaux protéiques qui ont été déterminés spécifiquement sur quelques populations cellulaires sélectionnées. Pour la suite, nous pourrions investiguer l'expression du gène *sirpα* dans le tissu pulmonaire ainsi que chez les macrophages alvéolaires des souris à la suite d'une exposition aiguë de quatre jours à la fumée de cigarette. Ainsi, nous pourrions davantage comparer les résultats obtenus à ceux analysés par cytométrie en flux. De plus, afin de documenter de façon plus approfondie l'expression de SIRPα, il pourrait être intéressant d'évaluer les niveaux protéiques dans le tissu pulmonaire par Western blot.

L'exposition à la fumée de cigarette module les niveaux protéiques de SIRPα chez différents types cellulaires retrouvés dans le poumon et le lavage broncho-alvéolaire.

Nous avons d'abord pensé que la proportion de cellules myéloïdes exprimant SIRPα serait plus élevée chez les souris exposées à la fumée de cigarette que chez les souris non fumeuses et ce, autant dans le tissu pulmonaire que dans le lavage broncho-alvéolaire. Cette hypothèse a été émise lorsque nous avons constaté l'augmentation de l'expression du gène *sirpα* dans le poumon de souris fumeuses. Toutefois, les résultats obtenus suggèrent une réponse beaucoup plus complexe. En effet, les résultats démontrent que le nombre de macrophages alvéolaires F4/80⁻ ou F4/80⁺, de neutrophiles et de cellules dendritiques exprimant SIRPα diminue chez les souris fumeuses. Néanmoins, une certaine proportion de ces populations cellulaires exprime toujours la protéine SIRPα et ces cellules le font à une plus forte intensité que chez les souris non fumeuses. Il est donc primordial de mieux comprendre comment l'exposition à la fumée de cigarette induit un tel changement dans les populations myéloïdes qui expriment SIRPα. Peu d'études se sont concentrées sur la caractérisation de la protéine SIRPα chez les neutrophiles et les cellules dendritiques comparativement aux macrophages alvéolaires. Nous avons donc priorisé notre recherche sur

ce type cellulaire, considérant également qu'ils sont des joueurs majeurs dans l'initiation de l'inflammation pulmonaire induite par la fumée de cigarette (Morissette et al., 2015a) et dans la pathogenèse de la MPOC (Barnes, 2004).

Nous avons plus précisément investigué l'activation de SIRP α chez les macrophages. Une étude a démontré que SIRP α est rapidement régulée à la baisse en réponse au LPS. D'un autre côté, la déplétion de SIRP α chez des macrophages entraîne une hypersensibilité au LPS, engendrant ainsi une libération élevée de cytokines pro-inflammatoires (Kong et al., 2007). Les niveaux de base de SIRP α chez les macrophages pourraient représenter un seuil afin de maintenir l'homéostasie (Kong et al., 2007). Une autre étude concernant l'activation de SIRP α a dévoilé l'implication de certains micro-ARNs (miARN) dans la régulation post-transcriptionnelle de la synthèse de cette protéine et leur rôle dans la modulation des réponses inflammatoires des macrophages. Trois principaux miARNs impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de SIRP α ont été identifiés : miARN-17, miARN-20a et miARN-106a. Cette étude démontre que l'expression de ces miARNs est significativement réduite chez des cellules HL-60, des promyéloblastes, suivant une stimulation par différents agents de différenciation dont l'acide rétinoïque et le phorbol 12-myristate 13-acétate qui sont conçus pour induire la production de la protéine SIRP α . Par ailleurs, *in vivo*, ces miARNs jouent un rôle dans la régulation de l'infiltration des macrophages, alors que des essais *in vitro* démontrent que ces miARNs modulent la fonction phagocytaire et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des macrophages. En outre, une stimulation au LPS engendre une activation des macrophages en augmentant les niveaux de ces miARNs. Toutefois, elle conduit également à la réduction de SIRP α (Zhu et al., 2013). En somme, l'activation des macrophages par différents stimuli peut donc entraîner la diminution de l'expression de SIRP α et, par le fait même, moduler la réponse des cellules qui l'expriment.

Plusieurs perspectives à court terme sont prévues pour parvenir à identifier et comprendre davantage ce qui se produit concernant les niveaux d'expression protéique de SIRP α chez les différents types cellulaires en contexte tabagique. Une caractérisation plus approfondie des macrophages alvéolaires provenant de souris fumeuse sera premièrement

effectuée afin de déterminer si cette population est plus ou moins fonctionnelle en investiguant la libération de médiateurs pro-inflammatoires, dont les cytokines IL-1 α et TNF- α . Différentes façons peuvent être utilisées pour parvenir à ces fins. La première d'entre elles est simplement d'ajouter deux anticorps intracellulaires afin d'évaluer par cytométrie en flux la sécrétion d'IL-1 α et de TNF- α dans les cellules d'intérêt. Cependant, un tri cellulaire, principalement des macrophages alvéolaires SIRP α^+ des souris fumeuses, pourrait être fait pendant l'analyse de cytométrie en flux. Ces macrophages alvéolaires pourraient ensuite être mis en culture afin d'évaluer leur réponse de base ainsi qu'à la suite de différents stimuli pro-inflammatoires notamment au LPS et au POLY (I :C). Toutefois, il est possible que le nombre de cellules recueillies à la suite des analyses de cytométrie soit un facteur limitant. Or, au lieu de diviser les différents types cellulaires par cytométrie, une autre option s'offre à nous. Il existe une méthode utilisant des billes magnétiques qui permet de séparer les cellules d'intérêts des autres types cellulaires. Par exemple, pour le lavage broncho-alvéolaire, nous pourrions d'abord utiliser des anticorps anti-GR-1 et anti-CD3 sur les billes magnétiques afin d'enlever les neutrophiles et les lymphocytes, respectivement. Par la suite, nous pourrions séparer les macrophages alvéolaires SIRP α^+ de ceux qui n'expriment plus ou que très peu SIRP α , les remettre en culture et procéder à la caractérisation de leur réponse avec ou sans stimulus inflammatoire. D'ailleurs, puisque la caractérisation fonctionnelle des macrophages alvéolaires est réalisée dans le surnageant de culture pour cette procédure, il serait envisageable de lyser et d'extraire l'ARN de ces macrophages. De cette façon, nous pourrions investiguer davantage ce changement phénotypique en analysant l'expression de différents miARNs impliqués dans la modulation post-transcriptionnelle de SIRP α , notamment miARN-17, miARN-20a et miARN-106a (Zhu et al., 2013).

L'exposition à la fumée de cigarette altère la liaison du CD47-Fc sur plusieurs types cellulaires retrouvés dans l'environnement pulmonaire

Autant dans le tissu pulmonaire que dans le lavage broncho-alvéolaire, nous avons observé par cytométrie en flux une diminution drastique du nombre de cellules ayant la capacité de lier la protéine de fusion CD47-Fc en contexte tabagique. D'ailleurs, plusieurs

types cellulaires sont affectés, dont les macrophages alvéolaires F4/80⁺ et F4/80⁻, les monocytes/macrophages interstitiels, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Bien que les résultats obtenus concernant la faible liaison du CD47-Fc concordent avec la diminution du pourcentage de cellules exprimant SIRP α chez les souris fumeuses, ceci n'explique pas tout. La question qui demeure est la suivante : comment la fumée de cigarette peut affecter à ce point la liaison du CD47-Fc à la protéine SIRP α ?

Pour répondre à cette question, nous devons d'abord nous interroger sur la localisation de SIRP α . Nous savons que SIRP α est une protéine membranaire qui possède trois domaines extracellulaires, une courte portion transmembranaire ainsi qu'une queue cytoplasmique (Kong et al., 2007) et que l'interaction entre SIRP α et CD47 se fait par la portion IgV à l'extrémité NH₂ du domaine extracellulaire de SIRP α (Barclay & Van den Berg, 2014). Il est donc pertinent de déterminer si cette portion du domaine extracellulaire de SIRP α peut être endommagée par la fumée de cigarette ou si, pour une quelconque raison, cette protéine peut être délocalisée ou internalisée, comme il a été démontré pour la protéine membranaire « Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator » (CFTR) (Clunes et al., 2012).

D'autres pistes peuvent expliquer la faible liaison du CD47-Fc à SIRP α en contexte tabagique. L'inhalation de la fumée de cigarette entraîne une altération du surfactant pulmonaire causant une accumulation lipidique chez les macrophages alvéolaires et, par le fait même, une augmentation de la taille de ces cellules (Morissette et al., 2015a). Est-il possible que ce changement morphologique ait provoqué un changement conformationnel dans la structure de la protéine SIRP α qui réduirait ainsi sa capacité de liaison à son ligand CD47 ?

De plus, nous savons que dans l'environnement pulmonaire, les macrophages alvéolaires interagissent avec les protéines du surfactant pulmonaire SP-A et SP-D via SIRP α (Barclay & Van den Berg, 2014). SP-A et SP-D sont surtout des protéines impliquées dans la défense locale de l'hôte contre des pathogènes (Kolomaznik, Nova, & Calkovska, 2017).

Il est donc plausible que l'altération du surfactant pulmonaire entraîne une liaison accrue des macrophages alvéolaires aux protéines du surfactant pulmonaire et limite ainsi la liaison de SIRP α à CD47 et, par le fait même, à la protéine de fusion CD47-Fc. D'ailleurs, les neutrophiles ont aussi la capacité de lier SP-A et SP-D par le biais de SIRP α (Kolomaznik et al., 2017). Nous pouvons donc considérer la même hypothèse pour ce type cellulaire. Toutefois, le peu d'étude concernant les niveaux de SIRP α sur les autres types cellulaires combiné aux impacts du tabagisme sur ceux-ci peut être en soi une limite pour notre étude, car il n'est pas possible de comparer et d'expliquer toutes les données obtenues avec celles retrouvées dans la littérature.

D'un autre côté, les polymorphismes de la protéine SIRP α peuvent influencer les niveaux de liaison du CD47-Fc. L'étude de Dai et al. a démontré que la liaison du mCD47-Fc chez différentes souches de souris n'a pas la même affinité dépendamment de la souche de souris. En effet, les souches C57BL/6 et BALB/c auraient une plus faible affinité à lier cette protéine de fusion comparativement à d'autres types de souris dont la souche « *Non Obese diabetic* » (NOD) (Dai et al., 2017), couramment utilisée comme modèle de diabète de type I (Pearson, Wong, & Wen, 2016). Une investigation plus approfondie de l'interaction entre SIRP α et la protéine de fusion CD47-Fc sera certainement à explorer lors de prochaines études.

Impact d'une administration du CD47-Fc sur l'infiltration cellulaire et la libération de cytokines suivant une exposition à la fumée de cigarette

L'impact de l'administration du CD47-Fc sur l'inflammation pulmonaire a été investigué chez des souris exposées à la fumée de cigarette pendant quatre jours. Une réduction significative du nombre de neutrophiles dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses a été obtenue chez celles qui avaient reçu le traitement comparativement aux souris non traitées. Ce résultat concorde avec des données publiées dans le cadre d'une étude explorant l'impact du CD47-Fc dans un modèle d'asthme allergique sensibilisé à l'ovalbumine. En effet, une diminution du nombre d'éosinophiles, de neutrophiles et de

lymphocytes a été observée chez les souris asthmatiques ayant reçu le CD47-Fc (Raymond et al., 2010). Toutefois, la faible réduction du nombre de neutrophiles chez les souris fumeuses traitées nous surprend. Pour compléter nos résultats, un protocole dose-réponse impliquant différentes quantités de CD47-Fc permettrait de déterminer si la dose administrée était optimale.

De plus, nous avons également observé une diminution de la sécrétion d'IL-1 α et de TNF- α par les macrophages alvéolaires stimulés *in vitro* avec du LPS ou du POLY (I :C) provenant des souris fumeuses traitées au CD47-Fc. Un fait intéressant, sans être nécessairement surprenant, puisque dans l'étude du modèle d'asthme allergique, la libération d'IL-5 et d'IL-13 était diminuée dans le fluide du lavage broncho-alvéolaire des souris asthmatiques traitées (Raymond et al., 2010). D'ailleurs, l'analyse de la sécrétion d'autres cytokines telles que MCP-1 et IL-6 pourrait être réalisée afin de caractériser davantage la réponse des macrophages alvéolaires en contexte tabagique. En outre, l'investigation de la sécrétion des cytokines présentes dans le fluide du lavage broncho-alvéolaire des souris pourrait bonifier la caractérisation de l'impact du CD47-Fc sur la réponse inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette.

En résumé, dans le cadre de cette étude, nous avons pu démontrer que la fumée de cigarette affecte les niveaux pulmonaires d'ARNm et protéiques de SIRP α dans l'environnement pulmonaire. Aussi, nous avons pu déterminer que la liaison du CD47-Fc aux différents types cellulaires exprimant SIRP α présents dans le poumon et le lavage broncho-alvéolaire est altérée par la fumée de cigarette. Plusieurs hypothèses peuvent tenter d'expliquer ce changement dans l'expression de SIRP α et l'affinité de liaison du CD47-Fc. Toutefois, de plus amples recherches permettront d'investiguer davantage ce phénomène. En outre, nous avons aussi constaté que l'administration systémique du CD47-Fc diminue significativement le nombre de neutrophiles retrouvés dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses. Le potentiel thérapeutique de ce traitement sera déterminé lors d'expositions chroniques à la fumée de cigarette et lors d'infections par des pathogènes.

4.1. Forces et limites de l'étude

Cette étude possède de nombreuses forces. Une de celles-ci est la découverte d'un certain changement phénotypique induit par la fumée de cigarette dans certaines populations cellulaires lors de la caractérisation protéique de SIRP α dans le poumon et le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses. En effet, la diminution du pourcentage de macrophages alvéolaires, de neutrophiles et de cellules dendritiques exprimant SIRP α chez les souris fumeuses ainsi que l'augmentation de l'intensité d'expression de SIRP α sur la proportion de cellules qui l'expriment toujours étaient inattendues et nécessitent de plus amples recherches.

L'utilisation du système d'exposition à la fumée de cigarette est également l'une des forces de cette étude puisque celle-ci a déjà fait ses preuves dans plusieurs recherches (Morissette, Jobse, et al., 2014; Morissette et al., 2015a; Morissette, Shen, Thayaparan, & Stampfli, 2015b). Ce système est doté d'une pompe à vide qui permet l'aspiration de la fumée primaire de 24 cigarettes de recherche 3R4F reproduisant ainsi l'inhalation de fumée de cigarette que font les humains. Les caractérisations effectuées à partir de ce modèle sont réalistes et représentent bien le mélange complexe de substances chimiques inhalé par les fumeurs. Le système de type « whole-body exposure » comporte des avantages supplémentaires comparativement au système « nose-only » qui peut aussi être utilisé. Toutefois, ce dernier expose seulement le nez des souris à la fumée de cigarette et celles-ci sont davantage confinées (Gaschler et al., 2008; Leberl, Kratzer, & Taraseviciene-Stewart, 2013). Dans la cage d'exposition de type « whole body », les souris sont plus libres et respirent plus normalement. Nous pouvons également exposer jusqu'à 160 souris en même temps dans le même système d'exposition, ce qui nous permet d'avoir une grande quantité de souris par groupe et par protocole. En outre, les différents paramètres de ce système sont contrôlés par un logiciel et l'exécution de cette tâche est également supervisée par un membre qualifié du personnel. De ce fait, nous pouvons assurer la reproductibilité des différents protocoles d'exposition à la fumée de cigarette. De plus, l'analyse des comptes cellulaires dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses est un indicateur clé pour valider la fonctionnalité du protocole. En d'autres mots, l'augmentation du nombre de neutrophiles et

de la taille des macrophages alvéolaires sont des caractéristiques typiques retrouvées chez les souris exposées à la fumée de cigarette comparativement aux souris exposées à l'air ambiant. De cette façon, il est possible de valider la constance des protocoles d'exposition entre eux avant de poursuivre avec de plus amples analyses.

Une autre force de ce projet est la possibilité d'étudier l'impact du CD47-Fc *in vivo* grâce à un modèle animal. En effet, sans ces modèles, il ne serait pas possible d'étudier rigoureusement les mécanismes cellulaires et moléculaires qui mènent au développement de différentes maladies complexes ainsi que de développer de nouvelles approches thérapeutiques (Leberl et al., 2013). De façon générale, il n'est pas possible d'investiguer tous ces processus chez l'être humain, car on ne peut directement étudier le potentiel thérapeutique d'une molécule en phase clinique sans avoir préalablement testé son innocuité et sa toxicité chez des modèles animaux. En outre, le choix réfléchi du modèle animal demeure essentiel (Canada, 2016). De nos jours, ce sont les rongeurs qui sont les plus utilisés, dont les cobayes, les rats et les souris (Leberl et al., 2013). Dans notre étude, l'utilisation des souris comme modèle a été favorisée due à la facilité de leur manipulation, leur petite taille et particulièrement parce que face à la fumée de cigarette, elles ont des réponses et des fonctions biologiques similaires à l'humain (Morissette, Lamontagne, et al., 2014). Certains pourraient considérer l'utilisation de modèle animal comme une limite. Cependant, il ne faut pas oublier que les études chez ces animaux sont conçues pour démontrer une preuve de concept sans forcément simuler exactement ce qui se produit chez l'humain.

Cette étude comporte également quelques lacunes. D'une part, lors des analyses protéiques de SIRP α par cytométrie en flux, certains types cellulaires analysés provenaient possiblement de la circulation sanguine et non du tissu pulmonaire, puisque l'exposition à la fumée de cigarette entraîne une accumulation de cellules sanguines au poumon notamment des neutrophiles et des monocytes. Une perfusion transcardiaque avec du PBS aurait donc éliminé presque la totalité des cellules provenant du sang dans le poumon. Toutefois, même si dans notre étude ce fait n'a pas une grande incidence, il n'en demeure pas moins qu'il faut en être conscient.

D'autres parts, le choix de certains marqueurs utilisés pour établir les populations cellulaires en cytométrie en flux pourrait être vu comme non idéal par certains. Le choix de ceux-ci aurait donc pu être légèrement différemment et des marqueurs supplémentaires auraient pu être ajoutés afin d'étoffer davantage les différentes populations retrouvées dans l'environnement pulmonaire. Sachant que la majorité des cellules dendritiques $CD11b^+ CD103^-$ expriment $SIRP\alpha$ contrairement à celles $CD11b^- CD103^+$ (Raymond et al., 2009), il aurait été intéressant d'ajouter des anticorps ciblant $CD11b$ et $CD103$ afin de séparer plus spécifiquement ces sous-types de cellules dendritiques. De plus, l'utilisation du marqueur Siglec F, un marqueur plus spécifique pour les macrophages alvéolaires que F4/80, aurait pu être employé et ainsi nous aurions mieux ciblé la population de macrophages alvéolaires (Misharin, Morales-Nebreda, Mutlu, Budinger, & Perlman, 2013). Bien entendu, l'ajout de plusieurs marqueurs peut devenir une contrainte à l'étude, puisque le nombre de cellules en cytométrie en flux peut être en soi une limite.

Finalement, une autre limite de notre étude pourrait être la faible affinité de liaison du $CD47$ -Fc à la protéine $SIRP\alpha$ des souris BALB/c que nous avons utilisé. En effet, comme démontré dans l'étude Dai et al., la liaison du $CD47$ -Fc semble être meilleure pour certaines souches de souris que pour d'autres, dont les souris NOD (Dai et al., 2017). Cependant, dans notre cas, il ne serait pas pertinent de changer de souche de souris pour en utiliser d'autres qui sont moins communes et moins appropriées à notre étude.

En somme, les résultats obtenus au cours de cette étude méritent d'être poursuivis malgré certaines lacunes. De plus amples recherches permettront de caractériser davantage le rôle de l'axe $SIRP\alpha/CD47$ en contexte tabagique chronique. Ainsi, l'étude de ces protéines pourra éventuellement se tourner vers une cible thérapeutique.

4.2. Perspectives

Ce projet de recherche comporte aussi quelques perspectives à long terme en plus de celles qui seront réalisées à court terme. En effet, l'impact de l'administration systémique du CD47-Fc sur la réponse immunitaire pulmonaire lors d'infections et d'expositions chroniques à la fumée de cigarette sera investigué. En outre, nous aimerions transposer cette étude chez l'humain.

Tout d'abord, l'effet du traitement au CD47-Fc pourrait être davantage exploré comme outil thérapeutique dans le cadre d'infections ou comme approche préventive dans certains cas. À court terme, l'instillation intranasale de LPS ou de POLY (I:C) démontrera si le CD47-Fc a un impact sur la réponse immunitaire pulmonaire suivant une agression causée par des agents microbiens. Toutefois, afin d'obtenir une meilleure idée du potentiel de ce traitement, l'infection devrait éventuellement être faite en utilisant des bactéries vivantes telles que *Haemophilus influenzae*, une bactérie opportuniste, Gram négatif, reconnue comme agent causal d'exacerbation chez les patients atteints de MPOC (Wedzicha & Seemungal, 2007). De plus, cette bactérie est souvent utilisée dans des modèles précliniques d'exacerbation bactérienne induite par la fumée de cigarette (Nikola et al., 2014). Elle serait donc un bon choix pour nos expérimentations. Pour débiter l'exploration des impacts du CD47-Fc en tant qu'agent préventif, des protocoles d'exposition à la fumée de cigarette de 4 jours seront effectués en administrant quotidiennement le CD47-Fc de façon intrapéritonéale. Environ 16 à 18 heures avant l'euthanasie des souris, 10^6 bactéries seront distribuées au poumon de façon intranasale afin de permettre la propagation de l'infection. Par la suite, une investigation de la neutrophilie dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses traitées et infectées ainsi qu'une estimation de la charge bactérienne présente dans le tissu pulmonaire de ces mêmes souris seront réalisées afin d'évaluer la capacité de résolution de l'inflammation. Des protocoles d'exposition plus chronique à la fumée de cigarette seront ensuite considérés selon les résultats obtenus lors des protocoles d'exposition aiguë.

Pour évaluer le potentiel thérapeutique du CD47-Fc en contexte d'exacerbation, d'autres protocoles devront être accomplis en administrant le traitement après l'inoculation d'*Haemophilus influenzae*. Plus précisément, un protocole d'exposition à la fumée de cigarette de huit semaines pourra être réalisé et l'instillation intranasale de la bactérie pourra être faite quatre jours avant l'euthanasie des souris. Durant les jours suivants l'infection, le CD47-Fc sera administré quotidiennement de façon intrapéritonéale. L'accumulation de neutrophiles et la charge bactérienne restante dans le poumon seront deux paramètres cruciaux à analyser pour déterminer l'effet du traitement. De ce fait, le rôle de l'axe SIRP α /CD47 dans la réponse inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette combinée à une infection pourra être investigué.

Ensuite, l'impact d'une administration systémique du CD47-Fc pourrait être évalué sur une exposition chronique à la fumée de cigarette. Par exemple, considérant un protocole d'exposition de huit semaines, le CD47-Fc pourrait être administré trois ou cinq jours par semaine durant les quatre dernières semaines d'exposition. Par conséquent, nous pourrions vérifier si, à la suite d'une exposition chronique à la fumée de cigarette, une diminution de la neutrophilie est également observée. L'investigation de la réponse des macrophages alvéolaires sera aussi effectuée en dosant leur sécrétion d'IL-1 α et de TNF- α . De ce fait, nous verrons si le CD47-Fc a un potentiel thérapeutique suivant une exposition chronique à la fumée de cigarette.

Finalement, il est aussi possible d'envisager à plus long terme le potentiel de cette étude chez l'humain. Pour débiter, l'analyse des niveaux d'expression de différents gènes pourra être réalisée dans une cohorte que nous avons déjà : la cohorte COPDexpect. Cette cohorte contient 264 fumeurs dont certains étaient atteints d'emphysème. De cette façon, nous pourrions comparer l'expression des gènes codant pour SIRP α , CD47 et certaines cytokines (IL-1 α , IL-6, TNF- α et MMP-12) chez ces différents individus afin de déterminer s'il existe une certaine corrélation avec les données obtenues chez la souris. D'autres parts, il serait possible de différencier des macrophages pulmonaires dérivés des monocytes du sang de fumeurs ou encore d'utiliser leurs macrophages alvéolaires en effectuant un lavage broncho-

alvéolaire, puis de les cultiver *in vitro* avec une quantité de CD47-Fc afin d'évaluer leur réponse de base ou suivant une stimulation au LPS et au POLY (I:C). Ainsi, une comparaison entre la réponse des macrophages de fumeurs et celle des macrophages de souris fumeuses pourra être établie.

Rapport-Gratuit.com

CONCLUSION

Les travaux réalisés dans ce projet de recherche ont permis de répondre aux objectifs préalablement fixés. Cette étude avait pour but premier de caractériser l'axe SIRP α /CD47 au niveau pulmonaire dans un contexte tabagique. Plus précisément, ce projet consistait à explorer l'expression transcriptionnelle des gènes codant pour CD47 et SIRP α dans le poumon ainsi que les niveaux protéiques de SIRP α sur les différentes populations cellulaires retrouvées dans le tissu pulmonaire et le lavage broncho-alvéolaire. Deuxièmement, ce projet visait à investiguer l'impact de l'administration d'un activateur de SIRP α , le CD47-Fc, sur la réponse inflammatoire pulmonaire induite par la fumée de cigarette.

Nous avons pu démontrer que l'exposition à la fumée de cigarette module l'expression du gène *sirp α* à la hausse et l'expression du gène *cd47* à la baisse. Plus spécifiquement, nous avons pu déterminer les niveaux protéiques de SIRP α sur les différents types cellulaires présents dans le tissu pulmonaire et le lavage broncho-alvéolaire. Globalement, le pourcentage de cellules myéloïdes exprimant SIRP α diminue en contexte tabagique, alors que l'intensité d'expression de cette protéine augmente chez les cellules qui l'expriment toujours. En ce qui concerne les niveaux de liaison du CD47-Fc, les résultats suivent sensiblement le même patron que ceux portant sur l'expression de SIRP α . En d'autres termes, la fumée de cigarette altère la liaison de cette protéine de fusion aux types cellulaires exprimant SIRP α . Cependant, le faible pourcentage de liaison du CD47-Fc chez les souris fumeuses n'empêche pas totalement l'effet du traitement puisqu'une diminution de la neutrophilie est tout de même observée dans le lavage broncho-alvéolaire des souris fumeuses traitées. Toutefois, la faible amplitude de cet effet pourrait être expliquée par une liaison déficiente du CD47-Fc à SIRP α en contexte tabagique.

De plus amples études permettront de comprendre davantage comment la fumée de cigarette peut affecter les populations cellulaires qui expriment SIRP α ainsi que l'affinité de liaison à son ligand. De plus, le potentiel thérapeutique du CD47-Fc lors d'expositions

chroniques à la fumée de cigarette et lors d'infections bactériennes ou virales sera aussi déterminé.

BIBLIOGRAPHIE

- Akella, A., & Deshpande, S. B. (2013). Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders. *Indian J Exp Biol*, 51(1), 5-22.
- Arias, C. F., & Arias, C. F. (2017). How do red blood cells know when to die? *R Soc Open Sci*, 4(4), 160850. doi:10.1098/rsos.160850
- Arnson, Y., Shoenfeld, Y., & Amital, H. (2010). Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun*, 34(3), J258-265. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.003
- Association Pulmonaire. (2014). MPOC ; poussées actives. Retrieved from <https://www.poumon.ca/santé-pulmonaire/maladies-pulmonaires/mpoc/pouss es-actives>
- Association Pulmonaire. (2016). MPOC, Emphys me et Bronchite. Retrieved from <https://pq.poumon.ca/maladies/mpoc/>
- Baba, N., Van, V. Q., Wakahara, K., Rubio, M., Fortin, G., Panzini, B., . . . Sarfati, M. (2013). CD47 fusion protein targets CD172a+ cells in Crohn's disease and dampens the production of IL-1beta and TNF. *J Exp Med*, 210(6), 1251-1263. doi:10.1084/jem.20122037
- Barclay, A. N., & Brown, M. H. (2006). The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 6(6), 457-464. doi:10.1038/nri1859
- Barclay, A. N., & Van den Berg, T. K. (2014). The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol*, 32, 25-50. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120142
- Barnes, P. J. (2004). Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 50 Online Pub, OL627-637.
- Benjamin, R. M. (2011). Exposure to tobacco smoke causes immediate damage: a report of the Surgeon General. *Public Health Rep*, 126(2), 158-159. doi:10.1177/003335491112600202
- Bhalla, D. K., Hirata, F., Rishi, A. K., & Gairola, C. G. (2009). Cigarette smoke, inflammation, and lung injury: a mechanistic perspective. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 12(1), 45-64. doi:10.1080/10937400802545094
- Botelho, F. M., Bauer, C. M., Finch, D., Nikota, J. K., Zavitz, C. C., Kelly, A., . . . Stampfli, M. R. (2011). IL-1alpha/IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. *PLoS One*, 6(12), e28457. doi:10.1371/journal.pone.0028457
- Botelho, F. M., Nikota, J. K., Bauer, C. M., Morissette, M. C., Iwakura, Y., Kolbeck, R., . . . Stampfli, M. R. (2012). Cigarette smoke-induced accumulation of lung dendritic cells is interleukin-1alpha-dependent in mice. *Respir Res*, 13, 81. doi:10.1186/1465-9921-13-81
- Bourbeau, L.-P. B. a. J. (2002). L'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique : comment les différencier? *le clinicien*, 105-116.
- Brusselle, G. G., Joos, G. F., & Bracke, K. R. (2011). New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 378(9795), 1015-1026. doi:10.1016/S0140-6736(11)60988-4

- Canada, G. d. (2016). *S6(R1) : Évaluation au stade préclinique de la sécurité des produits pharmaceutiques issus de la biotechnologie*. Retrieved from <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/medicaments-produits-sante/medicaments/demandes-presentations/lignes-directrices/international-conference-harmonisation/innocuite/evaluation-stade-preclinique-securite-produits-pharmaceutiques-issus-biotechnologie.html>.
- Cant, C. A., & Ullrich, A. (2001). Signal regulation by family conspiracy. *Cell Mol Life Sci*, 58(1), 117-124. doi:10.1007/PL00000771
- Centers for Disease, C., Prevention, National Center for Chronic Disease, P., Health, P., Office on, S., & Health. (2010). Publications and Reports of the Surgeon General. In *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US).
- Chung, K. F., & Adcock, I. M. (2008). Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*, 31(6), 1334-1356. doi:10.1183/09031936.00018908
- Clunes, L. A., Davies, C. M., Coakley, R. D., Aleksandrov, A. A., Henderson, A. G., Zeman, K. L., . . . Tarran, R. (2012). Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration. *FASEB J*, 26(2), 533-545. doi:10.1096/fj.11-192377
- Colarusso, C., Terlizzi, M., Molino, A., Pinto, A., & Sorrentino, R. (2017). Role of the inflammasome in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Oncotarget*, 8(47), 81813-81824. doi:10.18632/oncotarget.17850
- Committee on the Public Health Implications of Raising the Minimum Age for Purchasing Tobacco, P., Board on Population, H., Public Health, P., & Institute of, M. (2015). In R. J. Bonnie, K. Stratton, & L. Y. Kwan (Eds.), *Public Health Implications of Raising the Minimum Age of Legal Access to Tobacco Products*. Washington (DC): National Academies Press (US)
- D'Hulst A, I., Vermaelen, K. Y., Brusselle, G. G., Joos, G. F., & Pauwels, R. A. (2005). Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J*, 26(2), 204-213. doi:10.1183/09031936.05.00095204
- Dai, H., Friday, A. J., Abou-Daya, K. I., Williams, A. L., Mortin-Toth, S., Nicotra, M. L., . . . Lakkis, F. G. (2017). Donor SIRPalpha polymorphism modulates the innate immune response to allogeneic grafts. *Sci Immunol*, 2(12). doi:10.1126/sciimmunol.aam6202
- de Vries, H. E., Hendriks, J. J., Honing, H., De Lavalette, C. R., van der Pol, S. M., Hooijberg, E., . . . van den Berg, T. K. (2002). Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol*, 168(11), 5832-5839.
- Decramer, M., Janssens, W., & Miravittles, M. (2012). Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 379(9823), 1341-1351. doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9
- Demirjian, L., Abboud, R. T., Li, H., & Duronio, V. (2006). Acute effect of cigarette smoke on TNF-alpha release by macrophages mediated through the erk1/2 pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1762(6), 592-597. doi:10.1016/j.bbadis.2006.04.004
- Dugas, V., Beauchamp, C., Chabot-Roy, G., Hillhouse, E. E., & Lesage, S. (2010). Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun*, 35(1), 23-32. doi:10.1016/j.jaut.2010.01.002

- Escudier, J.-F. G. a. F. (2018). Maladie pulmonaire obstructive chronique. Retrieved from <https://aqnp.ca/documentation/degeneratif/maladie-pulmonaire-obstructive-chronique>
- Gaschler, G. J., Zavitz, C. C., Bauer, C. M., Skrtic, M., Lindahl, M., Robbins, C. S., . . . Stampfli, M. R. (2008). Cigarette smoke exposure attenuates cytokine production by mouse alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38(2), 218-226. doi:10.1165/rcmb.2007-0053OC
- Gorczyński, R. M. (2012). CD200:CD200R-Mediated Regulation of Immunity. *ISRN Immunology*, 2012, 1-18. doi:10.5402/2012/682168
- Gouvernement Canada. (2011). *Le tabagisme et la maladie pulmonaire obstructive chronique*. Retrieved from <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/preoccupations-liees-sante/tabagisme/legislation/etiquetage-produits-tabac/tabagisme-maladie-pulmonaire-obstructive-chronique.html>.
- Greabu, M., Battino, M., Totan, A., Mohora, M., Mitrea, N., Totan, C., . . . Didilescu, A. (2007). Effect of gas phase and particulate phase of cigarette smoke on salivary antioxidants. What can be the role of vitamin C and pyridoxine? *Pharmacol Rep*, 59(5), 613-618.
- Han, X., Sterling, H., Chen, Y., Saginario, C., Brown, E. J., Frazier, W. A., . . . Vignery, A. (2000). CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation. *J Biol Chem*, 275(48), 37984-37992. doi:10.1074/jbc.M002334200
- Hatherley, D., Lea, S. M., Johnson, S., & Barclay, A. N. (2014). Polymorphisms in the human inhibitory signal-regulatory protein alpha do not affect binding to its ligand CD47. *J Biol Chem*, 289(14), 10024-10028. doi:10.1074/jbc.M114.550558
- Ho, J. M., Danska, J. S., & Wang, J. C. (2013). Targeting SIRPalpha in cancer. *Oncoimmunology*, 2(2), e23081. doi:10.4161/onci.23081
- Hogg, J. C. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 364(9435), 709-721. doi:10.1016/S0140-6736(04)16900-6
- Ide, K., Wang, H., Tahara, H., Liu, J., Wang, X., Asahara, T., . . . Ohdan, H. (2007). Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(12), 5062-5066. doi:10.1073/pnas.0609661104
- Ishikawa-Sekigami, T., Kaneko, Y., Okazawa, H., Tomizawa, T., Okajo, J., Saito, Y., . . . Nojima, Y. (2006). SHPS-1 promotes the survival of circulating erythrocytes through inhibition of phagocytosis by splenic macrophages. *Blood*, 107(1), 341-348. doi:10.1182/blood-2005-05-1896
- Janssen, W. J., McPhillips, K. A., Dickinson, M. G., Linderman, D. J., Morimoto, K., Xiao, Y. Q., . . . Gardai, S. J. (2008). Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(2), 158-167. doi:10.1164/rccm.200711-1661OC
- Kids, T. F. (2016). Global Epidemic Retrieved from <https://www.global.tobaccofreekids.org/problem/toll-global>
- Kolomaznik, M., Nova, Z., & Calkovska, A. (2017). Pulmonary surfactant and bacterial lipopolysaccharide: the interaction and its functional consequences. *Physiol Res*, 66(Supplementum 2), S147-S157.
- Kong, X. N., Yan, H. X., Chen, L., Dong, L. W., Yang, W., Liu, Q., . . . Wang, H. Y. (2007). LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein {alpha}

- contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med*, 204(11), 2719-2731. doi:10.1084/jem.20062611
- Latour, S., Tanaka, H., Demeure, C., Mateo, V., Rubio, M., Brown, E. J., . . . Sarfati, M. (2001). Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol*, 167(5), 2547-2554.
- Leberl, M., Kratzer, A., & Taraseviciene-Stewart, L. (2013). Tobacco smoke induced COPD/emphysema in the animal model-are we all on the same page? *Front Physiol*, 4, 91. doi:10.3389/fphys.2013.00091
- Lee, J., Taneja, V., & Vassallo, R. (2012). Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res*, 91(2), 142-149. doi:10.1177/0022034511421200
- Leopold, P. L., O'Mahony, M. J., Lian, X. J., Tilley, A. E., Harvey, B. G., & Crystal, R. G. (2009). Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS One*, 4(12), e8157. doi:10.1371/journal.pone.0008157
- Lim, D., Kim, W., Lee, C., Bae, H., & Kim, J. (2018). Macrophage Depletion Protects against Cigarette Smoke-Induced Inflammatory Response in the Mouse Colon and Lung. *Front Physiol*, 9, 47. doi:10.3389/fphys.2018.00047
- Liu, Y., Buhning, H. J., Zen, K., Burst, S. L., Schnell, F. J., Williams, I. R., & Parkos, C. A. (2002). Signal regulatory protein (SIRPalpha), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration. *J Biol Chem*, 277(12), 10028-10036. doi:10.1074/jbc.M109720200
- Lofroth, G. (1989). Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components. *Mutat Res*, 222(2), 73-80.
- MacNee, W. (2005). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2(4), 258-266; discussion 290-251. doi:10.1513/pats.200504-045SR
- Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. R., & Perlman, H. (2013). Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49(4), 503-510. doi:10.1165/rcmb.2013-0086MA
- Morissette, M. C., Gao, Y., Shen, P., Thayaparan, D., Berube, J. C., Pare, P. D., . . . Stampfli, M. R. (2016). Role of BAFF in pulmonary autoantibody responses induced by chronic cigarette smoke exposure in mice. *Physiol Rep*, 4(24). doi:10.14814/phy2.13057
- Morissette, M. C., Jobse, B. N., Thayaparan, D., Nikota, J. K., Shen, P., Labiris, N. R., . . . Stampfli, M. R. (2014). Persistence of pulmonary tertiary lymphoid tissues and anti-nuclear antibodies following cessation of cigarette smoke exposure. *Respir Res*, 15, 49. doi:10.1186/1465-9921-15-49
- Morissette, M. C., Lamontagne, M., Berube, J. C., Gaschler, G., Williams, A., Yauk, C., . . . Bosse, Y. (2014). Impact of cigarette smoke on the human and mouse lungs: a gene-expression comparison study. *PLoS One*, 9(3), e92498. doi:10.1371/journal.pone.0092498
- Morissette, M. C., Shen, P., Thayaparan, D., & Stampfli, M. R. (2015a). Disruption of pulmonary lipid homeostasis drives cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. *Eur Respir J*, 46(5), 1451-1460. doi:10.1183/09031936.00216914

- Morissette, M. C., Shen, P., Thayaparan, D., & Stampfli, M. R. (2015b). Impacts of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation on cigarette smoke-induced exacerbated response to bacteria. *Eur Respir J*, *45*(1), 191-200. doi:10.1183/09031936.00004314
- Morse, D., & Rosas, I. O. (2014). Tobacco smoke-induced lung fibrosis and emphysema. *Annu Rev Physiol*, *76*, 493-513. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170411
- Murata, Y., Kotani, T., Ohnishi, H., & Matozaki, T. (2014). The CD47-SIRPalpha signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J Biochem*, *155*(6), 335-344. doi:10.1093/jb/mvu017
- Murata, Y., Saito, Y., Kaneko, T., Kotani, T., Kaneko, Y., Ohnishi, H., & Matozaki, T. (2014). Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRPalpha signaling pathway. *Methods*, *65*(2), 254-259. doi:10.1016/j.ymeth.2013.09.016
- Nikota, J. K., Shen, P., Morissette, M. C., Fernandes, K., Roos, A., Chu, D. K., . . . Stampfli, M. R. (2014). Cigarette smoke primes the pulmonary environment to IL-1alpha/CXCR-2-dependent nontypeable *Haemophilus influenzae*-exacerbated neutrophilia in mice. *J Immunol*, *193*(6), 3134-3145. doi:10.4049/jimmunol.1302412
- Nizri, E., Irony-Tur-Sinai, M., Lory, O., Orr-Urtreger, A., Lavi, E., & Brenner, T. (2009). Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses. *J Immunol*, *183*(10), 6681-6688. doi:10.4049/jimmunol.0902212
- Oldenborg, P. A. (2013). CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematol*, *2013*, 614619. doi:10.1155/2013/614619
- OMS. (2018). Tabagisme Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/fr/>
- Ozlu, T., & Bulbul, Y. (2005). Smoking and lung cancer. *Tuberk Toraks*, *53*(2), 200-209.
- Pauwels, R. A., & Rabe, K. F. (2004). Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet*, *364*(9434), 613-620. doi:10.1016/S0140-6736(04)16855-4
- Pearson, J. A., Wong, F. S., & Wen, L. (2016). The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J Autoimmun*, *66*, 76-88. doi:10.1016/j.jaut.2015.08.019
- Proulx, L. I., Pare, G., & Bissonnette, E. Y. (2007). Alveolar macrophage cytotoxic activity is inhibited by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a carcinogenic component of cigarette smoke. *Cancer Immunol Immunother*, *56*(6), 831-838. doi:10.1007/s00262-006-0243-6
- Qiu, F., Liang, C. L., Liu, H., Zeng, Y. Q., Hou, S., Huang, S., . . . Dai, Z. (2017). Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget*, *8*(1), 268-284. doi:10.18632/oncotarget.13613
- Qu, C. K. (2002). Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochim Biophys Acta*, *1592*(3), 297-301.
- Québec, G. d. (2017). *Effets du tabagisme et de la fumée secondaire sur la santé*. Retrieved from <http://sante.gouv.qc.ca/problemes-de-sante/effets-du-tabagisme-et-de-la-fumee-secondaire-sur-la-sante/>.
- Raymond, M., Rubio, M., Fortin, G., Shalaby, K. H., Hammad, H., Lambrecht, B. N., & Sarfati, M. (2009). Selective control of SIRP-alpha-positive airway dendritic cell

- trafficking through CD47 is critical for the development of T(H)2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 124(6), 1333-1342 e1331.
doi:10.1016/j.jaci.2009.07.021
- Raymond, M., Van, V. Q., Rubio, M., Welzenbach, K., & Sarfati, M. (2010). Targeting SIRP-alpha protects from type 2-driven allergic airway inflammation. *Eur J Immunol*, 40(12), 3510-3518. doi:10.1002/eji.201040797
- Reardon, J. Z., Lareau, S. C., & ZuWallack, R. (2006). Functional status and quality of life in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med*, 119(10 Suppl 1), 32-37.
doi:10.1016/j.amjmed.2006.08.005
- Rivera, A., Fu, X., Tao, L., & Zhang, X. (2015). Expression of mouse CD47 on human cancer cells profoundly increases tumor metastasis in murine models. *BMC Cancer*, 15, 964. doi:10.1186/s12885-015-1980-8
- Rodgman, A. (1992). Environmental tobacco smoke. *Regul Toxicol Pharmacol*, 16(3), 223-244.
- Rom, O., Avezov, K., Aizenbud, D., & Reznick, A. Z. (2013). Cigarette smoking and inflammation revisited. *Respir Physiol Neurobiol*, 187(1), 5-10.
doi:10.1016/j.resp.2013.01.013
- Saetta, M., Di Stefano, A., Maestrelli, P., Turato, G., Ruggieri, M. P., Roggeri, A., . . . Fabbri, L. M. (1994). Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*, 150(6 Pt 1), 1646-1652.
doi:10.1164/ajrccm.150.6.7952628
- Scott, J. E. (2004). The pulmonary surfactant: impact of tobacco smoke and related compounds on surfactant and lung development. *Tob Induc Dis*, 2(1), 3-25.
doi:10.1186/1617-9625-2-1-3
- Stapleton, M., Howard-Thompson, A., George, C., Hoover, R. M., & Self, T. H. (2011). Smoking and asthma. *J Am Board Fam Med*, 24(3), 313-322.
doi:10.3122/jabfm.2011.03.100180
- Statistique Canada. (2017). *Tabagisme*. Retrieved from <https://www.statcan.gc.ca/pub/82-625-x/2017001/article/54864-fra.htm>.
- Takenaka, K., Prasolava, T. K., Wang, J. C., Mortin-Toth, S. M., Khalouei, S., Gan, O. I., . . . Danska, J. S. (2007). Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 8(12), 1313-1323. doi:10.1038/ni1527
- Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., van Benthem, J., Wester, P., & Opperhuizen, A. (2011). Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health*, 8(2), 613-628. doi:10.3390/ijerph8020613
- Timms, J. F., Carlberg, K., Gu, H., Chen, H., Kamatkar, S., Nadler, M. J., . . . Neel, B. G. (1998). Identification of major binding proteins and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages. *Mol Cell Biol*, 18(7), 3838-3850.
- UniProt. (1986). UniProtKB - P01012 (OVAL_CHICK). Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprot/P01012>
- van Beek, E. M., Cochrane, F., Barclay, A. N., & van den Berg, T. K. (2005). Signal regulatory proteins in the immune system. *J Immunol*, 175(12), 7781-7787.
- van der Vaart, H., Postma, D. S., Timens, W., & ten Hacken, N. H. (2004). Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, 59(8), 713-721. doi:10.1136/thx.2003.012468

- van Nieuwenhuijze, A., Koenders, M., Roeleveld, D., Sleeman, M. A., van den Berg, W., & Wicks, I. P. (2013). GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Mol Immunol*, 56(4), 675-682. doi:10.1016/j.molimm.2013.05.002
- Vassallo, R., & Ryu, J. H. (2012). Smoking-related interstitial lung diseases. *Clin Chest Med*, 33(1), 165-178. doi:10.1016/j.ccm.2011.11.004
- Vignery, A. (2005). [Macrophage fusion: are somatic and cancer cells possible partners?]. *Med Sci (Paris)*, 21(12), 1070-1075. doi:10.1051/medsci/200521121070
- Wang, Y., Wang, H., Wang, S., Fu, Y., & Yang, Y. G. (2010). Survival and function of CD47-deficient thymic grafts in mice. *Xenotransplantation*, 17(2), 160-165. doi:10.1111/j.1399-3089.2010.00578.x
- Wedzicha, J. A., & Seemungal, T. A. (2007). COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet*, 370(9589), 786-796. doi:10.1016/S0140-6736(07)61382-8
- Xiao, Z. Y., Banan, B., Jia, J., Manning, P. T., Hiebsch, R. R., Gunasekaran, M., . . . Chapman, W. C. (2015). CD47 blockade reduces ischemia/reperfusion injury and improves survival in a rat liver transplantation model. *Liver Transpl*, 21(4), 468-477. doi:10.1002/lt.24059
- Xu, W., & Larbi, A. (2017). Immunity and Inflammation: From Jekyll to Hyde. *Exp Gerontol*. doi:10.1016/j.exger.2017.11.018
- Zen, K., Guo, Y., Bian, Z., Lv, Z., Zhu, D., Ohnishi, H., . . . Liu, Y. (2013). Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRPalpha cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state. *Nat Commun*, 4, 2436. doi:10.1038/ncomms3436
- Zeng, D., Sun, Q., Chen, A., Fan, J., Yang, X., Xu, L., . . . Sun, Z. (2016). A fully human anti-CD47 blocking antibody with therapeutic potential for cancer. *Oncotarget*, 7(50), 83040-83050. doi:10.18632/oncotarget.13349
- Zhu, D., Pan, C., Li, L., Bian, Z., Lv, Z., Shi, L., . . . Zen, K. (2013). MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein alpha. *J Allergy Clin Immunol*, 132(2), 426-436 e428. doi:10.1016/j.jaci.2013.02.005
- Zoz, D. F., Lawson, W. E., & Blackwell, T. S. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis: a disorder of epithelial cell dysfunction. *Am J Med Sci*, 341(6), 435-438. doi:10.1097/MAJ.0b013e31821a9d8e

ANNEXE

Tableau I. Caractéristiques des amorces utilisées lors des analyses de qPCR.

Analyse	Gène cible	Amorces et sondes	Séquence en nucléotides (5'-3')	Température d'hybridation
qPCR	<i>cd47</i>	Forward	TCA CTT CCC TTC ACC TAT TCC TA	57°C
		Reverse	GCT CTA GCA GAA CTA CTT GGA TT	
	<i>hprt</i>	Forward	AGC AGG TCA GCA AAG AAC T	57°C
		Reverse	CCT CAT GGA CTG ATT ATG GAC A	
	<i>rplp0</i>	Forward	ATC ACA GAG CAG GCC CTG CA	56°C
		Reverse	CAC CGA GGC AAC AGT TGG GT	
	<i>sirpa</i>	Forward	TCA TTT GTG TCC TGG ATC TGG	57°C
		Reverse	GTG CTT TGC TCG TAG TCC TG	

Tableau II. Caractéristiques des anticorps utilisés lors des analyses de cytométrie en flux.

Anticorps	Clone	Hôte/anti-	Fluorochrome
Anti-CD11c	N418	Hamster anti-souris	PE
Anti-CD326	G8.8	Rat anti-souris	PERCP/Cy5.5
Anti-CD45.2	104	Souris anti-souris	PE-Cy7
Anti-CMH II	M5/114.15.2	Rat anti-souris	PB
Anti-F4/80	BM8	Rat anti-souris	APC-Cy7
Anti-GR-1	RB6-8C5	Rat anti-souris	FITC
Anti-IgG Fc	HP6017	Souris anti-humain	APC
Anti-SIRP α	P84	Rat anti-souris	BV711